

**Entwicklung neuer Konzepte für die
festphasenunterstützte Kohlenhydratchemie
und deren
Anwendung in der Parallelsynthese
von Oligosacchariden und Glykokonjugaten**

DISSERTATION

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2005

vorgelegt von

JÖRG BAUER

Tag der mündlichen Prüfung:

Freitag, 19. August 2005

Dekan:

Prof. Dr. Stefan Laufer

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Jörg Rademann, FMP Berlin

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Günther Jung, Universität Tübingen

3. Berichterstatter:

Prof. Dr. Horst Kunz, Universität Mainz

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Jörg Rademann

im Arbeitskreis von

Herrn Prof. Dr. Günther Jung

in der Zeit von Oktober 2000 bis Juni 2005 am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn PROF. DR. JÖRG RADEMANN danke ich sehr für die intensive Betreuung, für die interessante Aufgabenstellung und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.

Herrn PROF. DR. GÜNTHER JUNG danke ich sehr für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, für die Freiheit bei der Bearbeitung des Themas und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.

Dank

Dank gebührt meinen Weggefährten DR. MICHAEL BARTH, DR. STEFFEN WEIK und DR. UDO MARQUARDT für ihre Freundschaft, ihre Anregungen und die vielen heiteren Momente innerhalb und außerhalb unseres „*Wir können alles*“-Labors 10M31.

Für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und für zahllose Diskussionen danke ich allen gegenwärtigen und ehemaligen Kollegen und Kolleginnen.

GRAEME NICHOLSON danke ich sehr für seinen wertvollen Rat sowie für die Durchführung von GC-MS- und FT-ICR-MS Messungen. MANFRED STEIMANN danke ich für seine tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung katalytischer Hydrierungen in Autoklaven. PAUL SCHULER und BERTHOLD MAIER danke ich für die Durchführung von NMR-Experimenten. ANTJE FRICKENSCHMIDT und THOMAS ANDRÉ danke ich für MALDI-TOF-Messungen. WOLFGANG BOCK danke ich für die Durchführung der Elementaranalysen.

PROF. DR. ZÄHRINGER, PROF. DR. BRANDENBURG und PD DR. HEINE sowie ihren Mitarbeitern vom FORSCHUNGSZENTRUM BORSTEL gilt mein herzlicher Dank für die interessante Kooperation und die freundschaftliche Zusammenarbeit während meines dortigen Forschungsaufenthaltes, dessen Ergebnisse diese Arbeit bereichert und abgerundet haben.

Meinen fleißigen Praktikantinnen NICOLE SESSLER und INES WEIBINGER sei ebenfalls gedankt, nicht nur für die vielen durchgeführten Säulenchromatographien, sondern auch für all die Leckerlis, die den Laboralltag ungemein versüßten.

Meinem Onkel JOSEF ZIKA danke ich für die virtuose Anfertigung der HASP-Halterungen.

Sehr herzlich danke ich Frau URSULA BECKER, die sich stets mit großem Engagement um alle organisatorischen Belange gekümmert hat.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danke ich für die Finanzierung eines Stipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs „*Chemie in Interphasen*“.

EBERHARD FORNER danke ich sehr für die Mühe, diese Arbeit Korrektur zu lesen.

Zuguterletzt gilt MEINEN ELTERN besonderer Dank für die fortwährende Unterstützung während des Studiums und der Doktorandenjahre.

*„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an
interessant zu werden, wo sie aufhört.“*

Justus Freiherr von Liebig, 1803 - 1873

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------------|
| <u>INHALTSVERZEICHNIS.....</u> | <u>I</u> |
| <u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u> | <u>V</u> |
| <u>1 EINLEITUNG.....</u> | <u>1</u> |
| <u>2 AUFGABENSTELLUNG.....</u> | <u>5</u> |
| <u>3 ALLGEMEINER TEIL</u> | <u>6</u> |
| 3.1 MODERNE GLYKOSYLIERUNGSMETHODEN..... | 6 |
| 3.1.1 ELEKTROPHILE KOHLENHYDRAT-DONOREN UND IHRE AKTIVIERUNG..... | 6 |
| 3.1.2 DAS „LATENT/AKTIV“-KONZEPT: MASKIERTE GLYKOSYL-DONOREN | 10 |
| 3.1.3 NUKLEOPHILE GLYKOSYLIERUNG DURCH O-ALKYLIERUNG..... | 11 |
| 3.1.4 INTRAMOLEKULARE GLYKOSYLIERUNG | 12 |
| 3.1.5 ORTHOGONALE GLYKOSYLIERUNG | 13 |
| 3.1.6 DIE FEINABSTIMMUNG DER DONOR-REAKTIVITÄT | 14 |
| 3.1.7 EINTOPF-GLYKOSYLIERUNGEN UND OPTIMER | 16 |
| 3.1.8 ENZYMATISCHE GLYKOSYLIERUNG: <i>SUPERBEADS</i> UND <i>SUPERBUGS</i> | 17 |
| 3.2 FESTPHASENSTRATEGIEN DER GLYKOCHEMIE | 19 |
| 3.2.1 DAS PRINZIP DER FESTPHASENSYNTHESE | 19 |
| 3.2.2 TRÄGER UND LINKER DER ZUCKERCHEMIE..... | 22 |
| 3.2.3 STRATEGIEN DER FESTPHASEN-OLIGOSACCHARIDSYNTHESE..... | 25 |
| 3.2.4 POLYMERUNTERSTÜTZTE GLYKOSYLIERUNGEN..... | 26 |
| 3.2.5 METHODEN ZUR MINIMIERUNG VON OLIGOSACCHARID-FEHLSEQUENZEN..... | 27 |
| 3.2.6 PHASENWECHSEL ALS TRENNUNGSSTRATEGIE DER PARALLELSYNTHESE | 30 |
| 3.3 DIE ANGEBORENE IMMUNITÄT | 32 |
| 3.3.1 ARCHITEKTUR BAKTERIELLER ZELLWÄNDE | 33 |
| 3.3.2 TOLL-LIKE REZEPTOREN UND IHRE LIGANDEN | 35 |
| 3.3.3 DIE TOLL-LIKE REZEPTOR-ABHÄNGIGE SIGNALTRANSDUKTION..... | 38 |
| 3.4 RHAMNOLIPIDE | 40 |
| 3.4.1 NOMENKLATUR UND CHARAKTERISTIKA VON RHAMNOLIPIDEN..... | 40 |
| 3.4.2 MIKROBIELLE GEWINNUNG VON RHAMNOLIPIDEN..... | 42 |
| 3.4.3 BIOSYNTHESEWEG VON RHAMNOLIPIDEN..... | 44 |
| 3.4.4 IMMUNOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON RHAMNOLIPIDEN..... | 45 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4 | ERGEBNISSE | 48 |
| 4.1 | SYNTHESEKONZIPIERUNG | 48 |
| 4.2 | DARSTELLUNG GEEIGNETER RHAMNOSEDONOREN | 49 |
| 4.2.1 | BUTAN-2,3-DIACETAL (BDA) ALS 3,4-SELEKTIVE RHA-SCHUTZGRUPPE | 49 |
| 4.2.2 | PHENOXYACETAT (POAC) ALS GEEIGNETE ORTHOGONALE 2-HYDROXY-SCHUTZGRUPPE DES DONORS | 50 |
| 4.2.3 | BDA- UND POAC-GESCHÜTZTER DIRHAMNOSYL-DONOR | 52 |
| 4.3 | DARSTELLUNG ENANTIOMERENREINER LIPIDBAUSTEINE | 55 |
| 4.3.1 | SYNTHESE UND GC-MS-ANALYTIK LANGKETTIGER β -KETOESTER | 55 |
| 4.3.2 | ENANTIOSELEKTIVE HYDRIERUNG VON LANGKETTIGEN β -KETOESTERN | 58 |
| 4.3.3 | BESTIMMUNG DER ENANTIOMERENREINHEIT DER (<i>R/S</i>)-3-HYDROXYESTER | 60 |
| 4.3.4 | DARSTELLUNG LANGKETTIGER (<i>R</i>)- BZW. (<i>S</i>)-3- <i>O</i> -TES-FETTSÄUREN | 63 |
| 4.3.5 | SYNTHESE DES REDUKTIV SPALTBAREN TRICHLORETHYLESTER-BAUSTEINES | 65 |
| 4.3.6 | SYNTHESE EINES HYDROGENOLYTISCH SPALTBAREN BENZYLESTER-LIPIDES | 66 |
| 4.3.7 | DARSTELLUNG EINES LIPIDBAUSTEINES FÜR RHAMNOLIPID-ALKOHOLE | 67 |
| 4.4 | DAS TRIMELLITSÄUREANHYDRID-LINKERSYSTEM - TAL | 69 |
| 4.4.1 | DARSTELLUNG VON POLYMERGEBUNDENEM PHTHALANHYDRID | 70 |
| 4.4.2 | METHODEN DER SUBSTRAT-IMMOBILISIERUNG AUF TAL-HARZ | 71 |
| 4.4.3 | METHODEN DER PRODUKTFREISETZUNG VOM TAL-HARZ | 74 |
| 4.4.4 | STABILITÄTSPROFIL DES POLYSTYROL-GEBUNDENEN TAL-LINKERS | 78 |
| 4.4.5 | SYNTHESE VON AMINO-GLYKOKONJUGATEN AUF TAL-HARZ | 79 |
| 4.4.6 | DIE STABILITÄT VON PS UNTER LEWIS-SAUREN BEDINGUNGEN | 83 |
| 4.5 | HASP – EINE NEUE STRATEGIE DER PARALLELSYNTHESE | 85 |
| 4.5.1 | VORVERSUCHE ZUR ERMITTLUNG GEEIGNETER BEDINGUNGEN FÜR DIE REVERSIBLE UND QUANTITATIVE LIPID-IMMOBILISIERUNG AUF RP-18-SILICA | 86 |
| 4.5.2 | DARSTELLUNG DES BIS- <i>N</i> -OCTADECYL HASP-ANKERS | 88 |
| 4.5.3 | HYDROXYBENZYL FUNKTIONALISIERUNG DES HASP-ANKERS | 89 |
| 4.5.4 | DURCHFÜHRUNG VON HASP-SYNTHESEN UND VERWENDETE GERÄTE | 91 |
| 4.6 | HASP-SYNTHESE EINES PENTASACCHARIDES | 96 |
| 4.6.1 | AUFBAU DES OLIGOSACCHARIDGERÜSTES | 96 |
| 4.6.2 | REAKTIONSMONITORING WÄHREND DER HASP-SYNTHESEN | 98 |
| 4.6.3 | ENTFERNUNG DES HASP-TAGS UND BEWERTUNG DER SYNTHESE | 100 |
| 4.7 | HASP-SYNTHESE EINER RHAMNOLIPIDBIBLIOTHEK | 102 |
| 4.7.1 | PARALLELE HASP-SYNTHESE GEEIGNETER DI- UND TRILIPIDMETHYLESTER | 102 |
| 4.7.2 | DARSTELLUNG VON RHAMNOSYL-LIPIDEN | 106 |
| 4.7.3 | ABSPALTUNG DER PHENOXYACETAT-SCHUTZGRUPPE | 108 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.7.4 | ZWEIT- UND DRITTLIGLYKOSYLIERUNG VON BDA-RHAMNOLIPIDEN..... | 111 |
| 4.7.5 | ABSPALTUNG DER BDA-SCHUTZGRUPPE..... | 113 |
| 4.7.6 | METHYLESTER ALS TERMINALE RHAMNOLIPID-SCHUTZGRUPPE – VERSUCHE DER SELEKTIVEN CHEMISCHEN ENTFERNUNG | 116 |
| 4.7.7 | 2,2,2-TRICHLORETHYLESTER ALS TERMINALE RHAMNOLIPID-SCHUTZGRUPPE..... | 119 |
| 4.7.8 | METHYLESTER ALS TERMINALE RHAMNOLIPID-SCHUTZGRUPPE – ENZYMATISCHE ESTERHYDROLYSE | 122 |
| 4.7.9 | BENZYLESTER ALS TERMINALE RHAMNOLIPID-SCHUTZGRUPPE | 129 |
| 4.7.10 | DARSTELLUNG VON RHAMNOLIPIDALKOHOL-VARIANTEN | 132 |
| 4.7.11 | NMR- UND MS-CHARAKTERISIERUNG AMPHIPHILER RHAMNOLIPIDE..... | 137 |
| 4.8 | IMMUNOLOGISCHE UND BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG SYNTHETISCHER RHAMNOLIPIDE | 144 |
| 4.8.1 | STIMULATION MONONUKLEÄRER ZELLEN: TNF- α -ASSAY..... | 144 |
| 4.8.2 | STIMULATION MONONUKLEÄRER ZELLEN: O ₂ -CHEMILUMINESZENZ-ASSAY..... | 147 |
| 4.8.3 | GEL-FLÜSSIGKRISTALLINES PHASENVERHALTEN DER RHAMNOLIPIDE..... | 149 |
| 4.8.4 | FRET ZUR BEWERTUNG DER INKORPORATION VON RHAMNOLIPIDEN IN LIPOSOMENMEMBRANEN | 151 |
| 4.8.5 | SCHLUßBETRACHTUNG DER ERGEBNISSE DER RHAMNOLIPID-TESTUNG..... | 153 |
| 5 | <u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u> | 154 |
| 6 | <u>EXPERIMENTELLER TEIL</u> | 157 |
| 6.1 | CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL..... | 157 |
| 6.2 | GERÄTE UND ANALYTISCHE METHODEN | 157 |
| 6.2.1 | DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE (DC)..... | 157 |
| 6.2.2 | KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR) | 158 |
| 6.2.3 | POLARIMETRIE | 158 |
| 6.2.4 | GC-EI-MS ANALYTIK | 158 |
| 6.2.5 | FT-ICR-MASSENSPEKTROMETRIE | 158 |
| 6.2.6 | ES-MASSENSPEKTROMETRIE..... | 158 |
| 6.2.7 | MALDI-MASSENSPEKTROMETRIE | 159 |
| 6.2.8 | ANALYTISCHE HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC)..... | 159 |
| 6.2.9 | INFRAROTSPEKTROSKOPIE (FT-ATR-IR) | 159 |
| 6.2.10 | UV/VIS-SPEKTROSKOPIE | 159 |
| 6.2.11 | MIKROWELLENUNTERSTÜTZTE SYNTHESSEN | 160 |
| 6.2.12 | CHLORANILTEST | 160 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 6.2.13 | KAISERTEST | 160 |
| 6.2.14 | UV-SPEKTROSKOPISCHE ERMITTLUNG VON HARZBELADUNGEN | 161 |
| 6.3 | SYNTHESEVORSCHRIFTEN | 162 |
| 6.3.1 | SYNTHESEN VON KOHLENHYDRATBAUSTEINEN | 162 |
| 6.3.2 | SYNTHESEN VON LIPIDBAUSTEINEN | 168 |
| 6.3.3 | FESTPHASENSYNTHESEN AM TAL-HARZ | 177 |
| 6.3.4 | SYNTHESE DES HASP-BENZYLANKERS..... | 182 |
| 6.3.5 | HASP-SYNTHESEN VON OLIGORHAMNANEN | 186 |
| 6.3.6 | HASP-SYNTHESEN VON RHAMNOLIPIDEN | 193 |
| 6.3.7 | RÜCKGEWINNUNG VON RP-18 KIESELGEL..... | 202 |
| 7 | <u>ANHANG.....</u> | 203 |
| 8 | <u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u> | 210 |
| | <u>PUBLIKATIONSLISTE.....</u> | 220 |

Abkürzungsverzeichnis

Die Monosaccharid-Nomenklatur folgt den Empfehlungen der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur [*Pure Appl.Chem.* **1996**, 68, 1919-2008].

Für Aminosäuren wurde der Ein- oder Dreibuchstaben-Code der IUPAC-IUB-Kommission verwendet [*Eur.J.Biochem.* **1984**, 138, 9-37].

| | | | |
|-------|---|---------|---|
| A | Absorption | DCC | Dicyclohexylcarbodiimid |
| abs. | wasserfrei | DCM | Dichlormethan |
| BAL | Backbone Amide Linker | DDQ | Dichlordicyanoquinon |
| BDA | Butan-3,4-diacetal | DEPT | Distortionless Enhancement by Polarization Transfer |
| BINAP | 2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl | DIC | Diisopropylcarbodiimid |
| Boc | <i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl | DIPEA | Diisopropylethylamin |
| BSTFA | Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamide | DISPOKE | Dispiroketal |
| CDA | Cylohexan-1,2-diacetal | DMAP | 4-Dimethylamino-pyridin |
| CHCA | α -Cyano-4-hydroxymizsäure | DMF | Dimethylformamid |
| CHO | Chinese Hamster Ovary | DMSO | Dimethylsulfoxid |
| CLSR | Chirale Lanthanoid-Shift-Reagenzien | DMTSB | Dimethyl(thiomethyl)sulfonium-tetrafluoroborat |
| CMC | Kritische Micellare Konzentration | DMTST | Dimethylmethylthiosulfonium-triflat |
| CMPP | 5-(4'-Chlormethylphenyl)pentyl | DNS | Desoxyribonucleinsäure |
| COSY | Correlation Spectroscopy | dr | Diastereomerenverhältnis |
| Cp | Cyclopentadienyl | EC | Enzyme Commission |
| DAST | Diethylamino-schwefeltrifluorid | EDC | <i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethyl-carbodiimid•HCl |
| DBU | 1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-en | EE | Ethylacetat |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | | | |
|-----------|---|---------|--|
| EI | Elektronenstoßionisation | IR | Infrarot |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay | kat. | katalytisch |
| eq | Aquivalent | LAB | Lipoarabinomannan |
| ESI | Electrospray Ionisierung | LDA | Lithiumdiisopropylamid |
| FD | Felddesorbtion | LPS | Lipopolysaccharid |
| Fmoc | Fluorenylmethoxycarbonyl | LTA | Lipoteichonsäure |
| FRET | Fluoreszenz-(Förster)-Resonanz-Energie-Transfer | M | Molarität |
| FT-ATR-IR | Fourier-Transform-Attenuated-Total-Reflection-IR | MALDI | Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation |
| FT-ICR | Fourier-Transform-Ionencyclotron-Resonanz | MAS-NMR | magic-angle-spinning-NMR |
| GC | Gaschromatographie | MEM | Methoxy-ethoxymethyl |
| HASP | Hydrophobically Assisted Switching-Phase | MNC | mononukleäre Zellen |
| HATU | <i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat | Mox | Methoxylamin |
| HEPES | [4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure | MS | Massenspektrometrie |
| HIV | Humanes Immunschwäche Virus | MSNT | 1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Correlation | MTPA | α -Methoxy- α -trifluormethylphenylelessigsäure |
| HOBT | 1-Hydroxybenzotriazol | MW | Mikrowelle |
| HPLC | High-Performance-Liquid-Chromatographie | NBD-PE | <i>N</i> -(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-phosphatidyl-ethanolamin |
| HR | High Resolution | NBS | <i>N</i> -Bromsuccinimid |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Correlation | Ni-NTA | Nickel-Nitrilotriessigsäure |
| IAD | Intramolecular Aglykon Delivery | NIS | <i>N</i> -Iodsuccinimid |
| IDCP | Iodoniumdicollidinperchlorat | NMI | <i>N</i> -Methylimidazol |
| IL | Interleukin | NMR | Kernresonanzspektroskopie |
| | | PAMP | Pathogen Associated Molecular Pattern |

| | | | |
|-----------|---|--------|---|
| PASP | Polymer-Assisted-Solution-Phase | TBAF | Tetrabutylammoniumfluorid |
| PCR | Polymerase Chain Reaction | TBDMS | <i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl |
| PEG | Polyethylenglycol | TBME | <i>tert.</i> -Butylmethylether |
| PG | Protective Group | TBTU | <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- N,N,N',N'-tetramethyluronium- tetrafluoroborat |
| PGN | Peptidoglykan | TCE | 2,2,2-Trichlorethyl |
| pH | potentia hydrogenii (pH-Wert) | TEA | Triethylamin |
| Pht | Phtaloyl | TES | Triethylsilyl |
| PMB | Polymyxin B | TFA | Trifluoressigsäure |
| POAc | Phenoxyacetyl | TFAA | Trifluoressigsäureanhydrid |
| ppm | parts per million | TfOH | Trifluormethansulfonsäure |
| PRR | Pattern Recognition Receptor | THF | Tetrahydrofuran |
| PS | Polystyrol | TLR | Toll-like Rezeptor |
| rel. int. | Relative Intensität | TMSOTf | Trimethylsilyltrifluormethansul- fonsäure |
| Rh-PE | <i>N</i> -(Lissamin-rhodamin B- sulfonyl)-phosphatidyl- ethanolamin | TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| RL | Rhamnolipid | TOCSY | Total Correlation Spectroscopy |
| RLU | Relative Lichteinheit | TOF | time-of-flight |
| RP | Reversed-Phase | Tos-OH | Toluolsulfonsäure |
| RT | Raumtemperatur | TPA | 12-O-Tetradecanoylphorbol-13- acetat |
| SPE | Solid Phase Extraction | Troc | 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl |
| SPOS | Solid-Phase-Organic-Synthesis | UV | Ultraviolett |
| TAL | Trimellitsäureanhydrid-Linker | | |
| TBAB | Tetrabutylammoniumbromid | | |

1 Einleitung

Die Vielfalt des Lebens, das unerschöpfliche Spektrum der Biodiversität, jede physiologische und strukturelle Funktionalität unserer belebten Welt liegt letztendlich begründet im verschlungenen filigranen Zusammenwirken der drei großen Klassen von Biopolymeren. Abgesehen von Lipiden und den wenigen nicht-oligomeren Verbindungen sind es im wesentlichen die Biopolymere - die Proteine, Nukleotide und Kohlenhydrate - die das interagierende System bilden, welches durch ein elegant ausgeklügeltes Zusammenspiel, dem universellen Prinzip von selektiver Erkennung, in seiner Gesamtheit einen komplexen dynamischen Organismus definiert.

Im gleichen Maße, wie die Funktionen von Peptiden, Proteinen und DNS in der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts mehr und mehr verstanden wurden, entwickelten sich auch die Methoden und Strategien ihrer chemischen Synthese weiter. Insbesondere die Festphasensynthese^[1] von definierten Peptiden^[2;3] ab 1963 und Oligonukleotiden^[4;5] ab 1965 sowie die Kombinatorische Chemie^[6] trugen wesentlich dazu bei, daß mittels großer Verbindungsbibliotheken und entsprechend dimensionierter Hochdurchsatz-Screeningverfahren^[7;8] Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nukleotiden untereinander und zueinander identifiziert und verstanden werden konnten. Mittlerweile ist die kombinatorische Festphasensynthese von Peptiden, Proteinen, Oligonukleotiden und einer Vielzahl von Mimetika^[9] soweit verbessert worden, daß sie industriell offensiv eingesetzt und zur Entwicklung von Therapeutika genutzt wird - *Genomics* und *Proteomics* sind zu Synonymen geworden für milliardenschwere und wirtschaftlich wie wissenschaftlich brandaktuelle Geschäftsfelder der Gentechnologie, der Biotechnologie, der Biochemie, der Medizin- und Pharmaforschung, deren Entwicklung durch die Beiträge der Synthesechemie erst ermöglicht und schließlich katalysiert wurde.

Regelrecht vernachlässigt wurde während dieser Entwicklung das dritte Biopolymer, die Gruppe der Kohlenhydrate. Zwar wurden in Analogie zu den wegbereitenden Arbeiten der Peptid- und Nukleotidsynthesen wenige grundlegende Arbeiten zur Festphasenchemie von Zuckern^[10] zwischen 1971 und 1976 veröffentlicht, doch verfiel dieser Forschungszweig in eine jahrelang währende winterschlafähnliche Phase der Stagnation. Mit dem in den 1980er Jahren stark zunehmenden Verständnis der Funktion von Lektinen – Kohlenhydrate spezifisch bindende Proteine – wurde offenkundig, daß die Interaktion zwischen Zuckern und Proteinen eine weit größere als bisher zugeordnete Rolle in Organismen spielt^[11]. Auch

für DNS können Glykokonjugate hochspezifische Liganden sein wie beispielsweise die Familie der antitumoral wirkenden Calicheamicine.^[12] Das in vielen Lehrbüchern immer noch vorherrschende Paradigma, Zucker dienten lediglich als physiologische Energiespeicher und hochmolekulare Gerüstsubstanzen, begann zu bröckeln. Trotz dieser sich abzeichnenden Relevanz scheuten Chemiker noch bis zum Jahre 1992 den Bereich der Festphasensynthese von Zuckern. Erst dann entwickelte sich erneute Dynamik auf diesem Sektor, beflügelt durch die zwischenzeitlichen Weiterentwicklungen der Kohlenhydratchemie.^[13;14]

Seither wurden beachtliche Erfolge erzielt, obwohl die Meßlatte hier weit höher liegt als in der Nukleotid- und Peptidsynthese, schließlich müssen in jedem Monomer bis zu fünf Hydroxygruppen vergleichbarer Reaktivität selektiv chemisch adressiert und stereoselektiv zu einem verzweigten Oligomer verknüpft werden. Eine Strukturaufklärung wird durch den Umstand erschwert, daß komplexe Glykane, die *in vivo* nicht durch Ablesen eines Rasters, sondern von Enzymen gefertigt werden, daher nur als heterogenes Gemisch erhältlich sind und auch keine Amplifikationsmethode wie beispielsweise PCR verfügbar ist. Genauso existiert nach wie vor kein Königsweg für die Festphasensynthese von Oligoglykanen und Glykokonjugaten, da die immense strukturelle Vielfalt von Kohlenhydraten kein allgemeines Syntheseprinzip mehr zuläßt.

Eine theoretische Betrachtung der möglichen Tetrameren (Abb. 1-1) läßt erahnen, wie gewaltig besagte strukturelle Vielfalt ist, die mit Oligosacchariden erzielt werden kann.^[15] Bereits ein reduziertes Repertoire von nur fünfzehn Zucker-Monomeren übertrifft die Anzahl der möglichen unterschiedlichen Verknüpfungskombinationen und damit die Informationsdichte von Peptiden um ein Vielfaches. Sie ergibt sich nach^[16] für ein *n*-Oligosaccharid gemäß

$$(Permutationen) = [(Monomere) \cdot (Anomere) \cdot (Ringgrößen)]^n \cdot (Verknüpfungstellen).$$

Ein Tetrasaccharid aus den fünfzehn gängigen Zuckerbausteinen mit durchschnittlich vier Verknüpfungsstellen pro Zucker kann gemäß dieser Theorie auf ca. $2 \cdot 10^8$ verschiedene Weisen realisiert werden. Die Isomerpermutationen kleiner Oligosaccharide ($M < 1500$) sind für Trisaccharide um ca. drei bis vier Zehnerpotenzen größer als die der Tripeptide;

beim Hexameren liegen aufgrund der Verzweigungsmöglichkeiten ganze sieben Zehnerpotenzen dazwischen.

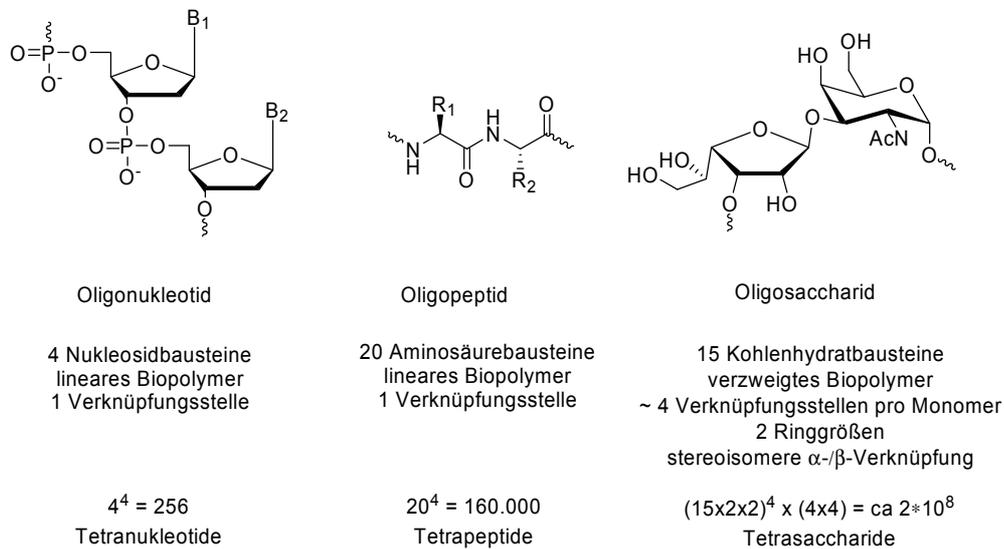


Abb. 1-1: Vergleich der Diversität von Biopolymeren am Beispiel des jeweiligen Tetrameren. Bei Oligosacchariden wurde von den in höheren Lebewesen weitläufig verbreiteten 15 Kohlenhydratbausteinen Ara, Fru, Fuc, Gal, GalNAc, GalN, Glc, GlcA, GlcNAc, IdoA, Kdo, Man, Neu5Ac, Rib und Xyl ausgegangen.

Tatsächlich wurde die Rolle der Zucker bei weitem unterschätzt, wie ein Blick in die neuere Literatur offenlegt: die Funktion der sogenannten Glycocalix, einer nanodimensionierten Zuckerschicht, die alle eukaryontischen Zellen auf sich tragen, spielt eine zentrale Rolle beispielsweise für die Angiogenese, für Entzündungsprozesse, für wesentliche Schritte der Immunantwort und für die Metastatisierung von Tumorzellen. Manche Zelloberflächen-Kohlenhydrate sind spezifische Marker für bestimmte Tumore, während andere Bindungsstellen für bakterielle und virale Pathogene darstellen oder biologische Information wie beispielsweise die Blutgruppe bestimmen.

Es ist eine naheliegende Konsequenz, daß mittlerweile auf diesem jungen Betätigungsfeld rege Aktivität herrscht und in zunehmendem Maße Zucker-Therapeutika entwickelt werden, die auf der Ebene der Glykocalix eingreifen.^[17] Heute existieren bereits moderne Glykokonjugat-Vakzinierungsstrategien^[18] nicht nur gegen beispielsweise Meningitis (*Omni-HIB*, GlaxoWellcome) oder Pneumokokken (*Prevnar*, Wyeth), sondern auch gegen Metastatisierung (Sialyl T_n-Antigen-Konjugat *Theratope*, Biomira, Phase III). Kohlenhydrat-Analoga, die die enzymatische Synthese von krankheitsassoziierten Kohlenhydraten inhi-

bieren, sind ein weiterer Ansatzpunkt. So reduziert beispielsweise der Mannosidase II inhibierende Aza-Zucker *Swainsonine* maligne Melanome um mehr als 98% (GlycoDesign, Phase II). *Celgosivir* (Micrologix, Phase II) ist ebenfalls ein Biosyntheseinhibitor, der das Glykosylierungsmuster von Zellen so ändert, daß die Bindung des humanen Immunschwäche Virus (HIV) an Lektine von T-Zellen unterbunden wird. Sialylsäuremimetika als Neuraminidase-Inhibitoren wie *Tamiflu* (Hoffman-La Roche) stellen eine neue Generation von Kohlenhydrat-basierten Grippemedikamenten dar.

Der ausgebrochene *Sugar rush*^[19] zieht eine zunehmende Zahl von Wissenschaftlern in seinen Bann. *Glycomics* - die Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen zum Verständnis der interzellulären Kommunikation und Signaltransduktion - verspricht nach *Genomics* und *Proteomics* zur dritten Dimension und zweifelsohne zur anspruchsvollsten Sparte der Molekularbiologie zu avancieren.^[20]

Einmal mehr sind Chemiker als Wegbereiter einer erfolgversprechenden, fundamentalen Entwicklung der *life sciences* aufgefordert.

2 Aufgabenstellung

Die vorliegende Dissertation beschreibt die erste Totalsynthese eines natürlich vorkommenden Rhamnolipides sowie einer Verbindungsbibliothek gezielter struktureller Variationen davon. Hierfür wurden zwei neue Konzepte der Kohlenhydrat-Festphasenchemie entwickelt: der TAL-Linker und das HASP-Konzept. Letzteres wurde für den Aufbau der anvisierten Glykolipidbibliothek eingesetzt und erwies sich auch als hocheffizientes Prinzip für die allgemeine Festphasensynthese von Oligosacchariden.

Rhamnolipide weisen außer ihrem Tensidcharakter eine Reihe weiterer hochinteressanter Eigenschaften auf: sie sind bakterizid, toxisch gegen Mykoplasmen und antiviral.^[21] Ein erst kürzlich aus *Burkholderia pseudomallei* isoliertes Rhamnolipid^[22] konnte am Forschungszentrum Borstel auch aus *Burkholderia plantarii* isoliert werden. Es konnte gezeigt werden, daß die Effizienz, mit der dieses Rhamnolipid über Cytokinfreisetzung eine Immunantwort in humanen Monocyten induziert, in etwa der bakterieller Endotoxine entspricht.^[23] Auffallend ist, daß trotz der völlig unterschiedlichen Strukturen das Rhamnolipid als Exotoxin eine Reihe von Charakteristika aufweist, die typisch für das Endotoxin Lipopolysaccharid sind. Allerdings wird die Interaktion dieses Rhamnolipides nicht über die Toll-like Rezeptoren TLR4 oder TLR2 vermittelt, die für die Zellaktivierung mittels LPS oder Lipopeptiden verantwortlich gemacht werden: Die niedermolekularen Rhamnolipide sind endotoxisch aktive Exotoxine mit bislang unbekanntem Wirkprinzip.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, eine Festphasenmethode zu entwerfen, die einen effizienten synthetischen Zugang zu den hochgradig amphiphilen Rhamnolipiden gewährt. Weiterhin soll deren Darstellung so konzipiert sein, daß der Zugang zu der angestrebten Verbindungsbibliothek durch Parallelsynthese erfolgen kann und die Zielverbindungen strategisch mittels repetitiver Synthese effizient aufgebaut werden können.

Mit den dargestellten Glykolipid-Variationen sollen quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ermittelt und biophysikalische Untersuchungen angestellt werden, um das Wirkprinzip der Rhamnolipide aufzuklären und Kenntnis über ihre immunologische Funktion zu erlangen.

3 Allgemeiner Teil

3.1 Moderne Glykosylierungsmethoden

Die zentrale Aufgabe der Zuckerchemie ist der gezielte stereoselektive Aufbau der glykosidischen Bindungen. Hierfür müssen die Monomere jeweils als Glykosyldonor und auch als Glykosylakzeptor fungieren können, so daß für jede Knüpfung eine individuell gewählte Schutzgruppenstrategie und die darauf ausgerichtete Wahl der Reaktivität vermittelnden Gruppen notwendig ist.

Für die erfolgreiche Durchführung der Glykosylierungsschritte ist jedoch nicht nur die Wahl der richtigen Synthesebausteine ausschlaggebend, sondern auch die Synthesestrategie, mittels der man die Bausteine verknüpft. Die Kapitel 3.1 und 3.2 konzentrieren sich auf diese Aspekte der modernen Oligosaccharid-Synthese.

3.1.1 Elektrophile Kohlenhydrat-Donoren und ihre Aktivierung

Die chemische Knüpfung der glykosidischen Bindung erfolgt heutzutage bevorzugt über die *Lewis*-saure Aktivierung der anomeren Schutzgruppe eines elektrophilen Glykosyldonors und die nukleophile Substitution der aktivierten Abgangsgruppe durch eine freie Hydroxygruppe des Glykosylakzeptors.^[24]

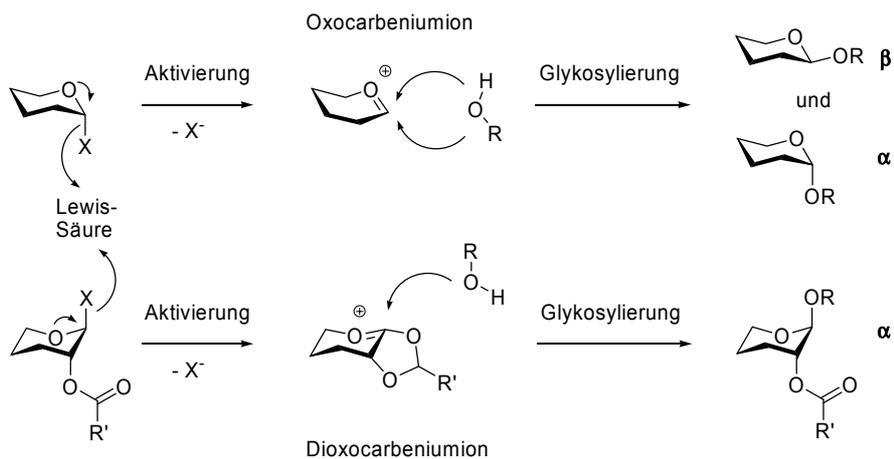
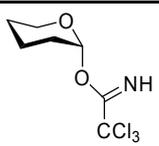
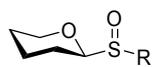
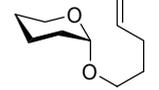
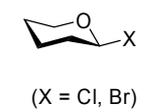
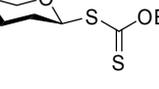
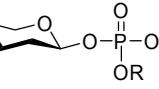
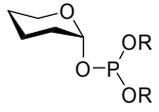


Abb. 3-1: Mechanismus der Glykosylierungsreaktion - Lewis-saure Aktivierung der anomeren Abgangsgruppe ohne (oben) und mit (unten) Nachbargruppenbeteiligung und damit erhältliche α -/ β -Glykoside.

Diese Reaktion läuft mechanistisch als schnelle S_N1 - oder S_N2 -Reaktion ab und erlaubt es nicht ohne weiteres, die Stereochemie am anomeren Zentrum zu bestimmen. Insbesondere die Polarität des Lösungsmittels und die Stärke der aktivierenden *Lewis*säure entscheiden über Inversion oder Retention. Eine weitere Möglichkeit, entweder das thermodynamisch oder kinetisch begünstigte Produkt zu erhalten, besteht darin, den kinetischen anomeren Effekt auszunutzen.^[25] Am zuverlässigsten hat sich die Verwendung von Schutzgruppen in 2-Position (meist Ester, Phthalimide oder Carbamate) bewährt, die bei der Substitution eine Nachbargruppenbeteiligung erlauben und so den nukleophilen Angriff ausschließlich zu einem definierten der beiden möglichen Produkte garantieren (Abb. 3-1).

Tab. 3-1: Auswahl von Glykosyldonoren mit aktivierbarer anomerer Abgangsgruppe.

| Glykosyldonor | Struktur | Aktivierung |
|--|---|-----------------------------------|
| Trichloracetimidat ^[26] |  | kat. TMSOTf |
| Sulfoxid ^[27] |  | Tf ₂ O |
| Fluorid ^[28;29] |  | SnCl ₂ /AgOTf |
| <i>n</i> -Pentenylglykosid ^[30] |  | NIS/Et ₃ SiOTf |
| Halogenid ^[31] |  (X = Cl, Br) | AgOTf |
| Acetat ^[32] |  | BF ₃ •OEt ₂ |
| Thioglykosid ^[13] |  | NIS/TfOH oder DMTST |
| <i>O</i> -Alkyldithiocarbonat (Xanthogenat) |  | DMTST/Cu(OTf) ₂ |
| Phosphat ^[33] |  | TMSOTf |
| Phosphit ^[34] |  | TMSOTf |

Bewährt haben sich als anomere Abgangsgruppe (Tab. 3-1) vor allem Trichloracetimide.^[26] Diese sind unter vergleichsweise schonenden Bedingungen darstellbar, stabil und damit lagerbar. Sie sind katalytisch unter sehr milden Bedingungen aktivierbar.

Die klassischen *Königs-Knorr*-Donoren Glykosylchlorid und -Bromid müssen mit einem Überschuß an Schwermetallsalzen aktiviert werden.^[31] Die Iodide werden nur *in situ* dargestellt, tendieren zu Eliminierung und sind für selektive Glykosylierungen zu reaktiv. Fluorid als Donorfunktion^[28] ist dagegen unaktiviert sehr stabil und kann bereits früh im Syntheseweg eingeführt werden.

Thioglykoside sind entweder direkt (Aktivierung zum reaktiven Sulfoniumsalz mit thiophilen Reagenzien) oder über zwei Stufen aktivierbar (Generierung und Aktivierung eines reaktiven Intermediates *in situ*, z.B. ein Fluorid via DAST oder ein Sulfoxid via Tf₂O) und liefern meist sehr gute Ausbeuten.^[13] Die verwandten Phenylselenoglykoside^[35] sind stabil unter sauren und basischen Bedingungen und bergen den Vorteil, selektiv mit Ag₂CO₃/AgOTf aktivierbar zu sein. Die aus Thioglykosiden oxidativ erhältlichen Glykosylsulfoxide^[27] sind hochreaktive Donoren und werden deshalb meist bei sehr tiefen Temperaturen eingesetzt.

Anomere Acetate als Donoren^[32] sind weniger reaktiv als andere Donoren und müssen stark *Lewis*-sauer aktiviert werden. *n*-Pentenylendonoren können flexibel über unterschiedliche synthetische Wege erhalten werden und zeigen mit NIS/Et₃SiOTf sehr gute Glykosylierungsausbeuten.^[30] Hochreaktive und sehr selektive Donoren, die auch in Organismen als reaktive Species auftreten, sind die Glykosylphosphate, die allerdings synthetisch nicht einfach zugänglich sind.^[33] Speziell für die anspruchsvolle Glykosylierung mit Sialylsäuren haben sich die Xanthogenate und insbesondere Phosphite^[34] als nützlich erwiesen. Letztere können auch durch Oxidation^[36] in Phosphate, mittels *Staudinger*-Reaktion in Phosphorimide^[37] oder mittels *Arbuzov*-Fragmentierung in die entsprechenden Phosphonate^[38] überführt werden, die als Glykosylphosphat-Analogon betrachtet werden können, aber stabiler als Phosphate sind.

Eher zu den spezielleren Methoden (Abb. 3-2) zu zählen ist die *Mitsunobu*-Glykosylierung,^[39] die genauso wie 1-*O*-Silylglykoside^[40] vorwiegend für Arylglykoside eingesetzt wird.

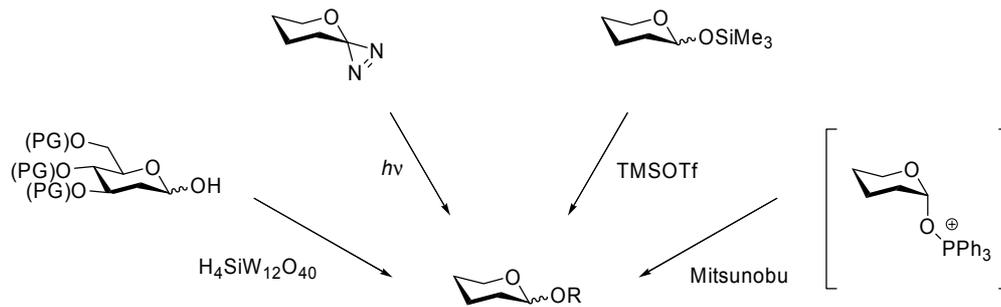


Abb. 3-2: Weniger gebräuchliche elektrophile Donoren: 1-OH-Zucker, Diazirine als Glykosylcarbenquelle, 1-O-Silylglykoside und Mitsunobu-Glykosylierung.

Auch 1-Hydroxy-Zucker können durch saure Aktivierung (*Fischer-Glykosylierung*) direkt als Donoren Anwendung finden, allerdings schränkt deren geringe Reaktivität und die Tendenz zur Trehalose-Bildung ihre Verwendung ein, so daß diese Methode v.a. für die einfacher zu bildenden Oxocarbeniumionen von 2-Desoxyzuckern in Frage kommt.^[41] Glykosylden-Diazirine als Carbenquelle^[42] erlauben die Glykosylierung mit Glykosylcarbenen.

Eine weitere Möglichkeit, die glykosidische Bindung über einen elektrophilen Baustein aufzubauen besteht darin, strategisch von Enolethern auszugehen. Der Begriff Enolether ist hierbei sehr weitläufig gehalten.

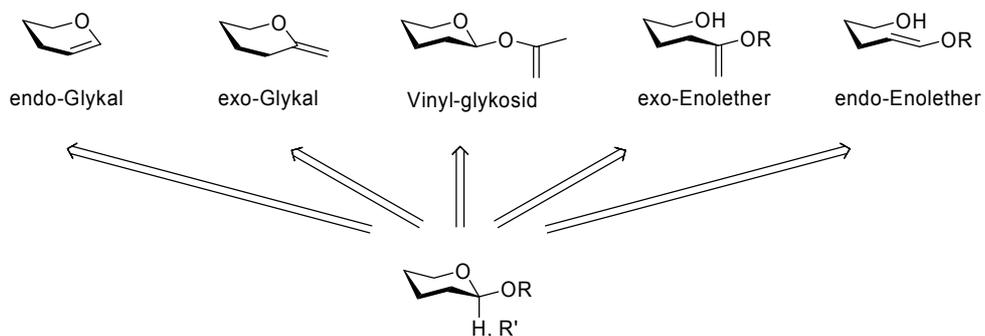


Abb. 3-3: Mögliche Strategien zum Aufbau der glykosidischen Bindung aus Enolethern.

Von den in Abb. 3-3 vorgestellten Enolethern finden die endo-Glykale häufige Anwendung als Donoren: *in situ* wird zuerst oxidativ ein elektrophiles Epoxid gebildet, das dann unter *Lewis*-saurer Katalyse durch die Hydroxygruppe des Akzeptors geöffnet wird.^[43]

Exo- und endo-Enolether konnten erfolgreich für den Aufbau von Sialy Säure- und Kdo-Glykosiden eingesetzt werden.^[44]

3.1.2 Das „latent/aktiv“-Konzept: maskierte Glykosyl-Donoren

Vinylglykoside sind Enolether-Donoren, die hinsichtlich ihrer Reaktivität keinen Vorzug gegenüber anderen Donoren aufweisen. Ihr Vorteil liegt in der erweiterten Verwendbarkeit als maskierter Donor. Ein Allylglykosid ist inaktiv gegenüber *Lewis*-saurer Aktivierung: Es ist ein latenter Donor, der erst nach katalytischer basischer Behandlung zum aktivierbaren Vinylglykosid isomerisiert (Abb. 3-4). Die Isomerisierung erfolgt schonend und zuverlässig mit *Wilkinson*-Katalysator $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}$ und *n*-Butyllithium. Durch (+*I*)-Substitution des glykosidischen Restes mit einer Methylgruppe wird das vinyloge System reaktiver und einfacher aktivierbar.^[45]

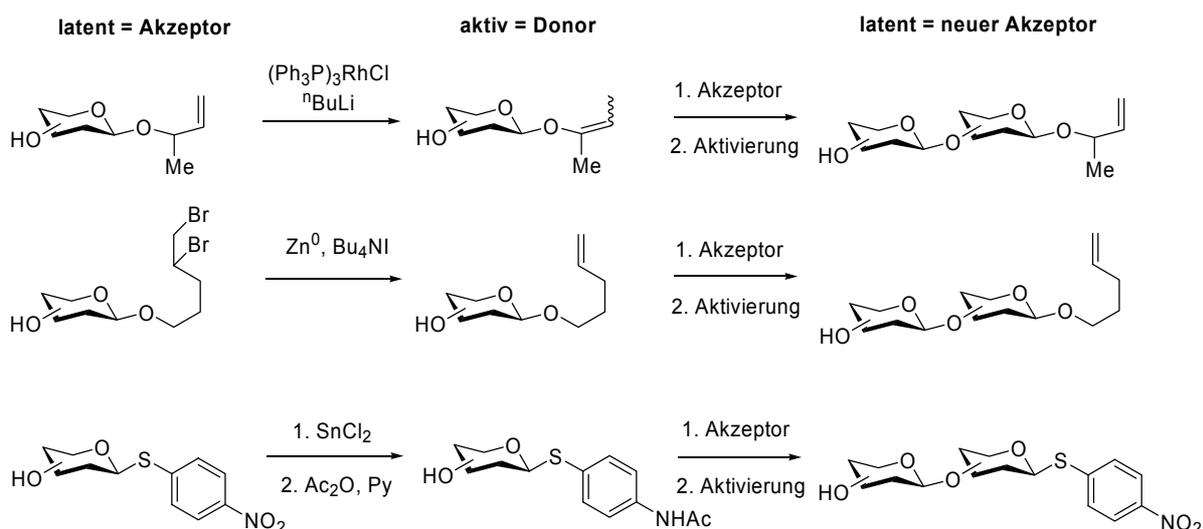


Abb. 3-4: Das „latent/aktiv“-Konzept: Transformation einer maskierten in eine aktivierbare Donorfunktion und anschließende Glykosylierung eines latenten Donors.

Auch *n*-Pentenyl-Donoren^[46] und *p*-Nitrophenylthioglykoside^[47] können für die chemoselektive Glykosylierung mit Hilfe des „latent/aktiv“-Konzeptes verwendet werden (Abb. 3-4) und zeigen, daß sich diese Strategie prinzipiell für den einfachen Aufbau von Oligomeren eignet.

3.1.3 Nukleophile Glykosylierung durch O-Alkylierung

Wie die Retrosynthese (Abb. 3-5) schnell zeigt, kann die Glykosidbindung auch auf einem zu den bisher vorgestellten Methoden chemisch inversen Weg erhalten werden, der Alkylierung des nukleophilen anomeren Sauerstoffs.

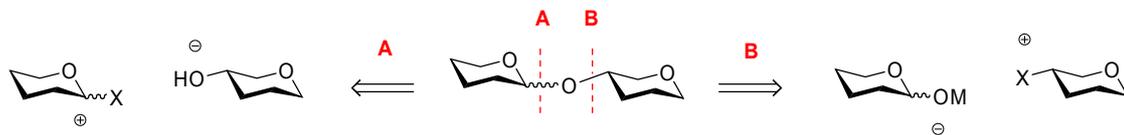


Abb. 3-5: Retrosynthetische Analyse der glykosidischen Bindung und resultierende Synthese.

Die O-Alkylierung am Anomerenzentrum erlaubt durch Substituenteneffekte der Schutzgruppen und/oder durch Komplexierung des Substrates, wie in Abb. 3-6 gezeigt, eine bemerkenswerte Stereoselektivität und kann durch Kryptanden gesteuert werden.^[48]

Da bei sekundären Alkoholen das Stereozentrum am O-glykosidisch angeknüpften Kohlenstoff des Elektrophils invertiert wird, eröffnen die nukleophilen Methoden auch Zugang zu ungewöhnlichen Zuckern.^[49]

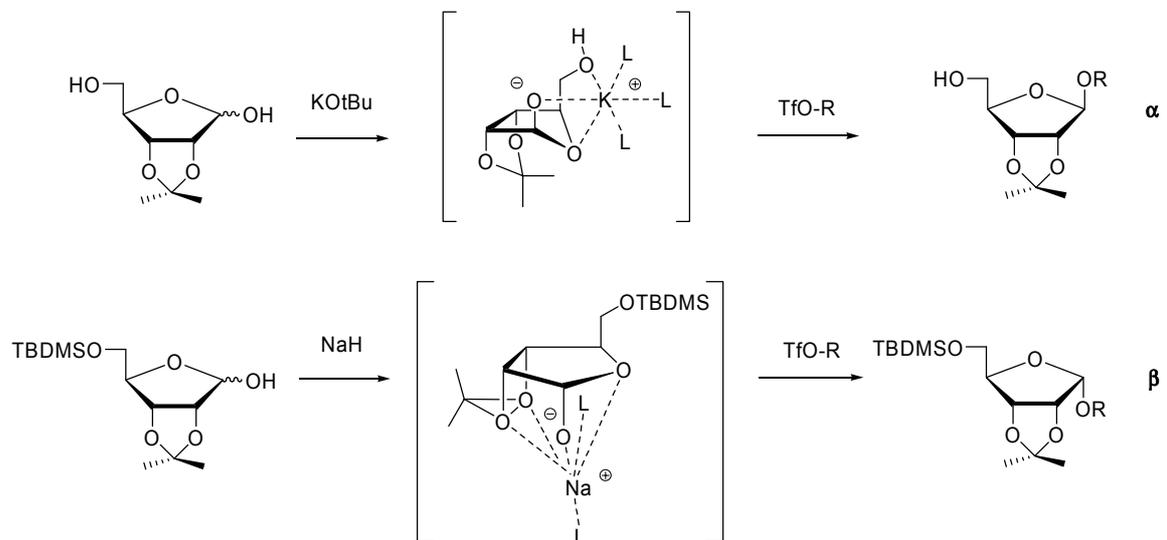


Abb. 3-6: Komplexierung einer 5-O-TBDMS geschützten und 5-OH-freien Ribofuranose und durch O-Alkylierung selektiv resultierende α - und β -Riboside; L = Lösungsmittelmolekül.

Eine der anspruchsvollsten Aufgaben der Kohlenhydratsynthese ist neben der Sialylierung die Bildung der in der Natur häufig vorkommenden β -Mannosid-Bindung: Das thermodynamisch wie auch kinetisch günstigere Anomer ist das α -Mannosid, das man über klassische Donoren mit elektronegativen Abgangsgruppen erhält. Auch Nachbargruppenbeteiligung begünstigt das α -Glykosid. Ein das β -Mannosid liefernder nukleophiler Angriff des Aglykons von der equatorialen Seite her wird durch den axialen C₂-Substituenten erschwert.

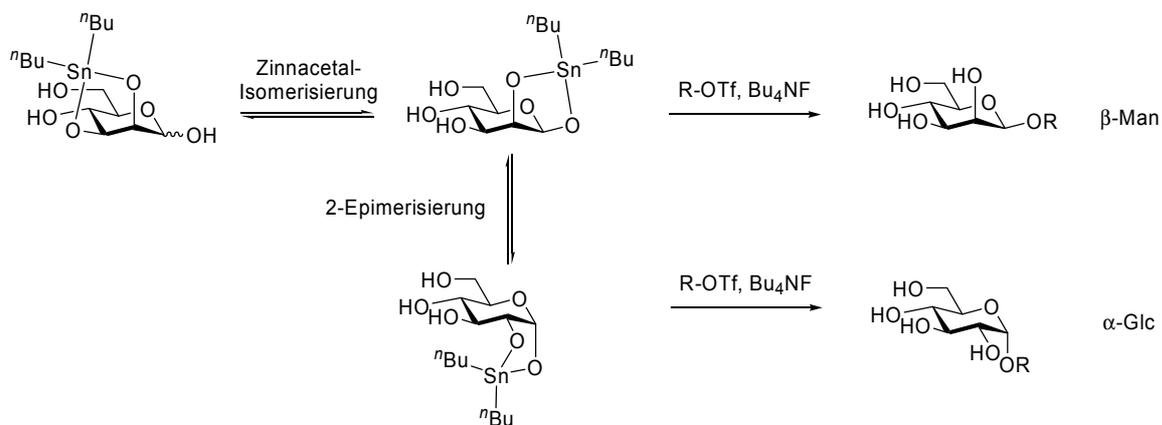


Abb. 3-7: Aufbau eines β -Mannosides über ein 1,2-*O*-Di-*n*-Butylzinn-Acetal, das eine „eingefrorene Anomerenkonfiguration“ aufweist sowie auftretende Nebenreaktionen, u.a. zu α -Glc.

Diese synthetisch schwierigen 1,2-*cis*- β -Glykoside können beispielsweise durch Verwendung von 1,2-*O*-Di-*n*-Butylzinn-Acetalen als Nukleophil mit „eingefrorener Anomerenkonfiguration“^[50] in vollständiger β -Selektivität auch mit ungeschützten Zuckern erhalten werden. Begleitet ist die Reaktion ungeschützter Zucker (Abb. 3-7) häufig von Isomerisierung sowie Epimerisierung an C₂.

3.1.4 Intramolekulare Glykosylierung

Um den Zugang zu synthetisch anspruchsvollen Glykosidbindungen zu ermöglichen, ist die intramolekulare Glykosylierung, die auch IAD (*intramolecular aglycon delivery*)^[51] oder *Tethering* genannt wird, eine attraktive Methode. Donor und Akzeptor werden dabei über eine geometrisch geeignete Vorverbrückung so gegeneinander fixiert, daß die intramolekulare Glykosylierung aufgrund der bereits richtig orientierten Reaktionspartner und eines konzertierten Reaktionsablaufes hoch diastereoselektiv abläuft.

Dabei lässt sich methodisch unterscheiden zwischen Verknüpfungen, die während der Glykosylierung inert sind und anschließend entfernt werden sowie Verbrückungen, die zusätzlich als aktivierende anomere Abgangsgruppe an der Reaktion teilnehmen. Zu letzteren zählen beispielsweise die Carbonate, die eine elegante „spurlose“ (Abb. 3-8) Glykosylierung erlauben.^[52] Auch cyclische Orthoester,^[53] Silyldiether,^[54] *p*-Methoxybenzylacetale^[55] und eine Reihe anderer Verbrückungen sind bekannte reaktive IAD-Brücken und führen bei anspruchsvollen Glykosylierungen wie dem in 3.1.3 geschilderten β -Mannosidproblem zu exzellenten Selektivitäten.^[56]

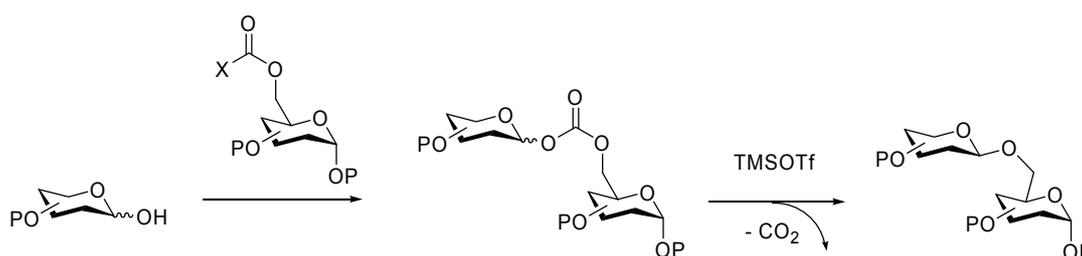


Abb. 3-8: Intramolekulare β -selektive Glykosylierung eines vorarrangierten Donor-Akzeptor-Systemes mittels einer Carbonat-Verbrückung, die auch als anomere Abgangsgruppe dient.

3.1.5 Orthogonale Glykosylierung

Das Prinzip der chemischen Orthogonalität¹ ist nicht alleine auf Schutzgruppen beschränkt, sondern kann auch auf Aktivierungsgruppen angewendet werden. Auf die anomeren Abgangsgruppen der Glykosylierungsschritte einer Kohlenhydratsynthese übertragen bedeutet dies, eine Donorfunktion A selektiv chemisch zu aktivieren, ohne dadurch eine zweite im System vorkommende Donorfunktion B zu beeinträchtigen. Während der ersten Glykosylierung mit A als anomerer Abgangsgruppe hat Donorfunktion B die Aufgabe einer Schutzgruppe. Auf diese Weise können Glykosylierungen aufeinanderfolgend durchgeführt werden, ohne die in der klassischen Vorgehensweise nötige Umfunktionalisierung einer Schutzgruppe P^B zu Donor B vorzunehmen (Abb. 3-9). Der Synthesaufwand verkürzt sich dadurch erheblich.

¹ “An orthogonal system is defined as a set of completely independent classes of protection groups. In a system of this kind, each class can be removed in any order and in the presence of all other classes” (G. Barany, R.B. Merrifield).^[287]

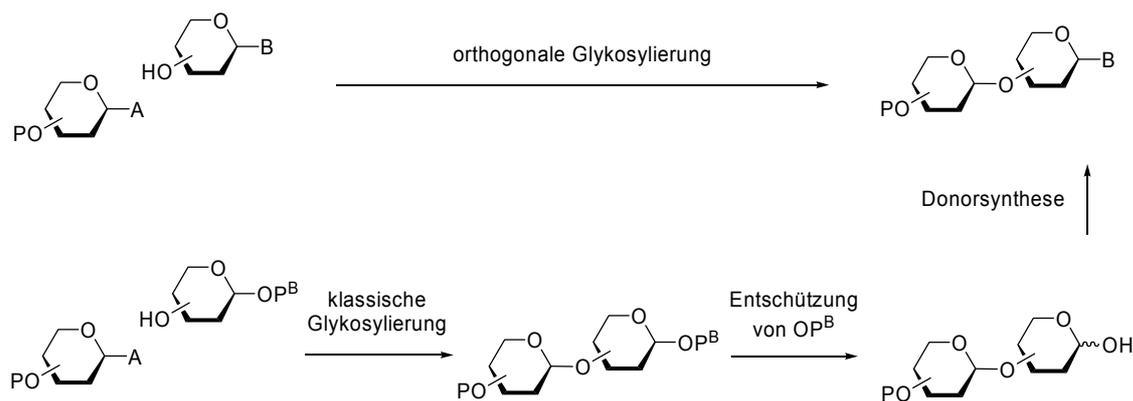


Abb. 3-9: Klassische Synthesen und orthogonale Glykosylierung mit geeigneten Donorfunktionen A und B.

Beispielsweise können Glykosylfluoride und Thioglykoside als orthogonales Donorset eingesetzt werden, da sich lediglich das Fluorid z.B. mit $\text{Cp}_2\text{HfCl}_2/\text{AgClO}_4$ selektiv aktivieren lässt und nur das Thioglykosid mit NIS/TfOH.

3.1.6 Die Feinabstimmung der Donor-Reaktivität

Die Erkenntnis, daß derselbe Glykosyldonor je nach Schutzgruppen *armed* und *disarmed*, also „bewaffnet“ (reaktiv) und „entwaffnet“ (inaktiv) sein kann,^[57] erweiterte die Kohlenhydratchemie um die Möglichkeit, individuelle Donoren nach ihrer relativen Reaktivität einzuordnen. Systematische Untersuchungen^[58;59] erlauben so, in gewissen Grenzen Donorreaktivitäten vorherzusagen, um z.B. das Produkt einer chemoselektiven Glykosylierungsreaktion direkt in einer anschließenden Reaktion durch geringfügig stärkere Aktivierung als Donor einzusetzen. Dieses Vorgehen ist methodisch eng mit der orthogonalen Glykosylierung (3.1.5) verwandt, doch konzeptionell verschieden. Die orthogonale Glykosylierung ist eine Ergänzung des *reactivity tunings*, innerhalb der die Donorreaktivität nicht kontinuierlich moduliert, sondern nur ein- oder ausgeschaltet werden kann.

Verschiedene Effekte sind, wie auch in Abb. 3-10 gezeigt, in ihrer Gesamtheit für die Chemoselektivität bzw. die zugrunde liegende Donorreaktivität verantwortlich. Die Bildung des reaktiven Oxocarbeniumions während der Glykosylierung wird bestimmt durch:

- Natur der Abgangsgruppe und verwendete Aktivierung
- elektronische Effekte (Schutzgruppenmuster und Ringkonfiguration/-größe)
- Torsionseffekte des Kohlenhydratringes
- sterische Einflüsse

Nicht nur das Dipolmoment am anomeren Zentrum hat einen großen elektronischen Einfluß auf die Donorreaktivität, auch weit entfernte Ringsubstituenten tragen bei. Die elektronische Aktivierung des Donors fällt ab mit der Substituentenreihe



Jedoch gelten für jedes Kohlenhydrat andere Reaktivitätsreihenfolgen: So hängt der aktivierende Einfluß der Benzoatschutzgruppe von ihrer jeweiligen Ringposition ab und nimmt bei Mannosendonoren mit der Positionsreihenfolge $2 > 6 > 4 > 3$ ab, während für Galaktose die Reihe $4 > 3 > 2 > 6$ gilt. Es läßt sich auch eine vom Kohlenhydratring alleine abhängige Reaktivitätsreihe $\text{Fuc} > \text{Gal} > \text{Glc} > \text{Man}$ feststellen.^[60]

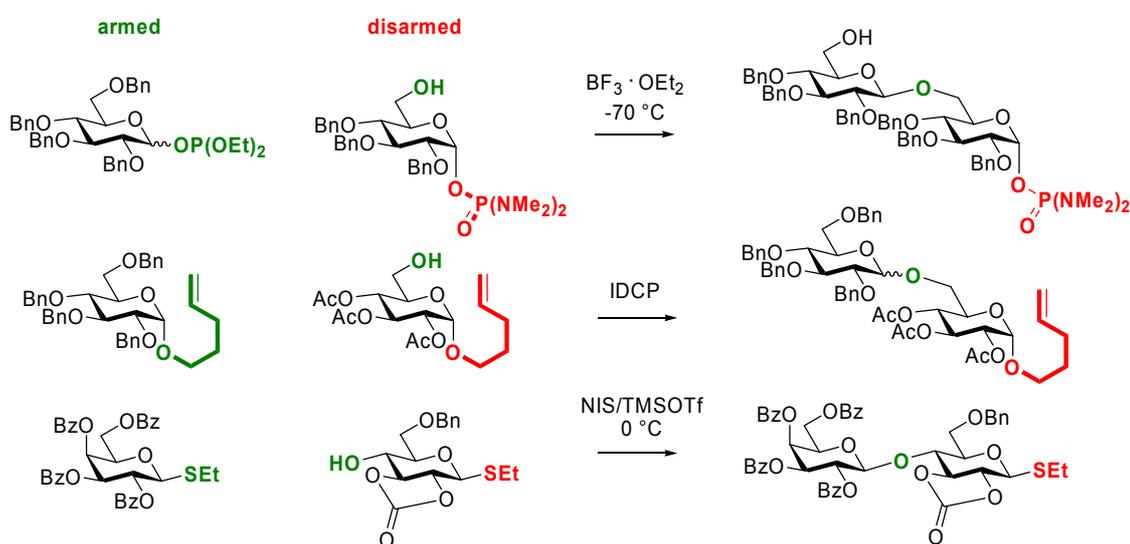


Abb. 3-10: „Reactivity tuning“: maßgeschneiderte Donoren erlauben chemoselektive Aktivierung. Oben: Chemoselektivität durch unterschiedliche Donoren; Phosphit ist bei -70 °C mit $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ aktivierbar, Tetramethylphosphoramidat erst ab -10 °C .^[61] Mitte: Nachbargruppenbeteiligung des Acetates stabilisiert das Oxocarbeniumion, der Benzylether des zweiten Donors kann nicht stabilisiert werden.^[57] Unten: Verbrückung mit einer Carbonatgruppe erschwert die Bildung des reaktiven Intermediates.^[62]

Ein durch verbrückende Schutzgruppen rigides Kohlenhydratgerüst benötigt ebenfalls eine höhere Aktivierung. Die Bildung des planaren sp^2 -Oxocarbeniumions erfordert eine Einbnung des $^4\text{C}_1$ -Ringes von Pyranosiden, was energetisch für bicyclisch fixierte Donoren extrem beungünstigt ist.^[60]

Eine Schutzgruppe, die, wie in 3.1.1 beschrieben, Nachbargruppenbeteiligung erlaubt, stabilisiert das reaktive Intermediat ebenfalls und senkt so die Reaktivität.

3.1.7 Eintopf-Glykosylierungen und OptiMer

Die logische Fortführung des Prinzipes der chemoselektiven Glykosylierung ist es, nicht nur zwei in ihrer Reaktivität aufeinander abgestimmte Donoren zu verwenden, sondern mehrere. Dabei muß die Reaktivität der Glykosyldonoren innerhalb der zu knüpfenden Reihenfolge stetig abnehmen, was eine prinzipielle Einschränkung der Methode auf kurze Oligomere darstellt. Die Eintopfsynthese eines Pentamannosides^[63] gelang so durch Verwendung von fünf Glykosyldonoren, die über Verbrückung und drei verschiedene anomere Abgangsgruppen in ihrer Reaktivität angepasst wurden.

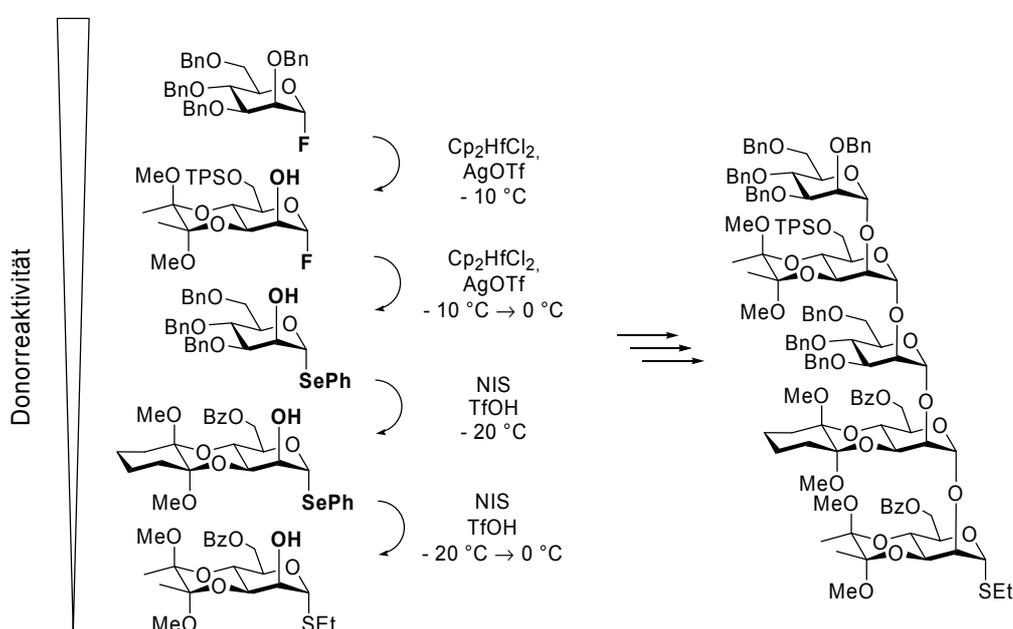


Abb. 3-11: Eintopfsynthese eines Pentamannosides von fünf in ihrer Reaktivität aufeinander abgestimmten Glykosyldonoren mit 8 % Ausbeute.^[63] Die Donorreaktivität nimmt dabei in jedem Schritt ab.

Dieses eher auf Empirie beruhende Vorgehen wurde von der Gruppe um *Wong* durch die systematische Quantifizierung von Donorreaktivitäten zur programmierbaren Eintopfsynthese verbessert: Die relativen Reaktivitäten (RRV, *relative reactivity value*) von mehreren hundert Glykosyldonoren wurden hierfür in einer Datenbank erfasst. Anhand dieser Datenbank erlaubt das Computerprogramm *OptiMer*^[64] für ein gegebenes Syntheseprodukt die rechnergestützte Ermittlung der optimalen Monomeren einer Eintopfreaktion. Die optimale Synthon-Kombination wird erhalten durch Ermittlung der Donorenkombination, die die größtmöglichen Reaktivitätsdifferenzen der für die einzelnen Schritte in Frage kom-

menden Bausteine aufweist. Mit Hilfe von OptiMer konnte z.B. eine Trisaccharidbibliothek mit 33 Verbindungen dargestellt werden.^[65]

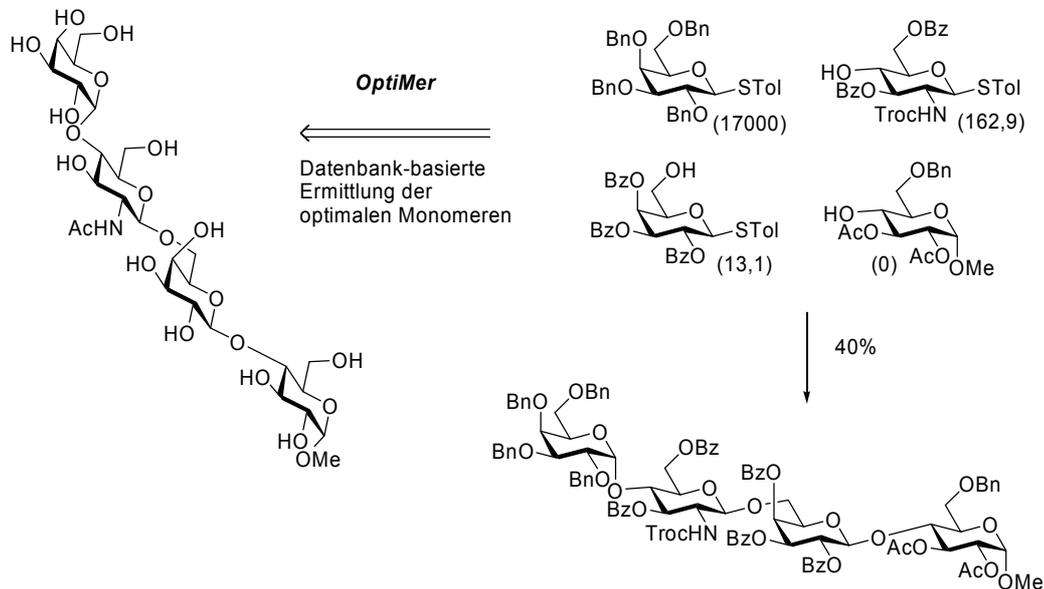


Abb. 3-12: Programmierte Eintopfsynthese: Analyse eines Oligosaccharides mit OptiMer und ermittelte optimale Monomer-Synthese für eine Eintopfreaktion; relative Reaktivitäten in Klammern.

3.1.8 Enzymatische Glykosylierung: Superbeads und Superbugs

Aufgrund der annähernd gleichen Reaktivität mehrerer nebeneinander vorliegender Hydroxygruppen ist in der Kohlenhydratsynthese die Anwendung von Enzymen eine attraktive Alternative. Sowohl bei der Bildung der glykosidischen Bindung als auch der Installation von Schutzgruppen^[66,67] sind so Selektivitäten erzielbar, die chemisch nur mit sehr großem Aufwand erhalten werden können.

Zur Bildung der Glykosidbindung benutzte Enzyme sind Glykosynthasen,^[68] Glykosidasen^[69] und Glykosyltransferasen.^[70] Glykosidasen spalten zwar *in vivo* Polysaccharide, können aber aufgrund der Reversibilität des enzymatischen Prozesses auch zum Aufbau von Sacchariden *in vitro* eingesetzt werden.^[69] Am häufigsten werden die für diesen Prozeß in der Natur verwendeten Glykosyltransferasen eingesetzt. Diese verwenden Zuckernukleotide (Glykosyltransferasen vom *Leloir*-Typ) oder Zuckerphosphate (nicht-*Leloir*-Typ) als Substrate.^[70]

Da Glykosyltransferasen meist an die Zellmembran gebunden und somit nicht einfach und einheitlich erhältlich sind, müssen sie in der Regel kloniert und in *E.coli* exprimiert werden. Durch die notwendigen Regenerationskreisläufe der Zuckernukleotide, die nur katalytisch vorhanden sein dürfen, um die Enzyme nicht zu inaktivieren, werden die verwendeten enzymatischen Systeme für die Oligosaccharidsynthese sehr komplex.

Superbeads^[71;72] sind mehrfach enzymbeladene Harze zur Regenerierung nukleotid-aktivierter Zucker und zur enzymatischen Glykosylierung. Dafür wurden an Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure) funktionalisierten Agarosebeads die für die Synthese der jeweiligen Oligosaccharidsequenz notwendigen Glykosyltransferasen und Nukleotid-Regenerationsenzyme als N-terminal His₆-getaggte rekombinante Enzyme immobilisiert.^[73]

Eine Verbesserung dessen stellen zelluläre Systeme dar, deren Metabolismus auf die Synthese eines bestimmten Saccharides optimiert wurde.^[74] Die beteiligten Enzyme müssen hier nicht separat kloniert und aufgereinigt werden, sondern werden mit einem einzigen Vektor kloniert und in *E.coli* exprimiert. Diese Multienzym-produzierenden Bakterienstämme, die *Superbugs*,^[75] erlauben eine kosteneffektive biotechnologische Synthese von einzelnen Oligosacchariden aus ungeschützten Zuckermonomeren.

3.2 Festphasenstrategien der Glykochemie

3.2.1 Das Prinzip der Festphasensynthese

Die Synthese an fester Phase fand seit den Pionierarbeiten von Merrifield^[1] breite Anwendung für die effiziente Wirkstoffsuche und ist heute die wichtigste Methode zur Herstellung kombinatorischer Substanzbibliotheken von Peptiden, Nukleotiden, einer Vielzahl von Mimetika sowie von nichtoligomeren Verbindungen.^[2-5;9]

Zur Synthese an fester Phase (Abb. 3-13) wird ein Edukt über einen Linker kovalent an einem polymeren Träger angebunden. Dieser Linker muß gegen alle anderen Syntheseschritte chemisch inert sein und eine selektive Produktabspaltung am Ende der Reaktionssequenz ermöglichen.

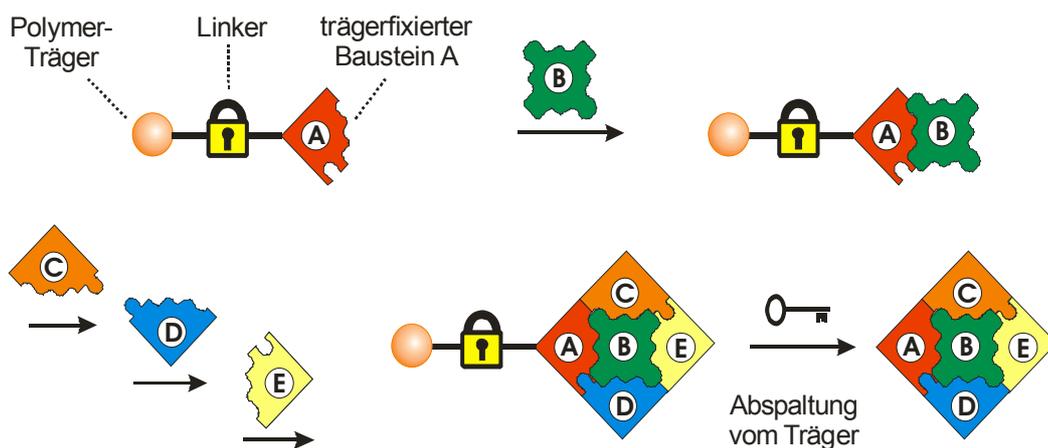


Abb. 3-13: Schematische Darstellung der Synthese an einem polymeren Träger mit den Bausteinen A, B, C, D, E. Das Linkermolekül ermöglicht dabei am Ende der Synthese die selektive Abspaltung des Produktmoleküles ABCDE. Im Falle einer kombinatorischen Synthese symbolisieren A-E jeweils einen „Building Block“, einen Reagenzienpool - man erhält damit eine Verbindungsbibliothek $A_iB_jC_kD_lE_m$.

Die Reaktionsführung an der festen Phase weist viele Vorzüge gegenüber der klassischen Lösungssynthese auf, so z.B. die Möglichkeit eine Vielzahl von Verbindungen in einem einzigen Schritt synthetisieren zu können, die sehr einfache Aufarbeitung durch Filtration und Waschen des Polymerträgers, die Möglichkeit der Automatisierung und die Erzielung vollständiger Umsetzungen durch hohen Reaktandenüberschuß.

Im Vergleich zur Synthese in Lösung bestehen jedoch Einschränkungen (Tab. 3-2) der Festphasenchemie, insbesondere was die Wahl der Reagenzien und der Reaktionsbedingungen betrifft sowie in der Analytik. Letztere muß *on-bead* mittels aufwendigerer Methoden als in der Lösungssynthese verlaufen.

Tab. 3-2: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile von Festphasensynthesen.

| Vorteile von Festphasensynthesen | Nachteile von Festphasensynthesen |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Hohe Ausbeuten, Reinheiten und kurze Reaktionszeiten durch Reagenzienüberschuß • Einfache und schnelle Aufarbeitung der Reaktionsmischung durch Abfiltrieren und Waschen des Polymers • Eingeschränkter Temperaturbereich (z.B. bis ca. 130 °C bei Polystyrol) • Verdünnungsprinzip: räumliche Trennung der reaktiven Gruppen: keine Quervernetzung oder Interaktion der Produktmoleküle • Hochparallel automatisierbar | <ul style="list-style-type: none"> • Routineanalytik muß <i>on-bead</i> erfolgen (MAS-NMR, FT-ATR-IR) oder durch Abspaltung v. Zwischenstufen • Reagenzien und Reaktionsbedingungen sind je nach physikalischer und chemischer Eigenschaft des Polymers eingeschränkt • Eine chemische Orthogonalität wird für die Linkerfunktion geopfert • Übertragung von Protokollen aus der Lösungssynthese oft nicht möglich - erfordert Ausarbeitung und Optimierung neuer Protokolle • Scale-up nur bedingt möglich, schlechte Atomökonomie • Stereoselektivität evt. durch Polymerbackbone eingeschränkt • Keine unmittelbar konvergente Synthese möglich • Keine heterogene Katalyse möglich • Fehlsequenzen bei nicht quantitativer Umsetzung |

Ein Ansatzpunkt zur Umgehung der Nachteile der reinen (Träger-) Festphasensynthese ist die Verwendung funktionalisierter Polymere in der Lösungssynthese, die sogenannte Festphasen-unterstützte Synthese (*polymer assisted solution phase synthesis*, PASP). Hierbei werden kovalent polymergebundene Reagenzien (Abb. 3-14) eingesetzt und nach der Reaktion abfiltriert. Für PASP kommen immobilisierte Katalysatoren und stöchiometrisch teilnehmende polymerunterstützte Reagenzien zum Einsatz. Varianten sind das Abfangen unerwünschter Substanzen mit polymeren Scavengern und die Aufreinigung von Reaktionsgemischen über die „*catch-and-release*“-Methode.^[76]

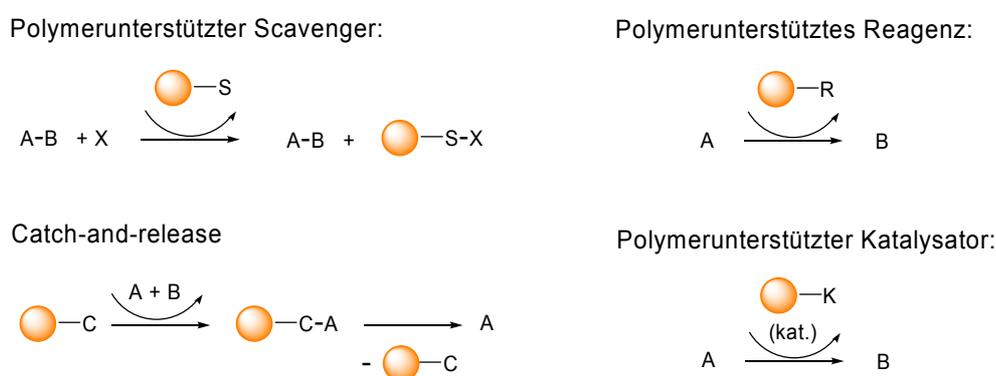


Abb. 3-14: Polymere Reagenzien: Einsatz von reaktiven, abfiltrierbaren Polymeren als Reagenz oder Katalysator. Aufarbeitung von Reaktionsgemischen der Lösungssynthese mit polymerem Scavenger oder mittels eines Catch-Release-Polymers.

Vor allem im Hinblick auf den Aufbau eines Kohlenhydratgerüsts muß die Festphasenstrategie kritisch betrachtet werden. Die Synthese von Oligosacchariden erfordert eine hoch diastereoselektiv verlaufende Bildung der glykosidischen Bindungen. Diese sind in Gegenwart eines Polymerbackbones oft nicht so selektiv aufbaubar wie in Lösung. Die hohe Reaktivität von aktivierten Glykosyldonoren erfordert einen im Polymer oft schwer zu bewerkstellenden völligen Ausschluß von Feuchtigkeit.

Da heterogen katalysierte Reaktionen während Festphasenreaktionen nicht möglich sind, ist v.a. die Verwendung der Benzylschutzgruppe als Standard-Schutzgruppe der Kohlenhydratchemie stark eingeschränkt. Der in den allermeisten Fällen erforderliche Hydrierungsschritt am Ende der Reaktion macht das Konzept der simultanen Spaltung von persistenten Schutzgruppen und Linker in der Kohlenhydratchemie beinahe unmöglich, wenn man von kostenintensiven Verfahren wie der Debenzylierung an fester Phase mit Palladi-

um-Nanopartikeln absieht.^[77] Die Verwendung löslicher Polymere umgeht dieses Problem zunächst, doch sind bei fällbaren Polymeren Ausbeuteverluste durch Auswascheffekte die Regel, die für iterative Synthesen inakzeptabel sind.^[78] Eine weitere Einschränkung besteht in der ausgeprägten Hygroskopie vieler löslicher Polymere, die die feuchtigkeitssensitive Glykosylierung zusätzlich beeinträchtigt. Darüber hinaus können bei PEG Ausbeuteverluste beobachtet werden, die durch dessen Tendenz zur Zersetzung via Peroxidbildung begründbar sind.^[79]

Oligosaccharide sind in den seltensten Fällen lineare Oligomere und erfordern daher eine mit Festphasensynthese nicht direkt mögliche konvergente Reaktionsführung. Weiterhin ist aufgrund der meist sauren Glykosylierungsbedingungen und der Säurelabilität von *O*-Glykosiden die Verwendung vieler sauer spaltbarer Standardlinker nicht möglich. Da die Kohlenhydratdonoren bereits über unterschiedlichste Synthesen mit jeweils individueller Schutzgruppentaktik erhalten werden müssen, ist die Verwendung eines generellen Standardsatzes chemischer Orthogonalitäten für die Festphasenzuckerchemie ein gegenwärtig nicht realisierbarer Wunschgedanke.

3.2.2 Träger und Linker der Zuckerchemie

Wie bereits erwähnt, führt die Kohlenhydratsynthese an löslichen Polymeren wie z.B. Methoxypolyethylenglykol MPEG^[80] oder unverzweigtem Polystyrol^[81] durch Auswasch- und Zersetzungseffekte oft zu nicht zufriedenstellenden Ergebnissen und ist für iterative Ansätze somit weniger geeignet. Die große Mehrzahl der Oligosaccharidsynthesen wird daher an unlöslichen Polymeren in Suspension durchgeführt. Dafür eingesetzt wurden v.a. die mit Divinylbenzol quervernetzten Standard-Polystyrolharze^[9;82;83] und PEG-PS-Kopolymere (TentaGel^[84], ArgoGel, SPOCC^[85]), aber auch Makroporöses PS^[86] oder CPG (Controlled Pore Glass)^[87] sowie einige andere Träger.

Die kovalente Anbindung von Kohlenhydraten an das Polymer, das als polymere Schutzgruppe betrachtet werden kann, erfordert eine Linkerfunktion, die während der Synthese stabil ist gegenüber den Glykosylierungsschritten und der Abspaltung der temporären Schutzgruppen bzw. mehrerer temporärer Schutzgruppen. Eine Auswahl der wichtigsten Linker und ihrer Spaltungsmethoden, die kompatibel mit den Anforderungen der Synthese von Oligosacchariden sind, wird in Tab. 3-3 gezeigt.

Tab. 3-3: Linkersysteme für Festphasen-Oligosaccharidsynthese (Auswahl) und Abspaltungsbedingungen.

| Nr. | Struktur des Linkers | Spaltung |
|-----|----------------------|--|
| 1 | | a) Raney Ni W2 ^[79] b) Pd-C/H ₂ ^[79] |
| 2 | | Pd-C/H ₂ ^[88] |
| 3 | | Sc(OTf) ₃ , Ac ₂ O ^[89] |
| 4 | | a) H ₂ , Pd(OH) ₂ oder TFA ^[90] b) H ₂ NNH ₂ •H ₂ O ^[90] |
| 5 | | Dioxiran, NaOMe ^[88] |
| 6 | | BF ₃ •OEt ₂ , (RCO) ₂ O ^[91] |
| 7 | | hν, THF ^[92] |
| 8 | | Hg(OCOCF ₃) ₂ ^[93] |
| 9 | | DMTSB/DIPEA (X = S) ^[94] NBS/DTBP (X = O) ^[14] |
| 10 | | a) TMSSPh, ZnI ₂ ^[95] b) hν, THF ^[95] |
| 11 | | H ₂ C=CH ₂ ^[96] |

| Nr. | Struktur des Linkers | Spaltung |
|-----|---------------------------------------|---|
| 12 | | 1. TMSCHN ₂ 2. 0.5 N NaOH ^[97] |
| 13 | <p>X = NH, O, COOCH₂NH</p> | aq. NH ₃ ^[98;99] |
| 14 | | DDQ ^[100] |
| 15 | | TFA, H ₂ O ^[101] |
| 16 | | NaI, 2-Butanon (zum 6-Iodid), NaI/NaOAc oder NaI/NaN ₃ ^[102] |
| 17 | <p>X = Donor</p> | TBAF, AcOH ^[103;104] |
| 18 | <p>X = Donor</p> | H ₂ , Pd(OH) ₂ ^[105] |

Die beschriebenen Linker aus Tab. 3-3 erlauben nicht ausschließlich die Freisetzung einer Zucker-OH-Funktion. Manche Systeme eignen sich zur Darstellung von Glykosiden mit einem bestimmten Aglykon, darunter z.B. die durch Olefinmetathese erhaltbaren *n*-Pentenyl-Glykoside (Nr. 11), die als Donoren weiter eingesetzt werden können. Genauso kann ein auf dem photolytisch spaltbaren Nitrobenzyl linker (Nr. 10) immobilisierter Zucker auch in einen Phenylthioglykosiddonor transformiert werden. Thioglykosid-Linker zeigen bemerkenswerte Stabilität unter Glykosylierungsbedingungen, so daß diese Linker

neben den Linkern des Succinoyltyps (Nr. 13) zu den ersten für die Festphasensynthese von Zuckern eingesetzten Linkern gehörten. Sie können oxidativ mittels Oxiran (Nr. 5) oder über viele thiophile Reagenzien (Nr. 8, Nr. 9) gespalten werden. Benzylische Glykoside erhält man über die mehrheitlich für lösliche Polymere konzipierten Oxy- und Alkoxybenzyl-Linker (Nr. 1-4, Nr. 18), anomere Ester sind an der festen Phase über $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ und einem Anhydrid mittels des Oxyethylsilyllinkers (Nr. 6) erhältlich, während andere Silyllinker (Nr. 17) und Linker vom Sulfonyltyp (Nr. 16) die Generierung polymergebundener Donoren zulassen. Aminozucker können am Backbone Amide Safety-Catch Linker (Nr. 15) immobilisiert werden, der erst nach N-Acylierung sauer gespalten werden kann.

3.2.3 Strategien der Festphasen-Oligosaccharidsynthese

Die iterative Kettenverlängerung zum Aufbau von Oligosacchariden kann sowohl vom reduzierenden als auch vom nichtreduzierenden Ende des Zielmoleküles (Abb. 3-15) her erfolgen. Dies impliziert entweder die Immobilisierung bzw. Generierung eines Glykosylakzeptors oder -donors am Polymerträger.

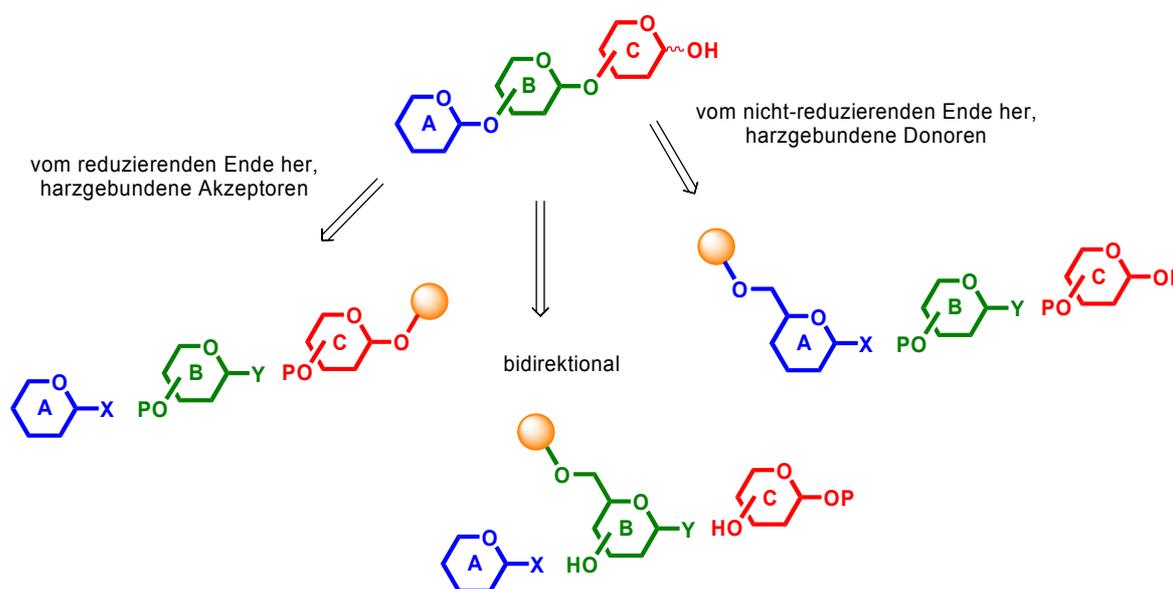


Abb. 3-15: Strategische Varianten für den iterativen Aufbau eines Oligosaccharides: Über harzgebundene Akzeptoren oder alternativ über harzgebundene Donoren bzw. durch bidirektionales Vorgehen (geeignet für orthogonale Glykosylierung).

Während die Immobilisierung des Akzeptors einen begünstigenden Überschuss der reaktiven Spezies in der Glykosylierungsreaktion erlaubt, erfordert die Immobilisierung des

Glykosyldonors die zusätzliche Transformation der anomeren Schutzgruppe in eine reaktive, harzgebundene Donorfunktion. Da sich die meisten Nebenreaktionen einer Glykosylierung am Donor ereignen, können hierbei vermehrt Nebenprodukte und Fehlsequenzen entstehen. Hierdurch ist diese Variante prinzipiell der klassischen Vorgehensweise unterlegen. Nichtsdestotrotz konnte die Gruppe um *Danishefsky* anhand dieser Strategie immobilisierte Glykale erfolgreich für den Oligosaccharidaufbau mit guten Ausbeuten einsetzen.^[104]

Der bidirektionale Ansatz eignet sich für orthogonale Glykosylierungsstrategien und erlaubt prinzipiell auch konvergente Synthese, da das Kohlenhydratprodukt aus zwei Richtungen aufgebaut wird.^[105]

3.2.4 Polymerunterstützte Glykosylierungen

Das Konzept der festphasengebundenen Reagentien fand in jüngerer Zeit vielversprechende Anwendung für Glykosylierungsreaktionen. Polymergebundenes Diphenylphosphanhydrobromid vermag allgemein Enoether sauer zu aktivieren, insbesondere Glykale können damit sehr schonend zur Reaktion gebracht werden.^[106] Noch eleganter ist die Aktivierung von Phenylthioglykosiden mit dem thiophilen, festphasengebundenen Bis(trifluoracetoxy)iodid.^[107] Dabei entstandenes Diphenyldisulfid kann in Gegenwart von *i*-PrOH mit Borhydrid-Harz als Scavenger abgefangen werden.

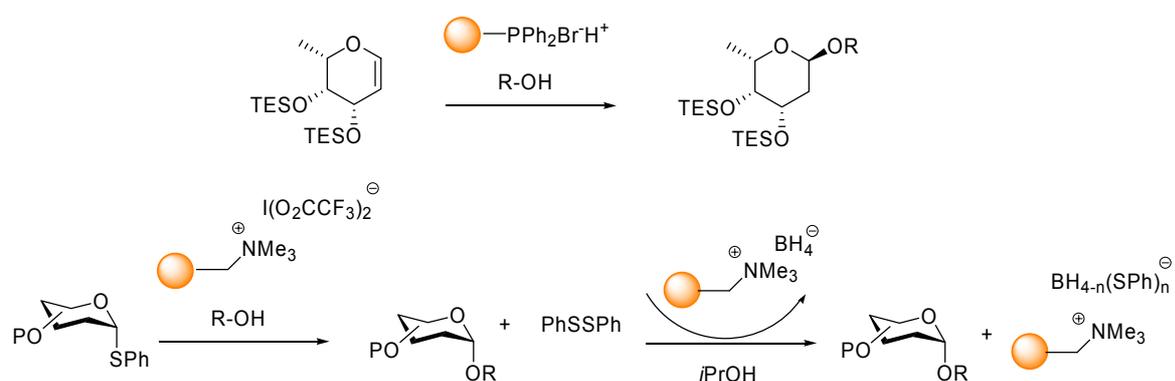


Abb. 3-16: *PASP-Glykosylierung von Glykalen mit polymergebundenem Diphenylphosphanhydrobromid (oben) und von Thioglykosiden mit festphasengebundenem Bis(trifluoracetoxy)iodid und anschließendem Disulfid-Scavenging (unten).*

3.2.5 Methoden zur Minimierung von Oligosaccharid-Fehlsequenzen

Beim Aufbau eines n -Oligosaccharides durch iterative Synthese an fester Phase sind wie beim Aufbau anderer Oligomere Fehlsequenzen ($n-1$, $n-2$, ...) die häufigsten Nebenprodukte. Sie akkumulieren sich während der Synthese am Polymerbead und sind am Ende der Synthese aufgrund ihrer geringen Polaritätsunterschiede nur sehr schwer wieder voneinander abzutrennen. Die Umsetzung nicht abreagierter Hydroxygruppen kann durch eine zweite Glykosylierung erreicht werden. Alternativ können die nicht glykosylierten intermediären Hydroxygruppen nach jedem Glykosylierungsschritt durch einfaches Blockieren z.B. mit Ac_2O den folgenden Reaktionsschritten entzogen werden. Durch derartiges Capping werden Fehlsequenzen zwar nicht vermieden, doch die finale Auftrennung erleichtert.

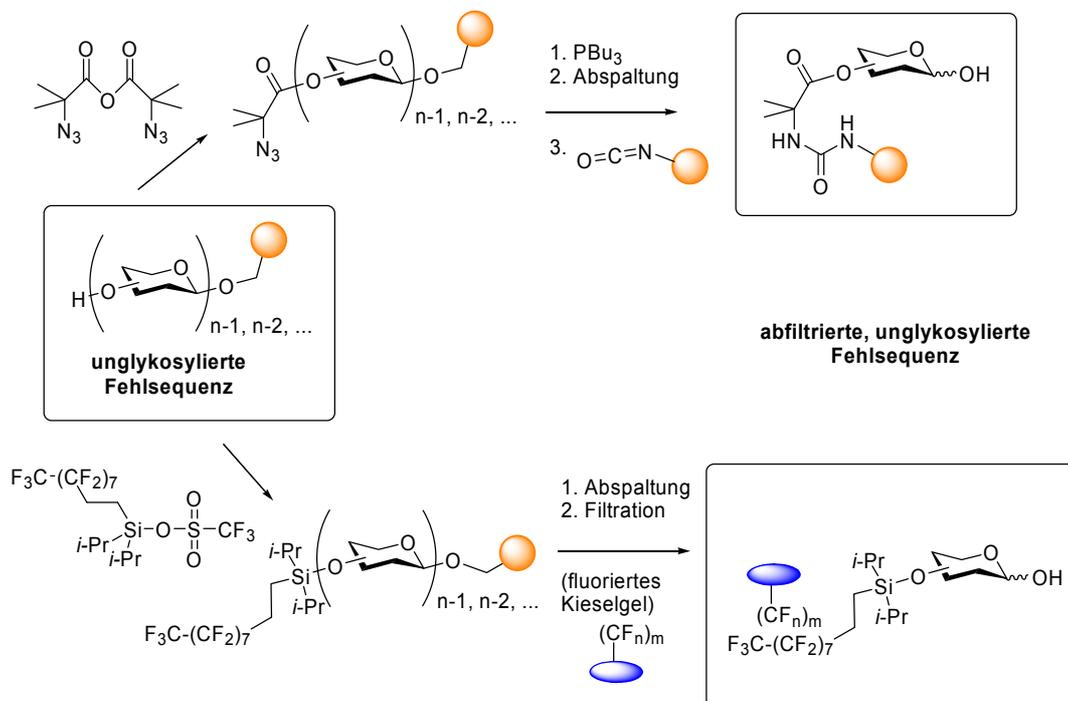


Abb. 3-17: Cap-Tags zum Capping unglykosylierter Hydroxyfunktionen und späterer Abtrennung von Fehlsequenzen mit polymeren Scavengern; Azid-Cap (oben) und Fluorid-Cap (unten).

Eine Verbesserung stellt die Verwendung von reaktiven *Cap-Tags*^[108] dar. Bei *Cap-Tags* (Abb. 3-17) handelt es sich um reaktive Schutzgruppen, mit denen nicht vollständig abreagierte Hydroxygruppen vor dem nächsten Glykosylierungsschritt blockiert werden. Am Ende der Synthese erlaubt es ein *Cap-Tag*, alle unerwünschten Nebenprodukte mit polymeren Scavengern abzufangen. Verwendung fanden hierfür bisher 2-Azido-2-methyl-

propionsäure und (Heptadecafluordecyl)-diisopropylsilyltriflat für die Einführung eines Azid- bzw. Fluorid-Tags^[108] zur gezielten Abtrennung von Nebenprodukten.

Das Analogon zum Tagging der Nebenprodukte während der Synthese ist das gezielte Tagging des erwünschten Glykosylierungs-Produktes und dessen erneute Freisetzung nach Abtrennung der Nebenprodukte. Für diese *capture-release*-Strategie ist die Verwendung von Glykosyldonoren mit reaktiven Schutzgruppen nötig, beispielsweise der Chloracetyl-Gruppe. Mit PS-Fmoc-Cystein konnte mittels eines *capture-release*-Schrittes nach jedem Glykosylierungsschritt das gewünschte Chloracetyl-Intermediat von Nebenprodukten befreit werden.^[109] Eine Verbesserung dieser Methode ist das Capping mit Ac₂O nach jedem Schritt und die selektive Chloracetyl-Entschützung (Abb. 3-18) nach den Glykosylierungsschritten mit Hydrazindithiocarbonat.^[110]

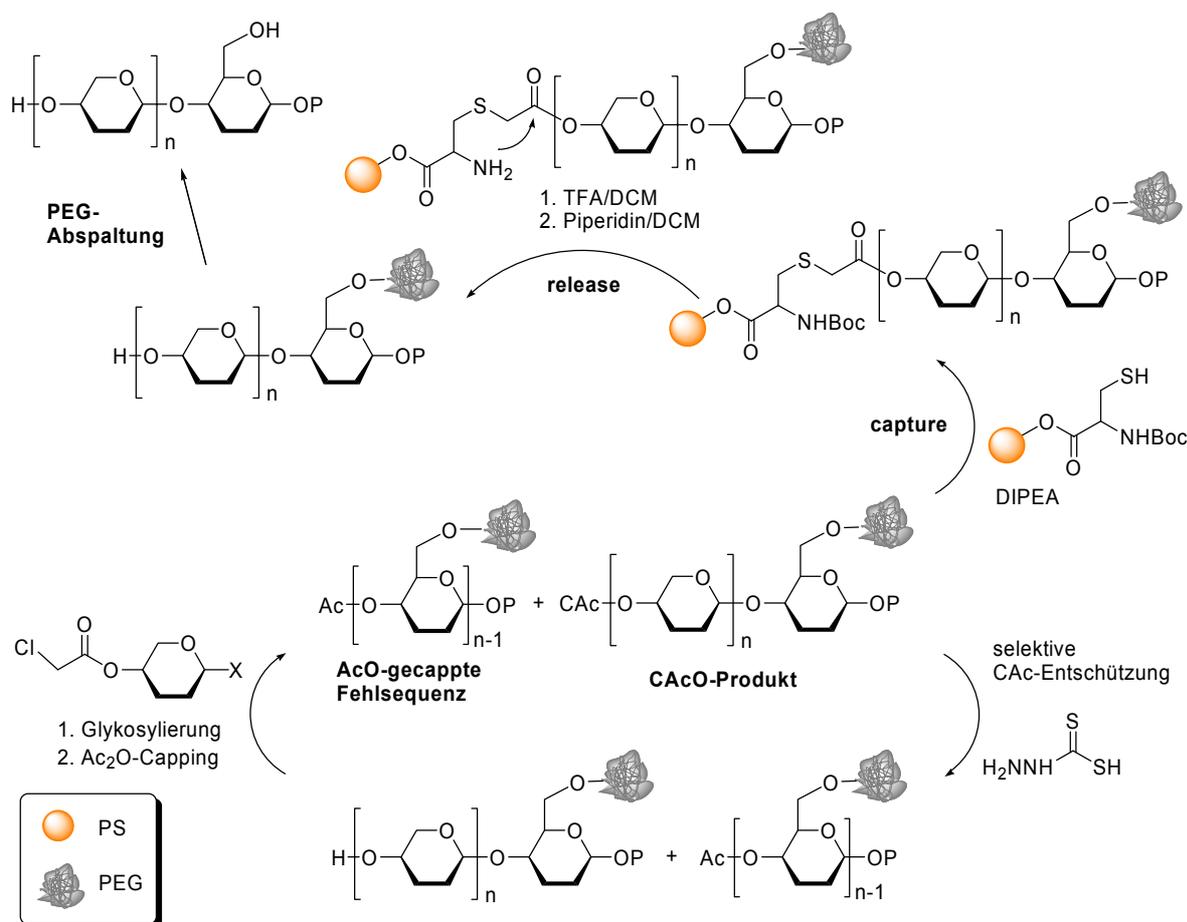


Abb. 3-18: Capture-release Aufreinigung mit Boc-Cystein-PS-Harz am Ende einer Folge von Glykosylierungen mit Chloracetyl-geschütztem Donor. Selektive Entschützung nach dem Capping erlaubt weitere Glykosylierungen. Die Aufreinigung erfolgt auf der Stufe des noch PEG-gebundenen Substrates.

Durch die Möglichkeit, die Chloracetyl-Gruppe des Donors selektiv zu spalten, ohne die Acetyl-Gruppen des Cappings zu beeinträchtigen, kann der *capture-release*-Schritt nur einmalig erst am Ende mit PS-Boc-Cystein (Abb. 3-18) erfolgen anstatt nach jedem Glykosylierungszyklus. Erschwert wird diese Art von Aufreinigung durch den Umstand, daß die Intermediate während der Synthese polymergebunden sind. Somit ist hierfür die Verwendung von löslichen Polymeren als Syntheseträger unumgebar.

Eine weitere *catch-and-release*-Methode, die dasselbe Prinzip von Glykosyldonoren mit reaktiven Schutzgruppen benutzt, basiert auf 4-Azido-3-chlorbenzyl-geschützten Donoren, die mittels *Staudinger*-Reaktion auf Triphenylphosphan-Harz immobilisiert werden können (Abb. 3-19) und oxidativ mit DDQ wieder abspaltbar sind.^[111;112]

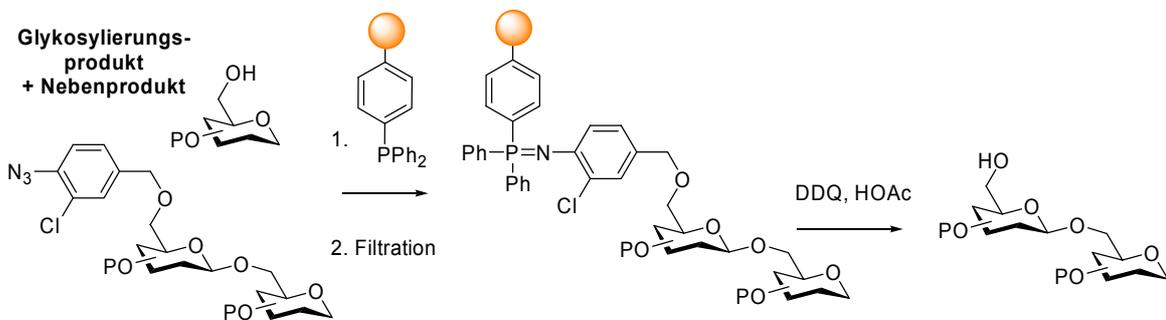


Abb. 3-19: *Catch-and-release* Aufreinigung via *Staudinger*-Reaktion und oxidative Spaltung der erhaltenen *p*-Aminobenzyl- verwandten Schutzgruppe mit DDQ.

Weiterhin findet auch die ungezielte Tag-Markierung des Endproduktes Anwendung in Lösungs- und Festphasensynthese von Kohlenhydraten: Die Einführung eines hydrophoben Tags am Ende der Synthese erleichtert hierbei lediglich die spätere säulenchromatographische Aufarbeitung. Hierfür wird im letzten Schritt beispielsweise ein 2-(Trimethylsilyl)ethyl-Baustein^[105] eingeführt, der nach Entschützen des Zuckers als einzige Schutzgruppe verbleibt und sowohl das Ziel-Oligosaccharid als auch alle Fehlsequenzen für RP-18-Chromatographie hydrophobisiert. Dennoch ist die Auftrennung dadurch einfacher als die eines Kohlenhydrat-Gemisches ohne hydrophobisierenden Tag. Dieselbe Vorgehensweise ist auch mit hydrophilisierenden, kurzkettigen PEG-Tags für die Aufreinigung über Normalphasen-Chromatographie beschrieben.^[113]

3.2.6 Phasenwechsel als Trennungsstrategie der Parallelsynthese

Die ideale Aufarbeitung von Reaktionsgemischen ist es, Produkt und Nebenprodukte/Edukte einer Reaktion jeweils in unterschiedlichen, voneinander einfach abtrennbaren Phasen anzureichern. Unter dem Begriff Phasenwechsel^[114;115] (*phase switching, phase trafficking*) hat dieses allgemeine Konzept Einzug in die neuere Literatur gehalten und ist insbesondere für Parallelsynthesen von herausragender Bedeutung. Die Auftrennung erfolgt anhand einer Phasenmarkierung^[116] (*phase label*), mittels der das markierte Produkt in die gasförmige, flüssige oder feste Zielphase dirigiert werden kann (Tab. 3-4). Die prominenteste Phasenwechsellmethode ist zweifelsohne die festphasenunterstützte Synthese, die als Phasenmarkierung eine polymere Matrix benutzt.

Tab. 3-4: Ineinander unlösliche Phasen, die anhand ihrer Phasenmarkierung voneinander trennbar sind.

| Phasenmarkierung | Phase | Trennungsmethode |
|---------------------|-----------|--|
| (keine) | organisch | Verdampfung, Extraktion, Filtration |
| ionische Gruppe | wässrig | Flüssig/flüssig- oder Festphasenextraktion |
| unlösliches Polymer | fest | Filtration |
| lösliches Polymer | fest | Filtration, Fällung |
| fluorhaltige Gruppe | fluorig | Flüssig/flüssig- oder Festphasenextraktion |

Substrate wie auch Reagenzien, die mit einem hochfluorierten Marker^[117] etwa als Schutzgruppe ausgestattet sind, erlauben die einfache Aufarbeitung durch Extraktion mit fluorierten Lösemitteln, in denen sich weder Wasser noch organische Lösungsmittel lösen.^[114]

Ionische Flüssigkeiten sind Salze mit mindestens einer organischen Komponente und einer delokalisierten Ladung, deren Ionen so schlecht koordiniert sind, daß sie schon bei Temperaturen < 100 °C flüssig sind. Setzt man ionische Flüssigkeiten als Lösungsmittel ein, scheidet sich das organische Produkt von der polaren ionischen Phase ab und kann somit ebenfalls leicht abgetrennt werden. Maßgeschneiderte ionische Flüssigkeiten bieten eine neue Alternative zu polymeren Scavengern.^[118]

Eine Phasenmarkierung für Festphasensynthese kann durch kovalente Permanentmarkierung von Substrat, Reagenz oder Katalysator mit Polymerträger erhalten werden. Reagen-

zien können auch mit einem Tag versehen werden, der selektive Phasenmarkierung erst nach der Reaktion erlaubt, z.B. mittels eines Anthracen-Tags für *Diels-Alder*-Reaktion an polymergebundenem Maleimid.^[119] Norbornenyl-getaggte Reagenzien können durch Ring-Öffnungs-Metathese polymerisiert und dann abfiltriert werden (ROMP-gels).^[120]

Allerdings erlaubt die Einführung eines Tags, also eines spezifischen molekularen Markers im Substratmolekül, auch die nicht-kovalente, reversible Anbindung an einen entsprechend funktionalisierten polymeren Träger. Durch derartige Affinitätstrennung werden homogene Reaktionsführung und Phasentrennung per Filtration vereint. Molekulare Phasenmarker hierfür (Abb. 3-20) sind z.B. der Bipyridyltag,^[121] der Kronenether-tag,^[122] der Barbitursäuretag^[123;124] oder der 4-*tert.*-Butylphenyl-Tag,^[125] der eine hohe Affinität gegenüber β -Cyclodextrin-Trägern zeigt.

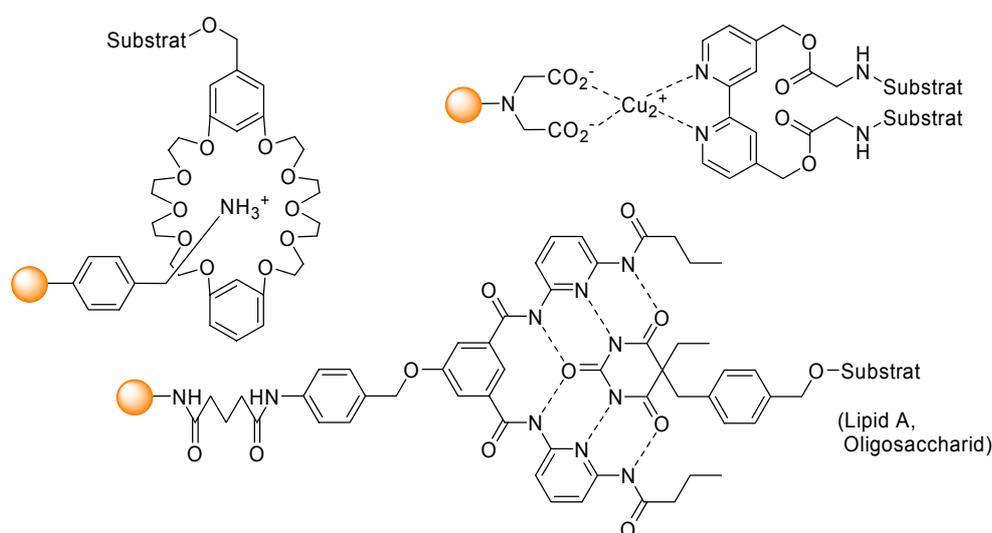


Abb. 3-20: Affinitätslabel zur nicht-kovalenten, reversiblen Immobilisierung von getaggtten Substraten: Kronenether-Tag, Bipyridyl-Tag und Barbitursäure-Tag.

Als unspezifische Marker für diesen Zweck kam z.B. der hydrophobe Tetrabenzoz[a,c,g,i]fluoren-Tag^[126] zum Einsatz, der an Graphit abfiltriert wurde. Weitere Arbeiten verwenden hochfluorierte Schutzgruppen als Tags zur Filtration an fluoriertem RP-Silica, etwa zu Darstellung von Oligosacchariden^[127;128] oder Dendrimer-markiertes Substrat, das mit Größenausschluß-Chromatographiegelen aufgereinigt wurde.^[129]

3.3 Die Angeborene Immunität

Der menschliche Organismus ist ständig mit bis zu 10^{14} Mikroorganismen besiedelt und vielen Fremdstoffen exponiert, die eine permanente Gefahr für Gesundheit und Leben darstellen. Das Immunsystem von Vertebraten vermag es durch eine Vielzahl von Mechanismen nicht nur, Pathogene von Bestandteilen des eigenen Organismus zu unterscheiden und gezielt zu zerstören, sondern verfügt auch über die Fähigkeit, auf unbekannte Pathogene eine spezifische Immunantwort zu entwickeln und diese ständig parat zu halten, so daß aufgrund dieses immunologischen Gedächtnisses eine erhöhte Resistenz gegenüber erneuten Infektionen mit demselben Pathogen besteht. Das Immunsystem wird untergliedert in die angeborene und die erworbene Immunität.

Das erworbene Immunsystem erzeugt kontinuierlich ein hochdiverses Repertoire von Antigenrezeptoren (auf B- und T-Zellen) und beantwortet den Kontakt mit einem Pathogen durch klonale Selektion und Expansion des Antigen-bindenden Lymphozytenklons zu verschiedenartigen Effektorzellen. Dieser adaptive Teil des Immunsystems gewährt ständigen Erwerb und Aufrechterhaltung immunologischer Funktionalität gegenüber einem spezifischen Antigen eines Pathogens durch Proliferation des Antigenrezeptors und Differenzierung von Effektorzellen. Da dieser Prozeß bis zur Funktionstüchtigkeit vier bis sieben Tage beansprucht, ist eine schnelle Sofortabwehr mit der spezifischen erworbenen Immunantwort nicht erreichbar.

Demgegenüber steht die angeborene Immunität als erste Abwehrlinie des Organismus. Neben der Haut als mechanischer Barriere und antimikrobiellen Sekreten von Schleimhäuten beinhaltet diese vor allem die rezeptorvermittelte schnelle Antwort auf konservierte molekulare Muster von Pathogenen. Die Erkennung dieser mikrobiellen Pathogenitätsfaktoren durch das angeborene Immunsystem führt über die Auslösung einer proinflammatorischen Kaskade zu einer lokalen Entzündung; eine Entgleisung dieser Immunantwort kann zum septischen Schock führen.^[130] Verantwortlich hierfür sind Makrophagen, Monocyten, Mastzellen und natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen). Mit Sterblichkeitsraten von 40 % - 60 % gehören Sepsis und septischer Schock trotz aller Fortschritte der Intensivmedizin zu den Haupttodesursachen (9.3 % aller Todesfälle!)^[131] der westlichen Welt, an der 0.3 % der Bevölkerung und 2 % der Krankenhauspatienten erkranken.^[132;133]

Die angeborene Immunität darf nicht völlig losgelöst von der erworbenen Immunität betrachtet werden, beide sind miteinander regulatorisch gekoppelt.

3.3.1 Architektur bakterieller Zellwände

Jede Zelle als kleinste lebensfähige biologische Funktionseinheit ist von einer Plasmamembran aus amphiphilen Molekülen umgeben, die durch räumliche Kompartimentbildung das Cytoplasma vom Zellkern und der Umwelt abtrennt und an welcher gleichzeitig über integrale Bestandteile wie z.B. Rezeptoren und Ionenkanäle alle Austausch- und Signalprozesse stattfinden. Zellen eukaryotischer Organismen wie Pilze, Tiere oder Pflanzen verfügen über einen Zellkern, ein Cytoskelett, Mitochondrien und ggf. Plastide und weisen auch innenliegende Membrankompartimentierung auf.

Zellen prokaryotischer Organismen (Eu- und Archaeobakterien) sind sehr einfach ohne abgegrenzten Zellkern und ohne die meisten Zellorganellen der eukaryotischen Zellen aufgebaut. Ihre DNS liegt frei im Cytoplasma. Aufgrund von Strukturunterschieden bakterieller Zellwände und den dadurch bedingten Permeabilitätsunterschieden bei der Aufnahme bzw. Abgabe von Farbstoffen lassen sich Bakterien anhand ihrer *Gram*-Färbung taxonomisch in *Gram*-positive und *Gram*-negative unterteilen.

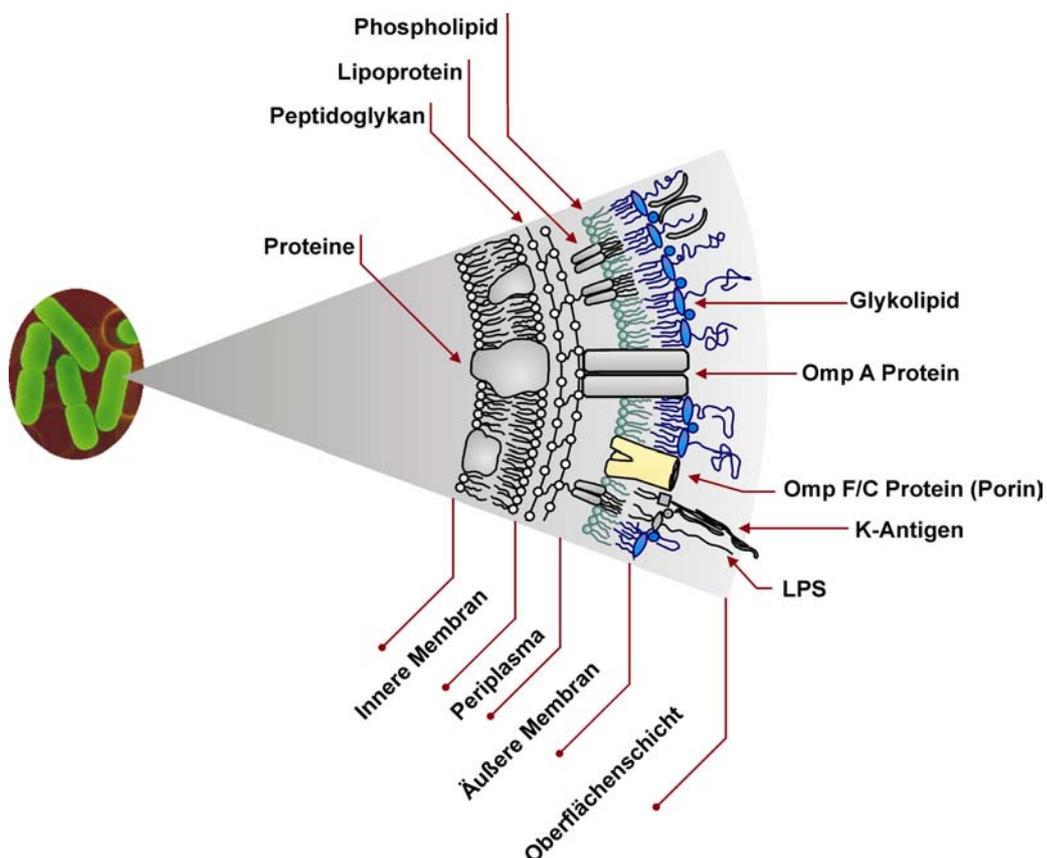


Abb. 3-21: Schematische Darstellung der Zellwand von Gram-negativen Bakterien. Innere symmetrische Phospholipid-Membran, Murein-Periplasma und asymmetrische äußere Membran.

Gram-positive Bakterien (*Firmicutes*) verfügen über eine das Cytoplasma umschließende Lipidmembran, die von vielschichtigem Murein (Peptidoglykan, PGN) umgeben wird. In der innen liegenden Lipidschicht sind Lipoteichonsäuren (LTA) verankert, in der äußeren Mureinschicht Teichonsäuren. Die Glykanenden von beiden ragen bis in den extrazellulären Raum.

Bei Gram-negativen Bakterien (*Gracilicutes*) ist die auf der inneren Membran liegende Peptidoglykanschicht dünner (Abb. 3-21) und von einer zweiten, äußeren Lipidmembran umgeben. Während die innere Membran symmetrisch aus Phospholipiden (Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Diphosphatidylglycerol) aufgebaut ist, ist die äußere Membran asymmetrisch. In diese Strukturmatrix sind periphere und integrale Proteine und Lipoproteine auf- bzw. eingelagert. Das in den extrazellulären Raum weisende Glykolipid Lipopolysaccharid (LPS) ist der Hauptbestandteil der äußeren Membran und die einzige darin vorkommende Lipidkomponente.

Mykobakterien verfügen über eine Cytoplasmamembran, die neben der inneren Membran und Murein aus Lipoarabinomannan (LAB), Arabinogalactan und Mykolsäuren besteht.

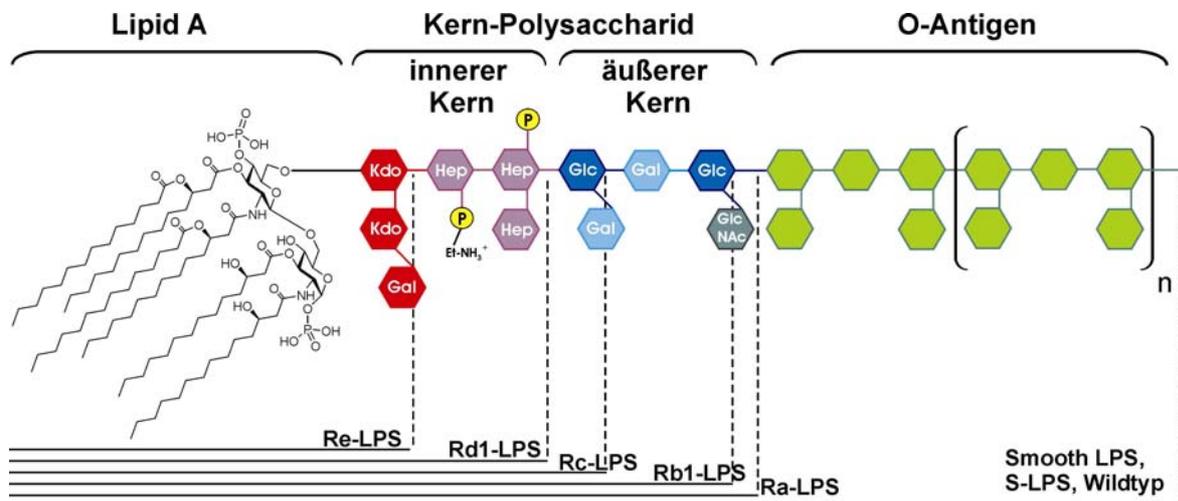


Abb. 3-22: Schematische Darstellung des Aufbaus von Lipopolysaccharid. Das O-Antigen besteht aus bis zu 40 sich wiederholenden n-Einheiten. Lipid A besteht aus acyliertem und phosphoryliertem Glucosamin. R-LPS: verschiedene R-Mutanten, S-LPS: Wildtyp mit morphologisch glatter Bakterienkolonie.

Das LPS-Molekül lässt sich in vier Bereiche untergliedern (Abb. 3-22). Die pyrogene Eigenschaft ist an den Membrananker Lipid A gebunden, ein 1,4'-diphosphoryliertes β -(1 \rightarrow 6)-verknüpftes Glucosamindisaccharid mit mindestens sechs Fettsäuren, die sich in

der Länge zwischen C₁₀ und C₁₆ bewegen und von denen zwei nicht hydroxyliert sind.^[134;135] Das Acylierungsmuster ist meist [4+2] oder [3+3], d.h. entweder zwei Lipide mit insgesamt vier Acylketten am inneren Glucosamin und zwei Acylketten am äußeren Glucosamin (wie in Abb. 3-22 gezeigt), bzw. je eine Monoacylkette und eine über Ester verknüpfte Diacylkette an jedem der beiden Glucosaminsysteme. Der innere Kern des Kernpolysaccharids besteht aus zwei oder mehreren 2-Keto-deoxyoctonsäuren (Kdo) und zwei oder drei L-Glycero-D-manno-Heptosen (Hep). Beide dieser Zucker kommen nur in Bakterien vor. Der äußere Kern ist variabler und umfaßt drei Zucker mit ein oder zwei als Seitenkette angebondenen Zuckern. Das hoch immunogene O-Antigen umfaßt bis zu 40 sich wiederholende Einheiten aus gewöhnlichen Kohlenhydraten. Eine phänomenologische Unterteilung unterscheidet nach Morphologie bei der Bildung von Bakterienkolonien: Je nach Ausbildung der Kohlenhydratdeterminante des LPS, die das O-Antigen und den inneren sowie äußeren Teil des Kernpolysaccharides umfaßt, erscheint die jeweilige Kolonie des produzierenden Bakteriums rau (*rough*, R) oder glatt (*smooth*, S) zu sein. Es existieren verschiedene R-Mutanten und eine S-Mutante (Abb. 3-22). Der Wildtyp, das S-LPS trägt als einziges ein O-Antigen.^[136]

3.3.2 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

Monocyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Epithelzellen verfügen über membranständige Rezeptoren, die befähigt sind, unveränderliche spezifische molekulare Signaturen eines mikrobiellen Pathogens zu erkennen (PAMPs - *pathogen associated molecular patterns*). Einige dieser Rezeptoren (PRRs - *pattern recognition receptors*) gehören zur Familie des zuerst bei *Drosophila* entdeckten Toll-Proteines, das dort bei der Entwicklung der dorsoventralen Achse der Larve und bei Immunantworten auf Pilzinfektionen des adulten Tieres von Relevanz ist.^[137] Elf analoge Rezeptoren sind bis heute als Toll-like Rezeptoren (TLR) bekannt. Sie erkennen insbesondere Zellwandbausteine wie Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykan (PGN), Lipoteichonsäuren (LTA), Lipopeptide^[138] oder Lipoproteine aber auch bakterielles Flagellin, bestimmte virale RNS, oder unmethylierte CpG-Motive bakterieller DNS. Tab. 3-5 liefert einen Überblick über die bis heute bekannten TLR-Liganden.^[139]

Die Antwort auf LPS wird über TLR4 reguliert,^[140] bei Anwesenheit von LTA, PGN und Lipopeptid werden Zellen über TLR2 aktiviert.^[141] TLR2 stellt eine Besonderheit dar, da dieser Rezeptor zur weiteren Ligandenspezifisierung mit anderen TLRs (z.B. TLR1 und TLR6) heterodimere Komplexe bildet.^[142] TLR5 wird durch bakterielles Flagellin aktiviert.^[143] TLR3, TLR7/8 und TLR9 sind endosomal membranständige TLRs, die selektiv durch pathogene RNS- und DNS-Liganden aktiviert werden.^[144;145] Entsprechende intrazelluläre Proteine, die insbesondere PGN-Muster erkennen, sind die NOD1- und NOD2-Rezeptoren.^[146]

Die cytoplasmatische Region von TLR besteht aus einer konservierten Domäne mit drei Regionen, die homolog zum Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R) sind und daher auch TIR-Domäne genannt wird (Toll/IL-1R). Der extrazelluläre Bereich dagegen unterscheidet sich vom IL-1R. TLRs verfügen hier über eine leucinreiche Region (*Leucin-rich repeats*, LRR, vgl. Abb. 3-23) mit 19-25 Kopien eines 24-29 Aminosäuren umfassenden LRR-Motives.^[147]

Tab. 3-5: TLRs, ihre Liganden und deren mikrobieller Ursprung. (*) kennzeichnet Liganden, deren Aktivität auf eine eventuelle Kontamination zurückzuführen ist. Tabelle nach^[139] (modifiziert).

| TLR | Ligand | pathogene Quelle |
|------------|--|---|
| TLR1 | Triacylierte Lipopeptide Lösliche Faktoren | Bakterien, Mykobakterien <i>Neisseria meningitidis</i> |
| TLR2 | Lipoproteine, Lipopeptide Peptidoglykan Lipoteichonsäuren Lipoarabinomannan Phenol-lösliches Modulin Glykoinositolphospholipide (GPI-Anker) Glykolipide Porine Atypisches Lipopolysaccharid Atypisches Lipopolysaccharid Zymosan Hitzeschockprotein 70* | verschiedene Pathogene Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mykobakterien <i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> Pilze Wirt |
| TLR3 | Doppelstrangige RNA | Viren |
| TLR4 | Lipopolysaccharide Taxol Fusionsproteine Hüllproteine Hitzeschockprotein 60*, 70* Fibronektin-Typ III Domänen Hyaluronsäure-Fragmente* Heparinsulfat-Fragmente* Fibrinogen* | Gram-negative Bakterien Pflanzen Syncytialer Atemwegsvirus Murines Mammakarzinomvirus <i>Chlamydia pneumoniae</i> , Wirt Wirt Wirt Wirt |
| TLR5 | Flagellin | Begeißelte Bakterien |
| TLR6 | Diacylierte Lipopetide, Lipoteichonsäure Zymosan | Mykoplasma Gram-positive Bakterien Pilze |
| TLR7, TLR8 | Einzelstrangige RNA Imidazochinolin | Viren (Synthetische Verbindungen) |
| TLR8 | Loxoribin, Bropirimin | (Synthetische Verbindungen) |
| TLR9 | CpG enthaltende DNA | Bakterien und Viren |
| TLR10 | (<i>unbekannt</i>) | (<i>unbekannt</i>) |
| TLR11 | (<i>unbekannt</i>) | Uropathogene Bakterien |
| NOD1 | Peptidoglykan | Gram-negative Bakterien |
| NOD2 | Peptidoglykan | Gram-positive Bakterien |

3.3.3 Die Toll-like Rezeptor-abhängige Signaltransduktion

Die Signalkaskaden, mittels derer TLRs auf mikrobielle Pathogene reagieren, sind hochkomplexe Vorgänge. Das Wissen über TLR und ihrer Signalgebung hat sich zwar in den vergangenen Jahren vervielfacht, ist aber nach wie vor ein längst nicht abgeschlossenes, hochaktuelles und daher stark beforschtes Themengebiet. Aufgrund der Komplexität der einzelnen Systeme sei hier nur sehr allgemein auf die Thematik eingegangen.

Nach Aktivierung der TLR durch einen pathogenen Liganden werden intrazelluläre Adapterproteine an die TIR-Domäne des TLR angelagert. TLR4 benötigt für eine erfolgreiche Endotoxin-Signalgebung eine Reihe von Korezeptoren wie LBP^[148] (*LPS-binding protein*), MD-2^[149] und CD14.^[150]

Die wichtigsten Adapterproteine sind hier das von allen TLR genutzte MyD88^[151] (*myeloid differentiation primary-response protein 88*) und die Kinasen der IRAK-Familie^[152;153] (*IL-1R-associated kinase*). Diese Phosphorylierungsschritte aktivieren wiederum MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinase*) und IKK (*inhibitor of nuclear factor- κ B-kinase complex*). IKK aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B, dieser transloziert und kann im Zellkern die Expression von Cytokinen anschalten (Abb. 3-23). Durch die Transkription der Zielgene werden inflammatorische Cytokine wie z.B. TNF- α (*tumor necrosis factor*), Interleukine und Chemokine produziert, die das erworbene Immunsystem anschalten, was zur lokalen Entzündung führt.

Ein aktueller umfassender Review erlaubt einen detaillierteren Einblick in die TLR-Signalkaskaden.^[139]

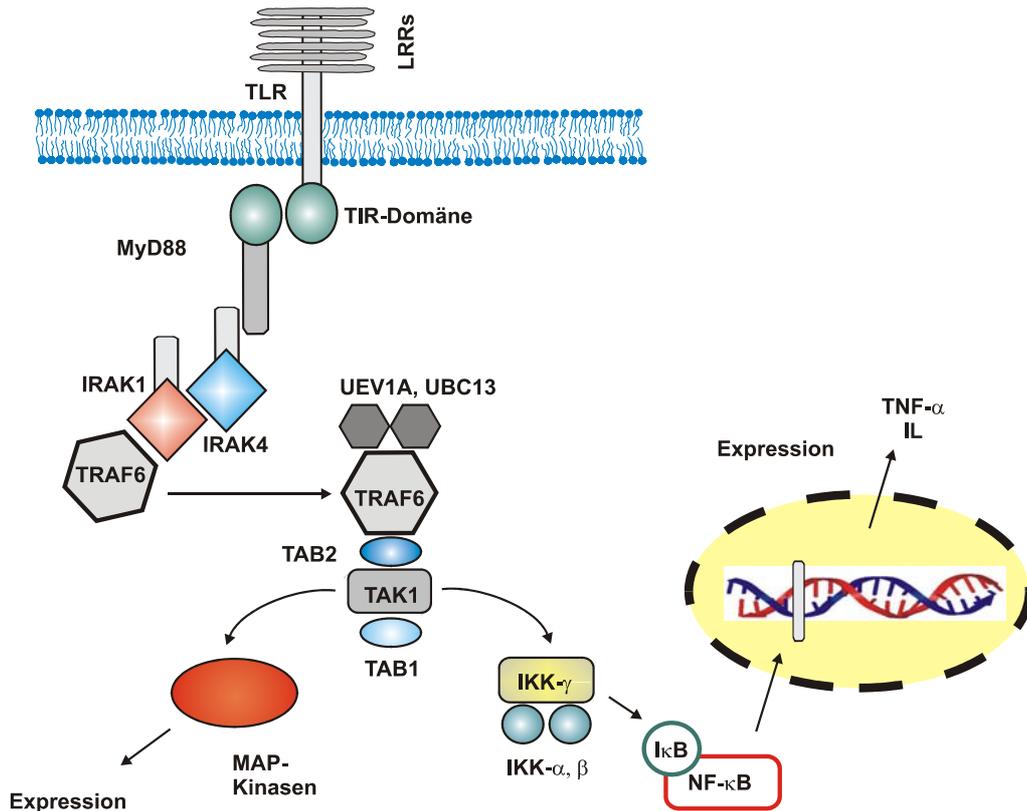


Abb. 3-23: Schematische und vereinfachte Darstellung der TLR-Signalkaskade: TLR-Stimulation führt zur Bindung von MyD88, das IRAK4 rekrutiert und damit die Assoziation von IRAK1 ermöglicht. Das phosphorylierte IRAK1 assoziiert wiederum mit TRAF6 (tumor-necrosis-factor-receptor associated factor 6). TRAF6 und phosphoryliertes IRAK1 dissoziieren daraufhin vom Rezeptor und bilden mit TAK1 (transforming-growth-factor- β -activated kinase), TAB1 (TAK1 binding protein 1) und TAB2 einen Komplex. Dies induziert Phosphorylierung von TAB2 und TAK1. IRAK1 wird abgebaut und transloziert ins Cytosol, wo die Ubiquitin-Ligasen UEV1A und UBC13 assoziiert werden und den TRAF6-Komplex ubiquitinylieren, wodurch TAK1 aktiviert wird. TAK1 schließlich phosphoryliert MAP-Kinasen und den IKK-Komplex (inhibitor of nuclear factor- κ B-kinase). Der IKK-Komplex phosphoryliert I κ B (inhibitor of nuclear factor κ B), der an NF- κ B gebunden ist, um dessen Translokation in den Zellkern zu verhindern. Die Phosphorylierung erlaubt die Translokation von NF- κ B in den Zellkern, wo es nach Bindung am NF- κ B-Bindungsmotiv die Expression von Cytokinen auslöst.^[139]

3.4 Rhamnolipide

3.4.1 Nomenklatur und Charakteristika von Rhamnolipiden

Glykolipide, die L-(+)-Rhamnose und β -Hydroxyalkansäuren enthalten und allgemein als Rhamnolipide bezeichnet werden, sind bereits seit 1946 bekannt, als sie zum ersten Mal in *Pseudomonas aeruginosa* (frühere Bezeichnung *Pseudomonas pyocyanea*, zur Taxonomie vgl. 3.4.2) gefunden wurden.^[154]

Es existiert bisher keine einheitliche Nomenklatur für Rhamnolipide, so daß zur eindeutigen Bezeichnung struktureller Varianten von Rhamnolipiden in dieser Arbeit folgende Systematik verwendet wurde (Abb. 3-24). Die Benennung setzt sich zusammen aus:

- **RL-** für Rhamnolipid
- der Zahl **N** der α -(1 \rightarrow 2)-glykosidisch ver- und angeknüpften Rhamnose
- der Zahl **M** der miteinander veresterten 3-(*R*)-Hydroxyfettsäuren
- dem Index **k**, der die Gesamtlänge der Fettsäure(n)kette(n) wiedergibt; existieren unterschiedlich lange Fettsäuren im Molekül, so wird dies mit zusätzlichen Indices **l, m...** für die weiteren Ketten angegeben. Es wird stets von (*R*)-konfigurierten, gesättigten 3-Hydroxyfettsäuren ausgegangen; (*S*)-konfigurierte und ungesättigte Fettsäuren werden im Index gekennzeichnet, z.B. als RL-1,2(*S*)_{14,18:9c}-COOH
- der Funktionalität der Kopfgruppe; hier wird zwischen Säuren (-COOH), Alkoholen (-OH), Estern (-COOR) und Carboxylaten unterschieden (-COO⁻).

Diese Nomenklatur erlaubt es, im vorgestellten Kürzel die Abfolge der strukturellen Einheiten beginnend am terminalen Kohlenhydrat einfach abzulesen.

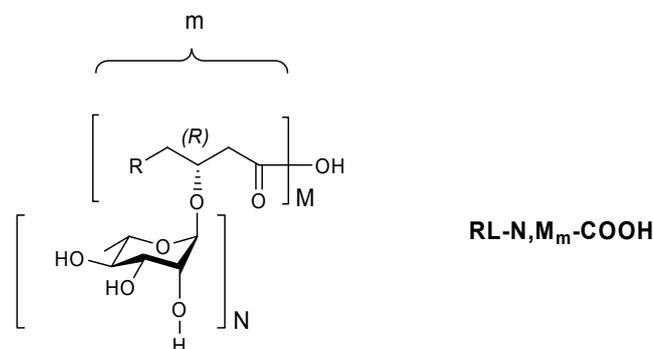


Abb. 3-24: Systematische Bezeichnung struktureller Varianten von Rhamnolipiden - Rhamnolipidsäure mit *N* α -verknüpften Rhamnose und *M* 3-(*R*)-Hydroxyfettsäuren der jeweiligen Gesamtlänge **k** (**l, m**).

Eine chemische Synthese von Rhamnolipiden wurde trotz ihrer Bekanntheit bislang nur von einem einzigen Rhamnolipid beschrieben: Das Rhamnolipid RL-2,2₁₀ wurde von der Gruppe um *van Boom* als Methylester RL-2,2₁₀-COOMe^[155] und in methodischer Verbesserung später als freie Säure RL-2,2₁₀-COOH^[156] dargestellt.

Die dominierende Eigenschaft von Rhamnolipiden ist ihre ausgeprägte Oberflächenaktivität. Biologisch relevante Tenside lassen sich grob untergliedern in hoch- und niedermolekulare Tenside. Die niedermolekularen Tenside sind dabei generell Lipopeptide wie z.B. die Polymyxine und Streptofactin^[157] oder Glykolipide, welche bis auf wenige Ausnahmen Rhamno-, Sophoro- oder Trehalolipide sind (Abb. 3-25).

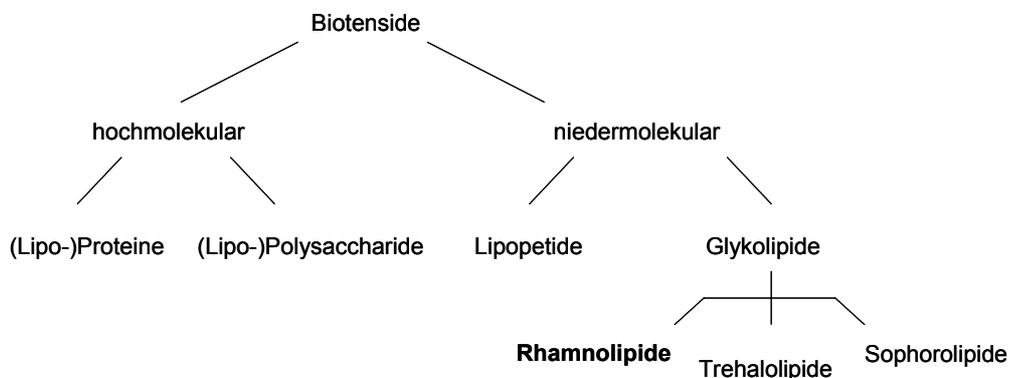


Abb. 3-25: Übersicht über die wichtigsten natürlich vorkommenden und biologisch relevanten Tenside.

In der Natur besitzen Tenside verschiedene Aufgaben: Die Vergrößerung einer hydrophoben Wachstumsfläche, die Erhöhung der Bioverfügbarkeit wasserunlöslicher Substrate, die Entfernung toxischer Schwermetalle mittels Emulsion sowie die häufig vorhandene antimikrobielle Aktivität zeigen, daß Biotenside ihre mikrobiellen Erzeuger zur Existenz in ökologischen Nischen befähigen und ihnen einen evolutionären Vorteil verschaffen.^[158] Am besten sind diesbezüglich die Rhamnolipide charakterisiert. Sie vermögen es, die Oberflächenspannung des Wassers von 72 mNm^{-1} auf unter 30 mNm^{-1} und die Grenzflächenspannung von Wasser/Öl-Systemen von 43 mNm^{-1} auf Werte unter 1 mNm^{-1} zu reduzieren.^[159] Auch vom biologischen Standpunkt aus betrachtet sind Rhamnolipide bereits als attraktive Verbindungen aufgefallen, sie sind bakterizid,^[160;161] toxisch gegen Mykoplasmen und antiviral;^[21] für einen Vertreter werden immunmodulierende Eigenschaften bei Autoimmunerkrankungen postuliert^[162].

3.4.2 Mikrobielle Gewinnung von Rhamnolipiden

Verschiedene Bakterienstämme sind in der Lage, Rhamnolipide zu produzieren. Insbesondere ist dies eine bekannte Eigenschaft von Vertretern der gramnegativen und aeroben Gattung *Pseudomonas*, aber auch von *Acinetobacter calcoaceticus* und *Rhodococcus erythropolis*.^[163] Am bedeutendsten ist hierfür die in der Natur weit verbreitete Gattung der Pseudomonaden, eine Klasse anspruchsloser, meist als Saprophyten lebender Bakterien mit einfachen Nährstoffanforderungen, die eine Vielzahl von organischen Verbindungen bis hin zu Aromaten als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen können. Dieser flexible Metabolismus zeichnet die *Pseudomonas*-Arten aus und daher wird ihre Verwendung für den Abbau von Öl-, PCB- und anderwertig kontaminierten Böden untersucht.^[164]

Rhamnolipide wurden erstmalig 1946 als Exotoxin von *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert.^[154] Eine Strukturaufklärung gelang 1949.^[165] Seither wurde die mikrobielle Gewinnung von Rhamnolipiden aus Pseudomonaden bis zur industriellen Anwendung verbessert.^[166] Grund dieser Entwicklung ist der großtechnische Zugang zur wertvollen L-(+)-Rhamnose, die industriell bisher aus Rutin, Hesperidin oder Naringin erhalten wird, welche jeweils durch extraktive Verfahren aus Citrusfrüchten gewonnen werden müssen.

Da zur Taxonomie der Gattung *Pseudomonas* früher unspezifische, morphologische Merkmale herangezogen wurden, entwickelte sich diese Gruppe zu einer Art Auffangbecken für unvollständig charakterisierte Arten. Durch neuere molekulargenetische Untersuchungen wurde die Art *Pseudomonas aeruginosa* im phylogenetischen Baum den γ -Proteobakterien richtig zugeordnet, während z.B. *Pseudomonas pseudomallei* (Basionym - alter Name) den β -Proteobakterien zugeordnet werden mußte, daher einen anderen Gattungsnamen erhielt und heute als *Burkholderia pseudomallei* richtig klassifiziert ist.

Aus *Pseudomonas aeruginosa*, dem nach *Escherichia coli* zweithäufigsten Erreger nosokomialer Infektionen,^[167] können mehrere strukturell verwandte Rhamnolipide isoliert werden^[165;168;169]. Das Spektrum der produzierten Rhamnolipide umfaßt einfach und zweifach glykosylierte Lipideinheiten, es werden ausschließlich α -(1 \rightarrow 2)-glykosidisch ver- und angeknüpfte Rhamnosin gefunden. Mehr Variation findet man im Lipidteil vor. Hier können Mono- und Dilipide gebildet werden, die jeweils aus 3-(*R*)-Hydroxyfettsäuren bestehen und je nach Fermentationsbedingungen in ihrer Länge variieren. Die primär zu findende Dilipideinheit ist das Dilipid aus zwei veresterten 3-(*R*)-Hydroxycaprinsäuren (C₁₀).

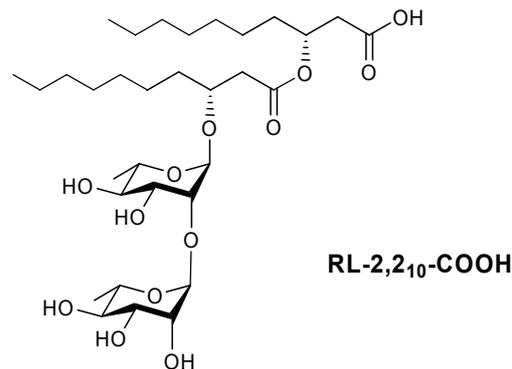


Abb. 3-26: Das Rhamnolipid RL-2,2₁₀-COOH, der bei weitem am häufigsten gefundene Vertreter mikrobiell hergestellter Rhamnolipide.

Die beteiligten Enzyme des Lipid-Biosynthesewegs sind nicht hochspezifisch - der Aufbau von Fettsäuren der Länge C₈ bis C₁₈ findet in geringem Maße statt.^[170] Weitere Variationen wurden gefunden, in denen eine dritte, ungesättigte Fettsäurekette in 2-Position der Rhamnose angebracht war.

Die gleichen Rhamnolipide findet man auch in *Burkholderia pseudomallei*, dem Pathogen der Melioidose, einer in den Tropen bei Mensch und Tier vorkommenden Infektionskrankheit. Hier werden sowohl die freien Säuren als auch die Methylester gefunden^[171]. Wiederrum dominiert die Produktion von Rhamnolipiden mit 3-(*R*)-Hydroxycaprinsäuren (C₁₀) im Dilipid gegenüber den Varianten mit anderer Kettenlänge; hier konnten auch die Vertreter mit 3-(*R*)-Hydroxymyristinsäuren (C₁₄) isoliert werden.^[22]

In *Burkholderia plantarii* konnten die Rhamnolipide RL-1,2₁₄-COOH und RL-2,2₁₄-COOH ebenfalls gefunden werden, die wie Lipid A Myristylester im Lipidteil aufweisen und deren bis dato unveröffentlichte immunologischen Eigenschaften die Motivation dieser Arbeit darstellen.

Bei allen genannten Bakterienstämmen wird übereinstimmend beobachtet, daß nach Abreicherung der Stickstoffquelle und dem Übergang in die stationäre Wachstumsphase vermehrt Rhamnolipide gebildet werden. Das für die Kultivierung verwendete Kohlenstoffsubstrat hat generell keinen Einfluß auf die Struktur der Rhamnolipide. Als günstige Kohlenstoffquellen haben sich Glycerin, Glukose, *n*-Alkane, Paraffin, Sojaöl und Triglyceride erwiesen, sogar Phenanthren konnte verwendet werden.^[159]

3.4.3 Biosyntheseweg von Rhamnolipiden

Die Biosynthese von Rhamnolipiden in Bakterienkulturen von *Pseudomonas aeruginosa* ist an zentrale Stoffwechselwege wie die Fettsäure-Biosynthese und dTDP-aktivierte Zucker geknüpft sowie an Enzyme, die am Aufbau des Exopolysaccharides Alginate beteiligt sind. Das Enzym, das im Biosyntheseweg die Dilipid-Vorläufer der Rhamnolipide aus dem generellen Fettsäureweg abzweigt, ist das Enzym RhlG, eine NADPH-abhängige Ketoacyl-Reduktase. Ein Review^[170] erlaubt eine sehr gute Übersicht über die beteiligten Enzyme sowie ihre Genloci und die bislang bekannten Ergebnisse über die Gen-Regulation der Rhamnolipid-Produktion.

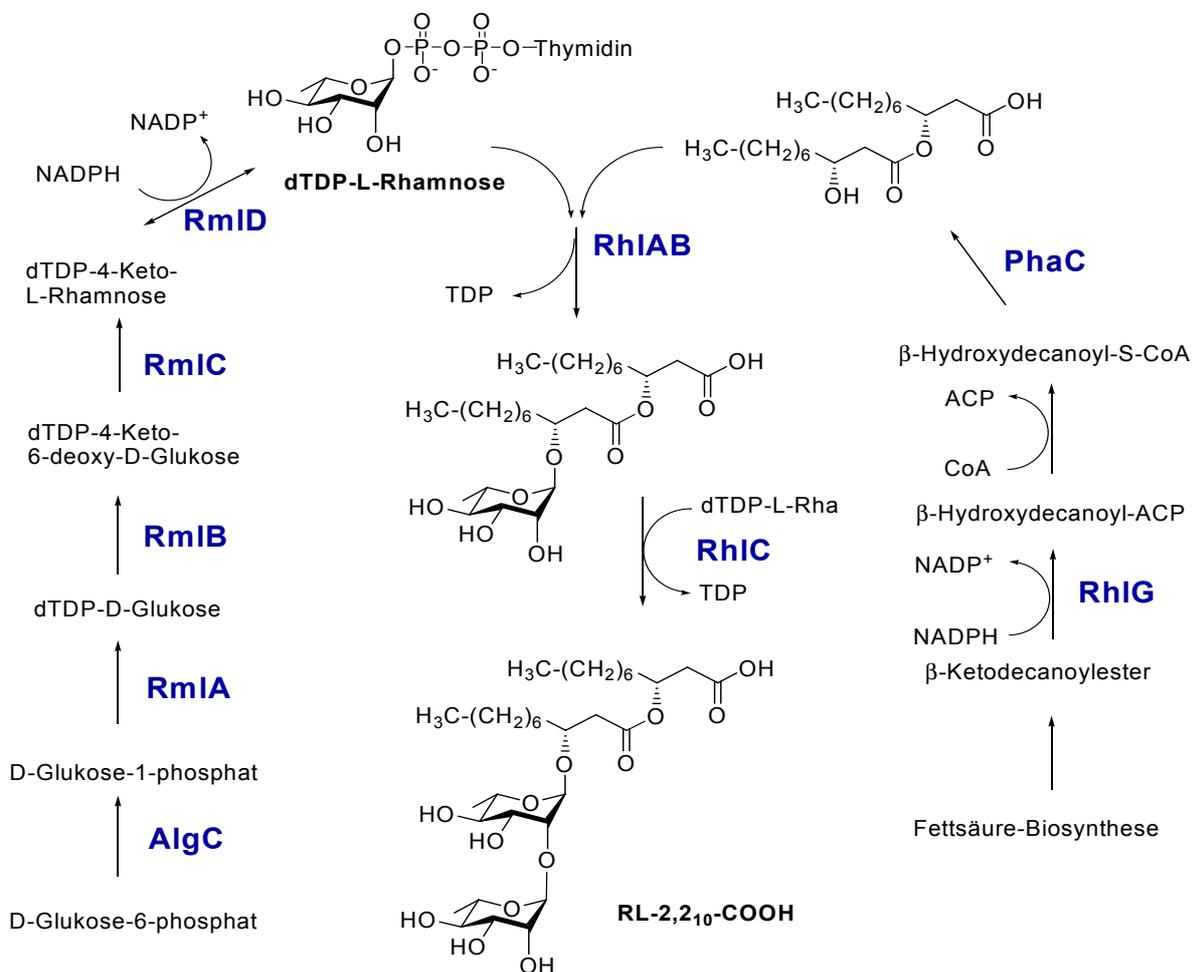


Abb. 3-27: Biosyntheseweg von Rhamnolipid RL-2,2₁₀-COOH in *Pseudomonas aeruginosa*.^[170] Abkürzungen: ACP = Acyl carrier protein; AlgC = Alginatsynthase; CoA = Coenzym A; dTDP = Thymidin-5'-diphosphat; PhaC = Polyhydroxyalkanoat-Synthase; RmlA = D-Glukose-1-phosphat-thymidylyl-Transferase; RmlB = dTDP-D-Glukose-4,6-Dehydratase; RmlC = dTDP-4-Keto-6-deoxy-D-hexulose-3,5-Epimerase; RmlD = dTDP-4-Keto-L-rhamnose-Reduktase; RhlAB = Rhamnosyltransferase 1; RhlC = Rhamnosyltransferase 2.

3.4.4 Immunologische Eigenschaften von Rhamnolipiden

3-(*R*)-Hydroxycaprinsäuren (C₁₀) enthaltende Mono- und Dirhamnolipide aus *Pseudomonas aeruginosa* vermögen die Phagozytose durch Makrophagen zu inhibieren. Dieser Effekt wird begleitet durch Histamin-Freisetzung aus Mastzellen und Ausschüttung von Interleukinen, ohne daß hier Cytotoxizität beobachtet wurde.^[172;173]

Das aus *Burkholderia pseudomallei* isolierte RL-2,2₁₄-COOH wirkt auf humane sowie auf Maus- und Schaferythrocyten hämolytisch. Humane Erythrocyten erwiesen sich dabei als etwa doppelt so sensitiv wie die murinen oder die Schaferythrocyten. Die Hämolyse wird neutralisiert durch humanes oder bovines Albumin, nicht aber durch humanes oder bovines γ -Globulin. Zusätzlich kann ein zeit- und dosisabhängiger cytotoxischer Effekt auf phagozytische (HL60) und nicht-phagozytische (HeLa) Zellen beobachtet werden. Serum-Albumine inhibieren diesen cytotoxischen Effekt. Die gefundenen Aktivitäten wurden von den Autoren auf den Detergenscharakter der hitzestabilen Rhamnolipide und deren direkte Einwirkung auf die Zellmembran zurückgeführt.^[22]

Weiterführende Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe zeigten, daß die Actin-Cytoskelettstruktur, die bei eukaryotischen Zellen für dynamische Prozesse wie Zellmotilität, Phagozytose und Zellwachstum entscheidend ist, durch Rhamnolipide stark beeinträchtigt wird. Bereits niedere Konzentrationen der Rhamnolipide führen zu starken morphologischen Veränderungen durch die Umorganisation des Cytoskelettes der Zelle und damit zu einer Beeinflussung zellulärer Funktionen, ohne die Vitalität der Zelle zu beeinträchtigen. Durch Exposition wird das Zellwachstum gestört, der Zellzyklus wird auf der G₀/G₁-Phase angehalten, Rhamnolipid RL-2,2₁₄-COOH zeigt hier einen cytopathischen Effekt. Die Internalisierung von lebenden *Burkholderia pseudomallei*-Bakterien durch Makrophagen ist nach Behandlung mit Rhamnolipid daher ebenfalls reduziert.^[174]

Eine wichtige regulatorische Rolle für Änderungen des Cytoskelettes scheinen die kleinen GTPasen (Rho, Rac, Cdc42) zu spielen.^[175] Jedoch wurde unlängst ein extrazelluläres Polyketid-Lipid, das Mycolacton von *Mycobacterium ulcerans* beschrieben, das ebenfalls einen regulatorischen Effekt aufweist und auf eine dem RL-2,2₁₄-COOH sehr ähnliche Art und Weise in den Zellzyklus eingreift.^[176;177]

Die Eigenschaft, daß RL-2,2₁₄-COOH mononukleäre Zellen (MNC) zu stimulieren vermag, ist bis heute in der Literatur unbekannt. Es induziert in humanen Monocyten eine effiziente Immunantwort durch Freisetzung von TNF- α . Das Wirkprinzip ist hier noch

unaufgeklärt. Wie bei Lipopolysaccharid konnte auch bei RL-2,2₁₄-COOH die Cytokin-Induktion durch Polymyxin B, einem bekannten Inhibitor endotoxischer Aktivität, drastisch inhibiert werden. Durch Versuche mit CHO-Zelllinien (*chinese hamster ovary*) konnte gezeigt werden, daß diese Stimulation unabhängig von den Toll-like Rezeptoren TLR4 und TLR2 verläuft, die für die Erkennung von Lipopolysaccharid respektive Lipopeptid relevant sind. Hierfür wurden CHO/CD14-Zellen (natürliche TLR2-knockout-Zelle) und CHO/CD14-hTLR2-Zellen verwendet.^[23]

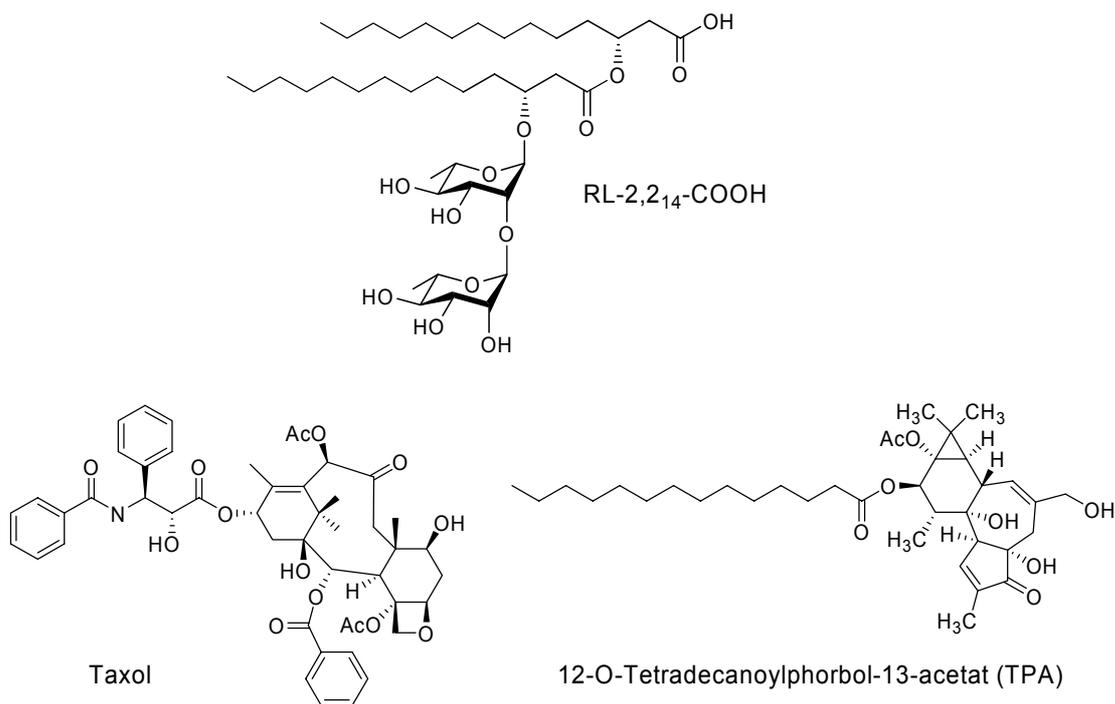


Abb. 3-28: Niedermolekulare Stimulatoren der Immunantwort: RL-2,2₁₄-COOH, Taxol und Phorbol ester.

Das konformative Konzept - die Korrelation physikochemischer Parameter von Endotoxinen mit ihrer biologischen Aktivität - ist auch für Rhamnolipide in der Diskussion.^[23] Ähnlich wie Lipopolysaccharid, Lipid A und ein Glykolipid aus *Mycoplasma fermentans* bildet auch das Rhamnolipid RL-2,2₁₄-COOH eine kubische Aggregatstruktur aus, die als Bedingung für die endotoxische Aktivität amphiphiler Virulenzfaktoren verstanden werden darf.^[178;179]

Bis heute sind kaum niedermolekulare Stimulatoren des angeborenen Immunsystems bekannt. Als gefestigte niedermolekulare Induktoren gelten das Taxol und das Proteinkinase C aktivierende 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) (Abb. 3-28). Während das

zytostatisch wirksame Diterpen Taxol CD14-, TLR4- und CD11b/CD18-abhängig eine LPS-ähnliche Immunantwort induziert, stimuliert der cocarcinogene TPA-Phorbolester TLR2- und TLR4-vermittelt; hierbei wird eine starke TPA-induzierte CD14- und TLR2-Expression beobachtet. ^[180-182]

Die vorgestellten immunologischen Eigenschaften von RL-2,2₁₄-COOH deuten darauf hin, daß die Interaktion zwischen Rhamnolipid und Zellen nicht lediglich auf einem unspezifischen Detergensmechanismus beruht, wie in einer frühen Veröffentlichung^[22] vermutet wurde. Eine spezifische Interaktion mit einem noch unbekanntem Rezeptor bzw. über ein noch nicht bekanntes Wirkprinzip kann nicht ausgeschlossen werden und stünde im Einklang mit den gemachten Beobachtungen.

4 Ergebnisse

4.1 Synthesekonzipierung

Das Ziel des synthetischen Teils dieser Arbeit war es, ein Protokoll zu entwerfen, das einen effizienten, parallelisierbaren Zugang zu Rhamnolipiden gewährt. Dies wird am einfachsten durch die Konzeption als Festphasensynthese erreicht. Zusätzlich ist ein Festphasenprotokoll aufgrund des ausgeprägten amphiphilen Charakters von Rhamnolipiden und den damit verbundenen Problemen einer Aufreinigung zu bevorzugen, da die Phasentrennung am Polymer unproblematisch ist. Für die Festphasensynthese spricht weiterhin, daß die Zielverbindungen aufgrund ihres linearen Charakters strategisch mittels repetitiver Synthese aufgebaut werden können.

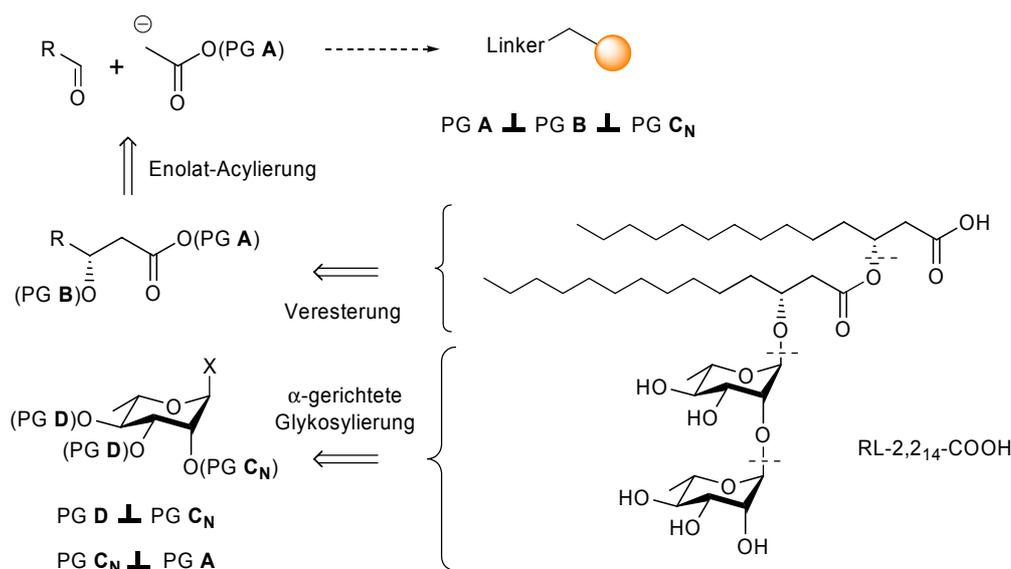


Abb. 4-1: Retrosynthese von RL-2,2_{14'}-COOH und notwendige Schutzgruppenorthogonalitäten.

Die retrosynthetische Betrachtung (Abb. 4-1) des RL-2,2_{14'}-COOH zeigt schnell, daß die vier notwendigen Bausteine mittels Veresterung und α -gerichteter Glykosylierung verknüpft werden können. Ein für iterative Synthese geeigneter Kohlenhydratbaustein muß orthogonal geschützt sein, seine Schutzgruppe PG C_N muß einen Nachbargruppeneffekt während der Glykosylierung erlauben. Die Fettsäurebausteine können durch Aldol-artige Acylierung einer geeigneten Enolatkomponente erhalten werden. Als terminale Schutzgruppe PG A bietet sich die Wahl einer polymeren Schutzgruppe an.

4.2 Darstellung geeigneter Rhamnosendonoren

4.2.1 Butan-2,3-diacetal (BDA) als 3,4-selektive Rha-Schutzgruppe

Die Struktureinheit der α -(1 \rightarrow 2)-glykosidisch verknüpften Rhamnoside in den projektierten Verbindungen erforderte die selektive Blockierung der 3,4-OH-Gruppen von Rhamnose. Erreichbar ist dieses Schutzgruppenmuster ausgehend von 2,3,4-ungeschützten Rhamnosiden über Benzylidenacetal-Bildung an der 2- und 3-Position mit Benzaldehyddimethylacetal, Benzylierung der 4-Position und anschließender 2-selektiver Öffnung des exo-Benzylidenacetals mittels LiAlH_4 und AlCl_3 .^[155] Eine weitaus elegantere Methode besteht in der Verwendung von cyclischen Diketal-Schutzgruppen, die die selektive Einführung des erwünschten Schutzgruppenmusters an dem *trans*-diäquatorialen, vicinalen Diol in einem Schritt erlauben.^[183]

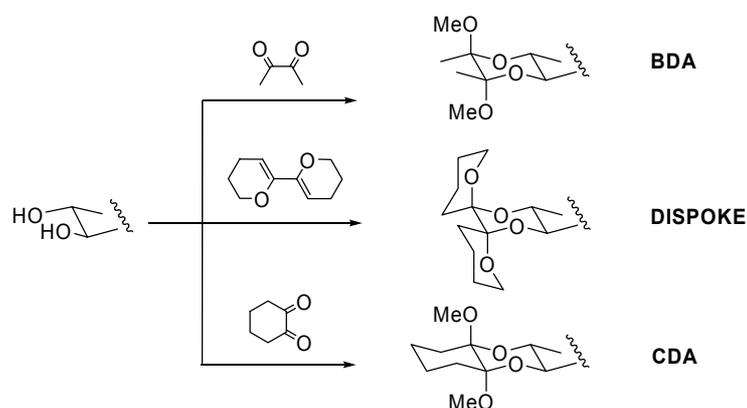


Abb. 4-2: Cyclische Diketal-Schutzgruppen: Butan-1,2-diacetal aus Butan-2,3-dion, Dispiroketal mittels 3,3',4,4'-Tetrahydro-6,6'-bis-2H-pyran (bis-DHP) und Cyclohexan-1,2-diacetal aus Cyclohexan-2,3-dion.

Die wesentlichen Vertreter dieser Schutzgruppen sind die Cyclohexan-1,2-diacetal-(CDA)^[184], die Dispiroketal- (DISPOKE)^[185] und die Butan-2,3-diacetal- (BDA)^[186] Gruppe (Abb. 4-2). Ihre außergewöhnlichen Selektivitäten begründen sich in einem starken Anomereffekt an den beiden Acetalzentren, einem thermodynamischen Effekt durch Ausbildung eines Ringsystemes und einem sterischen Effekt durch äquatoriale Anordnung der Alkylreste. Der für die Einführung der DISPOKE-Gruppe erforderliche bis-Tetrahydropyranether ist hochgradig feuchtigkeitssensitiv und relativ teuer. Zudem sind die damit erzielbaren Ausbeuten nicht in dem Bereich, wie sie für die CDA- und BDA-Schutzgruppen beschrieben sind. Die Wahl der Schutzgruppe für die 3,4-Position fiel somit auf die BDA-Gruppe. Ausgehend von Ethyl-1-thio- α -L-rhamnopyranosid **2**, das durch

BF₃•OEt₂-katalysierte Glykosylierung mit Thioethanol aus Tetra-*O*-acetyl- α,β -L-rhamnopyranose **1** einfach erhalten wurde,^[187] konnte die BDA-Schutzgruppe durch *p*-TosOH-katalysierte Acetalisierung mit Butan-2,3-dion unter thermodynamisch kontrollierter Reaktionsführung installiert werden.

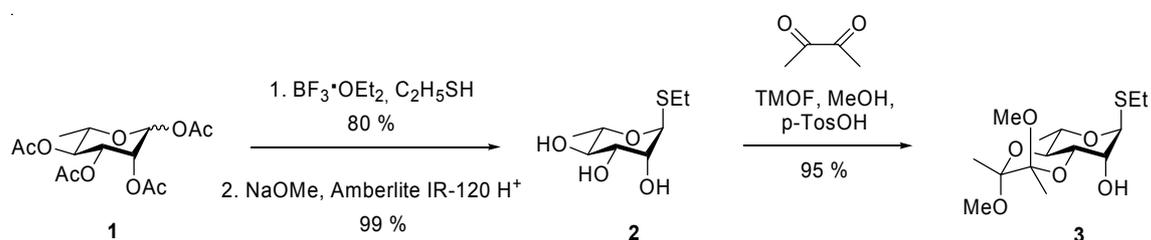


Abb. 4-3: Selektive Installierung der BDA-Schutzgruppe in 3,4-Position des Thiorhamnosides **2**.

Die Verwendung von Methanol als Lösungsmittel und Reagenz sowie der Einsatz von Trimethylorthoformiat zum Abfangen von freiwerdendem Wasser begünstigen die Gleichgewichtslage der Acetalisierungsreaktion derart, daß die Einführung des gewünschten Schutzgruppenmusters in einem Schritt mit 95 % Ausbeute selektiv zum 3,4-BDA-Rhamnosid gelang (Abb. 4-3). Ein zusätzlicher Vorteil der BDA-Gruppe ist die Umgehung einer hydrogenolytischen Benzyl-Abspaltung am Ende der Synthese.

4.2.2 Phenoxyacetat (POAc) als geeignete orthogonale 2-Hydroxy-Schutzgruppe des Donors

Die Schutzgruppe in Position 2 an BDA-Rhamnosid **3** mußte zwei Kriterien gerecht werden: Sie mußte a) einen Nachbargruppeneffekt während der Glykosylierung ermöglichen und b) orthogonal zu allen anderen Schutzgruppen bzw. funktionellen Gruppen der Rhamnolipide entfernbare sein. Für die Gewährleistung eines α -dirigierenden Nachbargruppeneffektes kommen hier prinzipiell Ester und Carbamate in Frage, allerdings muß beachtet werden, daß Rhamnolipide selbst Ester beinhalten. Ester-Schutzgruppen, die selektiv in Gegenwart anderer Ester entfernt werden können, sind beispielsweise Halo- und Alkoxy-substituierte Ester wie der Phenoxyacetat-Ester. Dieser kann aufgrund der aktivierenden Phenoxygruppierung unter milden Bedingungen z.B. in Gegenwart eines Benzoates mit 8 M MeNH₂/EtOH^[188] oder bereits mit Guanidin/DMF^[87] gespalten werden und sollte sich daher hervorragend eignen.

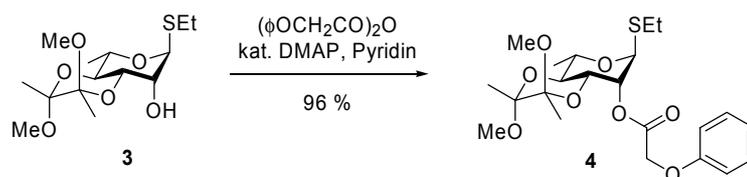


Abb. 4-4: DMAP-katalysierte Einführung der Phenoxyacetatschutzgruppe in Pos. 2 von Thiorhamnosid **3**.

Die Synthese des POAc-Rhamnosides **4** konnte mit Phenoxyessigsäurechlorid in Pyridin mit 77 % Ausbeute erzielt werden. Mit 96 % Ausbeute bestand jedoch der günstigste Weg zur Darstellung von **4** (Abb. 4-4) in der DMAP-katalysierten Acylierung mit Phenoxyacetanhydrid. Die labile Phenoxyacetatgruppierung ermöglicht sowohl Nachbargruppen-unterstützte Glykosylierung und stellt als basisch entfernbare Schutzgruppe die Orthogonalität innerhalb des Systemes dar.

Thioglykosid-Donor **4** wurde aufgrund der Säurelabilität der verwendeten BDA-Gruppe und der Vorzüge, die Trichloracetimide bieten, umfunktionalisiert. Zuerst wurde dazu das Thioglykosid zum 1-OH-freien Zucker **5** entschützt. Untersucht wurde die Entschützung durch $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ sowie die NH_4Br -vermittelte oxidative Hydrolyse, die schonend mit $\text{V}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}_2$ ^[189] oder mit $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O-H}_2\text{O}_2$ ^[190] katalysiert erfolgen kann - diese Methoden erzielten keine akzeptable Umsetzung. Lediglich die Hydrolyse mit NBS in Aceton/Wasser zeigte sich als effektiver Weg. Ein auf Verbindung **4** optimiertes Protokoll^[191] (4 eq NBS, 2 h) führt mit 91 % Ausbeute zum α/β -Hemiacetal **5**. Die anschließende Funktionalisierung zum Trichloracetimidat-Donor **6** (Abb. 4-6) erfolgte über DBU-katalysierte Addition an Trichloracetonitril (73 % Ausbeute).

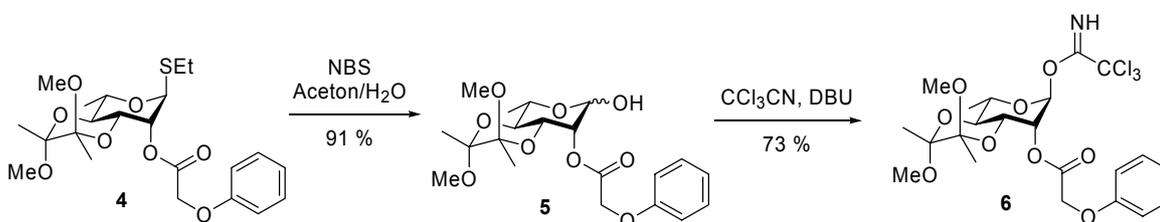


Abb. 4-5: Umfunktionalisierung des Donors zum Trichloracetimidat über das Hemiacetal.

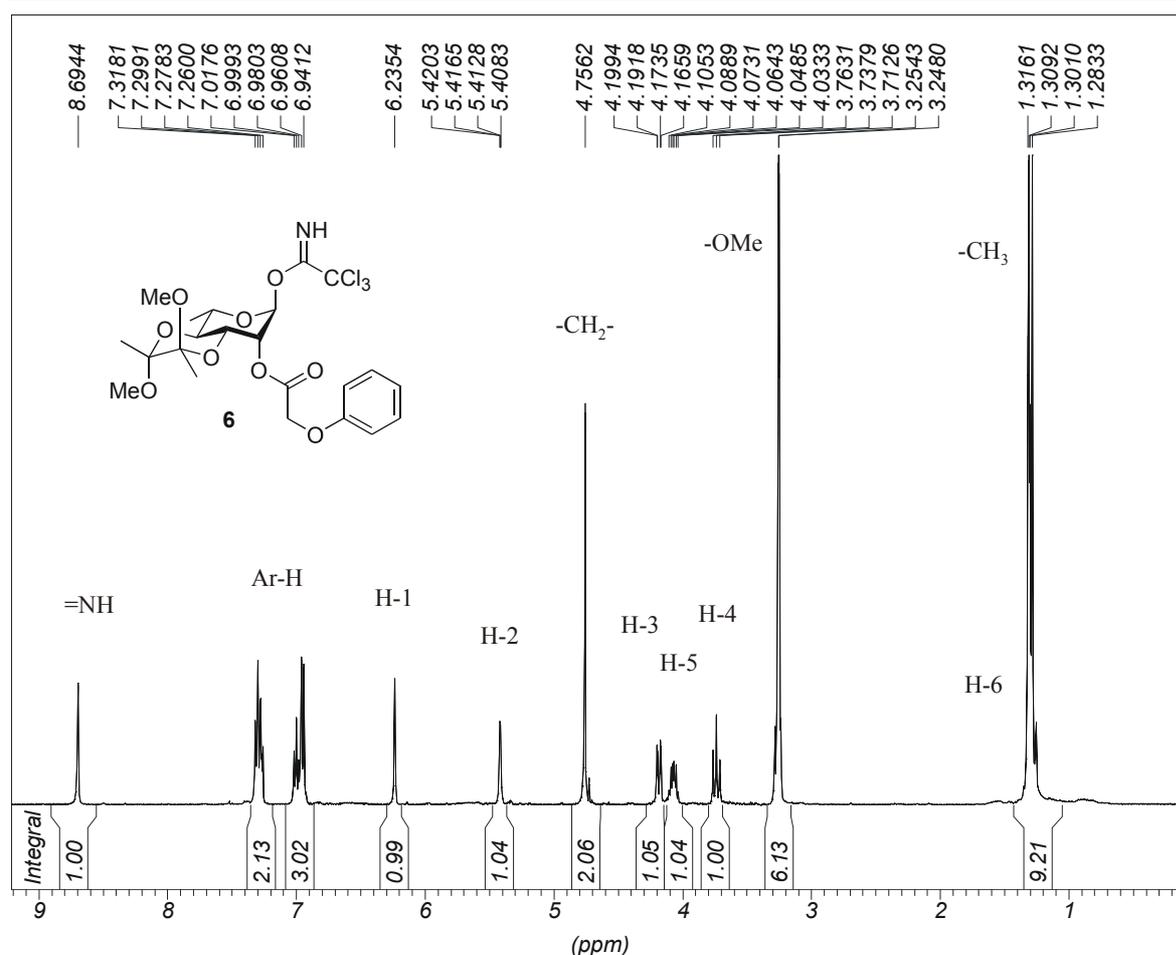


Abb. 4-6: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) des BDA- und POAc-geschützten Rhamnose-Donors **6**.

4.2.3 BDA- und POAc-geschützter Dirhamnosyl-Donor

Sollte sich die Strategie der iterativen Glykosylierung und Entschützung mit Monorhamnosyl-Donor **6** z.B. aufgrund von Einschränkungen der Ausbeuten und Selektivitäten an der festen Phase als nicht gangbarer Weg erweisen, kann ein „vorgefertigter“ Dirhamnosyl-Donor zum Einsatz kommen. Da sich allerdings im später gewählten Festphasensystem die iterative Synthese hocheffektiv und quantitativ durchführbar gestalten lässt, soll hierauf nur kurz eingegangen werden.

2-OH freies Thiorhamnosid **3** wurde TMSOTf-katalytisch mit Donor **6** in 63 % Ausbeute zum 2-O- α -L-Rhamnopyranosyl-1-thio- α -L-rhamnopyranosid **7** glykosyliert (Abb. 4-7, Abb. 4-8). Dieser Glykosylierungsschritt wird durch die unterschiedlich reaktiven Donorfunktionen (*reactivity tuning*, vgl. Kap. 3.1.6) ermöglicht. Für die Umfunktionalisierung zum Dirhamnose-Hemiacetal **8** erwiesen sich die für den Monosaccharid-Donor **6** gefun-

denen Bedingungen der NBS-Aceton/Wasser-Hydrolyse mit 81 % Ausbeute erneut als Optimum. Die anschließende Trichloracetimidatbildung erfolgte über das DBU/Trichloracetonitril-Protokoll mit akzeptablen 64 % Ausbeute des NMR-sauberen Produktes (Abb. 4-9). Ökonomisch ist die Verwendung von Disaccharid-Donor **9** dem iterativen Einsatz eines Überschusses von Monosaccharid-Donor etwa gleichwertig, doch ist aufgrund der fehlenden Nachbargruppe für Glykosylierungen mit **9** ein geringer Anteil an β -Glykosid zu erwarten.

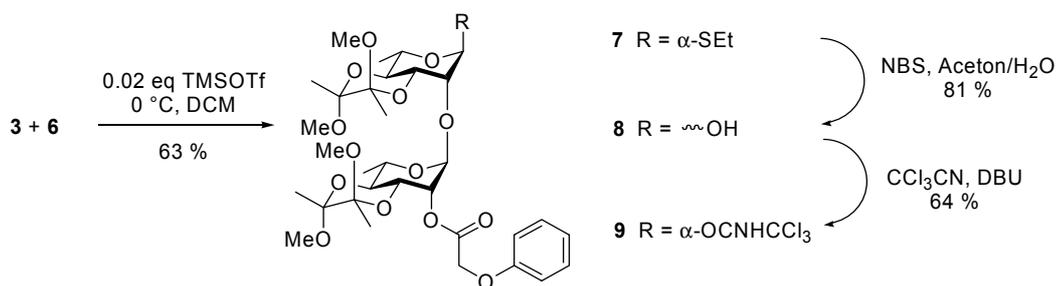


Abb. 4-7: Synthese des Dirhamnosyl-Donors **9** aus Monomeren der Monosaccharid-Donor-Synthese.

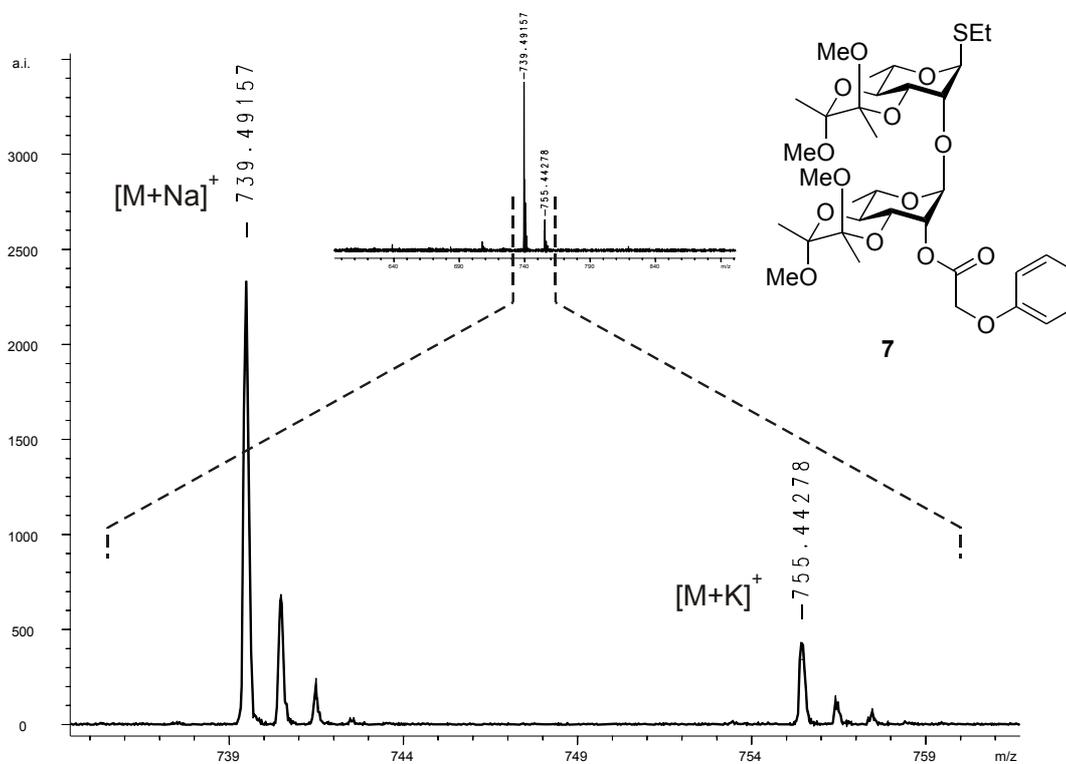


Abb. 4-8: MALDI-TOF-MS (CHCA, 0.1 % ges. aq. NaCl/MeOH) des Glykosylierungsproduktes 2-O- α -L-Rhamnopyranosyl-1-thio- α -L-rhamnopyranosid **7**.

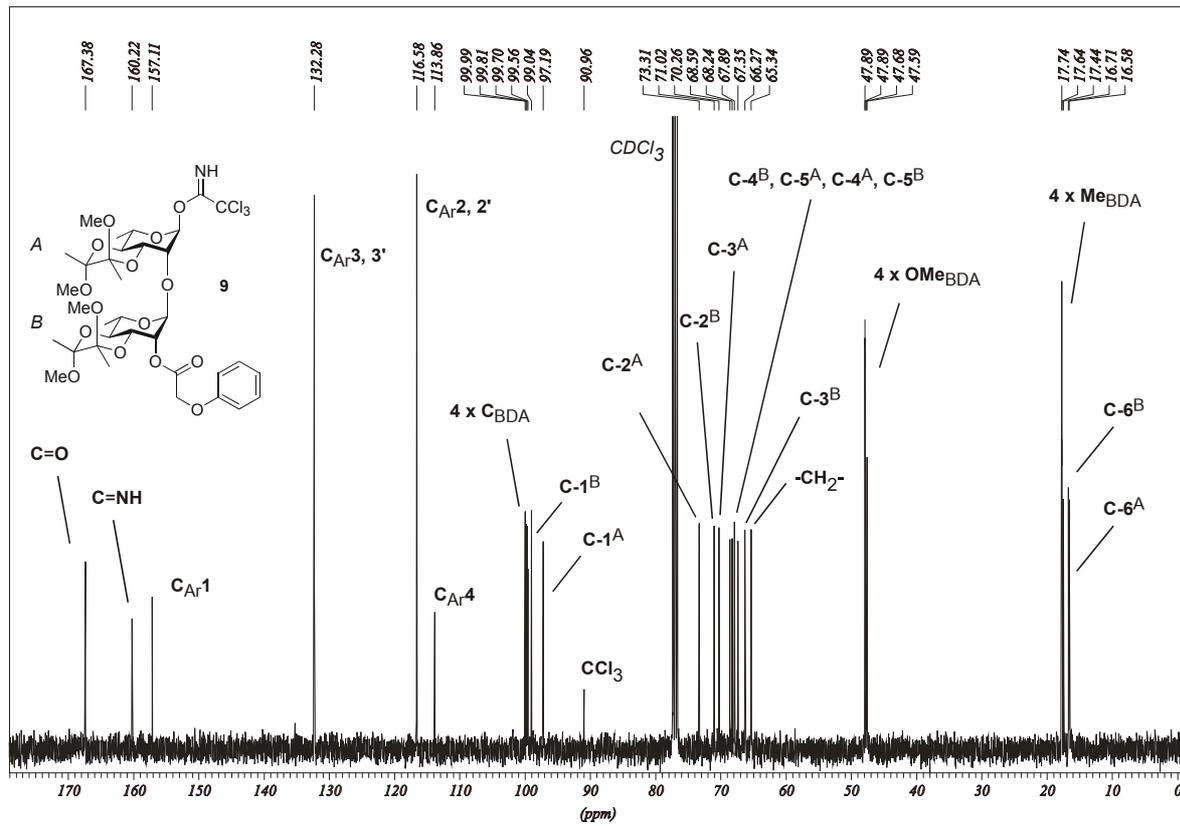


Abb. 4-9: ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) des BDA- und POAc-geschützten Dirhamnosyl-Donors 9.

4.3 Darstellung enantiomerenreiner Lipidbausteine

3-Hydroxyfettsäuren, die wie in Abschnitt 4.1 gezeigt für den ersten Schritt des repetitiven Rhamnolipid-Aufbaus nötig sind, werden racemisch für gewöhnlich via Reformatzki-Reaktion dargestellt. Enantiomerenreine 3-Hydroxyfettsäuren erhält man am effektivsten über enantioselektive Hydrierung von langkettigen β -Ketoestern als Vorläufer.

4.3.1 Synthese und GC-MS-Analytik langkettiger β -Ketoester

Praktikable Möglichkeiten zur Darstellung von β -Ketoestern bestehen z.B. in der klassischen Claisen-Esterkondensation oder der Alkylierung von Acetessigestern oder gemischten Malonestern, doch erfordern diese Methoden starke Basen und erlauben nicht die beliebige Variation der Estergruppe. Meldrumsäure dagegen (2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion, Malonsäure-*cycl.*-isopropylidenester) als aktive Methylenkomponente zeichnet sich durch eine hohe Acidität aus (pK_S 4.97, acyclische Malonester: pK_S 13.7, Acetessigester: pK_S 10.7), so daß Elektrophile wie z.B. Aldehyde bereits ohne starke Basen glatt abreagieren. Die anschließende Alkohololyse erlaubt zusätzlich auch die freie Variation des Esters.

Die Acylierung von Meldrumsäure **10** zur Darstellung der 3-Oxomethylester **12a-f** wurde für die Verbindungen **12a-e** in Gegenwart von 2 eq Pyridin über die jeweiligen Säurechloride durchgeführt. Im Fall des 3-Oxolignocerinsäuremethylesters **12f** wurde eine Acylierung via Carbodiimid-Aktivierung (EDC, DMAP) der Behensäure (C_{22}) durchgeführt.

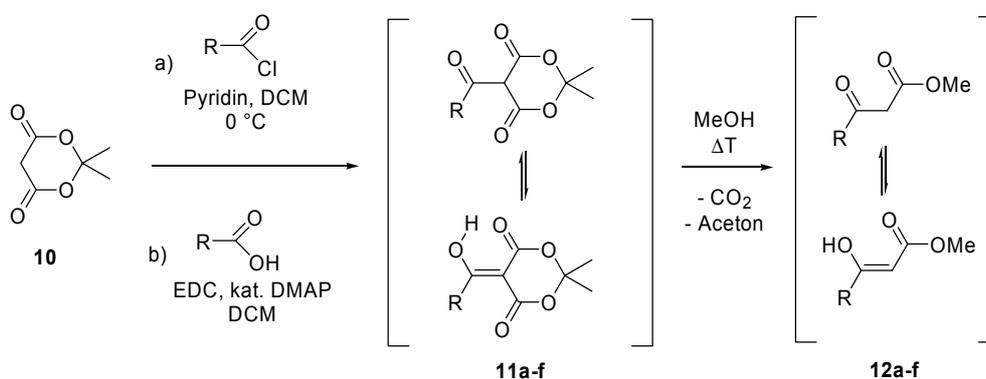


Abb. 4-10: Langkettige 3-Oxomethylester **12a-f** durch Acylierung und Methanololyse von Meldrumsäure.

Acyl-Meldrumsäuren wie z.B. **11a-f** können bezüglich ihrer Reaktivität und bezüglich des Produktes ihrer Alkoholyse als synthetisches Äquivalent eines gemischten Diketenes betrachtet werden.^[192] Als Ester wurde der später leicht verseifbare OMe-Ester gewählt. Die Methanolyse der Acyl-Meldrumsäuren **11a-f** unter Rückflussbedingungen führte unter Decarboxylierung (Abb. 4-10) in guten Ausbeuten zu den 3-Oxomethylestern **12a-f**.

Tab. 4-1: Ausbeuten und Reinheiten der langkettigen β -Ketoester. (*) als 3-Methoxylamin-Derivat (**) Carbodiimid-Acylierung, alle anderen: Säurechlorid-Acylierung.

| 3-Oxomethylester | | Ausbeute [%] | GC [%] (Mox) [*] |
|--|------------|--------------------|---------------------------|
| 3-Oxocaprylsäuremethylester (C ₈) | 12a | 92.1 | 98 |
| 3-Oxocaprinsäuremethylester (C ₁₀) | 12b | 91.7 | 99 |
| 3-Oxolaurinsäuremethylester (C ₁₂) | 12c | 82.6 | 99 |
| 3-Oxomyristinsäuremethylester (C ₁₄) | 12d | 77.9 | 99 |
| 3-Oxostearinsäuremethylester (C ₁₈) | 12e | 63.0 | 99 |
| 3-Oxolignocerinsäuremethylester (C ₂₄) | 12f | 47.0 ^{**} | 98 |

Die Reinheitsbestimmung der erhaltenen Verbindungen wurde gaschromatographisch und über NMR durchgeführt. Im NMR der Verbindungen ist zu erkennen, daß die Oxoester zu ca. 15 % als Enol-Tautomer vorliegen (Enol-OH im ¹H-NMR bei $\delta = 11.9$ ppm).

Die GC-Analytik von wenig flüchtigen Verbindungen erfordert allgemein eine hohe GC-Säulen-Temperatur zur Elution. Die underivatisierten β -Ketoester **12a-f** decarboxylieren unter diesen Bedingungen zum 2-Tridekanon (M = 198). Unzersetzter β -Ketoester zeigt Peak tailing vermutlich durch Anwesenheit des tautomeren Enoles. Mittels Derivatisierung zum 3-Methoxylimin^[193] durch einstündige Kondensation mit Methoxylamin (Mox) in Pyridin bei 60 °C konnte diese Zersetzung umgangen werden. Die Mox-Derivate erwiesen sich unter GC-Bedingungen stabil und erlaubten die GC-chromatographische Bestimmung der Reinheiten von **13a-f**, die mit Werten > 98 % (Tab. 4-1) sehr hoch sind. Durch Mox-Derivatisierung wird nicht nur die Zersetzung, sondern auch die für die GC-Analytik ungünstige Enolisierung der reinen Ketoester umgangen.

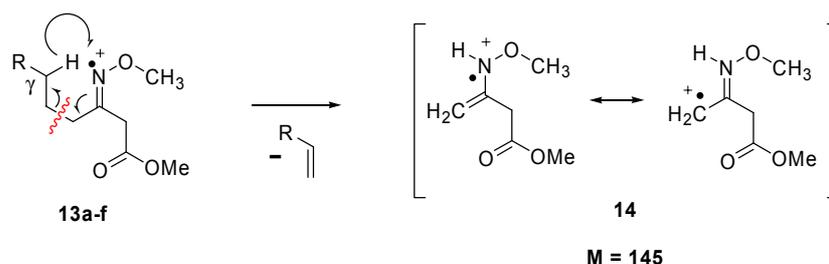


Abb. 4-11: McLafferty-Fragmentierung (im EI-MS) der β -Ketoester-Methoxylamin-Derivate **13a-f**.

Der Identitätsbeweis erfolgte über GC-MS-Kopplung – die Verbindungen **13a-f** zeigen eine McLafferty-Umlagerung über das γ -H-Atom mit dem hierfür in jedem Spektrum auftauchenden charakteristischen Peak $M = 145$ des konstanten Umlagerungsproduktes **14** (Abb. 4-11). Auch der Peak bei $M = 158$ taucht substratunabhängig auf, er entsteht durch Spaltung an der β -Position; MeOH-Abspaltung führt zum Tochterion $M = 126$, das wie auch $M = 113$ in allen Verbindungen **13a-f** auftaucht. $M = 113$ konnte als Folgefragment des McLafferty-Produktes identifiziert werden. Alle vom Substrat abhängige und unabhängige Fragmentierungsprodukte sind in Abb. 4-12 gezeigt.

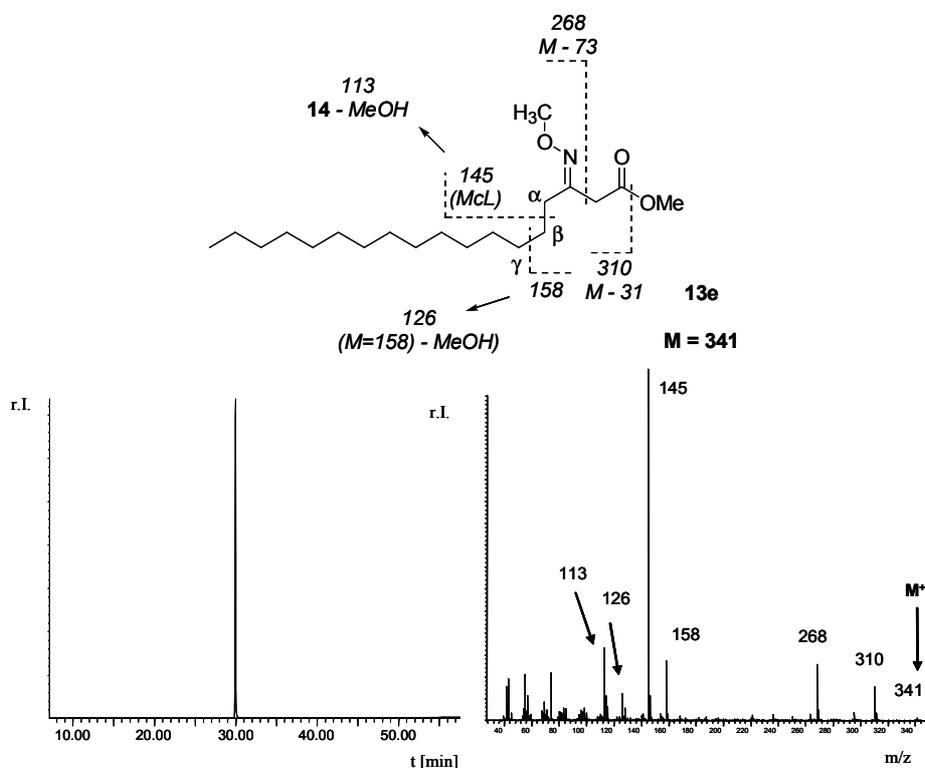


Abb. 4-12: GC-EI-MS von Mox-Derivat **13e**. Links: GC-Spur (DB-5MS, 11 m x 0.25 mm, $d_f = 0.1 \mu$, Starttemp. 80 °C, 3 min isotherm, 4 °C/min, Endtemp. 290 °C); Rechts: EI-MS-Spektrum; Peakzuordnung oben.

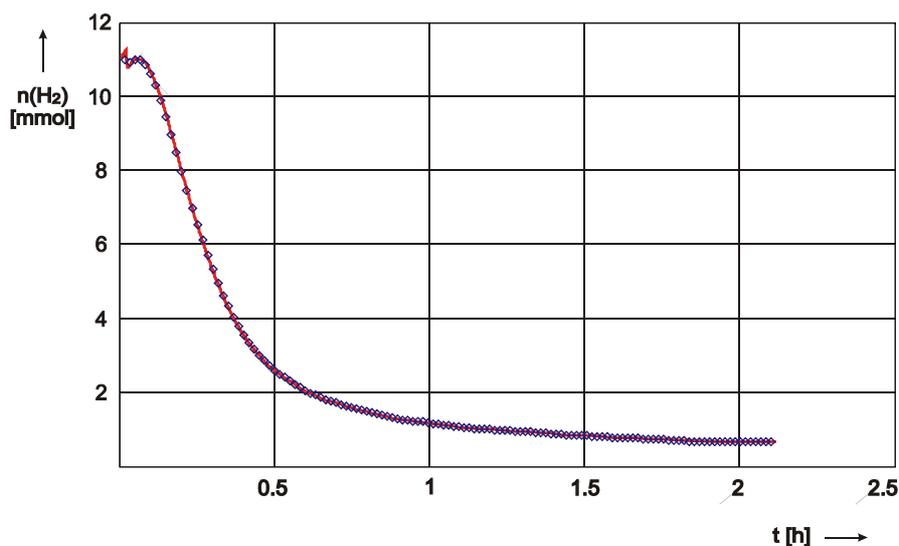


Abb. 4-15: Aufzeichnung des Wasserstoffverbrauchs während der Reduktion von 3-Oxostearinsäuremethylester **12e** (4 g, 12.8 mmol) mit (*R*)-BINAP-RuCl₂. Nach 2 h haben bereits ca. 10.5 mmol H₂ reagiert.

Die Reduktion mit (*R*)-BINAP als Träger der chiralen Information muß nicht ausschließlich zu (*R*)-3-Hydroxyestern führen. Je nach Größe der Ester- oder Alkylgruppe des β -Ketoesters führt (*R*)-BINAP auch zu (*S*)-Produkten. Zur Klärung der absoluten Konfiguration wird am einfachsten jeweils die Konsistenz der Vorzeichen der Drehwerte überprüft oder der Vergleich mit literaturbeschriebenen Drehwerten angestellt (vgl. 4.3.3).^[194]

Tab. 4-2: Ausbeuten der Hydrierungsreaktionen von langkettigen β -Ketoestern mit BINAP-RuCl₂.

| (<i>R</i>)-3-Hydroxymethylester | | Ausbeute [%] |
|---|------------|--------------|
| (<i>R</i>)-3-Hydroxyvaleriansäuremethylester (C ₅) | 18a | 93.3 |
| (<i>R</i>)-3-Hydroxycaprylsäuremethylester (C ₈) | 18b | 91.5 |
| (<i>R</i>)-3-Hydroxycaprinsäuremethylester (C ₁₀) | 18c | 92.5 |
| (<i>R</i>)-3-Hydroxylaurinsäuremethylester (C ₁₂) | 18d | 87.0 |
| (<i>R</i>)-3-Hydroxymyristinsäuremethylester (C ₁₄) | 18e | 95.6 |
| (<i>S</i>)-3-Hydroxymyristinsäuremethylester (C ₁₄) | 18f | 95.5 |
| (<i>R</i>)-3-Hydroxystearinsäuremethylester (C ₁₈) | 18g | 88.4 |
| (<i>R</i>)-3-Hydroxylignocerinsäuremethylester (C ₂₄) | 18h | 78.8 |

4.3.3 Bestimmung der Enantiomerenreinheit der (*R/S*)-3-Hydroxyester

Im Anschluß an die enantioselektive Ru-BINAP-Reduktion wurde zur Kontrolle der Enantiomerenreinheit am Beispiel des (*R*)-3-Hydroxymyristinsäuremethylesters **18e** versucht, die erhaltenen, optisch aktiven Verbindungen über chirale GC- oder LC-Chromatographiesäulen in (*R*)- und (*S*)-Enantiomer aufzutrennen. Zur Auffindung einer geeigneten Methode wurde jeweils zuerst das über NaBH₄-Reduktion erhältliche racemische Gemisch von **18e** vermessen. Resultat der Versuche mit underivatisiertem 3-Hydroxymyristinsäuremethylester-Racemat war, daß weder über eine chirale GC-Säule (ChirasilVal) noch über chirale LC-Säulen (Chiralcel OD-H, OB-H und OJ-H, *n*-Hexan/*i*-PrOH jeweils mit Gradientenelution und isokratischer Elution) eine Auftrennung möglich ist. Die Derivatisierung der 3-Hydroxyester zum 3-*O*-Phenylcarbamat mittels Phenylisocyanat, zum 3-*O*-Trifluoressigester mittels Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) oder zum 3-*O*-Trimethylsilylether mit Bistrimethylsilyltrifluoressigsäureamid (BSTFA) erlaubten ebenfalls keine Auflösung der Enantiomeren auf den genannten chiralen GC/LC-Chromatographiesäulen. Die Schwierigkeiten einer direkten chromatographischen Enantiomerenauflösung sind für β -Hydroxymyristinsäure beschrieben und konnten dort nur über eine spezielle chirale LC-Säule (Chiralcel OD) nach aufwendiger mehrstufiger Derivatisierung zum 3-*O*-Phenylcarbamaldiethylamid der freien β -Hydroxymyristinsäure bewältigt werden.^[197]

Auch die Verwendung chiraler Lanthanoid-Shift-Reagenzien (CLSR)^[198;199] in deuterierten Lösungsmitteln verschiedener Polaritäten zur ¹H-NMR-Bestimmung der optischen Reinheit von **18a-h** wurde untersucht. Hierfür kamen die CLSR Eu(tfc)₃ und Eu(hfc)₃ zum Einsatz. Die beschriebene ¹H-NMR-Enantiomerenauflösung des Hydroxyesters in einer Mischung von CCl₄-CDCl₃ 3:1 in Gegenwart von 10 bis 30 mol% Eu(hfc)₃ konnte allerdings nicht verifiziert werden.^[200]

Eine weitere Methode der Enantiomerenbestimmung besteht in der kovalenten Derivatisierung eines chiralen Substrates zum Diastereomer mit einem enantiomerenreinen chiralen Reagenz. Hierfür kommen vor allem asymmetrisch α -substituierte Phenylessigsäuren oder Phenylmandelsäuren sowie Campherderivate zum Einsatz.^[198]

Moschers Säure (*R*)-(+)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenylessigsäure^[201] als Derivatisierungsreagenz erlaubte die Bestimmung der Enantiomerenreinheit der (*R*)-3-Hydroxyfettsäureester **18a-h**. Hierzu wurde zunächst der jeweilige (*R*)-3-Hydroxyester **18**

und (*R*)-Moschers Säure (+)-MTPA **19** mit *N*-(2-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid (EDC) DMAP-katalysiert verestert (Abb. 4-16).

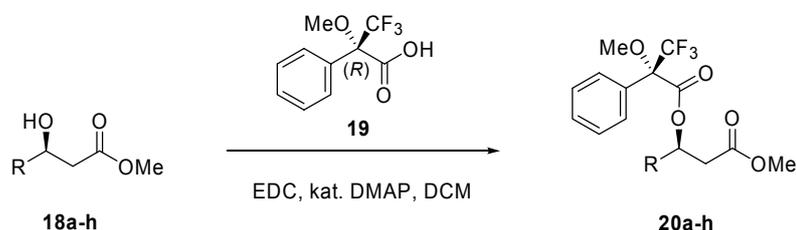


Abb. 4-16: Darstellung der 3-O-MTP-Ester durch EDC/DMAP-Veresterung mit Moschers Säure.

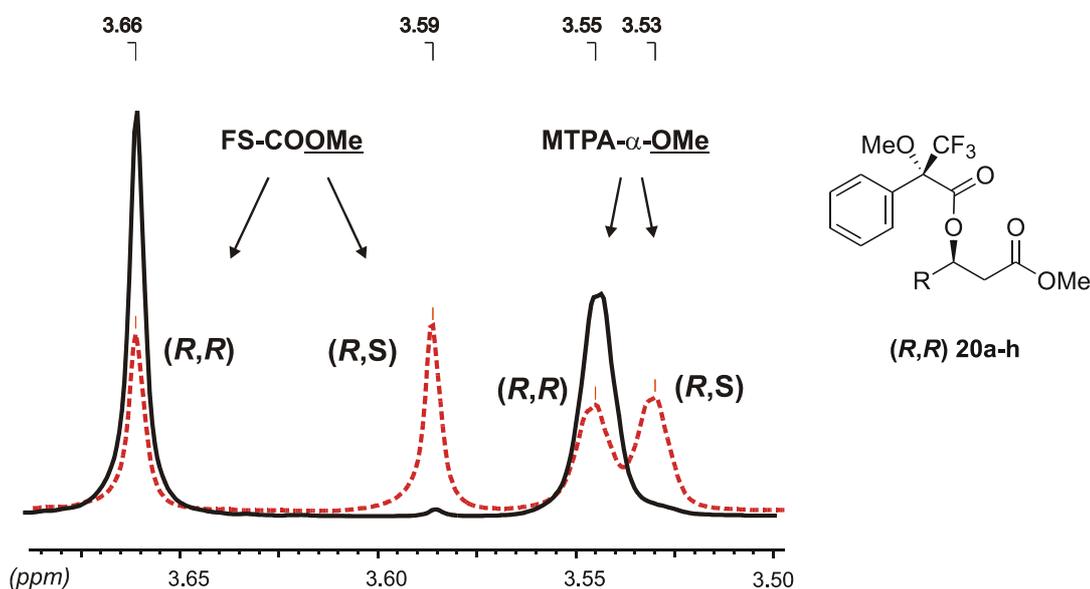


Abb. 4-17: $^1\text{H-NMR}$ (OMe-Region, 3.7 – 3.5 ppm) von 3-O-MTP-Fettsäuremethylestern **20a-h**. Das MTPA-Derivat der racemisch reduzierten Fettsäureester zeigt Signale der (*R,S*)- und (*R,R*)- Diastereomere (gestrichelte Linie); das Derivat der enantioselektiv reduzierten Fettsäureester zeigt nur einen Signalsatz (durchgezogene Linie). Bestimmung der Diastereomerenreinheit erfolgt über Integration der (*R,S*)- und (*R,R*)-FS-COOMe-Signale.

Das (*R,R*)-**20** und (*R,S*)-**20** enthaltende Diastereomerengemisch des 3-O-MTP-Esters wurde dann $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch vermessen. Hier zeigten die Methylester- und Methyl-ethersignale der Diastereomere von **20a-h** unterschiedliche chemische Verschiebungen (Abb. 4-17), so daß die Ermittlung der Diastereomerenanteile über Intergration erfolgen konnte.^[202] Die Enantiomerenreinheit der zugrundeliegenden (*R*)-3-Hydroxyester **18a-h** entspricht dabei direkt der Diastereomerenreinheit der korrespondierenden Moscherester

20a-h. Anhand der unterschiedlichen ppm-Werte des MTPA-Derivates kann die absolute Konfiguration der Fettsäure ermittelt werden. Das OMe-Signal von (*R,R*)-konfiguriertem Derivat **20** erscheint bei $\delta = 3.66$ ppm, das des (*R,S*)-Diastereomers bei $\delta = 3.59$ ppm.

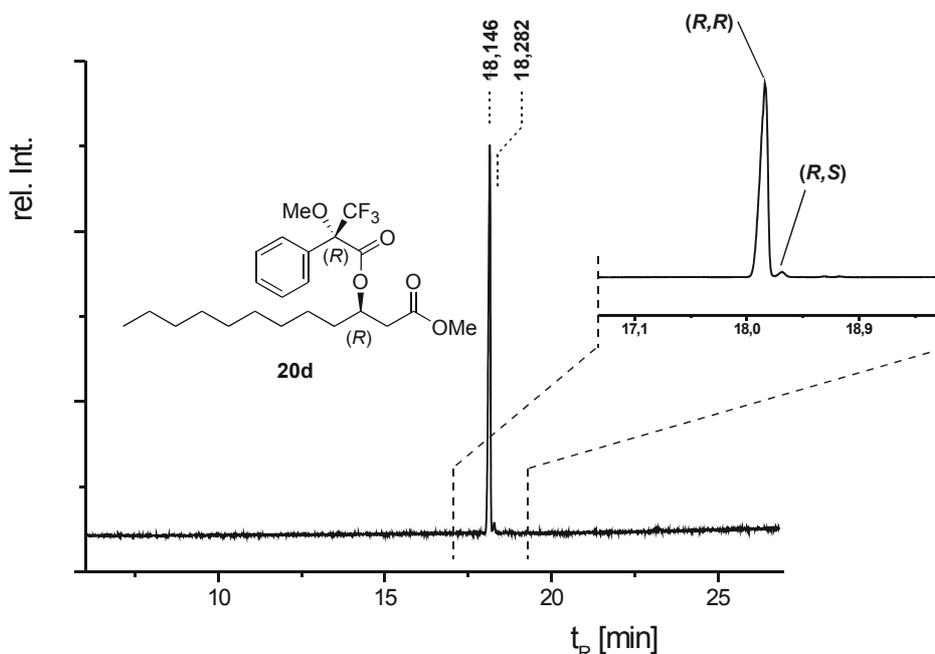


Abb. 4-18: GC des Diastereomerenmischungs von (*R*)-3-*O*-MTP-Laurinsäure-OMe **20d** (DB-5MS) zeigt mit 98.0 % des (*R,R*)- und 2.0 % des (*R,S*)-Esters eine Reinheit von 98.0 % dr_{GC} ($dr_{NMR} = 98.8$ %).

Darüber hinaus konnten die 3-*O*-MTP-Ester **20a-f** – also bis einschließlich einer Kettenlänge von C_{14} – auch gaschromatographisch auf einer Standard-DB-5MS-Säule (18 m x 0.25 mm, $d_f = 0.1$ μ , Starttemperatur 150 °C, 2 min isotherm, 3 °C/min, Endtemperatur 225 °C) basisliniengetrennt aufgelöst werden. Die erhaltenen NMR-spektroskopisch ermittelten optischen Reinheiten korrelieren dabei sehr gut mit den Werten der GC-Messungen, sie unterscheiden sich um jeweils weniger als ± 1 %. Da Verbindungen $> C_{14}$ per GC nicht mehr aufgetrennt werden konnten, werden im folgenden die über 1H -NMR ermittelten optischen Reinheiten als Diastereomerenverhältnis (entspricht dem Integralverhältnis des 1H -NMR) aufgelistet. Die ermittelten Drehwerte der (*R*)- bzw. (*S*)-3-Hydroxyester entsprechen literaturbeschriebenen Werten.^[200]

Tab. 4-3: Ermittlung der Enantiomerenreinheit der 3-Hydroxyfettsäureester **18a-h** nach MTPA-Derivatisierung als Diastereomerenverhältnis der (R,S)- und (R,R)-MTP-Fettsäureester; der % dr-Wert wurde hierzu aus den ¹H-NMR FS-COOMe-Signale der Derivate **20a-h** ermittelt.

| 3-O-MTP-Methylester | | % dr (NMR) 3-O-MTP-Ester 20a-h | [α] _D ²⁰ 3-OH-Ester 18a-h |
|--|------------|--------------------------------------|---|
| (R)-3-O-MTP-Valeriansäure-OMe (C ₅) | 20a | 95.9 | - 34.4° |
| (R)-3-O-MTP-Caprylsäure-OMe (C ₈) | 20b | 92.2 | - 20.4° |
| (R)-3-O-MTP-Caprinsäure-OMe (C ₁₀) | 20c | 97.1 | - 18.2° |
| (R)-3-O-MTP-Laurinsäure-OMe (C ₁₂) | 20d | 98.8 | - 17.4° |
| (R)-3-O-MTP-Myristinsäure-OMe (C ₁₄) | 20e | 98.3 | - 13.9° |
| (S)-3-O-MTP-Myristinsäure-OMe (C ₁₄) | 20f | 98.1 | + 13.6° |
| (R)-3-O-MTP-Stearinsäure-OMe (C ₁₈) | 20g | 97.4 | - 11.5° |
| (R)-3-O-MTP-Lignocerinsäure-OMe (C ₂₄) | 20h | 97.2 | - 7.3° |

4.3.4 Darstellung langkettiger (R)- bzw. (S)-3-O-TES-Fettsäuren

Zum Aufbau von Dilipidestern mit den enantiomerenreinen 3-Hydroxyfettsäureestern **18a-h** mußten diese noch in geeignet geschützte Säuren überführt werden. Von den dargestellten Verbindungen **18a-h** wurde dafür aufgrund des später beschriebenen Syntheseweges, die Dilipide über Methylesterdilipide aufzubauen, nur eine Auswahl umgesetzt; (R)-3-Hydroxybuttersäure als Edukt für den C₄-Baustein **22a** war kommerziell erhältlich. Die Verseifung der Methylester **18n** zu den freien (R)-3-Hydroxyfettsäuren **21a-e** gelang in Methanol/Wasser (4:1) mit Lithiumhydroxid-Monohydrat einfach und in jeweils annähernd quantitativen Ausbeuten. Es muß erwähnt werden, daß eine Verseifung der Fettsäureester mit 1 M KOH (Methanol/Wasser, 4:1) unterlegen war und lediglich zu Umsätzen unter 50 % geführt hat. Aufgrund der überragenden Selektivität des Siliziums für Hydroxygruppen fiel die Wahl der Schutzgruppe für Position 3 auf eine Silylschutzgruppe, mit der die 3-Hydroxygruppe erst nach der Verseifung selektiv blockiert werden kann. Wiederum aufgrund der später gewählten Festphasenstrategie mußte der Vorzug der weniger hydrophoben Triethylsilyl- anstelle der *tert.*-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppe gegeben werden. Die Einführung der Triethylsilylgruppe (TES) erfolgte durch Zutropfen von

1.05 eq Triethylsilylchlorid zur jeweiligen Fettsäure in Pyridin bei 60 °C in guten Ausbeuten und führte direkt zu den enantiomerenreinen 3-*O*-TES-Fettsäuren **22a-e**.

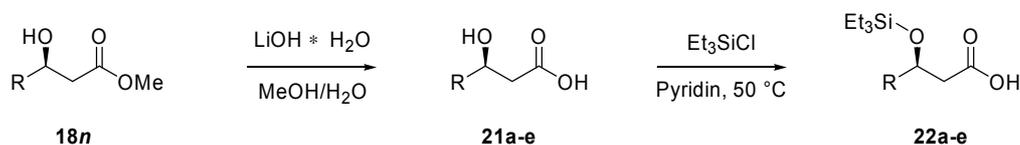


Abb. 4-19: Verseifung und Silylierung der Methyl ester **18n** zu langkettigen (*R*)-3-*O*-TES-Fettsäuren **22a-e**.

Die dargestellten 3-*O*-TES-Fettsäuren **22a-e** können massenspektrometrisch sehr gut als $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Addukte erfaßt werden, wenn sie aus Methanol mit 0.1%igem Zusatz einer gesättigten NaCl-Lösung vermessen werden. (Abb. 4-20) Als $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Addukte sind sie nicht detektierbar. Grund dafür dürften Lösungsmittelleffekte sein. Eine TES-Abspaltung unter sauren Ionisierungsbedingungen ist auszuschließen, da die Produkte einer Desilylierung nicht beobachtbar sind. In Gegenwart von Na^+ -Kationen kann im MS eine starke Dimerenbildung von **22a-e** beobachtet werden, was auf eine Lösungsvermittlung durch Adduktbildung schließen läßt. Bei nicht basisch abgepufferter Aufarbeitung der 3-*O*-TES-Fettsäuren und auch bei längerer Lagerung kann eine teilweise Selbstentschützung der Verbindungen **22a-e** beobachtet werden. Diese läßt sich am einfachsten am Auftreten eines zweiten Multipletts im $^1\text{H-NMR}$ Bereich von 4.0 - 4.1 ppm erkennen.

Tab. 4-4: Silylierungsausbeuten und Drehwerte der 3-*O*-TES-Fettsäuren **22a-e**.

| 3- <i>O</i> -TES-Fettsäure | | Ausbeute [%] | $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ |
|--|------------|--------------|----------------------------|
| (<i>R</i>)-3- <i>O</i> -TES-Buttersäure (C ₄) | 22a | 76.8 | n.b. |
| (<i>R</i>)-3- <i>O</i> -TES-Laurinsäure (C ₁₂) | 22b | 87.7 | - 2.0° |
| (<i>R</i>)-3- <i>O</i> -TES-Myristinsäure (C ₁₄) | 22c | 85.6 | - 3.1° |
| (<i>S</i>)-3- <i>O</i> -TES-Myristinsäure (C ₁₄) | 22d | 86.1 | + 2.9° |
| (<i>R</i>)-3- <i>O</i> -TES-Stearinsäure (C ₁₈) | 22e | 78.0 | - 3.7° |

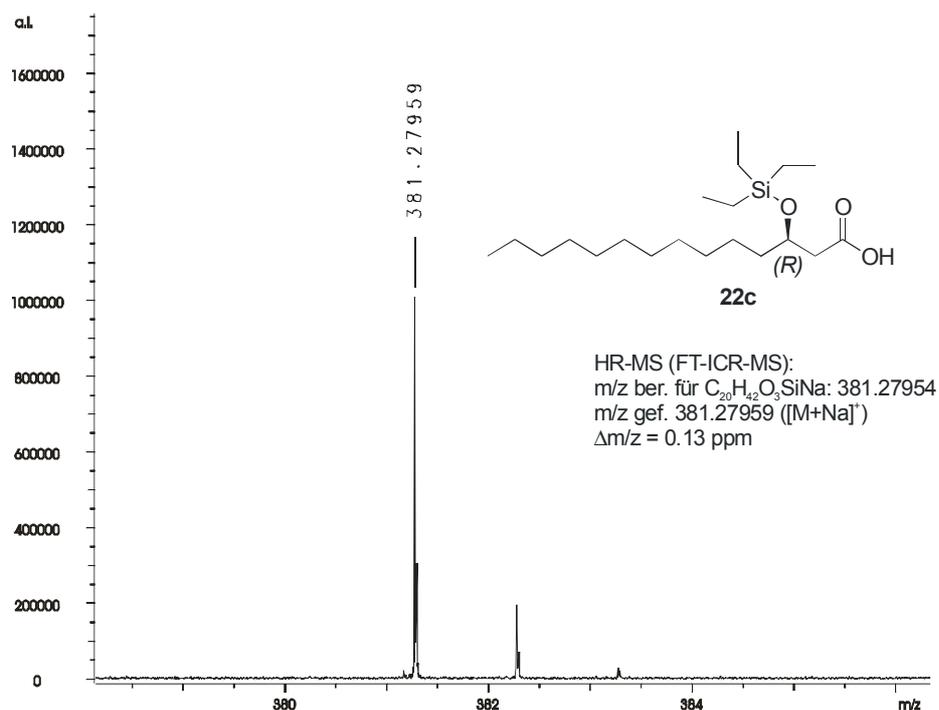


Abb. 4-20: FT-ICR-HR-MS von (*R*)-3-*O*-TES-Myristinsäure **22c** als Na^+ -Addukt ($\Delta m/z = 0.13$ ppm).

4.3.5 Synthese des reaktiv spaltbaren Trichlorethylester-Bausteines

Zusätzlich zu der in Abschnitt 4.1 vorgestellten bevorzugten Verwendung polymerer Schutzgruppen als terminale Rhamnolipid-Schutzgruppe wurde es im folgenden (vgl. Abschnitt 4.7) notwendig, nicht-polymere Esterschutzgruppen auf ihre Verwendbarkeit hin zu überprüfen. In Kapitel 4.7 wird darauf detailliert eingegangen, hier sei lediglich die Darstellung der Bausteine beschrieben.

Eine der im gewählten Syntheschema noch ungenutzten Schutzgruppenorthogonalitäten sind reaktiv spaltbare Gruppen. Die gewählte Trichlorethylester-Schutzgruppe kann von den säurestabilen Rhamnolipiden konventionell über $Zn^0/HOAc$ entfernt werden, aber auch SmI_2 in THF kann als schonendes Reduktionsmittel zum Einsatz kommen.^[203]

Die Darstellung eines geeigneten Trichlorethylester-Lipidbausteines wurde nur an einem Vertreter der verwendeten Lipidvariationen durchgeführt: Zur Synthese von (*R*)-3-Hydroxymyristinsäuretrichlorethylester **23** wurde zuerst versucht, den (*R*)-3-Hydroxymyristinsäuremethylester **18e** säurekatalysiert in Trichlorethanol als Lösungsmittel umzuestern. Die beste Umesterung konnte mit nicht zufriedenstellenden 21 % Ausbeute bei 100 °C durch Katalyse von *p*-Toluolsulfonsäure erzielt werden.

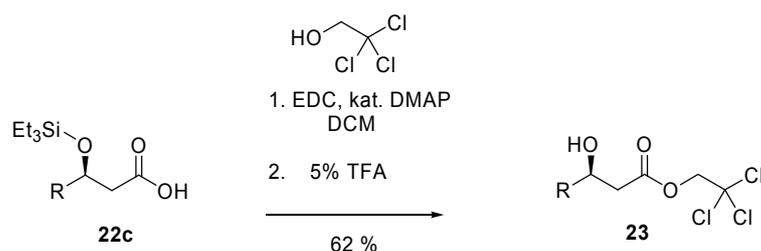


Abb. 4-21: Darstellung eines reaktiv spaltbaren Trichlorethylester-Monolipidbausteines ohne Isolierung des silylierten intermediären Esters ($R = n\text{-C}_{11}\text{H}_{23}$).

Als wesentlich günstiger erwies es sich, von (*R*)-3-*O*-TES-Myristinsäure **22c** auszugehen und mit *N*-(2-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl-carbodiimid (EDC) DMAP-katalysiert den erwünschten Ester darzustellen. Auf eine Aufreinigung des TES-geschützten Intermediates wurde hierbei verzichtet. Nach TES-Entschützung durch Zugabe von 5 % (v/v) TFA zur Reaktionslösung wurde der (*R*)-3-Hydroxymyristinsäuretrichlorethylester **23** in einer Zweischnittreaktion (Abb. 4-21) nach chromatographischer Aufreinigung mit insgesamt 62 % Ausbeute erhalten.

4.3.6 Synthese eines hydrogenolytisch spaltbaren Benzylester-Lipides

Eine weitere Variante ist die Verwendung von hydrogenolytisch spaltbaren Benzylestern als terminale Esterschutzgruppe. Analog zur Darstellung des Trichlorethylesterlipides **23** wurde von silylgeschützter (*S*)-3-*O*-TES-Myristinsäure **22d** ausgegangen und die Säure in Gegenwart eines Überschusses Benzylalkohol DMAP-katalysiert mit EDC verestert.

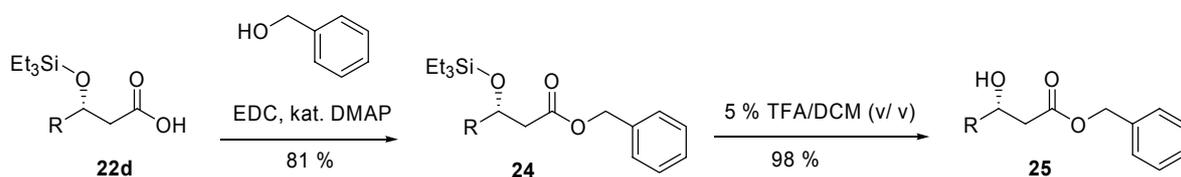


Abb. 4-22: Synthese des hydrogenolytisch spaltbaren Benzylester-Monolipidbausteines **25** ($R = n\text{-C}_{11}\text{H}_{23}$).

Im Unterschied zum Trichlorethylesterweg (Abb. 4-21) wurde die Synthese über zwei Stufen geführt. (*S*)-3-*O*-TES-Myristinsäurebenzylester **24** wurde dabei in 81 %, (*S*)-3-HO-Myristinsäurebenzylester **25** nach Chromatographie in 98 % Ausbeute erhalten.

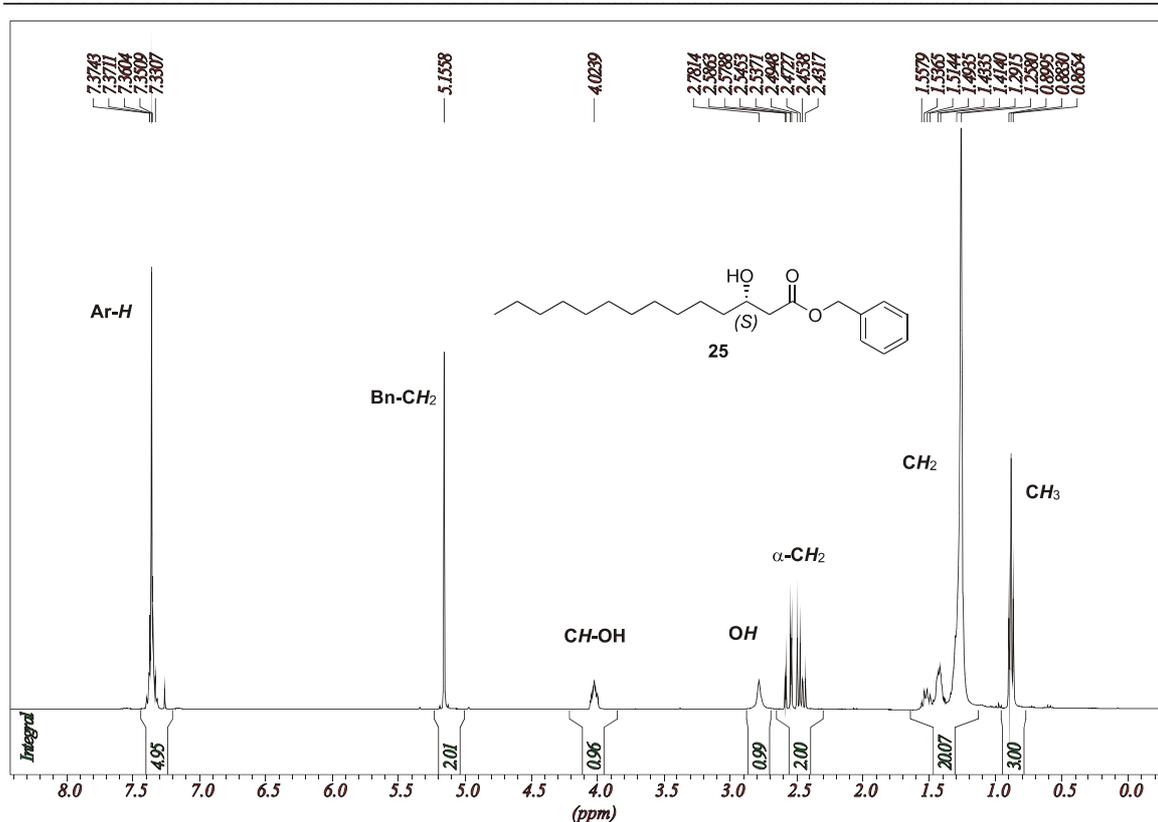


Abb. 4-23: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) des Monolipid-Bausteines (S)-3-HO-Myristinsäurebenzylester **25**.

4.3.7 Darstellung eines Lipidbausteines für Rhamnolipid-Alkohole

Von hohem Interesse ist der Einfluß der polaren Kopfgruppe der Rhamnolipide auf deren immunstimulierende Eigenschaften. Da eine selektive Reduktion der terminalen Carbonsäure von Rhamnolipiden ausgeschlossen scheint, muß ein separates geschütztes Lipid angefertigt werden, das die Darstellung dieser Alkohol-Strukturvariante ermöglicht. Ausgegangen wurde hierfür von enantiomerenreinem (R)-3-Hydroxymyristinsäuremethylester **18e**. Die von *E. J. Corey* entwickelte Methoxy-ethoxymethyl- (MEM) Schutzgruppe^[204] wurde mit 2-Methoxy-ethoxymethylchlorid und DIPEA in 93 % Ausbeute installiert und erlaubte als basenstabile Hydroxy-Maskierung sowohl die quantitative LiAlH_4 -Reduktion des (R)-3-O-MEM-Esters **26** zum Alkohol (R)-3-O-MEM- C_{14} -OH **27** als auch die anschließende Standard-Acetylierung des Alkoholes **27** mit Acetanhydrid. Mit wasserfreiem Zinkbromid (als Suspension in DCM) konnte die MEM-Gruppe von **28** in sehr guter Ausbeute (87 %) wieder entfernt werden (Abb. 4-24).

Die Entfernung der MEM-Gruppe beruht auf einer Bidentat-Koordination der beiden Sauerstoffatome auf ein *Lewis*-sures Kation. Neben ZnBr_2 ist hierfür auch TiCl_4 als effektive

Lewis-Säure beschrieben.^[204] Im Unterschied zu TiCl_4 ist mit ZnBr_2 jedoch keine Reaktionsführung in homogener Lösung möglich. Eine TiCl_4 -vermittelte MEM-Spaltung von **28** erwies sich jedoch mit nur 61 % Ausbeute als unterlegen. Der Versuch einer TFA-sauren Spaltung des (*R*)-3-*O*-MEM-Acetat **28** führte zu einem noch geringeren Umsatz.

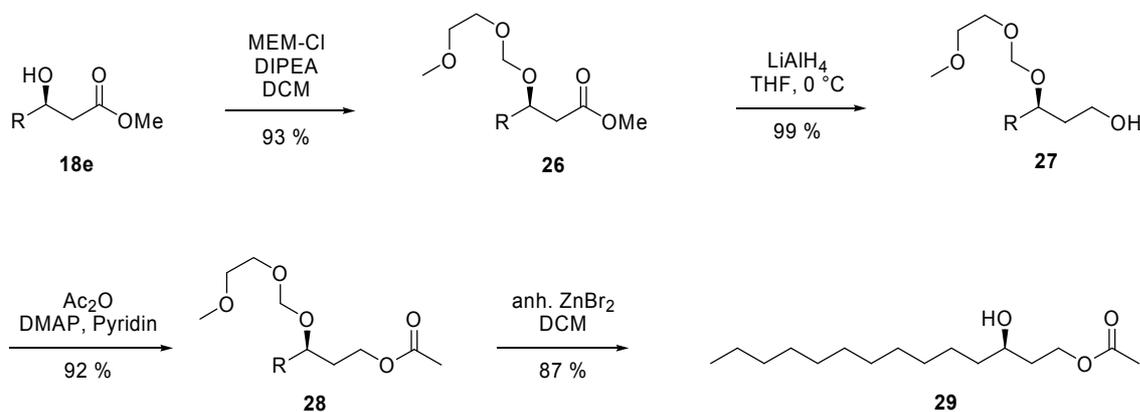


Abb. 4-24: Darstellung des Lipides **29** ($\text{R} = n\text{-C}_{11}\text{H}_{23}$) für RL-Alkohol-Varianten über den MEM-Weg.

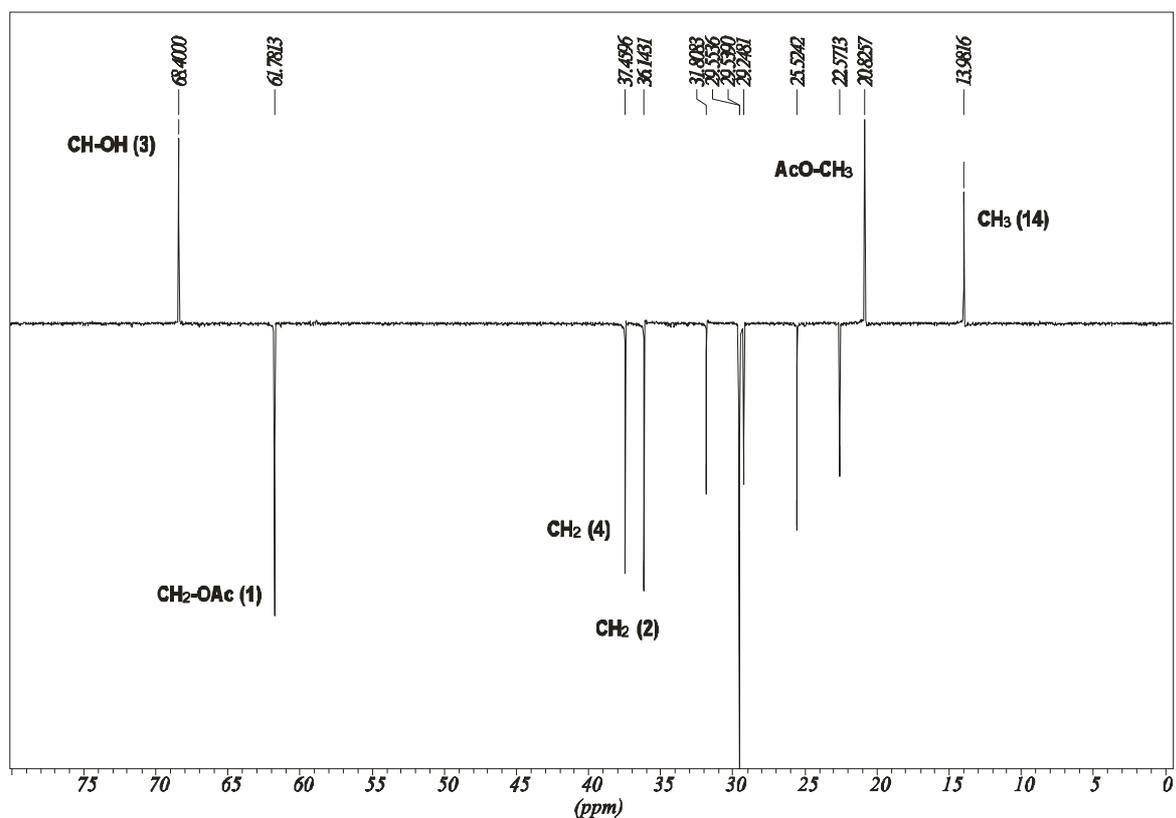


Abb. 4-25: ^{13}C -NMR-DEPT 135-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von (*R*)-3-Hydroxymyristylacetat **29**. Unbezeichnete Signale gehören zu den CH_2 -Gruppen von C_5 bis C_{13} .

4.4 Das Trimellitsäureanhydrid-Linkersystem - TAL

Der Verwendung eines polymergebundenen Phthalanhydrides als Aminlinker erlaubt es, die Einsatzmöglichkeiten der bewährten Phthalimidschutzgruppe auf *Solid-Phase-Organic-Synthesis* (SPOS) auszudehnen. Beispielsweise kann ein derartiges Linkersystem zur Festphasensynthese von Kohlenhydraten und Glykokonjugaten verwendet werden. Die Konzipierung des *TAL*-Systemes (Trimellitsäureanhydrid-Linker) sieht vor, zwei glykosylierungsbeständige Schutzgruppen in Reihe zu schalten: Einerseits die Phthalimidschutzgruppe, die sich in der Lösungssynthese von Aminozuckern als sehr zuverlässig erwies, als auch die Benzylschutzgruppe, die ebenfalls inert gegenüber den stark *Lewis*-sauren Bedingungen der Glykosylierungsreaktionen ist und als Standardschutzgruppe für die Synthese von Oligosacchariden kaum umgangen werden kann.

Ein derartiges Benzylalkohol-*N*-Pht-Konstrukt (Abb. 4-26) sollte dann den festphasenunterstützten Aufbau von benzylgeschützten Zuckern erlauben. Nach der Abspaltung vom *TAL*-System soll der resultierende Benzylrest im finalen Debenzylierungsschritt zusammen mit den übrigen permanenten Benzylschutzgruppen entfernt werden, so daß diese Strategie einen generell anwendbaren Festphasenzugang zu Oligosacchariden unter Einbeziehung von benzylgeschützten Donoren gewährleistet.

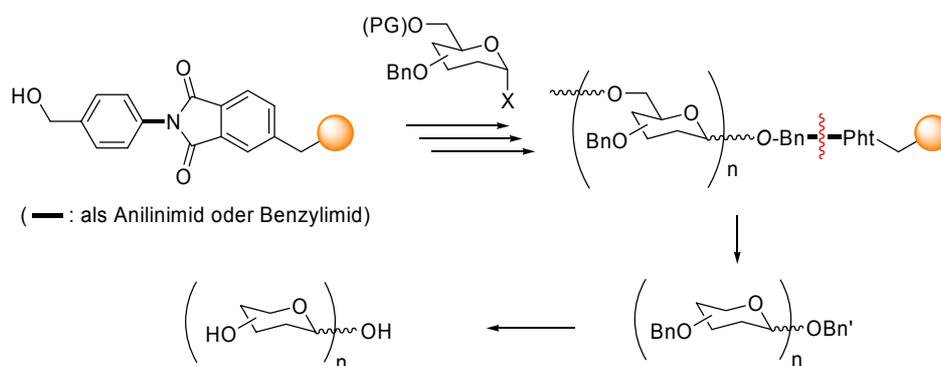


Abb. 4-26: Konzept der Festphasensynthese von Oligosacchariden über eine Reihenschaltung von Benzyl- und Phthalimid-Schutzgruppen. Das benzylierte Festphasenprodukt wird am Ende des Oligoaufbaus abgespalten und in Lösung zusammen mit den übrigen *OBn*-Gruppen debenzyliert.

4.4.1 Darstellung von polymergebundenem Phthalanhydrid

Bei dem polymeren Trägermaterial, das der Reaktionssequenz der folgenden Kapitel zugrunde liegt, handelt es sich um ein als *N*-Methylaminomethyl-Polystyrol **31** funktionalisiertes Copolymer aus Styrol und 1 % Divinylbenzol, das kommerziell erhältlich ist. Dieses mikroporöse Polystyrol (100-200 mesh) gehört zu den in der Festphasensynthese breit eingesetzten Trägermaterialien.

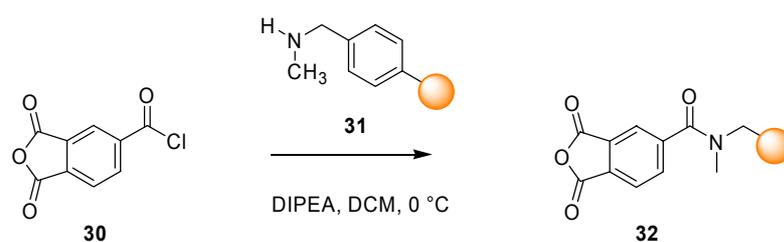


Abb. 4-27: Acylierung von *N*-Methylaminomethyl-PS mit Trimellitsäureanhydrid-chlorid zu TAL-Harz **32**.

Das 1,2-Anhydrochlorid der Trimellitsäure (1,2,4-Benzoltricarbonsäure) erlaubt einen effizienten synthetischen Zugang zu polymergebundenem Trimellitsäureanhydrid-Linker (TAL-Harz) **32**. Durch Acylierung des *N*-Methylaminomethyl-Polystyrols **31** mit einem Überschuß an Trimellitsäureanhydrid-chlorid **30** ist das TAL-Harz in einem Schritt darstellbar. Dabei ist zu beobachten, daß ohne Zusatz von DIPEA freiwerdender Chlorwasserstoff das Phthalanhydrid öffnen kann. Eine weitere Nebenreaktion ist die kompetitive Acylierung des polymeren, sekundären Amines **31** durch das Anhydrid. Durch Reaktionsführung bei 0 °C läßt sich die Nukleophilie des Amines **31** so weit reduzieren, daß diese Reaktion nicht mehr beobachtet werden kann. Die Vollständigkeit der Umsetzung wird durch einen negativen Chloranil-Farbttest angezeigt. Im FT-ATR-IR-Spektrum (Abb. 4-28) weist so dargestelltes TAL-Harz **32** zwei IR-Absorptionsbanden bei $\nu = 1854 \text{ cm}^{-1}$ und $\nu = 1782 \text{ cm}^{-1}$ auf, die eindeutig die intakte Phthalanhydridfunktion belegen.

Die durch Elementaranalyse des Polymers bestätigte quantitative Umsetzung mit dem Säurechlorid bedeutet, daß für Verbindung **32** die maximal mögliche Funktionalisierung mit einer Beladung von 1.10 mmol/g erreicht wurde. Nach mehreren Wochen der Lagerung bei 4 °C in einem luftdicht verschlossenen Gefäß war im IR-Spektrum keine Veränderung der Signale sowohl bezüglich ihrer Lage als auch ihrer Intensität feststellbar.

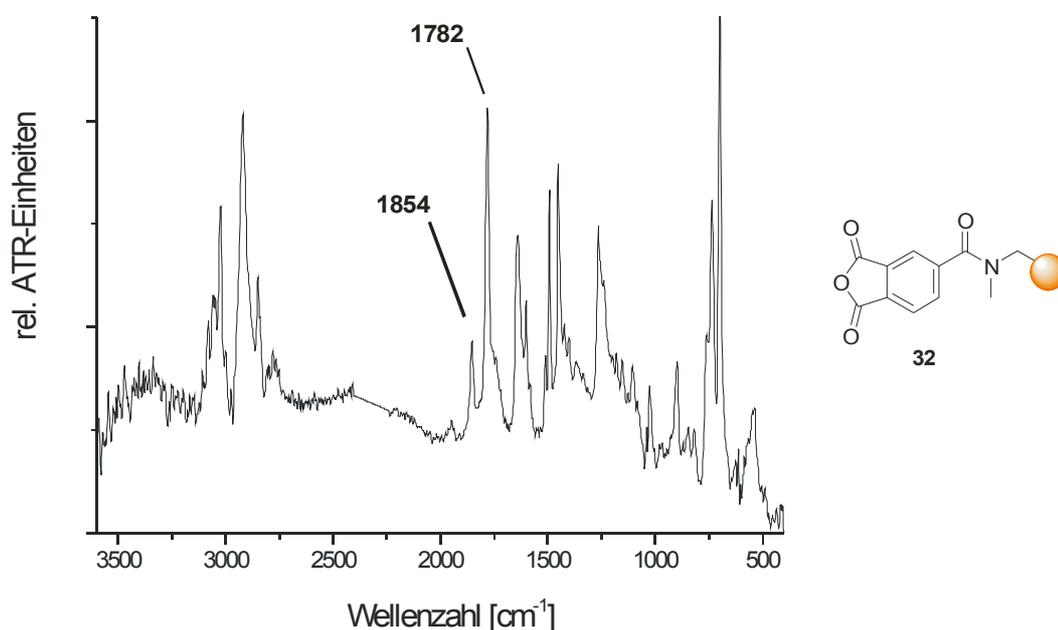


Abb. 4-28: FT-ATR-IR-Spektrum von TAL-Harz **32** mit Absorptionsbanden des Phthalanhydrides bei $\nu = 1854 \text{ cm}^{-1}$ und $\nu = 1782 \text{ cm}^{-1}$.

4.4.2 Methoden der Substrat-Immobilisierung auf TAL-Harz

Die Umsetzung von Stickstoffnukleophilen mit Phthalanhydrid ist in der Festphasenchemie beispielsweise im Kontext mit Festphasen-*Mitsunobu*-Reaktionen^[205], für die Synthese von Oligonukleotiden mit Spacern^[206] und als bivalente Schutzgruppe^[207] beschrieben. Die Verwendbarkeit von Phthalimiden bzw. von polymerem Phthalanhydrid als selektiv adressierbarem Linker wurde noch nicht untersucht.

Die Immobilisierung von temperaturunempfindlichen Aminsubstraten mit TAL **32** kann im einfachsten Fall thermisch zum Phthalimid **34n** erfolgen. Hierfür erwies sich bei konventioneller Reaktionsführung die Kondensation bei 90 °C für primäre aliphatische und benzyliche Amine als günstigster Reaktionsweg, mit höheren Temperaturen ließen sich nicht nennenswert schnellere Umsetzungen erzielen (Abb. 4-30). Die Reaktion von Anilinen ist unter diesen Bedingungen noch unvollständig, so daß diese aufgrund ihrer herabgesetzten Nukleophilie bei 110 °C immobilisiert werden mussten. Allgemein beeinträchtigen längerfristige Temperatureinwirkungen ab 120 °C verbunden mit den Scherkräften des mecha-

nischen Rührens das PS-Polymergerüst stark, so daß diese Methode noch nicht als Optimum angesehen werden kann. Eine Verbesserung dessen stellt der Einsatz eines Mikrowellenreaktors für die organische Synthese dar.



Abb. 4-29: Druckstabile Reaktionsgefäße (bis zu 20 bar) für die chemische Mikrowellensynthese.

Mikrowellenreaktoren erlauben die punktuelle schnelle Erhitzung auf Temperaturen weit über den eigentlichen Siedepunkt des verwendeten Lösungsmittels hinaus, da die Synthesen in versiegelten, druckstabilen Reaktoren stattfinden. Zusätzlich sorgen Konzentrations-effekte für sehr gute Ausbeuten, so daß durch Erhitzung mittels eines MW-Reaktors thermische Reaktionen sehr schnell und mit quantitativen Umsetzungen ablaufen. Polystyrol-Polymere leiden unter der kurzfristigen Erhitzung auf hohe Temperaturen nicht, so daß für den Fall der Aminimmobilisierung durch Mikrowellensynthese (Abb. 4-30) zwei Vorteile entstehen: Zum einen eine schnelle quantitative Reaktion ohne Beschädigung des polymeren Backbones, zum anderen ist auch die Phthalimidbildung von Anilinen unter MW-Bedingungen bei 200 °C in DMF bereits nach 5 min abgeschlossen.

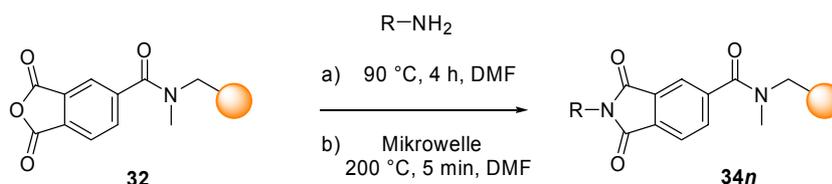


Abb. 4-30: Thermische Immobilisierung von Amins substraten am TAL-System über a) konventionelle Synthese bei 90 °C, 4 h oder b) Mikrowellensynthese bei 200 °C, 5 min.

Amine wie z.B. Glucosamin, die durch hohe Temperaturen zerstört werden, können über ein alternatives Protokoll am TAL-Linker immobilisiert werden. Hierzu wurde eine Zweistufenreaktion entwickelt (Abb. 4-31). Im ersten Schritt wird das zu immobilisierende Amin unter DMAP-Katalyse auf das polymere Phthalanhydrid **32** acyliert. Diese Reaktion verläuft schnell (2 h) und bereits bei Raumtemperatur. Sie kann per IR anhand der neu entstehenden breiten Amidbande und der verschwindenden Anhydridbande verfolgt werden. Das Auftreten einer kleinen Phthalimidbande (Abb. 4-32) deutet darauf hin, daß bereits bei der Acylierung zum Carboxamid **33n** ein geringer Anteil zum Imid **34n** cyclisiert.

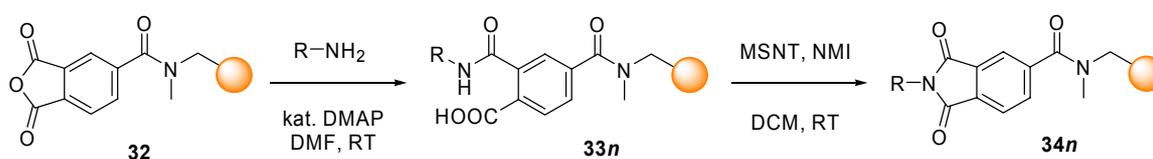


Abb. 4-31: Substratimmobilisierung am TAL-Harz mittels einer Zweistufenreaktion: Acylierung und Cyclokondensation zu polymeren Phthalimiden **34n**.

Verschiedene Kondensationsreagenzien wurden für die Cyclokondensation der Carboxamide **33n** untersucht. Während die versuchte Cyclokondensation mit 5 eq DIC/HOBT in DMF, mit 5 eq TBTU/HOBT/DIPEA in DMF, mit 5 eq PyBroP/HOBT/DIPEA in DMF nicht gelang und auch HATU- und Triphosgenaktivierung^[208] sich für das Syntheseproblem als ungeeignet erwiesen, führte die Verwendung von 3 eq MSNT (1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol)^[209] und *N*-Methylimidazol zu einer quantitativen Umsetzung nach 12 h Reaktionszeit, wie anhand einer scharfen Phthalimidbande im IR und der Elementaranalyse des Polymers bestätigt wurde (z.B. Stickstoff-Elementaranalyse von Tryptamin-Phthalimidharz **34-3**: N-Anteil von 99 % d. Theorie). Ebenso effizient erwies sich die einstündige Umsetzung der Carboxamide **33n** bei 80 °C in 0.05 M HCl/Dioxan. Aufgrund der weitaus schonenderen Reaktionsbedingungen ist die MSNT-Methode jedoch zu bevorzugen.

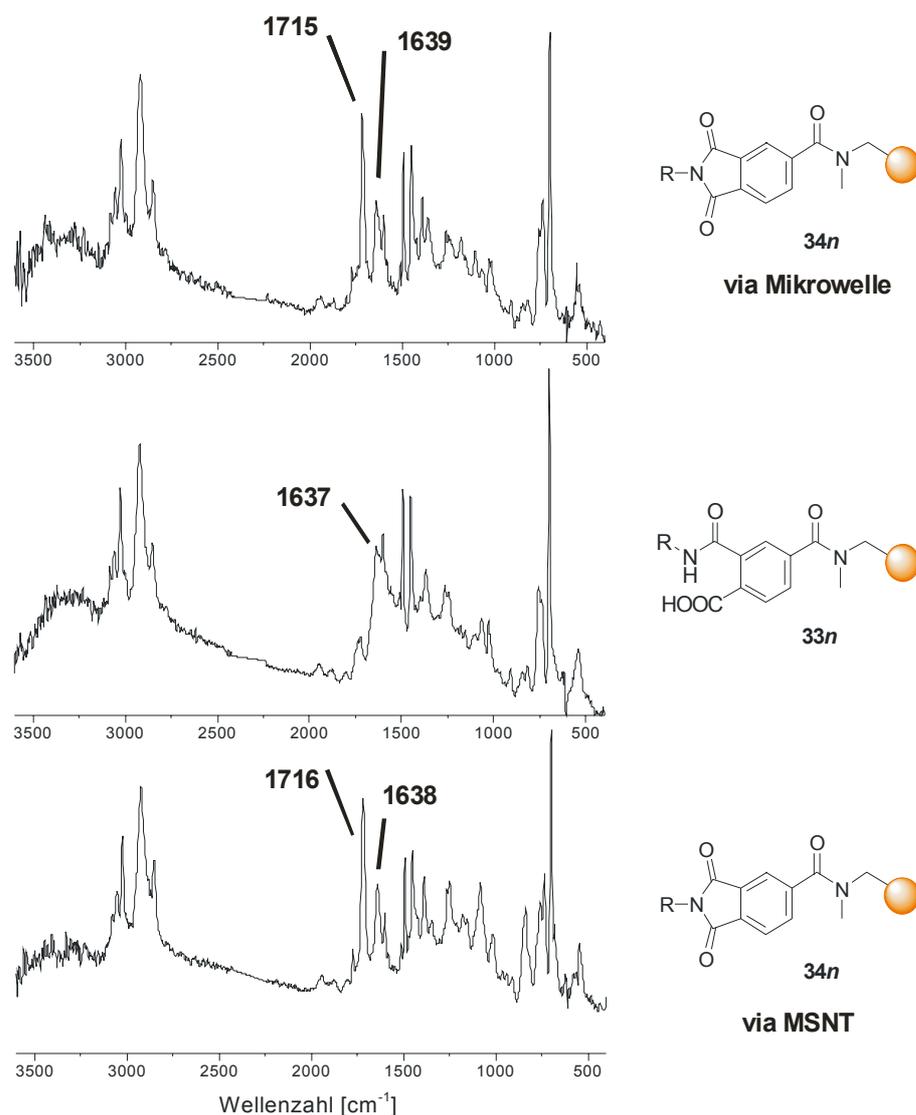


Abb. 4-32: Substratimmobilisierung am TAL-Harz mittels Mikrowellensynthese oder einer Acylierungs-Cyclokondensations-Zweistufenreaktion zu polymeren Phthalimiden **34n**. FT-ATR-IR-Spektren von polymeren Phthalimiden **34n** zeigen eine Imid-Absorptionsbande bei $\nu = 1712\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$, die Carboxamidvorstufen **33n** eine breite Amidbande bei ca. $\nu = 1637\text{ cm}^{-1}$.

4.4.3 Methoden der Produktfreisetzung vom TAL-Harz

Eine Variante der Abspaltung von Produkten, die auf dem TAL-Harz während einer Reaktionssequenz als Phthalimid immobilisiert sind, besteht in der Behandlung des Polymeres mit starken Nucleophilen, die das Amin durch Substitution freisetzen. Nucleophile, die zur Abspaltung einer Phthalschutzgruppe in Lösung häufig verwendet werden, sind beispiels-

weise MeNH_2 , HONH_2 , *tert.*- BuNH_2 oder Na_2S .^[210] Bevorzugt kommen jedoch bivalente Stickstoffnucleophile zum Einsatz – insbesondere Hydrazin, substituierte Hydrazine und mit Einschränkungen auch Ethylendiamin.^[211-214] Ihr Vorteil besteht darin, daß nach der Phthalimidöffnung durch den ersten nucleophilen Angriff das zweite Nucleophil intramolekular unter Ausbildung eines thermodynamisch begünstigten Sechsringes (im Fall von Hydrazinen) reagieren kann.^[215] Die Phthalimidspaltung mit Hydrazinen ist daher extrem begünstigt.

Diesem Mechanismus folgend wurde anhand der einfachen Substrate **38-1 bis 38-7** die Rückgewinnungsrate und Produktreinheit nach Hydrazinolyse von TAL-immobilisierten Aminen untersucht (Abb. 4-33). Basenstabile Amine konnten so mit 4 eq Hydrazin-Monohydrat in sehr guten gravimetrischen Ausbeuten und guten chromatographischen Reinheiten wiedergefunden werden (Tab. 4-5).

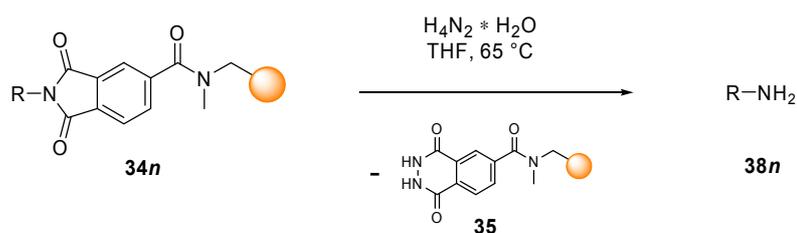


Abb. 4-33: Hydrazinolytische Produktfreisetzung von TAL-immobilisierten Amin-Substraten.

Weiterhin wurden einfache chemische Modifikationen vorgenommen, um die Tauglichkeit der TAL-Strategie für die Festphasensynthese zu belegen. So wurde z.B. mono-Boc-geschütztes 1,6-Hexyldiamin **38-1** gemäß der MSNT-Methode immobilisiert und nach Boc-Entschützung des resultierenden Phthalimidharzes **34-1** durch Kupplung mit einer Fmoc-Aminosäure zu Harz **34-2** umgesetzt. Die UV-spektroskopische Überprüfung der Beladung von **34-2** mittels Fmoc-Quantifizierung ergab nach der vierstufigen Festphasensynthese am TAL-Harz einen Belegungsgrad, der einer Umsetzung von 98 % der Theorie entspricht.

Allerdings eröffnet der vorgestellte Weg noch nicht den Zugang zur Synthese von stark basenlabilen Verbindungen am TAL-System. Um auch diese Verbindungsklassen am TAL-Harz verwenden zu können, wurde versucht, eine seltener beschrittene Methode zur Abspaltung von Phthalimidgruppen als Festphasenmethode zu etablieren. Dabei handelt es

sich um die reduktive Öffnung des Imides und der anschließenden Aminfreisetzung durch intramolekulare saure Lactonisierung des *o*-Hydroxymethylbenzamides (vgl. Abb. 4-34). Diese Reaktion wurde unter relativ schonenden Bedingungen mit NaBH₄/*iso*-Propanol und Essigsäure beschrieben.^[216] Sie erlaubt die Verwendung des TAL-Systemes als neuartigen Safety-Catch Aminlinker.^[217-220]

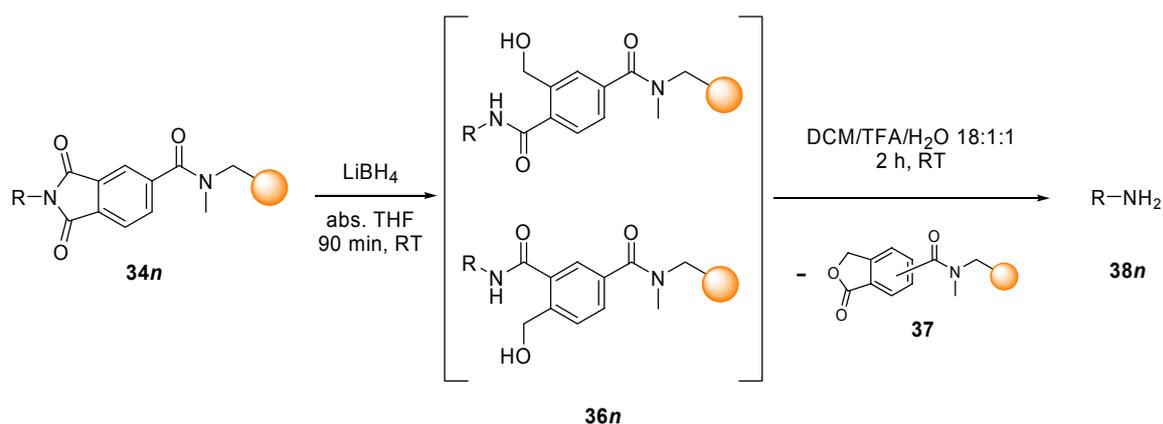


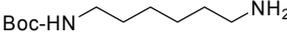
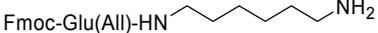
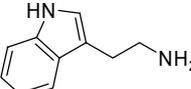
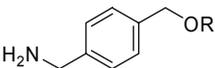
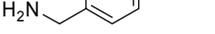
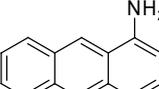
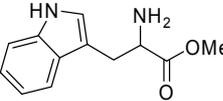
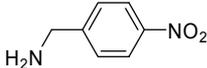
Abb. 4-34: LiBH₄-Reduktion zu polymeren Hydroxymethyldiamiden **36n** und anschließender Lactonisierung zu Harz **37** unter Freisetzung der Produkte **38n**.

An der festen Phase führten Reduktionsversuche mit NaBH₄ zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen. Auch die von den Autoren^[216] für die erfolgreiche und selektive Reduktion als entscheidend befundene Lösungsmittelzusammensetzung von *iso*-Propanol/Wasser (6:1) kann nicht ohne weiteres auf ein Festphasenprotokoll übertragen werden. Demzufolge musste eine neue Kombination von geeignetem Reduktions- und Lösungsmittel aufgefunden werden.

Bereits die Verwendung von NaBH₄ in abs. THF/abs. Methanol (1:1) lieferte nach 6 h Reaktionszeit unter Refluxbedingungen (65 °C) deutlich bessere Ergebnisse. Kriterium hierfür war die Phthalimid-Absorptionsbande von **34n** im IR, die nach vollständiger Reduktion verschwunden sein muß. Ein Wechsel zu LiBH₄ beschleunigte die Reduktion deutlich. Mit 3 eq LiBH₄ in abs. THF wurde eine vollständige Reduktion zu **36n** bereits nach 90 min erzielt. Prinzipiell können bei der Reduktion von **34n** zwei polymergebundene Produkte entstehen (vgl. Abb. 4-34), das 4-(Hydroxymethyl)-isophthaldiamid und das 3-(Hydroxymethyl)-terephthaldiamid (beide als **36n** bezeichnet). Für den weiteren Syntheseverlauf ist dies jedoch unerheblich. Analoge Überlegungen gelten für die Acylierungsprodukte **33n**.

Die anschließende Lactonisierung der Hydroxymethyldiamid-Harze **36n** unter Freisetzung der Aminprodukte **38n** wurde anfänglich mit THF/HOAc/Wasser-Gemischen bei 60 °C durchgeführt. Hier zeigte sich, daß ein HOAc-Zusatz von 5 % einen Gesamt-Wassergehalt von mindestens 30 % erfordert, um *N*-Acetylierung der Amine zu unterbinden. Die bessere Methode zur Lactonisierung an fester Phase besteht in der Verwendung von DCM/TFA/H₂O (18:1:1 (v/v)). Bereits bei Raumtemperatur konnten so binnen 2 h sehr gute Produktausbeuten (gravimetrisch/HPLC) erzielt werden (Tab. 4-5).

Tab. 4-5: Gravimetrisch festgestellte Ausbeuten und HPLC-Reinheiten (214 nm) der Amine **38n** nach hydrazinolytischer Abspaltung und Lactonabspaltung von den jeweiligen Phthalimidharzen **34n**. (*) Produktgemisch des Esters und des Hydrazides (LC-MS), daher nicht quantifiziert. **38-4b** wurde ausgehend von **38-4a** dargestellt, **38-2** aus **38-1**.

| Freigesetztes Produktamin | | N ₂ H ₄ -Abspaltung Ausb.; (HPLC) [%] | Lacton-Abspaltung Ausb.; HPLC [%] |
|---|--------------|--|--------------------------------------|
|  | 38-1 | 88; (92) | 63; (n.b.) |
|  | 38-2 | -- | 82; (97) |
|  | 38-3 | 86; (99) | 99; (96) |
|  | 38-4a | 88; (90) | 90; (99) |
|  | 38-4b | 87; (99) | -- |
|  | 38-5 | 68; (99) | 76; (89) |
|  | 38-6 | n.b.; (66+29)* | n.b.; (90) |
|  | 38-7 | 96; (95) | 84; (95) |

Die Abspaltung gemäß der Lactonmethode resultiert aufgrund der beiden regioisomeren Hydroxymethyldiamide **36n** in zwei isomeren Lactonen. Die ATR-IR-Spektren des Lactonharzes zeigen entsprechend der Regioisomerie von **37** eine verbreiterte Esterbande bei ca. $\nu = 1770 \text{ cm}^{-1}$ (Abb. 4-35).

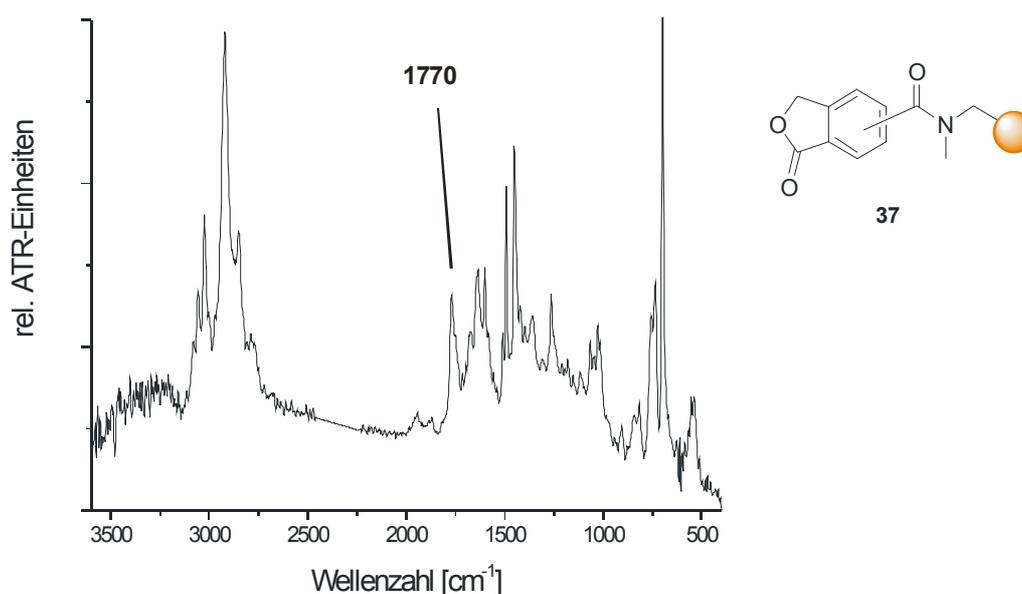


Abb. 4-35: FT-ATR-IR-Spektrum des Benzolacton-Harzes **37** nach cyclisierender Abspaltung mit einer durch Regioisomerie breit erscheinenden IR-Absorptionsbande des Lactones bei $\nu = 1770 \text{ cm}^{-1}$.

4.4.4 Stabilitätsprofil des Polystyrol-gebundenen TAL-Linkers

Zur vollständigen Charakterisierung des TAL-Systemes wurde untersucht, unter welchen Bedingungen TAL-immobilisierte Substrate zuverlässig am Polymer gebunden bleiben. Das Stabilitätsprofil wurde ermittelt, indem ein stark chromophores Amin (Tryptamin) auf TAL-Harz **32** immobilisiert wurde und das resultierende Harz **38-3** verschiedenen chemischen Bedingungen ausgesetzt wurde. Die Reaktionslösung durfte danach im HPLC-Chromatogramm kein freigesetztes Tryptamin zeigen und das FT-ATR-IR-Spektrum nach Waschen des Harzes keine Veränderungen aufweisen. Das TAL-System erwies sich dabei stabil gegenüber folgenden Bedingungen:

- | | |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> TMSOTf saure Glykosylierung | <input checked="" type="checkbox"/> verdünntes NaOMe (~ pH 9) |
| <input checked="" type="checkbox"/> TBTU/HOBT/DIPEA | <input checked="" type="checkbox"/> Ac ₂ O/Pyridin. |
| <input checked="" type="checkbox"/> 95 % TFA | <input checked="" type="checkbox"/> H ₂ O ₂ /THF |
| <input checked="" type="checkbox"/> Silylierung | <input checked="" type="checkbox"/> NBS |
| <input checked="" type="checkbox"/> 0.1 M DBU | <input checked="" type="checkbox"/> ΔT (1 h, 80 °C) |
| <input checked="" type="checkbox"/> 25 % Piperidin, | <input checked="" type="checkbox"/> HF/Pyridin |

Insbesondere die Resistenz gegenüber katalytischen Mengen Methanolat (Desacetylierungsbedingungen) und TMSOTf (Glykosylierungsbedingungen) machen das TAL-System zu einem attraktiven Linker für Kohlenhydratsynthesen. Auch Anforderungen der Peptidchemie werden toleriert, weiteres Potential birgt die Stabilität gegenüber den Bedingungen von oxidativ spaltbaren und β -eliminierbaren Schutzgruppen.

4.4.5 Synthese von Amino-Glykokonjugaten auf TAL-Harz

Zur Untersuchung der Eignung des TAL-Systemes für die Festphasensynthese von Oligosacchariden wurde am vorgestellten Trimellitsäureanhydrid-Linker **32** die Parallelsynthese von fünf verschiedenen Amino-*O*-rhamnopyranosiden unternommen.

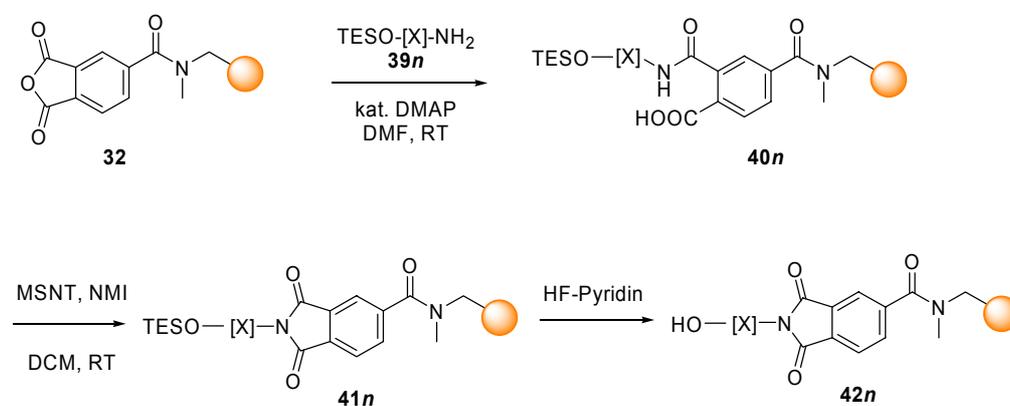


Abb. 4-36: Immobilisierung verschiedener *O*-silylierter Aminoalkohole (dargestellt als [X]) **39n** auf TAL-Harz mittels des MSNT-Protokolles und anschließende HF-Entschützung zu TAL-Aminoalkoholen **42n**.

Ausgegangen wurde hierbei von fünf *O*-Triethylsilyl-Aminoalkoholen **39n**, die durch einfache Standardsilylierung mit Triethylsilylchlorid erhältlich waren.^[210] Diese Silylaminoalkohole wurden über das vorgestellte Acylierungs-/MSNT-Verfahren auf TAL-Harz **32** zu den silylgeschützten Phthalimiden **41n** immobilisiert (Abb. 4-36) und anschließend mittels 20 % HF-Pyridin in Pyridin zu den korrespondierenden TAL-gebundenen Aminoalkoholen **42n** umgesetzt.

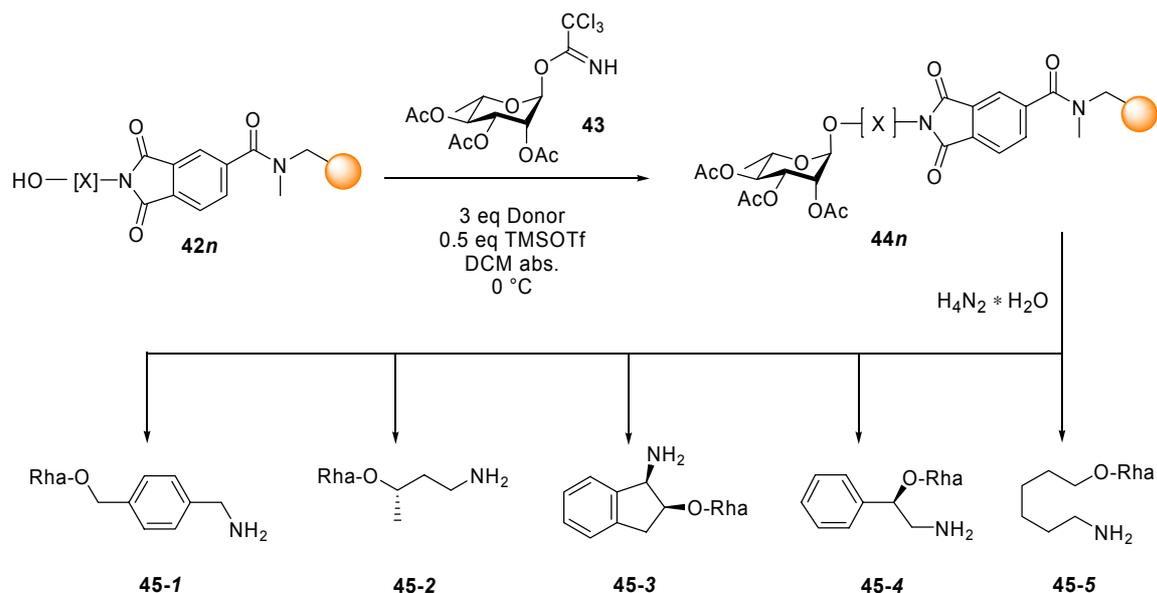


Abb. 4-37: Festphasenglykosylierung mit Trichloracetimidat-Donor **43** und anschließende Abspaltung der TAL-gebundenen Aminoalkohole **42n**. Rha = α -L-Rhamnopyranosyl-.

Die Glykosylierung mit 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-L-rhamnopyranosyl- α -trichloracetimidat **43** wurde mit 3 eq des Donors durchgeführt (Abb. 4-37). Zur Aktivierung waren bezüglich der rechnerischen Hydroxybeladung des Harzes **42n** 0.5 eq TMSOTf notwendig. Eine derart erhöhte Aktivatorkonzentration überrascht nicht unbedingt. Auch für andere Festphasen-Glykosylierungsbeispiele, die katalytisch aktivierbare Trichloracetimide verwenden, ist die notwendige Aktivierung durch stöchiometrischen Zusatz der jeweiligen *Lewis*säure beschrieben. Beispielsweise erfordert die Glykosylierung auf Alkylthiopolymeren^[221] 0.3 eq Aktivator, auf Tris(alkoxy)benzylamin funktionalisiertem PS (BAL-Linker)^[101] konnte erst ab 2 eq TMSOTf eine Glykosylierung erzielt werden.

Derart glykosyliertes TAL-Aminoalkoholharz **44n** zeigt starke IR-Absorptionsbanden der drei Acetylschutzgruppen bei $\nu = 1747 \text{ cm}^{-1}$. Die durch die intensive Esterbande überlagerte Phthalimidbande kann noch als Schulter des Estersignales erkannt werden (Abb. 4-38). Weitere Banden bei $\nu = 1219 \text{ cm}^{-1}$ und $\nu = 1049 \text{ cm}^{-1}$ weisen ebenfalls eindeutig auf den polymergebundenen acetylgeschützten Zucker hin.

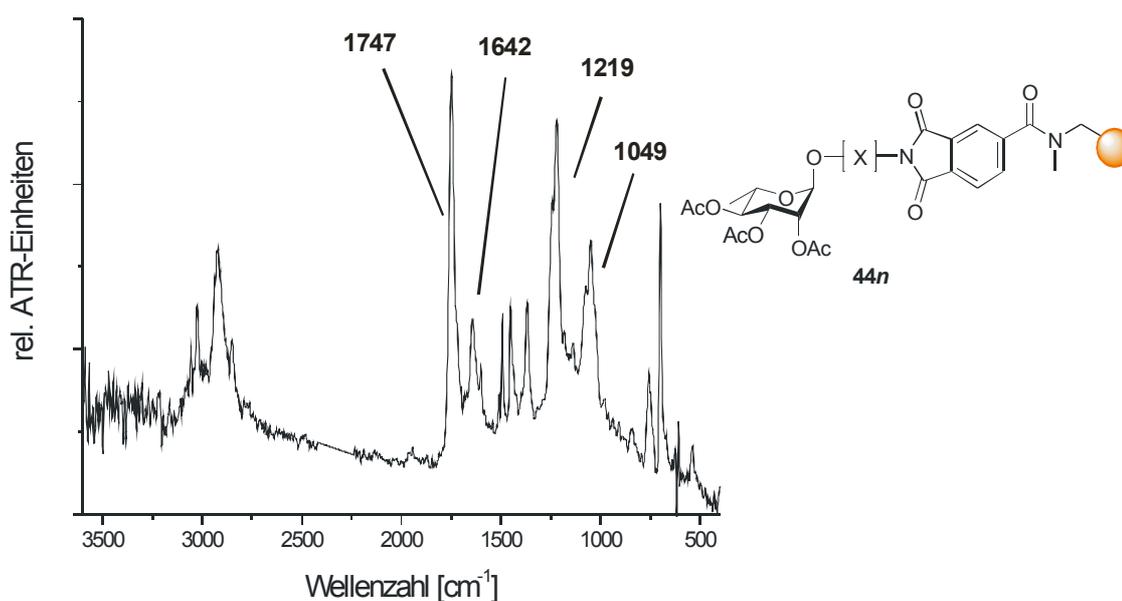


Abb. 4-38: FT-ATR-IR-Spektrum des glykosylierten Harzes **44-5** mit Absorptionsbanden der Acetatschutzgruppen bei $\nu = 1747 \text{ cm}^{-1}$ und $\nu = 1219 \text{ cm}^{-1}$.

Die Abspaltung und gleichzeitige Desacetylierung der Amino-Glykokonjugate vom TAL-Harz wurde über das Hydrazinolyseprotokoll erzielt. Nach dreimaligem Lyophilisieren der Rohprodukte **45n** konnte gravimetrisch eine zufriedenstellende Ausbeute erzielt werden. Die NMR-Analytik der Abspaltprodukte zeigte eine große Menge an Verunreinigung, die eindeutig vom Polystyrol-Backbone des polymeren Trägermaterials stammt (breite ^1H -NMR-Signale bei 7.0 – 6.6 ppm (aromatisch) sowie bei 1.9 - 1.6 ppm (aliphatisch)). Durch eine SPE-Aufreinigung konnten diese Anteile entfernt werden, jedoch bewegen sich die Ausbeuten der per NMR, ESI-MS und HPLC (Abb. 4-39) charakterisierten Verbindungen **45n** danach in der Größenordnung von ca. 50% (Tab. 4-6). Unglykosylierte Aminoalkohole konnten massenspektrometrisch nicht detektiert werden, so daß der Produktverlust auf die Zerstörung des PS-Gerüsts und in geringerem Umfang auf den Aufreinigungsschritt eingegrenzt werden konnte.

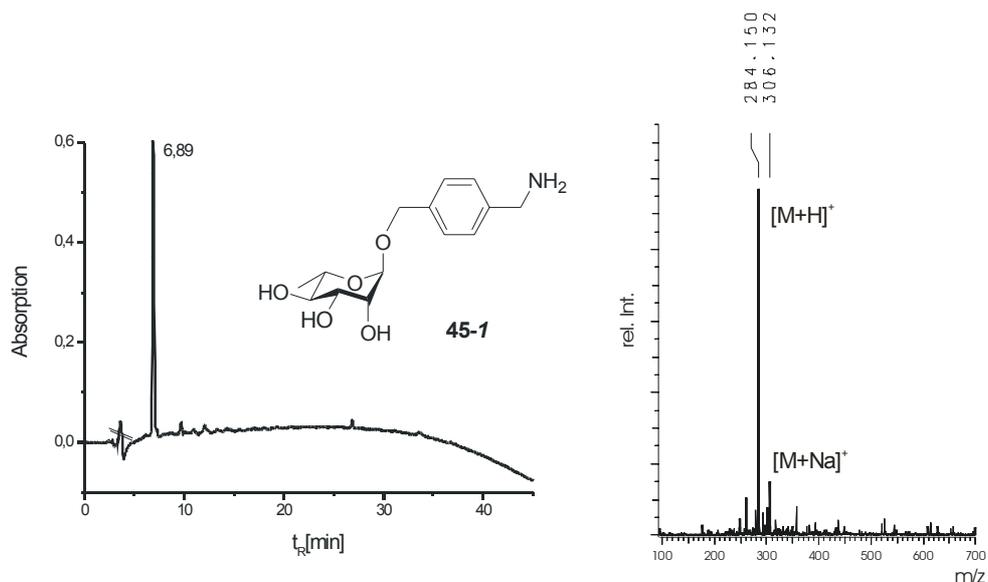
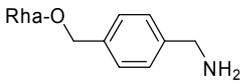
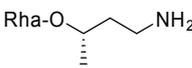
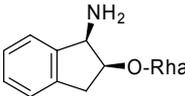
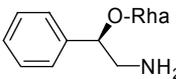
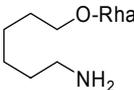


Abb. 4-39: HPLC-Chromatogramm (214 nm) und MS-Spektrum von Verbindung **45-1** nach Aufreinigung.

Da basische Reaktionsbedingungen zu nahezu quantitativen Ausbeuten führten (Tab. 4-5), scheint der Grund für die allgemein verminderte Ausbeute der Amino-*O*-rhamnoside **45n** offenbar das Polystyrol-Grundgerüst zu sein, das sich unter den stark *Lewis*-sauren Bedingungen (0.5 eq TMSOTf) als nicht ausreichend stabil erwies (vgl. Kap. 4.4.6).

Tab. 4-6: Gesamtausbeuten (Rohausbeute und nach SPE-Aufreinigung) der glykosylierten Aminoalkohole **45n** nach der fünfstufigen Festphasensynthese am TAL-System.

| Freigesetztes Amino- <i>O</i> -rhamnosid | Ausbeute | |
|---|----------|-------------------|
| | roh [mg] | aufgereinigt [mg] |
|  45-1 | 8.8 | 6.2 (54 %) |
|  45-2 | 10.1 | 5.9 (56 %) |
|  45-3 | 13.8 | 5.6 (35 %) |
|  45-4 | 14.2 | 8.0 (54 %) |
|  45-5 | 11.3 | 7.4 (49 %) |

4.4.6 Die Stabilität von PS unter Lewis-sauren Bedingungen

Die Ausbeute der in Kap. 4.4.5 gezeigten Glykosylierungsreaktionen konnte nicht weiter optimiert werden, es waren stets große Polystyrolanteile im abgespaltenen Produkt auffindbar. Das Problem der mangelnden Ausbeute ist daher nicht hauptsächlich am TAL-System, sondern am Trägermaterial zu suchen:

Quervernetztes Polystyrol ist das gegenwärtig am weitesten verbreitete Trägermaterial der Festphasenchemie. Gegenüber starken Basen (LDA, 40% NaOH/180 °C), schwachen Oxidantien (Ozon, DDQ) und Säuren (HBr, TfOH) ist es nahezu inert. Allerdings kann das polymere Gerüst unter Bedingungen, die allgemein Alkylbenzole chemisch modifizieren, in Mitleidenschaft gezogen werden. In Frage kommen dafür starke Oxidationsmittel bei hohen Temperaturen und starke Lewis-säuren bereits bei Raumtemperatur.^[222]

Für die Glykochemie ist besonders die Beständigkeit unter Lewis-sauren Bedingungen von Relevanz: Unter dem Einfluß starker Lewis-säuren kann das Polystyrolgerüst depolymerisieren. Die Quervernetzung des Backbones wird unter Aufbau neuer Verzweigungen umstrukturiert, und es werden gleichzeitig niedermolekulare PS-Ketten aus dem Gerüst entfernt. Solvensabhängige *Friedel-Crafts*-analoge Reaktionen dieser Art sind für Polystyrol beschrieben.^[223] Eine durch Depolymerisierung verursachte Viskositätsniedrigung von unvernetztem PS kann ebenfalls beobachtet werden.^[224;225]

In der Literatur existieren Hinweise, daß schon bei kurzen Festphasensynthesen mit Lewis-säuren wie ZnBr₂ bei RT oder ZnCl₂ bei 50 °C Ausbeuteverluste von ca. 40 % entstehen.^[226;227] *Kobayashi* konnte zeigen, daß eine über TMSOTf und Sc(OTf)₃ verlaufende kurze Reaktionssequenz an fester Phase eine dramatische Ausbeutesteigerung (bis zu 30 % im Vergleich mit Standard-Merrifield Harz) erfährt, wenn das gewählte Linkersystem nicht über Heteroatome z.B. als Ether, Ester oder Amid angeknüpft wird, sondern ein für diese Studie dargestelltes rein aliphatisches CMPP-Harz^[228] (5-(4'-Chlormethylphenyl)pentyl-Polystyrol) verwendet wird. Dies indiziert, daß die eingesetzten Lewis-säuren bevorzugt an Stickstoff und Sauerstoff der Linkeranknüpfung koordinieren und von diesem Startpunkt aus Linker und Trägermaterial depolymerisieren können. Nichtsdestotrotz führt auch die Verwendung des CMPP-Harzes in manchen Fällen zu Ausbeuterückgängen, die vermutlich auf die nicht-Heteroatom-induzierte Depolymerisation tieferliegender Polystyrolketten zurückzuführen ist.^[228]

Eigene Experimente an verschiedenen (auch unfunktionalisierten) PS-Harzen bestätigten, daß die gewählten Glykosylierungsbedingungen (30 min Einwirkung einer ca. 0.05 M TMSOTf/DCM-Lösung bei RT) dazu führten, daß der Polystyrolträger depolymerisiert. Per $^1\text{H-NMR}$ konnte eluiertes PS einfach detektiert werden. Eine Quantifizierung war aufgrund von Salzbildung im TAL-Polymer nicht möglich.

Es muß in Betracht gezogen werden, daß die zu den reversiblen elektrophilen Substitutionsreaktionen gehörende *Friedel-Crafts*-Alkylierung während *Lewis*-saurer Festphasenglykosylierungen teilweise auch als Rückreaktion am Polystyrol, d.h. als Desalkylierung unter Aufhebung der Polymerquervernetzung, abläuft. Dieser Gedanke steht in Übereinstimmung mit den gemachten Beobachtungen am TAL-System und wirft die Frage auf, ob Polystyrol prinzipiell als Träger für Glykosylierungsreaktionen nicht eher vermieden werden sollte.

Die für einen einzigen Glykosylierungsschritt zufriedenstellenden Ausbeuten bei sehr guten Reinheiten belegen die generelle Verwendbarkeit des TAL-Systemes.^[229] Für die anvisierten iterativen Glykosylierungen erscheint das System allerdings nicht geeignet zu sein. Dies gilt um so mehr, als für die iterative Oligosaccharidsynthese ein Dibenzyl-Phthalimid-Konstrukt (Abb. 4-26) als Glykosylierungsanker und damit als zentraler Baustein geplant war. Da dieser Dibenzyl-Baustein beidseitig sowohl über das Glykosid als auch das Imid gegenüber *Lewis*säuren aktiviert wird, ist er eindeutig zu reaktiv unter Bedingungen, die bereits an den weniger reaktiven benzyllischen Funktionen des Polystyrols zu den beschriebenen Depolymerisationsreaktionen führen.

4.5 HASP – Eine neue Strategie der Parallelsynthese

Zur Entwicklung einer leistungsfähigen Methode der Festphasensynthese, die die iterative, parallele Glykosylierung gestattet, wurde im vorliegenden Kapitel die generelle Eignung eines reversiblen, hydrophoben Ankers als Phasenmarkierung (vgl. Kap. 3.2.6) untersucht.^[114;116] Ziel dieser Untersuchungen war es, eine hocheffiziente Festphasenstrategie zu finden, die polymere Trägermaterialien wie PS oder PEG und die mit ihnen verbundenen Nachteile (vgl. Kap. 4.4.6) umgeht.

Erstrebenswert wäre es, das Kohlenhydratsubstrat mittels eines hydrophoben Labels kovalent an einem hydrophoben Träger zu immobilisieren. Die Verankerung über eine hydrophobe Phasenmarkierung an einem geeigneten Träger sollte es dann ermöglichen, durch einen – im Unterschied zu SPE – nicht-kontinuierlichen Polaritätswechsel der Lösungsmittel (z.B. durch Evaporation und anschließender Zugabe eines polarerer Lösungsmittels) das Substrat während einer Synthese polymer zu binden. Dieser Gedanke stellt eine methodische Weiterentwicklung der Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) dar, die allgemein zur Aufkonzentrierung von Proben^[230] und zur Aufreinigung kombinatorisch erstellter Substanzbibliotheken verwendet wird.^[231;232] Dieses neue Konzept hätte im Unterschied zu Fluorphasen-Markierungen und den „gewöhnlichen“ polymeren Phasenmarkierungen aufgrund der nicht-kovalenten, reversiblen Immobilisierung den großen Vorteil, als Hybridstrategie zu jedem beliebigen Zeitpunkt einer Synthese das Arbeiten sowohl in Lösung als auch an fester Phase zu erlauben.

Die im Hinblick auf die Synthese von Glykolipiden entwickelte „Hydrophob unterstützte Phasenwechsel-Synthese“ (Hydrophobically assisted switching phase (*HASP*[†]) synthesis) soll in diesem Kapitel zunächst als allgemein verwendbares Konzept der Festphasensynthese vorgestellt und charakterisiert werden. Kriterium für eine allgemeine Verwendbarkeit soll daher die Anwendbarkeit innerhalb der Glykochemie sein.

[†] Hasp: Any of several devices for fastening; *especially*: a fastener especially for a door or lid consisting of a hinged metal strap that fits over a staple and is secured by a pin or padlock. (Quelle: *Encyclopaedia Britannica*). Die Wahl des Akronymes HASP soll die reversible und quantitative Substratanbindung an einen hydrophoben Träger während hydrophob unterstützter Phasenwechsel-Synthese verdeutlichen.

4.5.1 Vorversuche zur Ermittlung geeigneter Bedingungen für die reversible und quantitative Lipid-Immobilisierung auf RP-18-Silica

Um Substrate für eine Festphasensynthese nicht-kovalent über hydrophobe Wechselwirkung an einem Trägermaterial zu immobilisieren und von Verunreinigungen und Edukten durch Waschschrte und anschließender Filtration befreien zu können, sind Solvensbedingungen notwendig, die mit einem einzigen Lösungsmittel kaum erreichbar sind. Dessen Polarität müsste hoch genug sein, um das gelöste Substrat am hydrophoben Träger während der Waschschrte quantitativ zu adsorbieren, während andererseits die Polarität des Lösungsmittels nicht allzu hoch gewählt werden darf, da das unpolare Substrat anfänglich vollständig gelöst sein muß, um gleichmäßig durch Diffusion in das verwendete hydrophobe Trägermaterial (C₁₈-Umkehrphasen-Kieselgel, RP-18) einzudringen.

Eine derartige Immobilisierung kann allerdings durch einen nicht-kontinuierlichen Lösungsmittelwechsel erreicht werden (mit einem unpolaren Solvens und dessen anschließender Evaporation). Für die Waschschrte kommen polare Methanol/Wasser-Gemische in Frage. Daher wurde zunächst das Verhalten der Substratretention von Verbindungen mit unterschiedlichen Fettsäure-Kettenlängen in RP-18-Dünnschichtchromatogrammen mit Methanol/Wasser-Gemischen als Laufmittel untersucht.

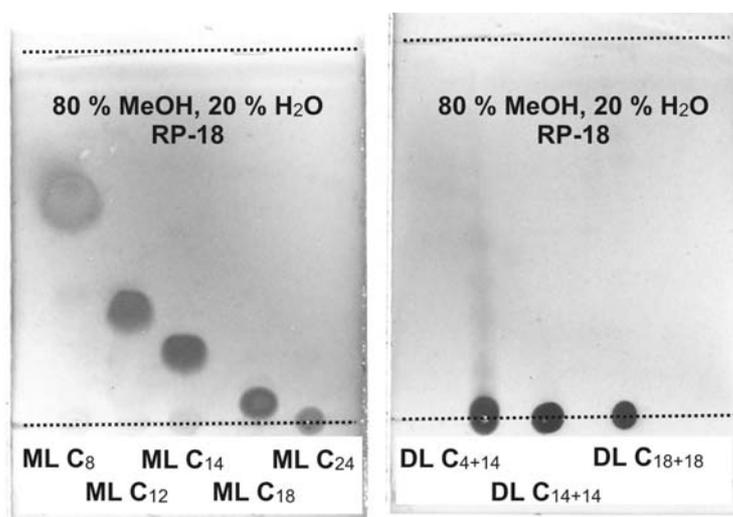


Abb. 4-40: Dünnschichtchromatogramme (RP-18, Methanol/Wasser 80/20 v/v, Ce(IV)Mo-Dip) von Monolipid-Fettsäuren (links) der Kettenlänge C₈ bis C₂₄ und Dilipiden (rechts) von C₄-C₁₄, C₁₄-C₁₄, und C₁₈-C₁₈. Die Dilipide tragen bereits eine polare Kohlenhydratkopfgruppe. Der Vergleich von z.B. ML-C₁₈ mit DL-C₄-C₁₄, das zusätzlich eine polare Zuckerkopfgruppe trägt, zeigt, daß die Dilipide trotz übereinstimmender Lipid-Gesamtkettenlänge unter gleichen Polaritätsbedingungen wesentlich hydrophober sind.

Wichtigstes Kriterium für die Retention von *n*-Alkylcarbonsäuren ist die Kettenlänge: Die Hydrophobizität von C₈-C₂₄ deckt ein so breites Spektrum ab, daß sich keine Laufmittelzusammensetzung finden ließ, bei denen alle *n*-Carbonsäuren C₈-C₂₄ einen R_f = 0 aufweisen, was eine Voraussetzung für die hydrophobe Phasenmarkierung mit Lipiden ist. Durch Variation der Kopfgruppe läßt sich der R_f-Wert dieser Monolipide nochmals stark beeinflussen.

Die Einführung einer zweiten *n*-Alkylkette mittels Veresterung führte zu Dilipiden (in Abb. 4-40 gezeigt sind die Verbindungen **60a**, **60e** und **60h** aus Kap. 4.7.2) und bringt eine umfangreiche Verstärkung der Hydrophobizität mit sich. Unter gleichen Polaritätsbedingungen zeigen Dialkyl-Lipide gegenüber Monoalkyl-Lipiden trotz identischer Gesamtkettenlänge (z.B. ML C₁₈ gegenüber DL C₄-C₁₄) eine gesteigerte Hydrophobizität^[233]. Eine Variation der polaren Kopfgruppe (wie in Abb. 4-40 gezeigt: DL C₄-C₁₄ trägt bereits ein Kohlenhydrat) scheint keinen starken Einfluß auf die Hydrophobizität zu haben. Aufgrund dieser Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, daß jedes Dilipid mit n(C) > 18 eine ausreichend hydrophobe Phasenmarkierung für die HASP-Strategie ist und daß sich ein Bis-*n*-octadecyl-Label (C₁₈)₂ als Ankermotiv besonders eignen sollte.

Als Trägermaterial für HASP-Synthesen wurde Octadecyl-funktionalisiertes Reversed Phase Silica Grom-Sil ODS-4 HE Kieselgel mit einer Körnung von 50 µ bei 120 Å Porengröße (Grom, Tübingen) gewählt. Dieses RP-18 Kieselgel mit großer Porenweite wird als Standardmaterial für SPE eingesetzt und ist mit denselben Parametern auch von anderen Firmen kommerziell beziehbar.

Analoge Versuche an HPLC-RP-Silica mit geringerer mittlerer Porengröße (60 Å) führten zu einer schlechteren Rückgewinnungsrate der immobilisierten Substrate. Der Grund hierfür ist in einer nicht optimalen Substratverteilung bzw. in unvollständiger Diffusion in das Partikelinnere zu suchen, so daß es während der Waschschrte zu Substratverlust kam: Als Faustregel der SPE gilt, daß die Grenze von 60 Å für einen C₁₈-Baustein nicht unterschritten werden sollte (bei einer sp³-C-C-Bindungslänge von 154 pm entspricht die Gesamtlänge von C₁₈ (= ca. 30 Å) etwa der halben mittleren Porengröße).

Eine weitere empirische Regel der SPE besagt, daß das Massenverhältnis zwischen Probe und RP-Material ca. 1:100 betragen sollte (entspricht etwa zehn C₁₈-Ketten/Substratmolekül). Für HASP wurde ein Verhältnis von 1:10 verwendet (vgl. Kapitel 4.5.4), ohne daß dadurch Ausbeuteverluste zu beobachten waren.

4.5.2 Darstellung des Bis-*n*-octadecyl HASP-Ankers

Will man die HASP-Methode als allgemein anwendbare Festphasenstrategie verstehen, muß man unterscheiden zwischen Substanzen, die intrinsische Bis-*n*-alkyl-Dilipide sind und daher keiner zusätzlichen Phasenmarkierung bedürfen und Verbindungen, die kein solches Dilipid-Motiv aufweisen. Letztere können jedoch mittels eines maßgeschneiderten Dilipid-Ankers für die HASP-Methode allgemein zugänglich gemacht werden. Hierfür wurde basierend auf den Vorversuchen (Kap. 4.5.1) ein Bis-*n*-octadecyl-Anker entworfen, dessen Synthese aus den einfachen Grundchemikalien Epichlorhydrin und *n*-Octadecanol gelingt.

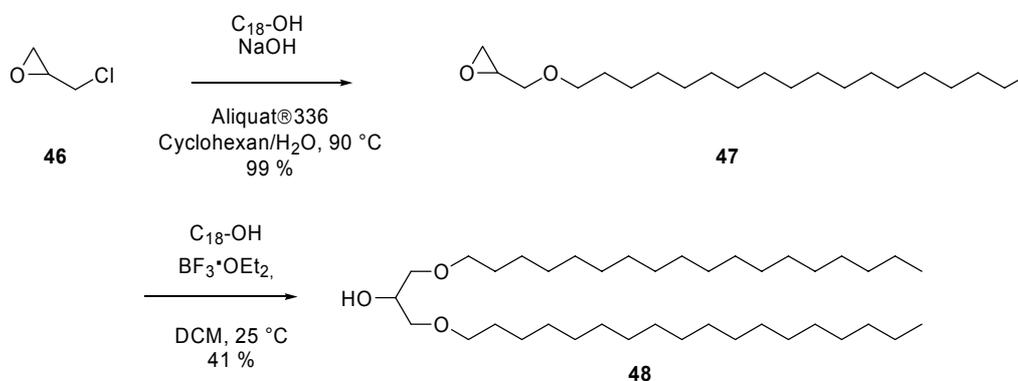


Abb. 4-41: Darstellung eines Hydroxy-funktionalisierten Bis-*n*-octadecyl-Ankers für die HASP-Synthese.

Ausgehend von racemischem Epichlorhydrin **46** wurde das Dilipid über zwei Schritte erhalten. Zunächst wurde Epichlorhydrin an der Glycidylposition alkalisch mit *n*-Octadecanol verethert. Da durch Versuche mit Natriumhydrid in THF nur geringe Produktausbeuten erzielbar waren, kam als Base eine 50 %ige NaOH/Wasser-Lösung (w/w) zum Einsatz, wie es für die Veretherung von Epichlorhydrin in Cyclohexan-Wasser-Systemen bereits beschrieben ist.^[234] Allerdings bedeutet dies, daß die Reaktion zweiphasig durchgeführt werden muß, so daß die Veretherung mit *n*-Octadecanol einen geeigneten Phasentransferkatalysator erfordert. Ein Zusatz von Tetrabutylammoniumbromid (TBAB)^[234] führte bei 90 °C zu keiner Ausbeutesteigerung gegenüber der unkatalysierten Zweiphasenreaktion in Cyclohexan/Wasser. Die Reaktion verläuft jedoch unter denselben Bedingungen quantitativ zum 1,2-Epoxy-3-octadecyloxypropan **47**, wenn der langkettige Phasentransferkatalysator Aliquat®336 (Methyltricaprylammoniumchlorid) verwendet wurde.^[235;236]

Das Epoxid des so dargestellten Glycidylethers **47** wurde unter $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ - saurer Katalyse wiederum mit *n*-Octadecanol als Nukleophil geöffnet (Abb. 4-41).^[237] Hierbei musste die Reaktionslösung auf 20 °C temperiert werden, um eine Ausfällung der Fettsäurebausteine zu verhindern. Eine Epoxidöffnung zum 1,2-Dilipid wurde nicht beobachtet. Das resultierende 1,3-Bis-octadecyl-2-propanol **48** kann mittels Normalphasenchromatographie von überschüssigem *n*-Octadecanol nur schwer wieder abgetrennt werden. Die mit 41 % relativ niedere Ausbeute der Epoxidöffnung ist in erster Linie auf das annähernd identische Laufverhalten von **47** und **48** unter nahezu allen Laufmittelzusammensetzungen und den dadurch entstehenden Verlusten durch sich überschneidende Chromatographiefraktionen zurückzuführen.

4.5.3 Hydroxybenzylfunktionalisierung des HASP-Ankers

Verbindung **48** wurde zum Hydroxybenzyl-HASP-Anker **52** funktionalisiert, da das HASP-Festphasenkonzept an der Synthese von Oligosacchariden evaluiert werden soll. Die Benzylschutzgruppe des HASP-Ankers, die inert gegenüber den stark *Lewis*-sauen Bedingungen der Glykosylierungsreaktionen ist, kann als Standardschutzgruppe für die Synthese von Oligosacchariden im finalen Debenzylierungsschritt zusammen mit anderen permanenten Benzylschutzgruppen entfernt werden. Diese Strategie gewährleistet einen generell anwendbaren HASP-Festphasenzugang zu Oligosacchariden unter Einbeziehung von benzylgeschützten Donoren.

Erreicht wurde die Einführung der Benzyl-Funktionalität durch Veretherung des 2-Propanols **48** mit einem Überschuß von α, α' -Dibromxylool **49**. Bei einem Überschuß von 2.5 eq ist eine beidseitige Veretherung des Dibromides **49** nicht zu beobachten und es konnten nach chromatographischer Aufreinigung 71 % des Benzylbromides **50** erhalten werden. Als wichtig erwies sich die Verwendung eines THF/Toluol-Gemisches, da THF alleine das Edukt nicht zu lösen vermag.

Das Bromid **50**, das durch Immobilisierung von Stickstoffnukleophilen eine breitere Verwendbarkeit des HASP-Ankers ermöglicht, wurde abschließend in einen glykosylierbaren Benzylalkohol transformiert. Versuche der direkten Bromidsubstitution mit Hydroxid über KOH/Kronenether, über NaOH/Aliquat[®] 336 und über KOH/Tetrabutylammoniumhydroxid führten zu mangelhaften Ausbeuten des Benzylalkoholes.

Abhilfe schuf der Umweg über die Bromidsubstitution mittels eines Acetates bei 100 °C. Das Benzylbromid **50** konnte so mit hervorragenden 99 % Ausbeute zu Benzylacetat **51**

umgesetzt werden, welches sich durch eine einfache *Zemplén*-Desacetylierung mit 90 % Ausbeute in den gewünschten Benzylalkohol **52** überführen ließ (Abb. 4-42), der gleichermaßen als benzylicher Linker und Dilipid-HASP-Anker dient.

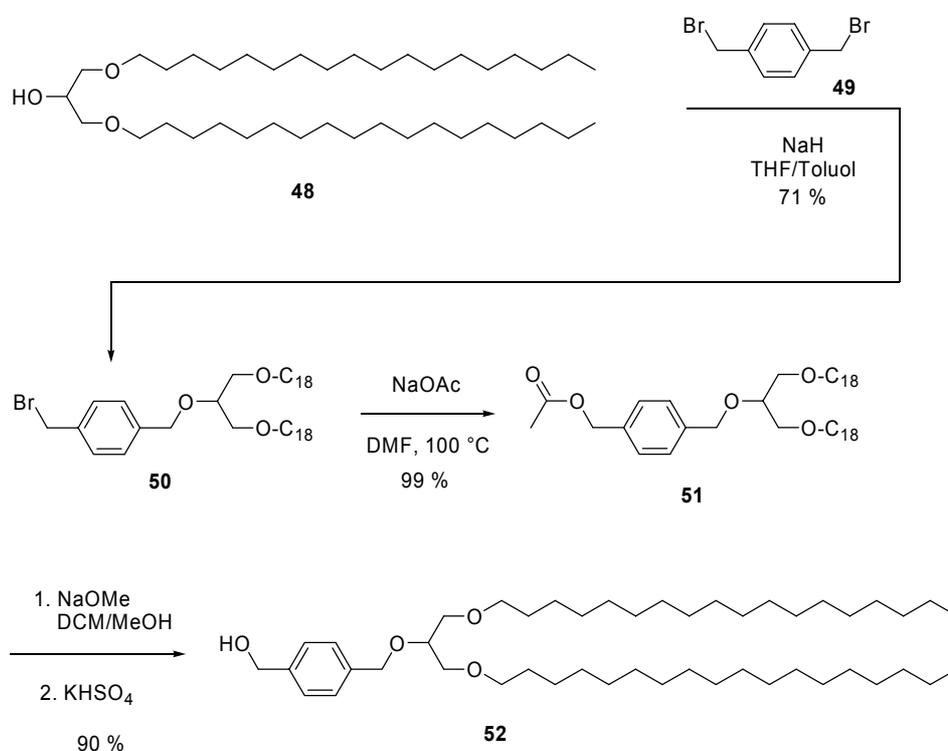


Abb. 4-42: Funktionalisierungsschritte zum Glykosylierungsanker, dem Hydroxybenzyl-HASP-Anker **52**.

Im folgenden wird für das 2-[(4-Hydroxymethylphenyl)-methoxy]-bis-1,3-octadecyl-2-propan **52**, also anstelle der vollständigen Strukturformel des HASP-Ankers aus Gründen der Übersichtlichkeit das in Abb. 4-43 gezeigte Symbol verwendet.

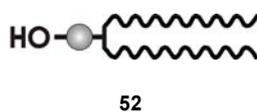


Abb. 4-43: Symbolische Darstellung des HASP-Glykosylierungsankers, des Benzylalkoholes **52**.

Um zu verdeutlichen, daß es sich bei HASP um eine Festphasenstrategie handelt, wurde ein Symbol gewählt, das an das gängige Symbol für polymere Träger der SPOS erinnert und dieses um die schematische Darstellung zweier Dilipidketten erweitert.

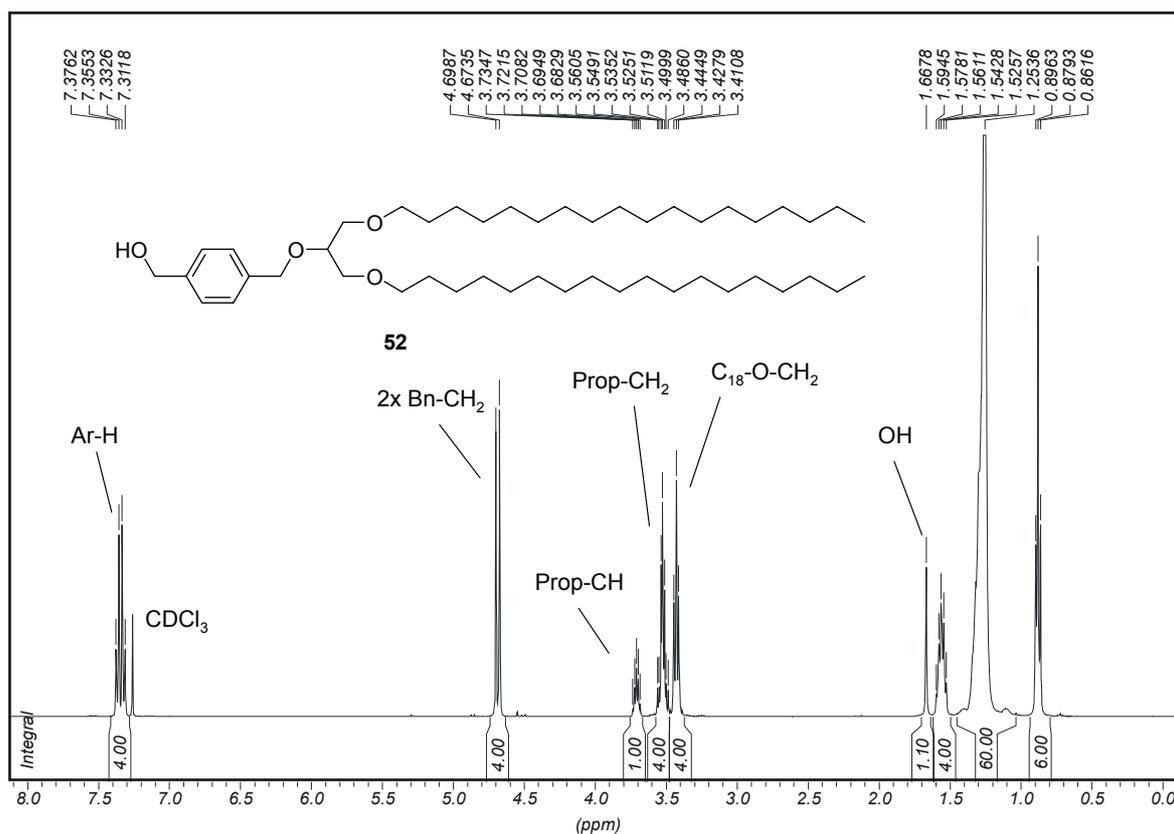


Abb. 4-44: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, CDCl_3) des Glykosylierungsankers 2-[(4-Hydroxymethyl-phenyl)-methoxy]-bis-1,3-octadecyl-2-propan **52**. Unbezeichnete Signale gehören zu den aliphatischen CH_2 -Gruppen der Dilipid-Alkylketten.

4.5.4 Durchführung von HASP-Synthesen und verwendete Geräte

Im Hinblick auf die Immobilisierung von Dilipiden an C_{18} -RP-Silica für die HASP-Strategie wurden zwei sich gegenseitig ergänzende Methoden/Protokolle entwickelt. Alle durchgeführten HASP-Synthesen wurden in der Größenordnung von bis zu 0.5 mmol bzw. 400 mg des erwünschten Produktes durchgeführt. Es erwies sich für die quantitative Substratimmobilisierung als ausreichend, mit einer Retentionskapazität von 10 % zu arbeiten, also pro 100 mg des jeweiligen Dilipidproduktes 1 g RP-18 als Träger zu verwenden.

Ein Phasenwechsel von der flüssigen zur festen Phase kann bei HASP verschiedenartig erreicht werden: Lipide in Reaktionsansätzen, die flüchtige organische Lösungsmittel beinhalten, können durch einfache Evaporation am RP-18 Träger immobilisiert werden. Daher war es von Vorteil, die jeweiligen Reaktionen in einem Büchi[®] Syncore Syntheseautomaten (Abb. 4-45) durchzuführen: Diese Reaktionsplattform erlaubt die parallele Reak-

tionsführung und anschließende Evaporation und eignete sich hervorragend für die Parallelevaporation der Lösungsmittel aus den von der Konsistenz her breiartigen HASP-Ansätzen. Durch ein Filtrationsmodul konnten die so immobilisierten Verbindungen aufgereinigt und eluiert werden, ohne dafür das trockene und substratbeladene RP-Silica in ein anderes Gefäß/eine Fritte zu transferieren. Alternativ wurden modifizierte Glasfritten verwendet, die mit Hahn, Fritte und einem bzw. zwei verschraubbaren Verschlüssen ausgestattet waren und für die nicht-parallele Synthese eingesetzt wurden. Hierbei war nach Evaporation jedesmal ein Transfer des beladenen RP-Silica in die Fritte notwendig.

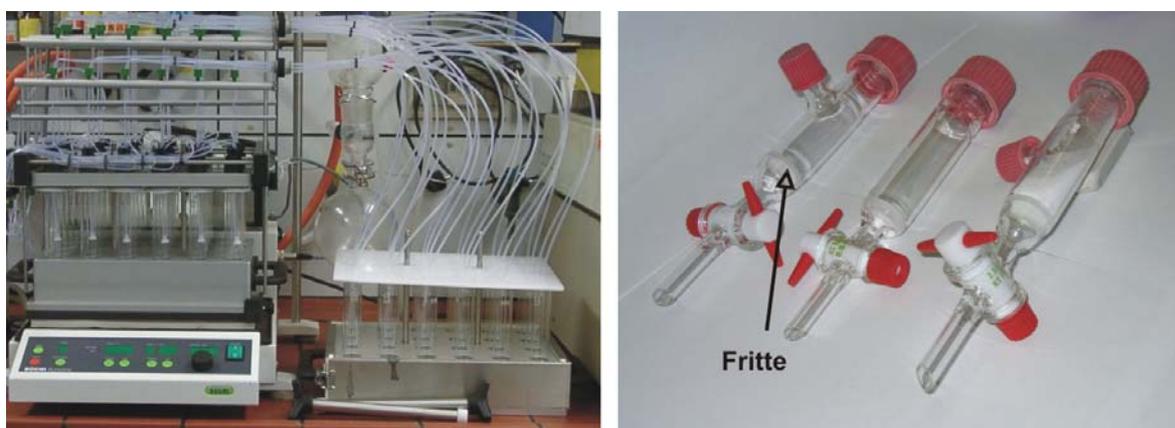


Abb. 4-45: Büchi[®] Syncore Synthesepattform (links) für parallele Reaktionsführung und Evaporation. Mit dem Filtrationsmodul kann das RP-Trägermaterial ohne Transfer gewaschen und das Produkt eluiert werden. Modifizierte verschraubbare Glasfritten mit Hahn (rechts) für die manuelle HASP-Synthese (bedingt den Transfer des Trägermaterials bzw. der Reaktionslösung).

Zusätzlich kann ein Phasenwechsel von der flüssigen an die feste Phase erreicht werden, wenn der Lösungs-Reaktionsansatz in einem wässrig verdünnbaren Lösungsmittel vorliegt. Die Reaktionslösung wird in diesem Fall auf RP-Silica gegeben und kann nach Zusatz von wenigen Volumenteilen Wasser filtriert werden – hydrophobe Dilipide bleiben quantitativ am Träger adsorbiert. Die exakte Menge Wasser, bei der das Dilipidsubstrat quantitativ am Träger adsorbiert bleibt, muß durch DC-Experimente ermittelt werden. Für den in MeOH oder THF gelösten Hydroxybenzyl-HASP-Anker **52** ist bereits ein Zusatz von 5 % Wasser (v/v) völlig ausreichend für eine quantitative Immobilisierung. Auch diese Form der Substratimmobilisierung wurde sowohl mittels des Büchi[®] Syncore als auch mit den modifizierten Glasfritten erfolgreich durchgeführt.

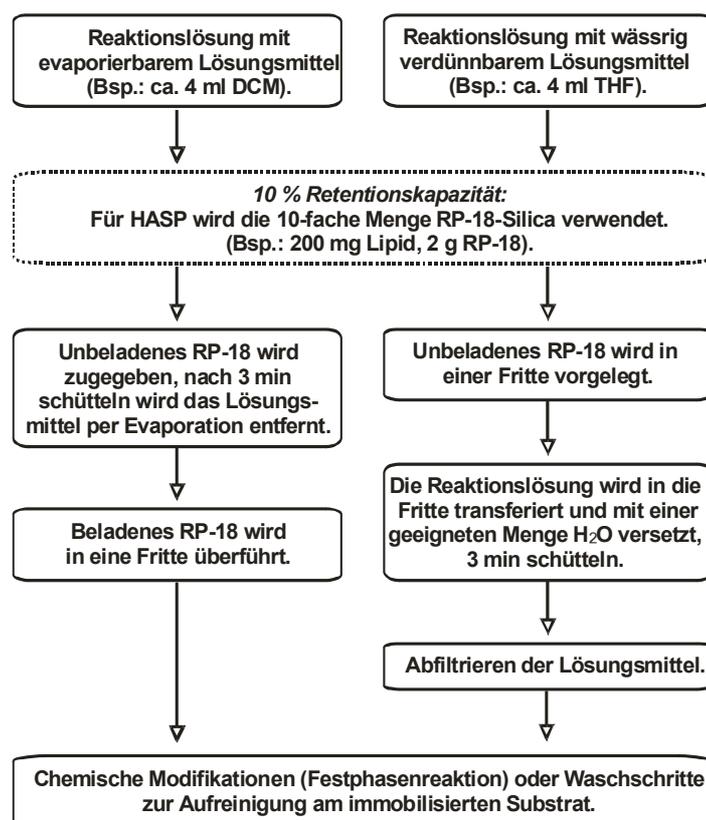


Abb. 4-46: Fließschema der RP-18 Substratbeladung während HASP-Synthesen. Das Schema gibt die Vorgehensweise für die „manuelle“ HASP wieder (Verwendung der Frittengefäße mit Hahn). Bei Verwendung der Büchi® Syncore-Plattform entfällt der Schritt des RP-Silica Transfers.

Nachdem das jeweilige Dilipidsubstrat so an den hydrophoben Träger nichtkovalent angebunden wurde, konnten chemische Modifikationen vorgenommen werden oder die Reaktionsansätze der Lösungssynthese über einen Filtrationsschritt aufgereinigt werden. Für Festphasenreaktionen besteht allerdings aufgrund der hydrophoben Immobilisierung die Einschränkung, spätestens bei der Filtrationsaufarbeitung mit anteilig wässrigen Lösungen (ab 5 % H₂O v/v) arbeiten zu müssen, um nicht erhebliche Produktmengen durch Auswascheffekte zu verlieren. Zur Aufreinigung von Veresterungs- oder Glykosylierungsreaktionen dilipidhaltiger Verbindungen hat es sich bewährt, im Anschluß an den Adsorptionsschritt das Trägermaterial durch Waschen mit einer Methanol/Wasser-Mischung (80 %/20 %) von nicht umgesetzten überschüssigen Edukten und Nebenprodukten zu befreien. Mit dieser Waschlösung konnte ein C₁₈-Monolipidbaustein noch eluiert werden, während ein beliebiges Dilipid quantitativ adsorbiert blieb. Ein C₂₄-Monolipid konnte auch

mit höherem Methanolanteil nicht mehr abgetrennt werden, so daß eine Monolipid-Kettenlänge von $> C_{20}$ als Grenze der HASP-Methode angesehen werden muß.

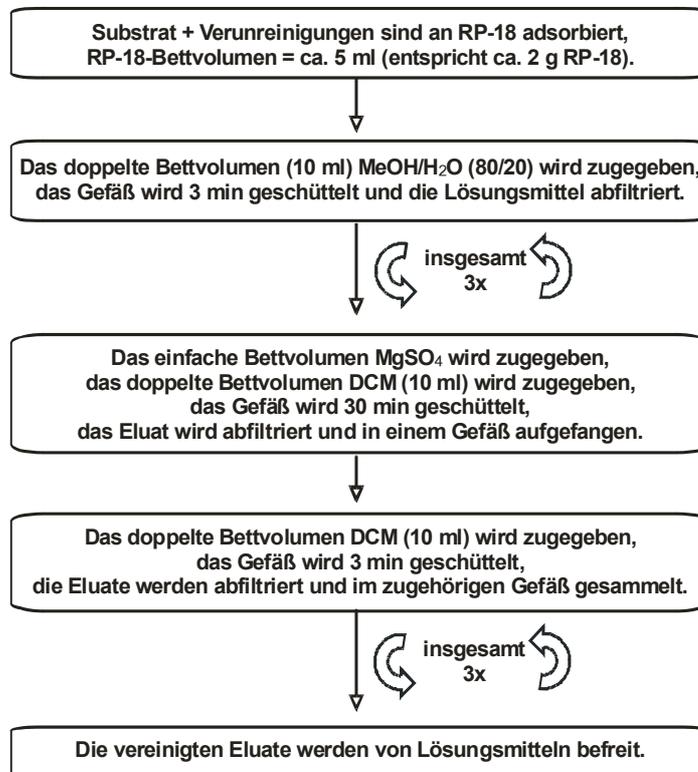


Abb. 4-47: Fließschema der RP-18 Substrataufreinigung während HASP-Synthesen. Das Schema gibt die allgemeine Vorgehensweise mit Methanol/Wasser(80/20) und $MgSO_4$ zur Trocknung mit insgesamt drei Waschschritten und drei Elutionsschritten wieder.

Im Anschluß an die Waschschriffe, die insgesamt dreimal durchgeführt wurden um eine vollständige Abtrennung aller Verunreinigungen zu gewährleisten, wurde das Dilipid-Substrat durch unpolare Lösungsmittel wieder vom hydrophoben Träger freigesetzt. Als unpolare Solventien für die Elution von stark hydrophoben Verbindungen kommen niederkettige *n*-Alkane in Frage, insbesondere *n*-Pentan und das geringfügig polarere *n*-Hexan. Als genauso effizient erwies sich die Verwendung von Dichlormethan, das im folgenden als Standard-Eluens verwendet wurde. Nach dreimaliger DCM-Elution konnten auch die hydrophobsten Verbindungen mit Rückgewinnungsraten von annähernd 100 % eluiert werden.

Ein Problem stellte noch die Entfernung von Wasserspuren dar, die nach den Methanol/Wasser Waschschriffen im RP-Silica-Träger verblieben. Durch Zugabe des einfachen

Bettvolumens wasserfreien Magnesiumsulfates im ersten DCM-Elutionsschritt konnten diese entfernt werden. Zur vollständigen Bindung der Wasserspuren erwies es sich als nicht ausreichend, die RP-Silica/MgSO₄/DCM-Mischung nur kurz (3 min.) zu schütteln, so daß für den Trocknungsschritt 30 min geschüttelt wurde.

4.6 HASP-Synthese eines Pentasaccharides

Um die Effizienz der vorgestellten HASP-Strategie zu belegen, wurde mittels des dargestellten HASP-Ankers **52** eine mehrstufige HASP-Synthese durchgeführt. Insbesondere für die Kohlenhydratchemie bietet sich HASP an, da Glykosylierungsschritte an fester Phase nur unzureichend ablaufen und daher bevorzugt in Lösung durchgeführt werden (vgl. Kap. 4.4.5). Andererseits ist die Abspaltung von Schutzgruppen am Polymer unproblematisch, so daß hier ein Festphasenschritt das Optimum darstellt. Als Exempel wurde daher in iterativer HASP-Synthese eine Abfolge von Glykosylierungen und Schutzgruppenabspaltungen gewählt, während der in jedem Schritt zwischen fester Phase und Lösungsphase gewechselt wurde und so die Reaktion in der jeweils optimalen Phase durchgeführt wurde.

4.6.1 Aufbau des Oligosaccharidgerüsts

Ausgegangen wurde von dem in Kap. 4.5.3 vorgestellten 2-[(4-Hydroxymethylphenyl)methoxy]-bis-1,3-octadecyl-2-propan **52**, das die Funktion eines Glykosylierungsankers, einer Phasenmarkierung und eines hydrogenolytisch spaltbaren Linkers hat.

Mit einem Überschuß des BDA- und POAc-geschützten Trichloracetimidat-Donors **6** (2 eq) wurde der Anker **52** TMSOTf-katalytisch (0.05 eq) glykosyliert (Abb. 4-48). Nach Neutralisation der Reaktionslösung mit wenig DIPEA, das bis zur Entfärbung der rötlich-braunen Lösung zugegeben wurde (ca. 0.1 eq), wurde RP-Silica zugefügt (Retentionskapazität 10 %) und das Lösungsmittel (DCM) nach kurzem Schütteln zur gleichmäßigen Substratverteilung mit Hilfe einer Büchi[®]Syncore Plattform evaporiert. Die jeweils verwendeten Volumina an Lösungsmitteln folgen den in Kap. 4.5.4 vorgestellten allgemeinen HASP-Schemata. Das glykosylierte *n*-Oligosaccharid **53-*n*** wurde daraufhin von überschüssigem Edukt und Verunreinigungen durch Waschschrte (dreimalige Filtration mit MeOH/Wasser 80/20, v/v) befreit. Die gravimetrisch ermittelten Ausbeuten der einzelnen Glykosylierungsschritte lagen beim Aufbau des Pentarhamnosides **53-5** zwischen 96 % und 99 %. Unvollständig glykosyliertes Produkt konnte nicht nachgewiesen werden; die Differenzen zu 100 % erklären sich vermutlich durch Verluste während der Aufarbeitung (unvollständige Desorption, Transferverluste, Adsorption des Produktes an Schläuchen und Gefäßwänden). Ein Verlust durch Auswaschung von Produkt während der Aufarbeitung konnte durch Überprüfung der Wascheluate mit der hochsensitiven Anthron-Farbreaktion^[238] ausgeschlossen werden.

Die Desacetylierung von **53-n** wurde als Festphasenreaktion durchgeführt: Hierfür wurde das substratbeladene Trägermaterial in Methanol suspendiert und mit NaOMe innerhalb von 30 min nach *Zemplén* desacetyliert. Durch Zugabe von Wasser im Anschluß an die Reaktion (Verdünnung auf das MeOH/Wasser-Verhältnis 80/20, zweimalige Wiederholung) und Filtration des RP-Silicas wird das desacetylierte Produkt **54-n** von Verunreinigungen befreit. Zur Bindung von restlichem Wasser wurde das einfache Bettvolumen MgSO₄ vor dem ersten DCM-Elutionsschritt zugefügt und 30 min geschüttelt. Die eigentliche Produktfreisetzung erfolgte über insgesamt dreimalige Desorption mit DCM und Filtration. Die wiederum gravimetrisch ermittelten Ausbeuten der Desacetylierung betragen beim Aufbau des Pentarhamnosides **54-5** jeweils mindestens 92 %.

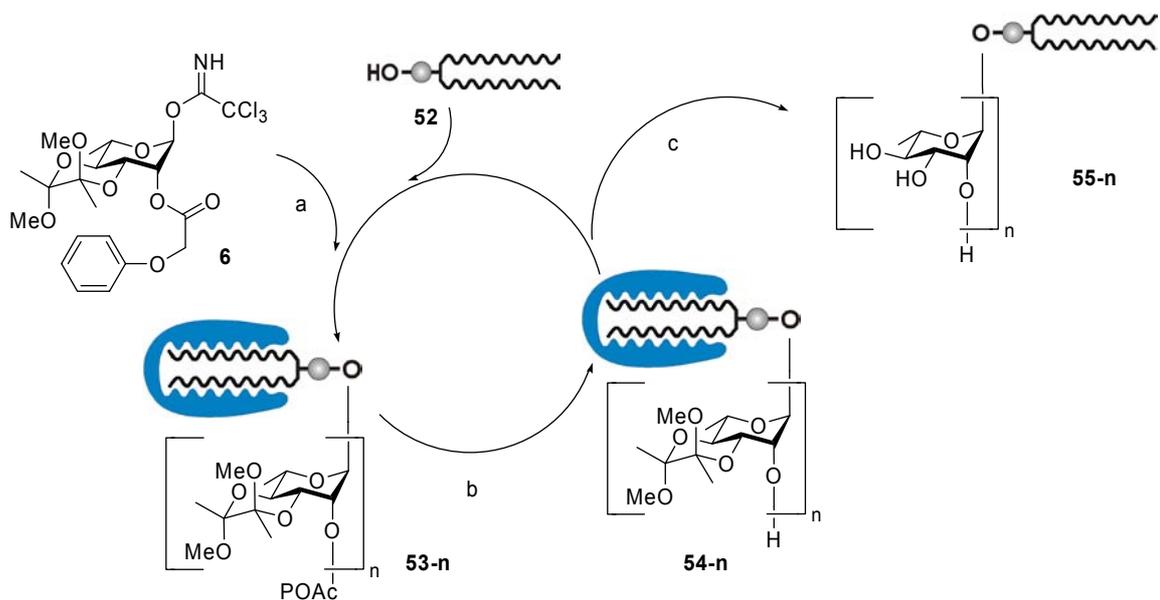


Abb. 4-48: *Repetitiv durchlaufener Syntheszyklus zum HASP-Aufbau eines *n*-Oligorhamnosidgerüsts. Bedingungen (a) 2 eq Donor **6**, 0.05 eq TMSOTf, abs. DCM, Ar, > 95 %; (b) NaOMe, MeOH, > 92 %; (c) TFA/Wasser > 72 %. Glykosylierungen wurden in Lösung durchgeführt, Schutzgruppenmodifikationen an der festen Phase (RP-Silica, durch das Symbol \subset dargestellt). Im Anschluß an die Glykosylierung (a) wurde das Produkt wie beschrieben adsorbiert und mit MeOH/Wasser 80/20 gewaschen. Ebenso wurde im Anschluß an die Desacetylierung (b) gewaschen und mit DCM wie beschrieben das Produkt für weitere Glykosylierungen in Lösung eluiert. Analog wurde bei der Entfernung der BDA-Gruppen (c) verfahren.*

Eine dreimalige Behandlung (je 10 min) mit einem Überschuß eines 90 %igen TFA/Wasser-Gemisches war erforderlich, um das BDA-Diacetal vollständig zu entfernen; bereits 80 %ige TFA/Wasser-Lösung erwies sich hierfür als nicht ausreichend. Die BDA-

Entschützung der Oligorhamnoside **54-n** wurde wie für den Desacetylierungsschritt beschrieben durchgeführt und führte zu den freien und noch HASP-getaggtten Pentarhamnosiden **55-n**. Vom Trirhamnosid **55-3** wurden nach chromatographischer Zwischenaufreinigung 74 % erhalten, Pentarhamnosid **55-5** konnte mit 72 % Ausbeute dargestellt werden.

4.6.2 Reaktionsmonitoring während der HASP-Synthesen

Im Gegensatz zu klassischen Festphasenreaktionen mit kovalenter Substratanbindung kann der Reaktionsfortschritt bei der HASP-Methode auf jeder beliebigen Stufe mittels Standardanalytik überwacht werden. Die Glykosylierungsschritte wurden erst nach vollständiger Umsetzung (typischerweise 30 min, Kontrolle durch RP-18-Dünnschichtchromatographie) beendet. Alle Produkte der Reaktionssequenz wurden auf jeder Stufe per NMR und MALDI-MS (Abb. 4-49) vollständig und direkt charakterisiert, durch MALDI-TOF-Analytik konnte der Reaktionsfortschritt qualitativ und innerhalb der Grenzen der Massenspektrometrie auch quantitativ schnell beurteilt werden.

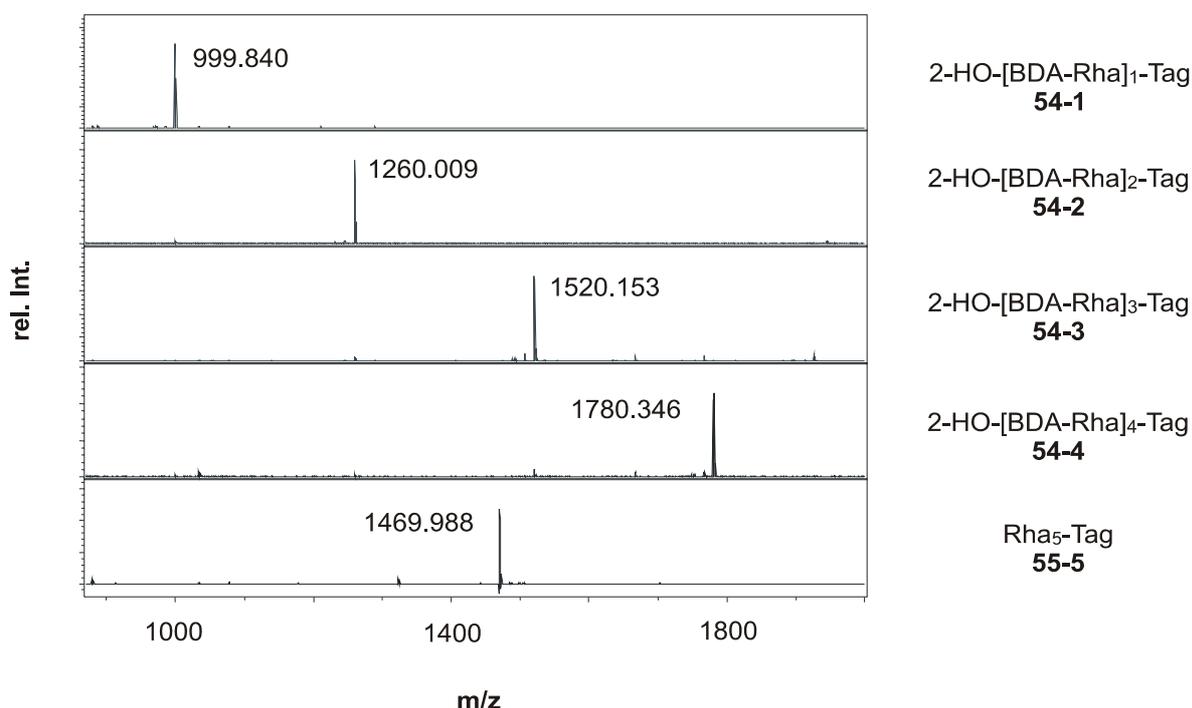


Abb. 4-49: MS-Monitoring des HASP-Aufbaus eines Oligosaccharides: MALDI-TOF-MS (CHCA) der Rohprodukte **54-n** und **55-5**, also jeweils nach einem abgeschlossenen Glykosylierungs-/Desacetylierungszyklus bzw. nach BDA-Entschützung als getaggttes Pentarhamnosid **55-5**.

Während die NMR-Analytik aller geschützten Oligosaccharide ohne weiteres bei 295 K in CDCl₃ erfolgen kann, liegen nach der BDA-Abspaltung die getaggtten Verbindungen als

amphiphile Moleküle vor. Durch das unpolare Ende des Dilipidankers und die polare Kopfgruppe der freien Zucker aggregieren die Zwischenstufen **55-n**, so daß sie NMR-spektroskopisch nur noch durch Hochtemperatur-Messungen analysierbar sind. In Abb. 4-50 gezeigt ist das ^1H -NMR-Übersichtsspektrum des Trirhamnosides **55-3**, das wie auch die höheren Vertreter nur durch Hochtemperaturmessung bei 80 °C in $[\text{D}_6]$ -DMSO ein genügend aufgelöstes Spektrum liefert. Bereits hier ist anhand der Integration der Signale der anomeren Kohlenhydratprotonen H-1^{B} , H-1^{C} und H-1^{A} (1.04 : 1.03 : 1.02) zu erkennen, daß die Glykosylierungsschritte jeweils vollständig abgelaufen sind.

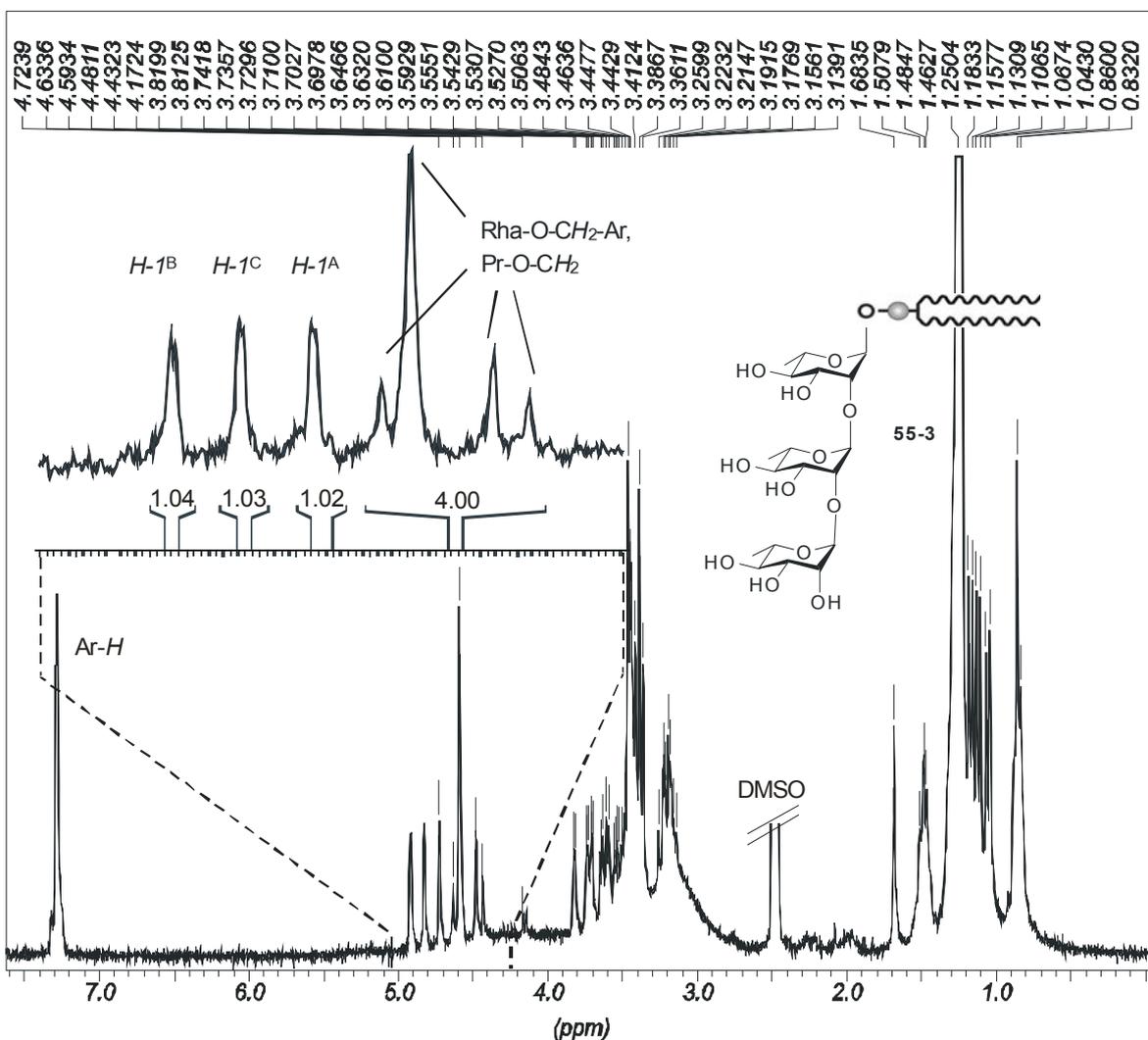


Abb. 4-50: Hochtemperatur- ^1H -NMR (250 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO, 80 °C) des amphiphilen Trirhamnosides **55-3**. Der vergrößerte Ausschnitt des Spektrums zeigt die Signale der anomeren Protonen (Integralverhältnis 1.04 : 1.03 : 1.02) sowie die vier benzylichen Signale des glykosidisch angebindenen HASP-Tags.

4.6.3 Entfernung des HASP-Tags und Bewertung der Synthese

Um die Synthese des Oligosaccharides abzuschließen, muß noch im letzten Schritt der für die HASP-Strategie eingeführte benzyliche Dilipid-Anker entfernt werden. Dies wurde durch eine Standard-Debenzylierungsreaktion in einem Hydrierautoklaven bei 4 bar H_2 -Druck über Pd^0/C -Katalysator durchgeführt (Abb. 4-51) und führte mit 93.9 % Ausbeute zum vollständig entschützten Pentarhamnan **56-5**, der Penta-2-*O*-(α -L-rhamnopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)- α/β -L-rhamnose (Ausbeute des Trirhamnanes **56-3**: 96.5 %)

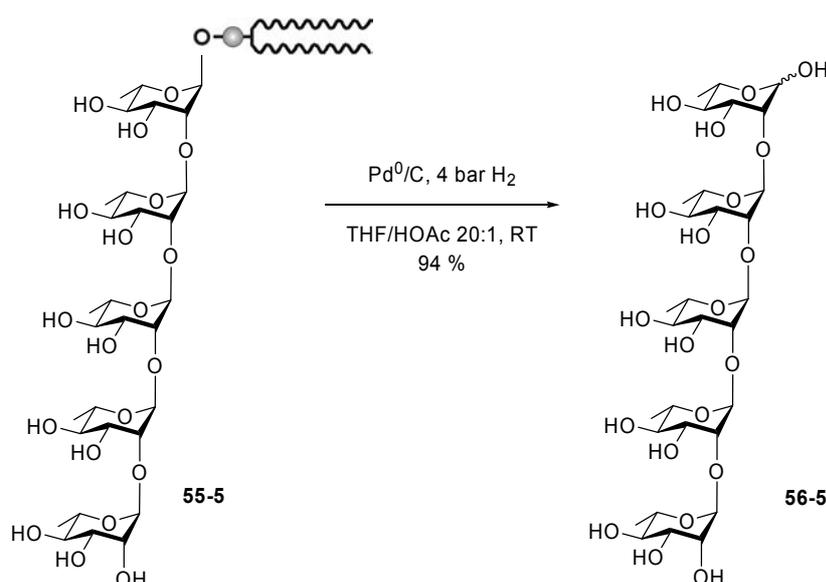


Abb. 4-51: Hydrogenolytische (Pd^0/C) Entfernung des HASP-Tags zum freien Pentarhamnan **56-5**.

Die abschließende quantitative und qualitative Bilanz der HASP-Oligosaccharidsynthese verdeutlicht, daß das HASP-Verfahren eine hocheffiziente Methode für den Aufbau von Kohlenhydraten bietet: Wie in Tab. 4-7 gezeigt, führte die insgesamt zwölfstufige (**56-5**) bzw. achtstufige (**56-3**) Synthese des Oligosaccharides mit 93.6 % bzw. 93.0 % pro Schritt in exzellenten Ausbeuten zum Ziel. Jeder Reaktionsschritt war inklusive Aufarbeitung in 1 h abgeschlossen, so daß die vorgestellte Methode einen sehr schnellen Zugang zu höhergliedrigen Zuckern ermöglicht und literaturbekannten Synthesen vergleichbarer Oligorhamnane^[239-242] in punkto Effizienz, Syntheszeit und Ausbeute überlegen war. Die resultierenden Kohlenhydrate konnten anhand der 2D-NMR-Techniken HH-COSY, HSQC, HMBC und TOCSY vollständig und eindeutig NMR-spektroskopisch charakterisiert werden (Abb. 4-52).^[243]

Tab. 4-7: Übersicht über die jeweiligen HASP-Ausbeuten des Oligosaccharidaufbaus von 56-n.

| Pentarhamnan 56-5; Ausbeuten [%] | | Trirhamnan 56-3; Ausbeuten [%] | |
|----------------------------------|------|--------------------------------|------|
| 1. Glykosylierung zu 53-1 | 99.7 | 1. Glykosylierung zu 53-1 | 99.7 |
| 1. Desacetylierung zu 54-1 | 91.6 | 1. Desacetylierung zu 54-1 | 91.6 |
| 2. Glykosylierung zu 53-2 | 97.2 | 2. Glykosylierung zu 53-2 | 97.2 |
| 2. Desacetylierung zu 54-2 | 96.8 | 2. Desacetylierung zu 54-2 | 96.8 |
| 3. Glykosylierung zu 53-3 | 95.7 | 3. Glykosylierung zu 53-3 | 95.7 |
| 3. Desacetylierung zu 54-3 | 95.0 | 3. Desacetylierung zu 54-3 | 95.0 |
| 4. Glykosylierung zu 53-4 | 98.0 | - | - |
| 4. Desacetylierung zu 54-4 | 91.7 | - | - |
| 5. Glykosylierung zu 53-5 | 99.2 | - | - |
| 5. Desacetylierung zu 54-5 | 95.1 | - | - |
| BDA-Abspaltung zu 55-5 | 72.4 | BDA-Abspaltung zu 55-3 | 73.9 |
| Debenzylierung zu 56-5 | 93.9 | Debenzylierung zu 56-3 | 96.5 |
| Gesamtausbeute 56-5 | 45.0 | Gesamtausbeute 56-3 | 55.7 |
| Ausbeute pro Schritt (12) | 93.6 | Ausbeute pro Schritt (8) | 93.0 |

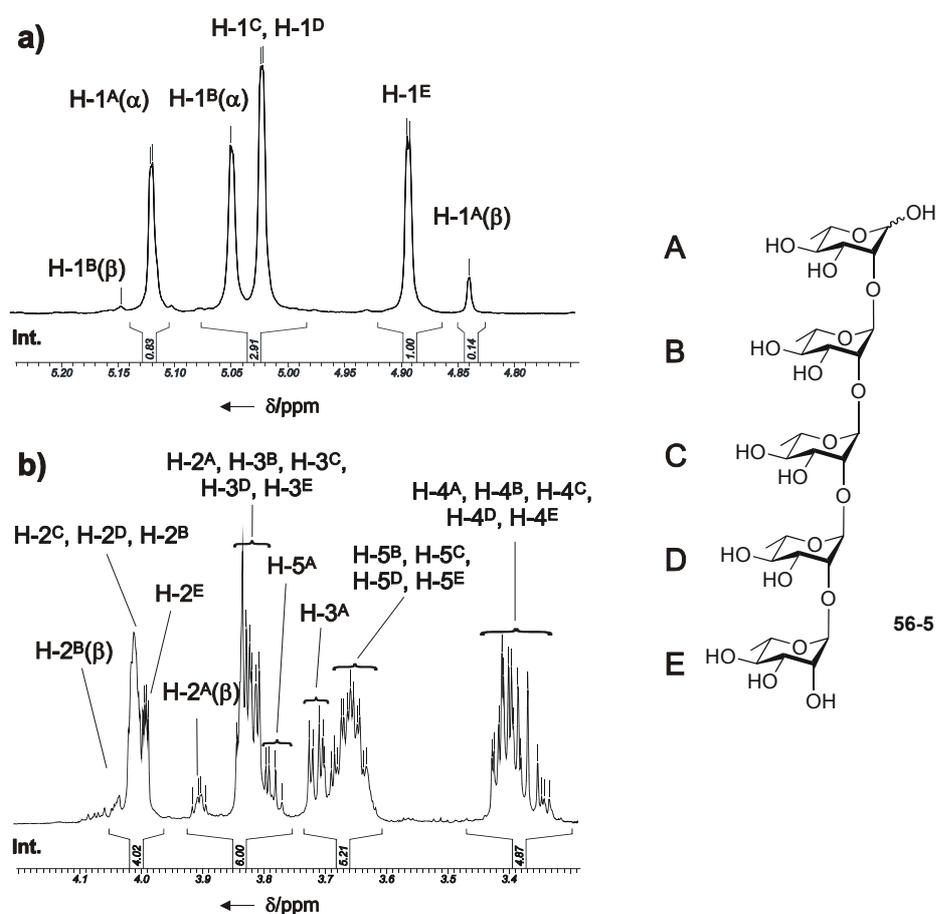


Abb. 4-52: Ausschnitte des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums (600 MHz, D_2O) des Pentarhamnanes 56-5. a) Bereich der anomeren Protonen (5.2 - 4.8 ppm), b) Kohlenhydrat-Kernregion (4.2 - 3.3 ppm).

4.7 HASP-Synthese einer Rhamnolipidbibliothek

Da sich das entwickelte HASP-Verfahren, wie in Kapitel 4.6 vorgestellt, als sehr effektive Methode zur Darstellung größerer Glykokonjugate erwies und einen prinzipiell parallelsierbaren Zugang zu Kohlenhydratverbindungen erlaubt, wurde es auch zur Darstellung von Strukturvarianten der in Kapitel 3.4 allgemein vorgestellten Rhamnolipide verwendet. Die Darstellung dieser Glykolipidbibliothek, die das primäre Ziel und die Kernmotivation der vorliegenden Arbeit darstellt, unterstreicht die generelle Verwendbarkeit der hierfür verwendeten Methode. Im Unterschied zu der in Kapitel 4.1 skizzierten Synthesekonzipierung kann nun nicht mehr auf eine polymere Schutzgruppe zurückgegriffen werden, so daß im folgenden von einem Methylester als Carboxy-terminaler Schutzgruppe ausgegangen wurde. Diesem Vorgehen zugrunde lag die Arbeitshypothese, daß der primäre Rhamnolipid-Methylester selektiv in Gegenwart des sekundären Dilipidesters entfernt werden kann.

4.7.1 Parallele HASP-Synthese geeigneter Di- und Trilipidmethylester

Der Aufbau geeigneter Dilipide und Trilipide erfolgte durch Veresterung einer Auswahl der enantiomerenreinen 3-Hydroxyfettsäuremethylester **18a-h** (je 1 eq) mit den silylgeschützten 3-*O*-TES-Fettsäuren **22a-e** (je 2 eq). Zur Auffindung der optimalen Veresterungsbedingungen wurde diese Reaktion mit einer Reihe verschiedenster Kondensationsreagentien (je 3 eq) in DCM durchgeführt. Nach 12 h wurde die Umsetzung bewertet, indem Proben aus den unaufgearbeiteten Reaktionslösungen ¹H-NMR-spektrometrisch vermessen wurden und jeweils das Signal des 3-*CH*-Kernes von umgesetztem, verestertem 3-Hydroxyfettsäuremethylester mit dem 3-*CH*-Signal des Eduktes verglichen wurde. Unter der gegebenen Voraussetzung gleicher Kernrezeptivitäten gibt das Verhältnis der ¹H-NMR-Signalintegrale direkt Auskunft über die Produkt/Edukt-Anteile und damit über die Vollständigkeit der Umsetzung. Veresterungsmethoden, die auf der *in situ*-Generierung von Säurechloriden bzw. symmetrischen Anhydriden mit sauren Reagenzien (POCl₃) oder Säurefluoriden (via TFFH) als reaktives Agens basieren, sind aufgrund der Säure- und Fluoridlabilität der TES-Gruppe von der Verwendung ausgeschlossen.

Die Thiazoliumkupplungsreagenzien BEMT und BMTB^[244], das Imidazoliumreagenz CIP^[245] und das Pyridiniumreagenz BEP, die jeweils mit einer katalytischen Menge DMAP und 2 eq DIPEA verwendet wurden, erwiesen sich wie auch DIC/HOBT als gänzlich ungeeignet. Unter denselben Bedingungen (DCM, 2 eq DIPEA, kat DMAP) zeigten auch BOP sowie die Pyrrolidinophosphoniumsalze PyBOP und PyBroP nur unzureichenden

Umsatz (< 50 %). Bessere Ausbeuten waren durch *Mitsunobu*-Veresterung (ca. 70 %) und *Yamaguchi*-Veresterung^[246] (ca. 75 %) zu erreichen, die jedoch aufgrund der Notwendigkeit einer absolut feuchtigkeitsfreien Reaktionsführung apparativ aufwendiger sind. Mit den gebräuchlicheren Methoden HATU/DIPEA/DMAP und DCC/DMAP dagegen waren gute Ausbeuten (> 80 %) erzielbar. Eindeutig überlegen ist das *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid (EDC, Abb. 4-53)^[247], das auch ohne DIPEA zu nahezu quantitativen Umsetzungen führte. Aufgrund dieser Feststellung wurden alle Dilipide **57a-h** und das Trilipid **59** sowie die MTPA-Derivate **20a-h** aus Kap. 4.3.3 mit EDC dargestellt.

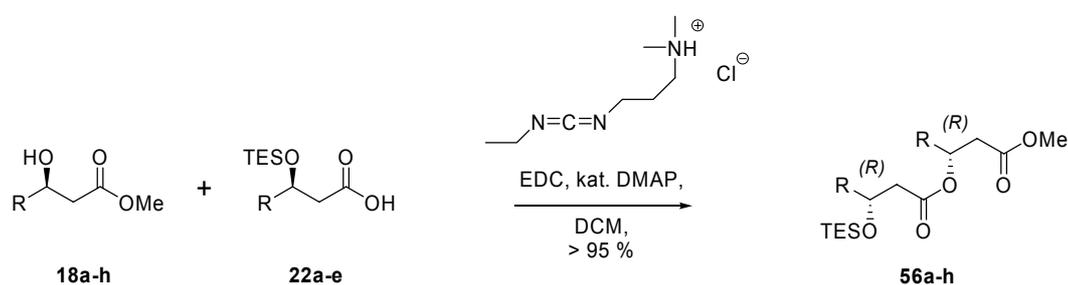


Abb. 4-53: EDC/DMAP-Veresterung einer Auswahl der enantiomerenreinen Lipidbausteine zu Dilipiden **56a-h** (hier gezeigt: ein (3'*R*,3*R*)-Diastereomer).

Die Eigenschaft von EDC, ein wasserlösliches Carbodiimid zu sein, ist für die HASP-Synthese von Vorteil – im Anschluß an die Veresterungsreaktion konnte überschüssiges EDC und dessen Harnstoffderivat sowie das verwendete DMAP durch die HASP-Waschgänge mit MeOH/Wasser (Verhältnis 80/20, v/v) einfach entfernt werden. Die Aufarbeitung der Veresterungsansätze kann wie bereits in Abb. 4-46 und Abb. 4-47 gezeigt durchgeführt werden und führt in sehr guten Ausbeuten und Reinheiten direkt zu den silylgeschützten Dilipiden **56a-h**.

Auf diese Zwischenisolation wurde im folgenden jedoch verzichtet. Die an RP-18 immobilisierten 3-*O*-TES-Dilipidester **56a-h** wurden im nächsten Schritt von der Silylschutzgruppe befreit. Erst nach dieser Festphasenreaktion wurden die jeweiligen Produkte wieder desorbiert und für eine Lösungssynthese zugänglich gemacht.

Zur Entfernung der Triethylsilylschutzgruppe^[248] wurde im Anschluß an den letzten HASP-Waschschritt der Dilipidsynthese das substratbeladene Trägermaterial nochmals in Methanol/Wasser (80/20, v/v) suspendiert und nach Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA, 5 % v/v) 20 min geschüttelt. Das entschützte Produkt **57a-h** wurde erst dann nach weiteren

drei Waschschrinen wie in Abb. 4-47 beschrieben vom Träger desorbiert. Ein zweiter Durchlauf dieser Syntheseroute ausgehend vom Dilipidester **57e** führte über **58** zum homologen Trilipid **59** (Abb. 4-54).

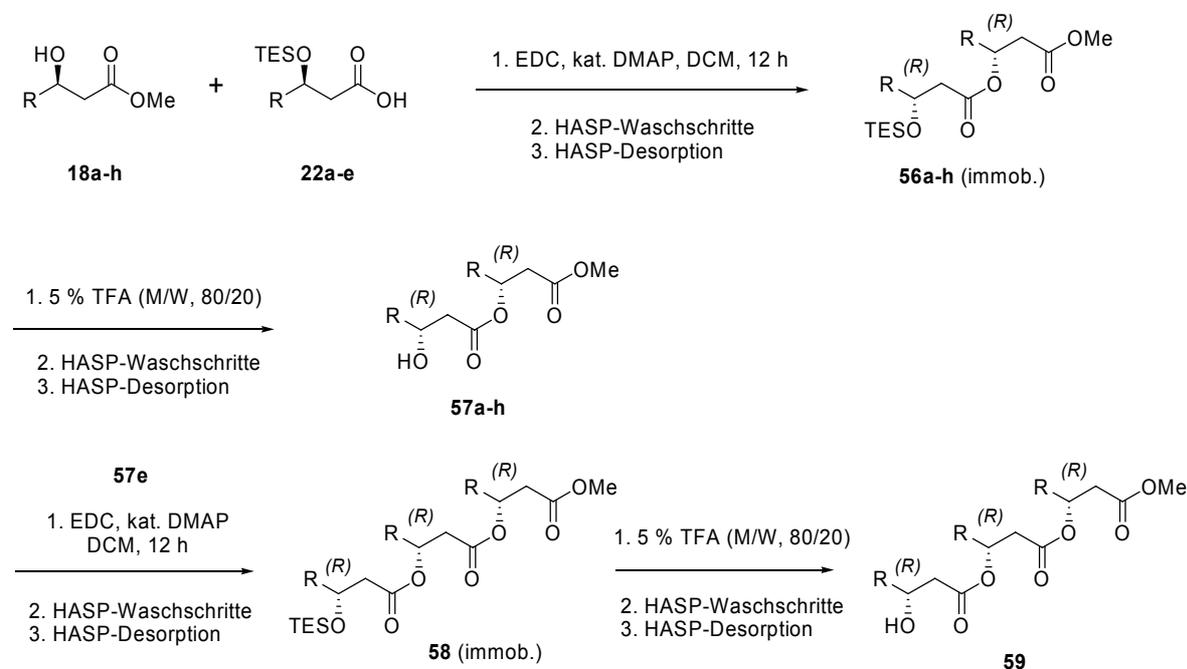


Abb. 4-54: Als HASP-Synthese geführte Veresterung und Silylschutzung zu den Dilipiden **57a-h** und zu Trilipid **59** (hier gezeigt: (3'R,3R)- bzw. (3'R,3'R,3R)-Diastereomere).

Obwohl von langkettigen Trilipiden eine höhere Hydrophobizität zu erwarten ist als von den zugehörigen Dilipiden, konnten beide unter identischen Bedingungen vom Träger vollständig und in guten Ausbeuten (Tab. 4-8) desorbiert werden.

Es besteht allerdings eine Einschränkung bezüglich der verwendeten Silylschutzgruppe: Von den Trialkylsilylschutzgruppen erwies sich die TBDMS-Gruppe als ungeeignet. Das bei einer sauren Desilylierung entstehende Trialkylsilanol ist im Falle der TBDMS-Gruppe nicht mehr mit MeOH/Wasser (Verhältnis 80/20, v/v) vollständig aus dem RP-18-Träger auswaschbar. Aufgrund dieser Beobachtung wurde in Kap. 4.3.4 die Triethylsilylschutzgruppe zur Maskierung der Lipidalkohole **21a-e** verwendet. Diese lässt sich noch unter den beschriebenen Bedingungen vom verwendeten hydrophoben Träger entfernen.

Die Di- und Trilipide **57n** und **59** konnten im ESI-Massenspektrometer nicht als $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Addukt detektiert werden. Sehr gut sind sie jedoch als $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Addukt zu erfassen, wenn

sie aus Methanol mit 0.1%igem Zusatz einer gesättigten NaCl-Lösung vermessen werden; sie tendieren dabei zu starker Dimerenbildung (Abb. 4-55).

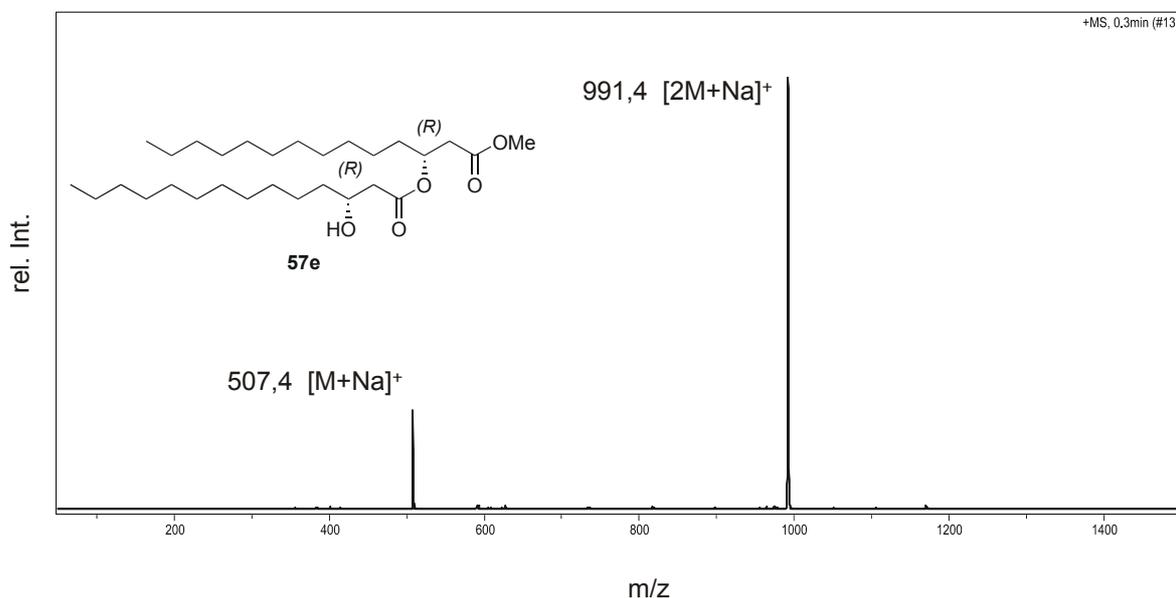


Abb. 4-55: Routine-ESI-MS von entschütztem Dilipid **57e** als monomeres und dimeres Na^+ -Addukt.

Tab. 4-8: Ausbeuten der HASP-Veresterung und HASP-Silylentschützung nach insgesamt zwei (Dilipide **57a-h**) bzw. vier Syntheseschritten (Trilipid **59**).

| Di-/Trilipid | | Ausbeute [%] | $[\text{M}+\text{Na}]^+$ |
|--|------------|--------------|--------------------------|
| (R) -3-HO- C_{14} - (R) -3'-O- C_4 -OMe | 57a | 73.6 | 367.3 |
| (R) -3-HO- C_4 - (R) -3'-O- C_{14} -OMe | 57b | 96.1 | 367.3 |
| (R) -3-HO- C_{12} - (R) -3'-O- C_{12} -OMe | 57c | 93.5 | 451.3 |
| (R) -3-HO- C_{14} - (R) -3'-O- C_{12} -OMe | 57d | 99.3 | 479.5 |
| (R) -3-HO- C_{14} - (R) -3'-O- C_{14} -OMe | 57e | 98.2 | 507.4 |
| (R) -3-HO- C_{14} - (S) -3'-O- C_{14} -OMe | 57f | 99.5 | 507.5 |
| (R) -3-HO- C_{18} - (R) -3'-O- C_8 -OMe | 57g | 94.8 | 479.4 |
| (R) -3-HO- C_{18} - (R) -3'-O- C_{18} -OMe | 57h | 99.2 | 619.5 |
| H- $[(R)$ -3-O- C_{14}] ₃ -OMe | 59 | 95.7 | 733.6 |

4.7.2 Darstellung von Rhamnosyl-Lipiden

Im Unterschied zu Kap. 4.6, in dem eine eigens entworfene hydrophobe Schutzgruppe als Anker eingesetzt wurde, verfügen die Rhamnolipid-Zielmoleküle selbst über ein Dilipidmuster, dessen Hydrophobizität als nun intrinsische Phasenmarkierung zur Anreicherung in einer hydrophoben Phase verwendet werden kann.

In Übereinstimmung mit der bewährten Vorgehensweise des HASP-Aufbaus von Oligosacchariden wurden alle Glykosylierungsschritte als Lösungssynthesen durchgeführt. Da die zu glykosylierende 3'-Hydroxygruppe der Dilipide **57a-h** bzw. des Trilipides **59** über eine intramolekulare Wasserstoffbrücke aktiviert ist (Abb. 4-56), war eine quantitative Glykosylierung von **57a-h/59** bereits mit einem geringen Überschuß von 1.2 eq des 3,4-BDA- und 2-POAc-geschützten Glykosyldonors **6** möglich. Um eine vollständige Umsetzung zu garantieren, wurde ein Überschuß von 1.3 eq Donor gewählt und dieser mit 0.05 eq TMSOTf katalytisch aktiviert.

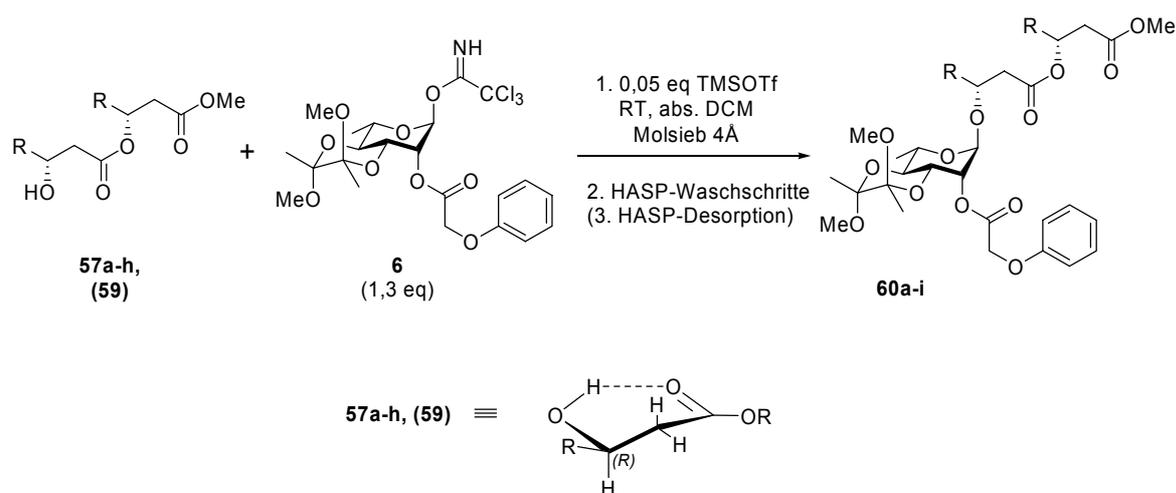


Abb. 4-56: Erleichterte Glykosylierung (TMSOTf) der β -Hydroxygruppe von **57a-h** und **59** durch intramolekulare Wasserstoffbrücken-Aktivierung.

Um eine eventuelle Donorhydrolyse zu unterbinden, die stattfinden könnte, wenn Feuchtigkeitsspuren in der Reaktionslösung vorhanden sind, die durch die wässrige HASP-Filtration eingebracht aber nicht vollständig durch den MgSO_4 -Zusatz gebunden werden konnten, wurden die Glykosylierungsreaktionen stets in Gegenwart einer geringen Menge (5 Körnchen) Molsieb (4 Å) durchgeführt. Das glykosylierte Produkt verbleibt für die folgende Umsetzung an der festen Phase, wurde aber in den ausgewählten Beispielen zum

Zwecke der Quantifizierung vom Träger desorbiert. Die Routineanalytik zur Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion erfolgte mittels ESI-MS unter den gleichen Bedingungen wie für die Verbindungen **57a-h/59**. Roh-NMR (Abb. 4-58) und ESI (Abb. 4-57) der Produkte lassen nach den HASP-Schritten kein Edukt-Lipid mehr erkennen.

Tab. 4-9: Ausbeuten der HASP-Glykosylierungen zu **60a-i**.

| 3,4-BDA-2-POAc-Rhamnolipid-Methylester | Ausbeute [%] | [M+Na] ⁺ | |
|---|--------------|---------------------|--------|
| BDA-POAc-RL-1,2 _{14,4} -COOMe | 60a | 86.7 | 761.4 |
| BDA-POAc-RL-1,2 _{4,14} -COOMe | 60b | 81.9 | 761.4 |
| BDA-POAc-RL-1,2 ₁₂ -COOMe | 60c | 97.6 | 845.5 |
| BDA-POAc-RL-1,2 _{14,12} -COOMe | 60d | 90.7 | 873.5 |
| BDA-POAc-RL-1,2 ₁₄ -COOMe | 60e | 93.8 | 901.6 |
| BDA-POAc-RL-1,2 _{(R)14,(S)14} -COOMe | 60f | 87.2 | 901.6 |
| BDA-POAc-RL-1,2 _{18,8} -COOMe | 60g | 87.4 | 873.5 |
| BDA-POAc-RL-1,2 ₁₈ -COOMe | 60h | 91.7 | 1013.7 |
| BDA-POAc-RL-1,3 ₁₄ -COOMe | 60i | 84.9 | 1127.8 |

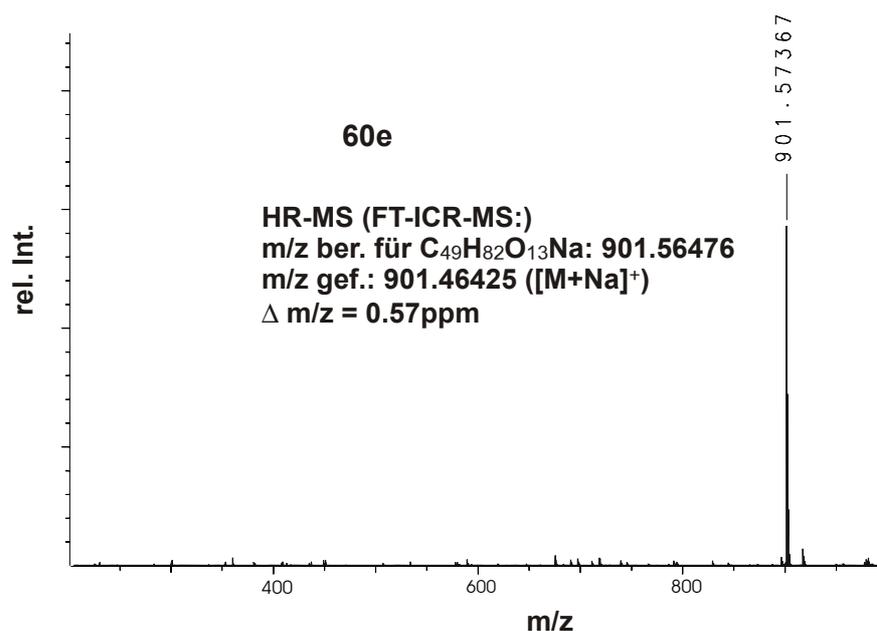


Abb. 4-57: FT-ICR-HR-MS von BDA-POAc-RL-1,2₁₄-COOMe **60e** als Na⁺-Addukt (Δm/z = 0.57 ppm).

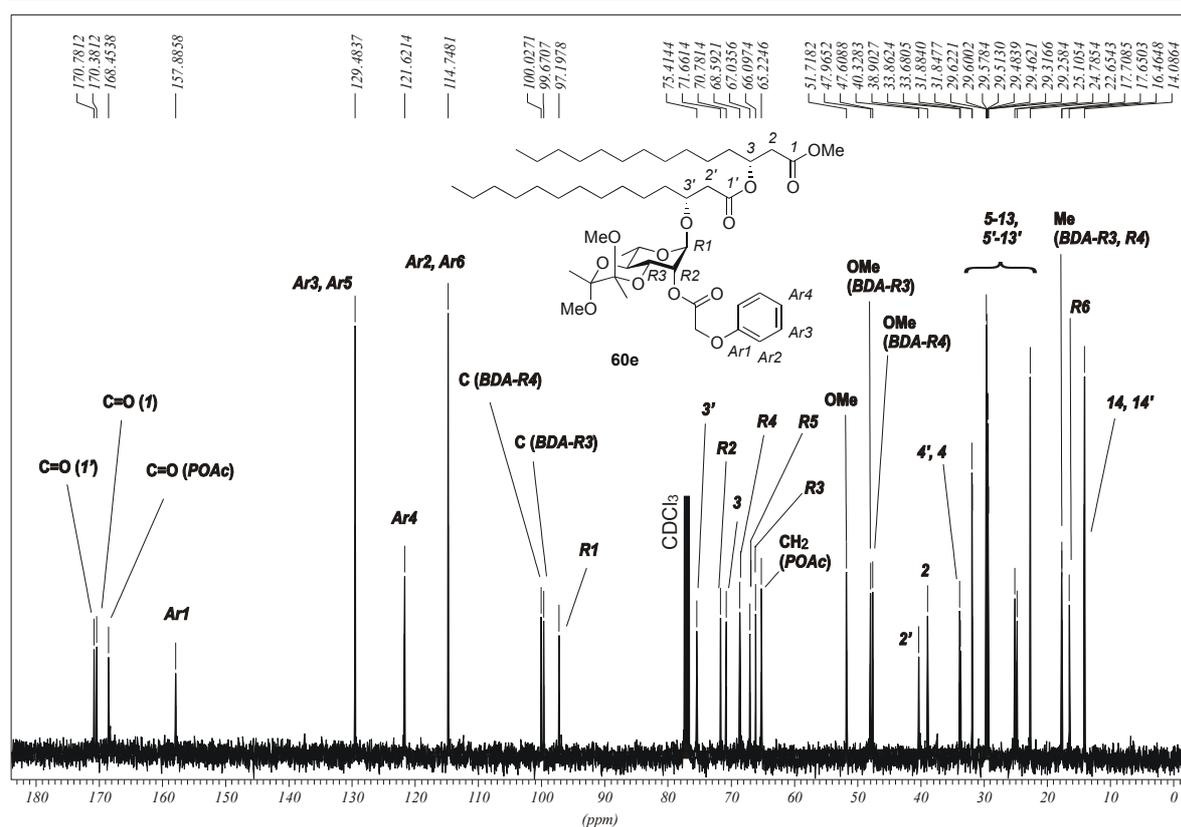


Abb. 4-58: $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) des BDA- und POAc-geschützten Rhamnolipides BDA-POAc-RL-1,2,14-COOMe **60e**. Gezeigt ist das NMR des Produktes direkt nach der HASP-Elution. Es ist kein β -Anomer und kein unglykosyliertes Edukt-Lipid erkennbar.

4.7.3 Abspaltung der Phenoxyacetat-Schutzgruppe

Um die selektive Entfernung der Schutzgruppe in Position 2 des Zuckers zu ermöglichen ohne andere Ester dabei zu beeinträchtigen, wurde in Kapitel 4.2.2 die Phenoxyacetat-Estergruppe an Donor **6** eingeführt. Diese kann nach Glykosylierungsschritten aufgrund der aktivierenden Phenoxygruppierung katalytisch entfernt werden. Die Labilität und damit die Hydrolysegeschwindigkeit eines Acetates lässt sich durch α -Substitution steuern. Gegenüber einem einfachen Acetat reagiert ein α -Methoxyacetat ca. 20 mal schneller, ein α -Phenoxyacetat ca. 50 mal schneller; α -Chlorsubstitution verleiht dem Ester eine noch höhere Reaktivität.^[249;250] Unter Festphasenbedingungen wurde die POAc-Spaltung unter sehr milden, nicht-katalytischen Bedingungen durchgeführt, z.B. in Gegenwart eines Benzoes mit 8 M $\text{MeNH}_2/\text{EtOH}$ ^[188] oder mit Guanidin/DMF^[87].

Zur Entschützung der 2-Position wurden die vollgeschützten einfach und mehrfach glykosylierten Rhamnolipide **60n**, **64n** und **65**, die nach dem vorhergehenden Glykosylier-

rungsschritt am RP-18 Trägermaterial immobilisiert belassen wurden, mit Methylamin desacetyliert. Hierzu wurde das substratbeladene RP-Silica in THF/MeOH (1:1) suspendiert und mit Methylamin (40 eq einer 40 %igen, 11.5 M wässrigen Lösung) versetzt (Abb. 4-59). Die fortschreitende Desacetylierung der aromatischen POAc-Gruppe konnte mittels RP-18-Dünnschichtchromatographie im UV (254 nm) sehr gut beobachtet werden. Während eine quantitative Umsetzung mit 20 eq Methylamin 7 h Reaktionszeit erforderte, war die Reaktion mit 40 eq bei RT bereits nach 60 min abgeschlossen. Mono-, di- und triglykosylierte Rhamnolipide wurden auf diese Art und Weise gleichermaßen zu den jeweiligen 2-Hydroxy-Rhamnolipiden **61a-h**, **62a-e** und **63** desacetyliert.

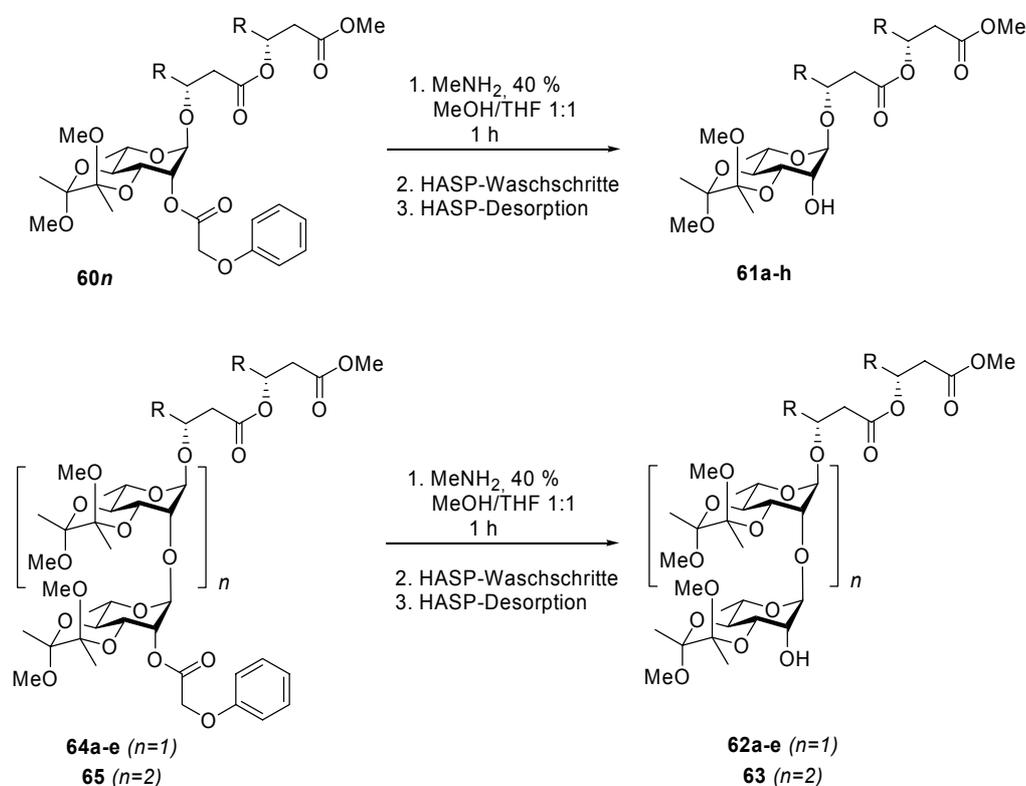


Abb. 4-59: Entfernung der α -Phenoxyacetylgruppe mit 40 eq Methylamin mittels einer HASP-Festphasenreaktion im Anschluß an einen Glykosylierungsschritt. Die Abbildung gibt nicht alle glykosylierten Dilipidmuster wieder, (3S)-Dilipide und Trilipide sind nicht dargestellt.

Da die Polarität der Methanol/THF-Lösung (4 ml) für eine quantitative Substratimmobilisierung während der ersten HASP-Filtration noch nicht ausreicht, wurde für den ersten Filtrationsschritt Wasser (12 ml) zugesetzt. Damit folgte dieses Vorgehen dem für wässrig verdünnbare Lösungsmittel allgemein in Abb. 4-46 gezeigten Schema der HASP-

Immobilisierung. Die weitergehende HASP-Aufarbeitung der durchgeführten Desacetylierungsreaktionen und die Produktfreisetzung wurde gemäß den in Abb. 4-47 beschriebenen Standardverfahren durchgeführt und führte zu NMR-saubereren Produkten (Tab. 4-10, Abb. 4-60). Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels ESI-MS unter den bereits beschriebenen Ionisierungsbedingungen nachgewiesen.

Tab. 4-10: Übersicht über die jeweiligen HASP-Ausbeuten der POAc-Desacetylierung. (*) Das POAc-Desacetylierungsprodukt wurde nicht isoliert – die angegebenen Werte geben die Gesamtausbeute der POAc- und der anschließenden BDA-Abspaltung wieder.

| 3,4-BDA-2-HO-Rhamnolipid-Methylester | | Ausbeute [%] | [M+Na] ⁺ |
|---|------------|--------------|---------------------|
| BDA-HO-RL-1,2 _{14,4} -COOMe | 61a | 71.3 | 627.5 |
| BDA-HO-RL-1,2 _{4,14} -COOMe | 61b | 70.5 | 627.5 |
| BDA-HO-RL-1,2 ₁₂ -COOMe | 61c | 80.4 | 711.6 |
| BDA-HO-RL-1,2 _{14,12} -COOMe | 61d | 83.0 | 739.6 |
| BDA-HO-RL-1,2 ₁₄ -COOMe | 61e | 93.1 | 767.6 |
| BDA-HO-RL-1,2 _{(R)14,(S)14} -COOMe | 61f | 85.0 | 767.6 |
| BDA-HO-RL-1,2 ₁₈ -COOMe | 61g | 85.3 | 879.8 |
| BDA-HO-RL-1,3 ₁₄ -COOMe | 61h | 97.6 | 993.8 |
| BDA-HO-RL-2,2 ₁₂ -COOMe | 62a | 94.9 | 971.7 |
| BDA-HO-RL-2,2 ₁₄ -COOMe | 62b | 92.5 | 1027.7 |
| BDA-HO-RL-2,2 _{(R)14,(S)14} -COOMe | 62c | (> 93.4)* | n.b. |
| BDA-HO-RL-2,2 ₁₈ -COOMe | 62d | (> 93.5)* | n.b. |
| BDA-HO-RL-2,3 ₁₄ -COOMe | 62e | 96.7 | 1254.1 |
| BDA-HO-RL-3,2 ₁₄ -COOMe | 63 | (> 70.7)* | 1287.5. |

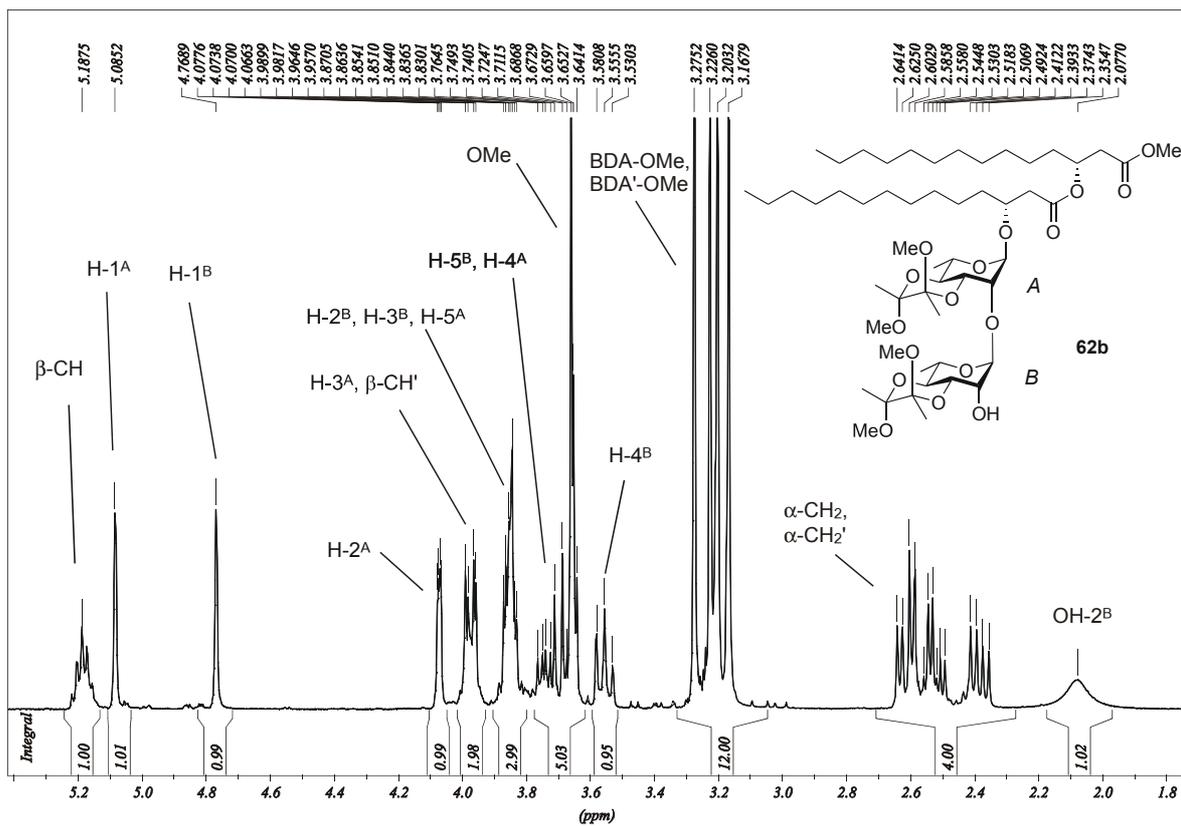


Abb. 4-60: Ausschnitt (5.3 ppm – 1.8 ppm) des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums (400 MHz, CDCl_3) von BDA-geschütztem Rhamnolipid **62b** BDA-RL-2,2,1,4'-COOMe nach der POAc-Desacetylierungsreaktion.

4.7.4 Zweit- und Drittglykosylierung von BDA-Rhamnolipiden

Zum Aufbau höherer Vertreter der Rhamnolipide ist eine weitere Glykosylierung der entschützten 2-Position der BDA-Rhamnolipide **61a-h** und **62a-e** nötig.

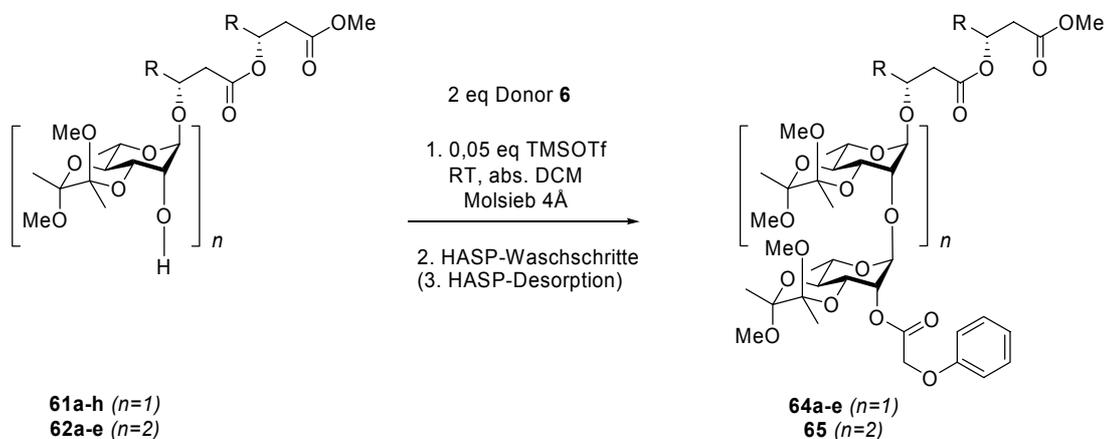


Abb. 4-61: Höhere Rhamnolipide durch Glykosylierung zu Di- und Trirhamnosyllipiden.

Im Gegensatz zur Darstellung der Monorhamnosyllipide **60n**, die durch die Wasserstoffbrückenaktivierung der 3'-Hydroxygruppe begünstigt war, muß für Di- und Trirhamnosyllipide **64a-e** und **65** ein unaktivierter sekundärer Alkohol glykosyliert werden. Der für die Erstglykosylierung ausreichende Überschuß von 1.3 eq des Donors **6** führte zu unvollständigen Umsetzungen, so daß unter Beibehaltung aller anderen Parameter ein für Festphasenreaktionen typischer Überschuß von 2 eq Monosaccharid-Donor **6** (Abb. 4-61) verwendet wurde, wodurch eine quantitative Zweit- und Drittglykosylierungsreaktion gewährleistet werden konnte. Die Verwendung des Dirhamnosyl-Donors **9** zur direkten Darstellung der Dirhamnosyllipide **64a-e** durch Glykosylierung der Lipide **57n** erwies sich aufgrund der vollständig ablaufenden repetitiven Synthese als nicht notwendiger Umweg. Gegenüber der Verwendung eines zweifachen Überschußes von Donor **6** birgt die Darstellung von **9** ausgehend von den zwei Monorhamnosebausteinen **3** und **6** keinen Vorteil.

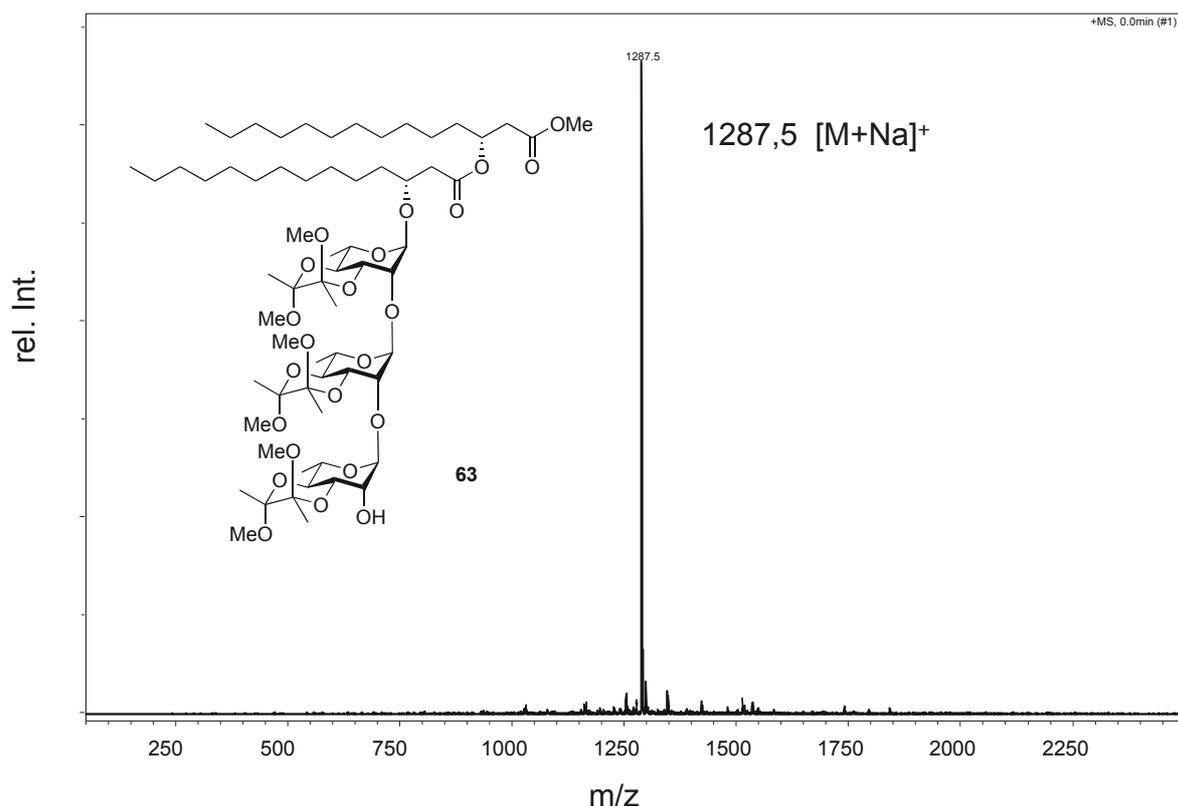


Abb. 4-62: Routine-ESI-MS des rohen HASP-Eluates nach dem letzten POAc-Entschüttungsschritt des dreifach glykosylierten Rhamnolipides BDA-HO-RL-3,2₁₄-COOMe **63** (als Na⁺-Addukt).

4.7.5 Abspaltung der BDA-Schutzgruppe

Die Entfernung der Butandiacetal-Schutzgruppen der 3- und 4-Positionen der BDA-Rhamnolipidmethylester **61a-h**, **62a-e** und **63** erfolgte mit wässriger Trifluoressigsäure. Der Erfolg der sauren Hydrolysereaktion von cyclischen Bisacetalen mit Essigsäure oder Trifluoressigsäure scheint vom verwendeten Wasseranteil abhängig zu sein. Sie scheint im Bereich von TFA/Wasser 90/10 ein Optimum aufzuweisen, für einen nach oben und unten abweichenden Wasseranteil sind jeweils Ausbeuterückgänge beschrieben.^[185;251] Am vorliegenden System der ein- bis dreifach BDA-geschützten Kohlenhydratkonjugate **61a-h**, **62a-e** und **63** konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Eine BDA-Entschützung der am RP-18-Träger immobilisierten BDA-Glykolipide führte nach einer zweimaligen, einstündigen Behandlung mit TFA/Wasser (80/20) zu keiner vollständigen Entschützung, wie im ¹³C-NMR anhand der BDA-Methoxy-Signale leicht festgestellt werden konnte. Auch bei Verwendung von TFA/Wasser (95/5) reichte eine zweimalige Entschützung nicht aus. Verwendet man ein TFA/Wasser-Gemisch (90/10, v/v), ist innerhalb von zweimal 20 min kein Edukt mehr detektierbar. Um eine vollständige Schutzgruppenabspaltung zu **66a-h**, **67a-e** und **68** zu garantieren, wurde der Entschützungsschritt 3 x 10 min mit TFA/Wasser (90/10) durchgeführt (Abb. 4-63).

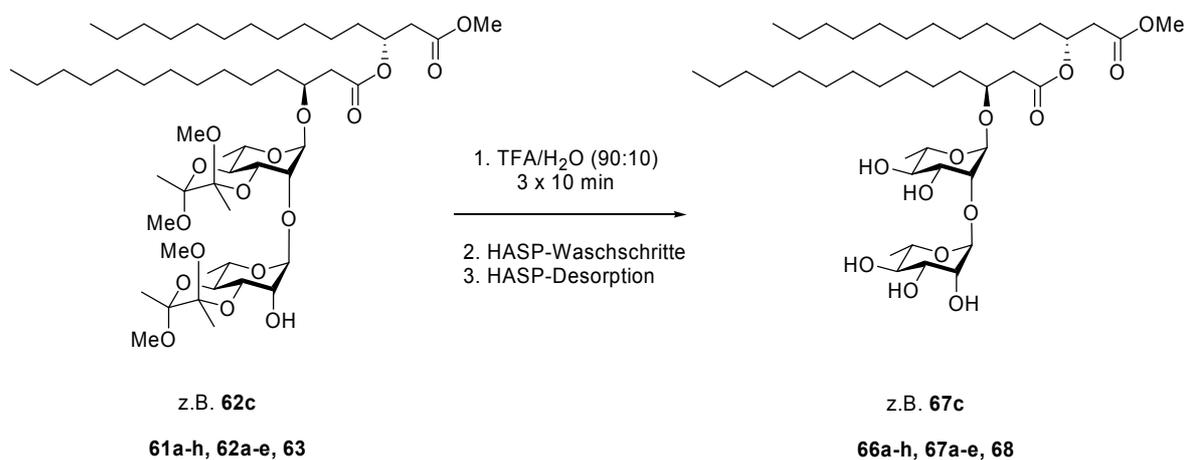


Abb. 4-63: TFA-Hydrolyse des Bisacetals am Beispiel des BDA-Rhamnolipidmethylesters **62c**.

Die Aufarbeitung und Produktfreisetzung der als HASP-Festphasenreaktion durchgeführten Acetalspaltung folgte dem für wässrig verdünnbare Lösungsmittel allgemein in Abb. 4-46 und Abb. 4-47 gezeigten Standardverfahren.

Insbesondere bei bereits mehrfach TFA-behandeltem RP-18-Silica-Trägermaterial ist nach längerer TFA-Einwirkung eine Zersetzung zu beobachten. Aufgrund dessen wurde die Reaktionszeit auf jeweils 10 min (dreimalige Wiederholung) verkürzt. Neues RP-18 zeigte sich unter diesen Bedingungen stabil, bereits mehrfach säurebehandeltes RP-18 verunreinigte jedoch die Produkte, so daß für den BDA-Schritt nicht wiederverwendetes RP-18 zum Einsatz kam (RP-18-Recycling vgl. Kap. 6.3.7). Verunreinigte Verbindungen konnten durch Filtration über ein kurzes Kieselgelbett (Normalphase, DCM, MeOH) einfach gereinigt werden.

Tab. 4-11: Gravimetrisch festgestellte Ausbeuten und MALDI-MS-Identifikation der Rhamnolipidmethylester **66a-h**, **67a-e** und **68**. (*) Das jeweilige Edukt wurde nicht isoliert - die angegebenen Werte geben die Gesamtausbeute der vorhergegangenen POAc- und der BDA-Abspaltung wieder.

| Entschützter Rhamnolipid-Methylester | Ausbeute [%] | [M+Na] ⁺ | |
|--------------------------------------|--------------|---------------------|--------|
| RL-1,2 _{14,4} -COOMe | 66a | 95.2 | 513.3 |
| RL-1,2,4,14-COOMe | 66b | 85.3 | 513.2 |
| RL-1,2 ₁₂ -COOMe | 66c | 94.1 | 597.2 |
| RL-1,2 _{14,12} -COOMe | 66d | 92.8 | 771.4 |
| RL-1,2 ₁₄ -COOMe | 66e | 96.9 | 653.5 |
| RL-1,2 _{(R)14,(S)14} -COOMe | 66f | 98.8 | 653.5 |
| RL-1,2 ₁₈ -COOMe | 66g | 95.6 | 765.5 |
| RL-1,3 ₁₄ -COOMe | 66h | 94.0 | 879.6 |
| RL-2,2 ₁₂ -COOMe | 67a | 81.8 | 743.4 |
| RL-2,2 ₁₄ -COOMe | 67b | 98.1 | 799.1 |
| RL-2,2 _{(R)14,(S)14} -COOMe | 67c | (> 93.4)* | 799.1 |
| RL-2,2 ₁₈ -COOMe | 67d | (> 93.5)* | 911.6 |
| RL-2,3 ₁₄ -COOMe | 67e | 71.5 | 1025.6 |
| RL-3,2 ₁₄ -COOMe | 68 | (> 70.7)* | 945.6 |

Die Produktreinheiten nach der Acetalspaltung konnten nur bedingt über NMR-Spektroskopie überprüft werden. Sämtliche Rhamnolipidmethylester **66a-h**, **67a-e** und **68** sind bereits amphiphile Verbindungen, die in Lösung zu Bildung von höheren Aggregaten neigen, wodurch ein hochaufgelöstes NMR-Spektrum schwierig zu erhalten ist. Durch Hochtemperaturmessung bei 80 °C in $[D_6]$ -DMSO sind zwar ausreichend aufgelöste Spektren erhältlich, doch aufgrund des schwer entfernbaren Lösungsmittels DMSO wurden die Produkte dieses Syntheseschrittes bevorzugt massenspektrometrisch analysiert. ESI-Massenspektrometrie, mit der die Analytik der Dilipide, der POAc- und BDA- sowie der BDA-geschützten Rhamnolipide als $[M+Na]^+$ -Addukte sehr gut gelang, erwies sich für die amphiphilen Rhamnolipidmethylester als ungeeignet. Vermutlich durch die Tendenz zur Aggregation zu größeren Oligomeren, die im NaCl-haltigen Solvens hochgeladen vorliegen, konnten nur geringe Mengen Rhamnolipidmethylester ESI-MS-spektrometrisch detektiert werden. Benutzt man MALDI als Ionisierungstechnik, ist dieser als Aggregationsdiskriminierung beschreibbare Effekt nicht mehr zu beobachten. Per MALDI-TOF-MS (Abb. 4-64) konnten alle Rhamnolipidmethylester **66a-h**, **67a-e** und **68** eindeutig als massenspektrometrisch saubere Verbindungen identifiziert werden.

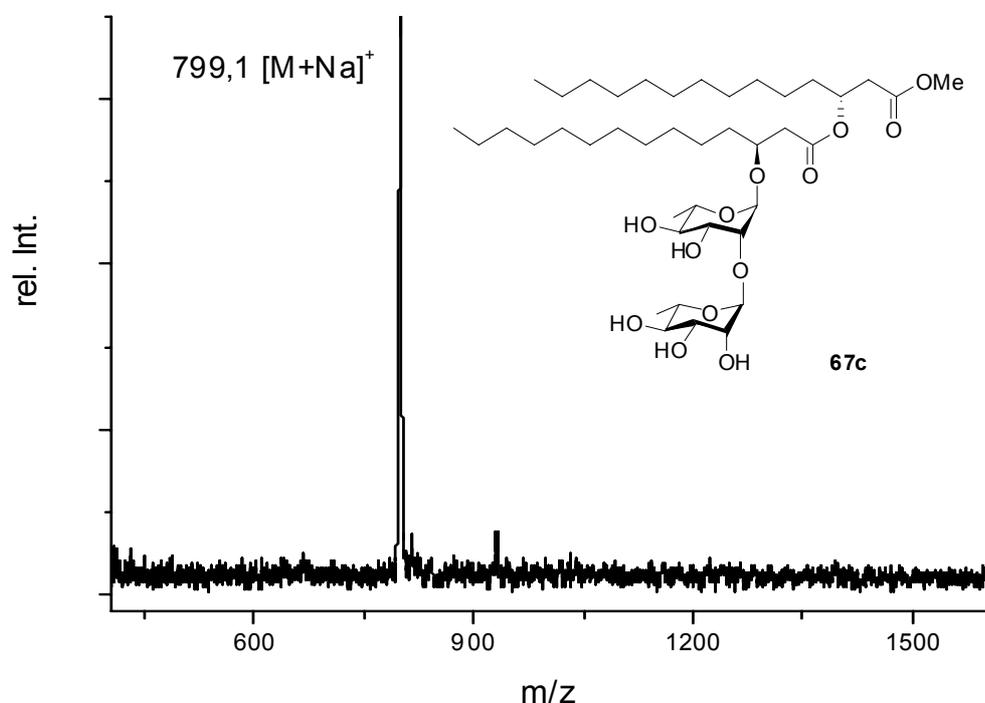


Abb. 4-64: MALDI-TOF-MS (CHCA) des HASP-Eluates nach der BDA-Entschützung des Rhamnolipidmethylesters $RL-2,2_{(R)14,(S)14}$ -COOMe **67c** (als Na^+ -Addukt).

4.7.6 Methylester als terminale Rhamnolid-Schutzgruppe

– Versuche der selektiven chemischen Entfernung

Es sind zahlreiche Methoden beschrieben, mit denen eine selektive Entfernung von primären Methylestern unter verschiedensten Bedingungen erreicht werden kann, die allesamt dem Schema einer sauren oder basischen Verseifung folgten oder zu den Methoden der nukleophilen Substitution des Esteralkylrestes zu rechnen sind.^[210;252;253] Anhand des Rhamnolidmethylesters RL-2,2₁₄-COOMe **67b** als stellvertretende Verbindung wurden diese Methoden auf ihre Verwendbarkeit für die gewünschte Esterhydrolyse aller Rhamnolipide untersucht (Abb. 4-65).

Der Versuch, die opaleszent trübe Lösung des Eduktes in MeOH/Wasser (2:1) einer basischen Hydrolyse mit 1 eq KOH (als 6.4 μ M Lösung (Endkonzentration)) zu unterziehen, resultierte bereits nach 30 min in einer vollständigen Klärung der anfänglich trüben Reaktionslösung. Durch das gewünschte amphiphile Carboxylat sollte die Reaktionslösung jedoch opaleszent bleiben. Eine ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung der Produkte zeigte, daß der Methylester vollständig erhalten blieb, während neue olefinische Signale bei 6.98 ppm (m) und 5.82 ppm (dd, ³J_{tr} = 15.7 Hz, ³J_{Allyl} = 1.5 Hz) entstanden sind.

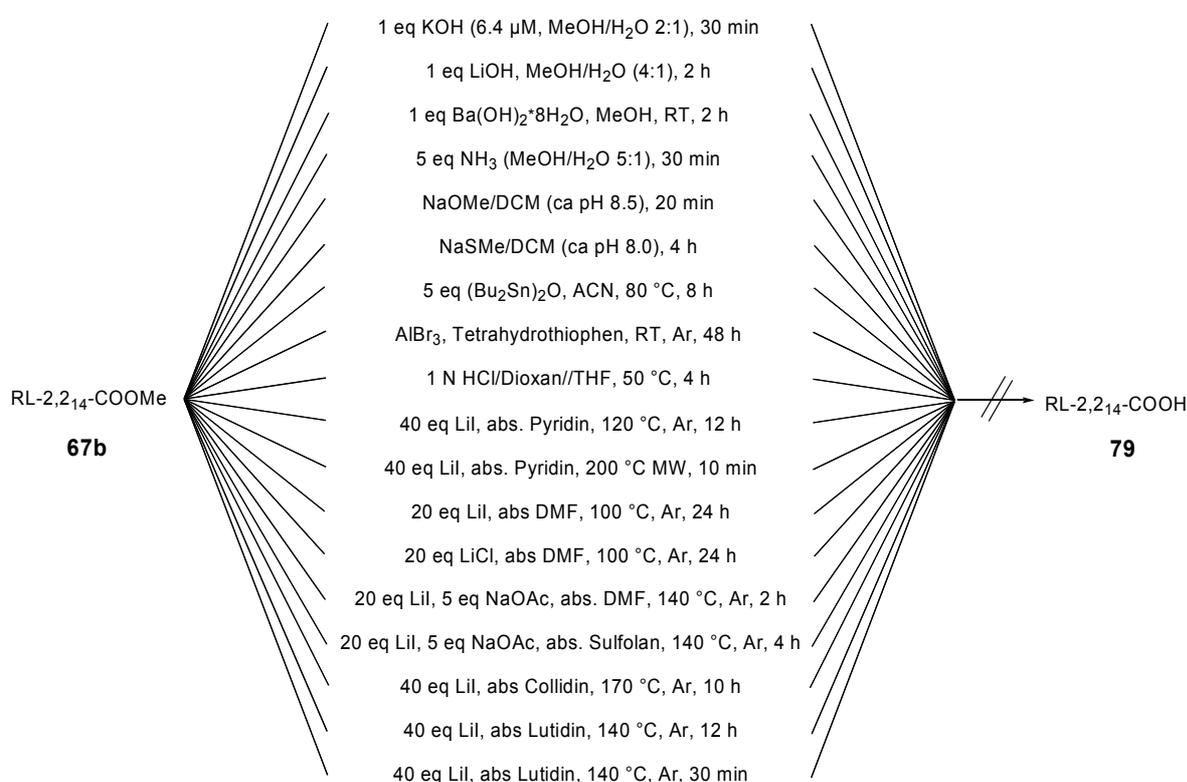


Abb. 4-65: Versuche der selektiven chemischen Methylesterhydrolyse von RL-2,2₁₄-COOMe **67b**.

Das Auftreten von olefinischen $^1\text{H-NMR}$ -Signalen kann durch eine Eliminierungsreaktion am RL-2,2,14-COOMe **67b** begründet werden, die durch die hohe Acidität der α -Methylenprotonen und der Carboxylatgruppe als geeigneter Abgangsgruppe begünstigt wird, und die zum vinylogenen Methylester **69** sowie dem Monolipid-Abbauprodukt **70** führte (Abb. 4-66). Für beide Verbindungen ist wie beobachtet keine Opaleszenz mehr zu erwarten. Das Auftreten dieser Nebenreaktion wurde durch MALDI-TOF-MS bestätigt.

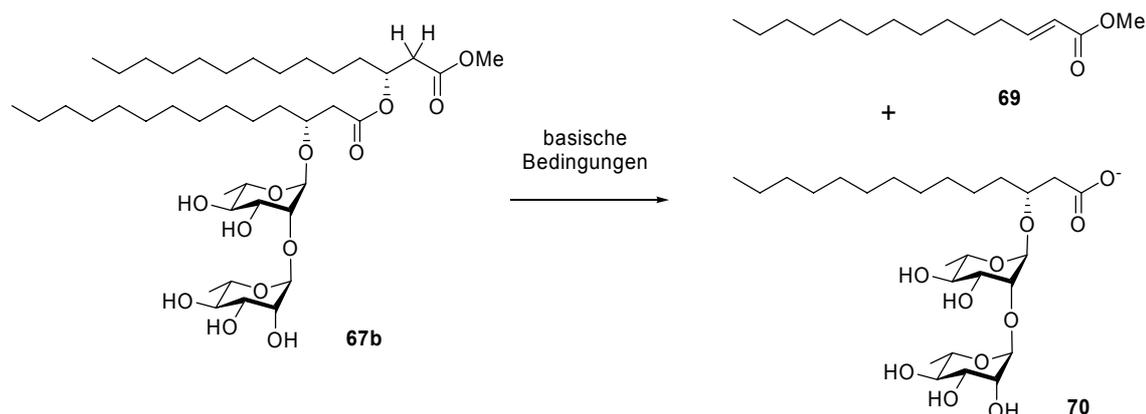


Abb. 4-66: Beobachtete Eliminierungsreaktion an Rhamnolipidmethylestern unter basischen Bedingungen.

Mit bis zu 3 eq Ammoniak in wässrigem Methanol (5:1) ist weder die gewünschte Hydrolyse noch die Eliminierungsreaktion zu beobachten. Nachdem die Äquivalenzahl des Ammoniak auf fünf erhöht wurde, war wieder ausnahmslos die Nebenreaktion zu beobachten. Auch ein Wechsel auf die schonenden Verseifungsreagenzien LiOH und $\text{Ba}(\text{OH})_2$ resultierte einzig und allein in der Nebenreaktion. Eine katalytische Hydrolyse mit NaOMe (NaOMe in DCM, pH 8.5 auf nassem pH-Papier) führte zu denselben Ergebnissen; die katalytische Verwendung des weniger basischen NaSMe führte zu keiner der beiden Reaktionen. Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse erscheint eine basische Rhamnolipid-Verseifung generell nicht möglich zu sein.

Eine weitere Methode, gezielt ungehinderte Ester mit einem harten Nukleophil am Carbonylkohlenstoff selektiv zu spalten, besteht in der Verwendung von Bistributylzinnoxid $(\text{Bu}_3\text{Sn})_2\text{O}$, jedoch zeigte auch diese Methode keinen Erfolg.^[254]

Durch saure Hydrolyse konnte zwar eine teilweise Entschützung des OMe-Esters erzielt werden, allerdings erst unter Bedingungen, bei denen das Kohlenhydratgerüst von **67b** zersetzt wurde.

Das Kohlenstoffatom der Alkylgruppe eines Esters muß im Gegensatz zum Carbonylkohlenstoff als weiches, elektrophiles Zentrum betrachtet werden und sollte daher die Substitution mit weichen nukleophilen Reagenzien erlauben. Thiolate und Selenide konnten dabei aufgrund ihrer Basizität nicht verwendet werden. Mit AlBr_3 /Tetrahydrothiophen war ebenfalls keine nukleophile Substitution erreichbar, sondern nur eine Zersetzung zu beobachten.^[255]

Insbesondere Halogenide haben sich für die nukleophile Esterspaltung bewährt. So konnten beispielsweise die Methylester eines Neuraminsäureoligomeres mit LiCl nukleophil entfernt werden.^[256] Unter analogen Bedingungen (bei 120 °C, 16 h) lies sich **67b** mit 40 eq LiI bzw mit dem weniger nukleophilen LiCl in Pyridin noch nicht entschützen, bei 180 °C (MW) war eine vollständige Zersetzung des Kohlenhydrates beobachtbar. Wurde Pyridin, Lutidin oder Collidin als Lösungsmittel verwendet, konnte oberhalb von 120 °C die Bildung des vinylogenen Methylesters **69** durch die bereits beschriebene Eliminierung beobachtet werden. Ein Wechsel auf das für LiI-Substitutionsreaktionen günstige DMF^[257] brachte keine Verbesserung. Auch die Verwendung von Sulfolan als dipolarem aprotischen Lösungsmittel zeigte keinen positiven Effekt.

Das durch LiI-Substitution des Methylesters entstehende Methyliodid kann in einer Rückreaktion oftmals wieder das entschützte Produkt methylieren. Durch Zusatz eines geringen Überschusses von Natriumacetat als MeI-Scavenger kann diese Rückreaktion unterbunden werden und die für eine vollständige Umsetzung notwendige Reaktionstemperatur um bis zu 20 °C gesenkt werden.^[258] Am Beispiel des RL-2,2₁₄-COOMe **67b** konnte durch NaOAc-Zusatz jedoch keine Verbesserung der Umsetzung erzielt werden; die notwendige Temperatur für eine OMe-Entschützung lag nach wie vor höher als die Temperatur, bei der eine Zersetzung des Rhamnolipides eintrat.

Als Ergebnis der Versuche zur selektiven chemischen Entfernung des Rhamnolipidmethylesters läßt sich festhalten, daß insbesondere basische Bedingungen gänzlich ungeeignet sind und unter Eliminierung zur Bildung vinylogener Methylester führten. Saure und nukleophile Esterspaltungsvarianten erforderten zu drastische Reaktionsbedingungen und resultierten in einer Zersetzung des Kohlenhydratgerüsts.

4.7.7 2,2,2-Trichlorethylester als terminale Rhamnolid-Schutzgruppe

Eine im Gesamtsystem noch nicht verwendete Schutzgruppenorthogonalität ist die Klasse der reaktiv entfernbarer Schutzgruppen. Auf der Suche nach einer chemischen Alternative einer geeigneten terminalen Rhamnolid-Esterschutzgruppe wurde daher versucht, auf 2,2,2-Trichlorethylester auszuweichen. TCE-Ester können quantitativ reaktiv entfernt werden. Meist kommt hierfür Zn^0/HOAc zum Einsatz, doch auch Samarium(II)-iodid/THF als selektives Ein-Elektronen-Reduktionsmittel kann verwendet werden.^[259;260]

Die Einführung der Trichlorethylestergruppe zum TCE-Baustein **23** ausgehend von der TES-geschützten (*R*)-3-*O*-TES-Myristinsäure **22c** mit Trichlorethanol und EDC wurde bereits in Kap. 4.3.5 beschrieben. Der Aufbau des Dilipides (Abb. 4-67) wurde analog den beschriebenen HASP-Veresterungen/-Desilylierungen in Kap. 4.7.1 durchgeführt, ohne das intermediäre TES-Produkt zu isolieren und erlaubte die Darstellung des 3-OH-entschützten TCE-Dilipides **71** in insgesamt 98 %iger Ausbeute.

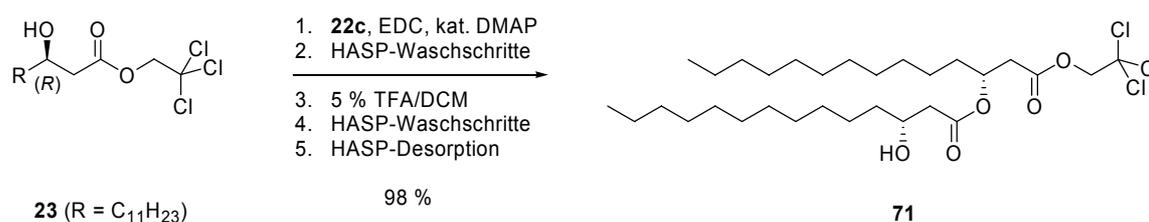


Abb. 4-67: HASP-Synthese des Trichlorethyl-Dilipides **71**.

Zur Glykosylierung des Trichlorethyl-Dilipides **71** mit Rhamnosendonor **6** wurde analog dem in Kap. 4.7.2 vorgestellten allgemeinen Glykosylierungs-HASP-Verfahren vorgegangen. Wiederum konnte mit lediglich 1.3 eq Donor quantitativ (97.5 %) glykosyliert werden, wie die gravimetrische, massenspektrometrische und ¹H-/¹³C-NMR-spektroskopische Betrachtung (Abb. 4-69) des hierfür desorbierten Produktes **72** ergab.

Anschließend wurde in einer HASP-Festphasenreaktion versucht, die Phenoxyacetat-Schutzgruppe vom BDA-POAc-RL-1,2₁₄-COOTCE **72** zu entfernen. Das hierfür benutzte HASP-Protokoll entsprach ebenfalls dem für die entsprechenden Methylester vorgestellten Verfahren (vgl. Kap. 4.7.3) mit 40 eq Methylamin in Methanol/THF (1:1). Nach der Aufreinigung und Desorption des Reaktionsansatzes war zwar die gewünschte POAc-Abspaltung erreicht worden. Zusätzlich ereignete sich jedoch anstelle der direkten Reakti-

on zum 2-OH-entschützten OTCE-Produkt **73** unter basischer Methylamin-Katalyse auch die vollständige Umesterung der Trichlorethylestergruppe des Eduktes zum korrespondierenden Methylester (Abb. 4-68). Mit der definiert dargestellten Verbindung BDA-RL-1,2₁₄-COOMe **61e** (vgl. Kap. 4.7.3) stimmt das OMe-Produkt **61e** aus dieser Synthese in allen MS- und NMR-Werten überein.

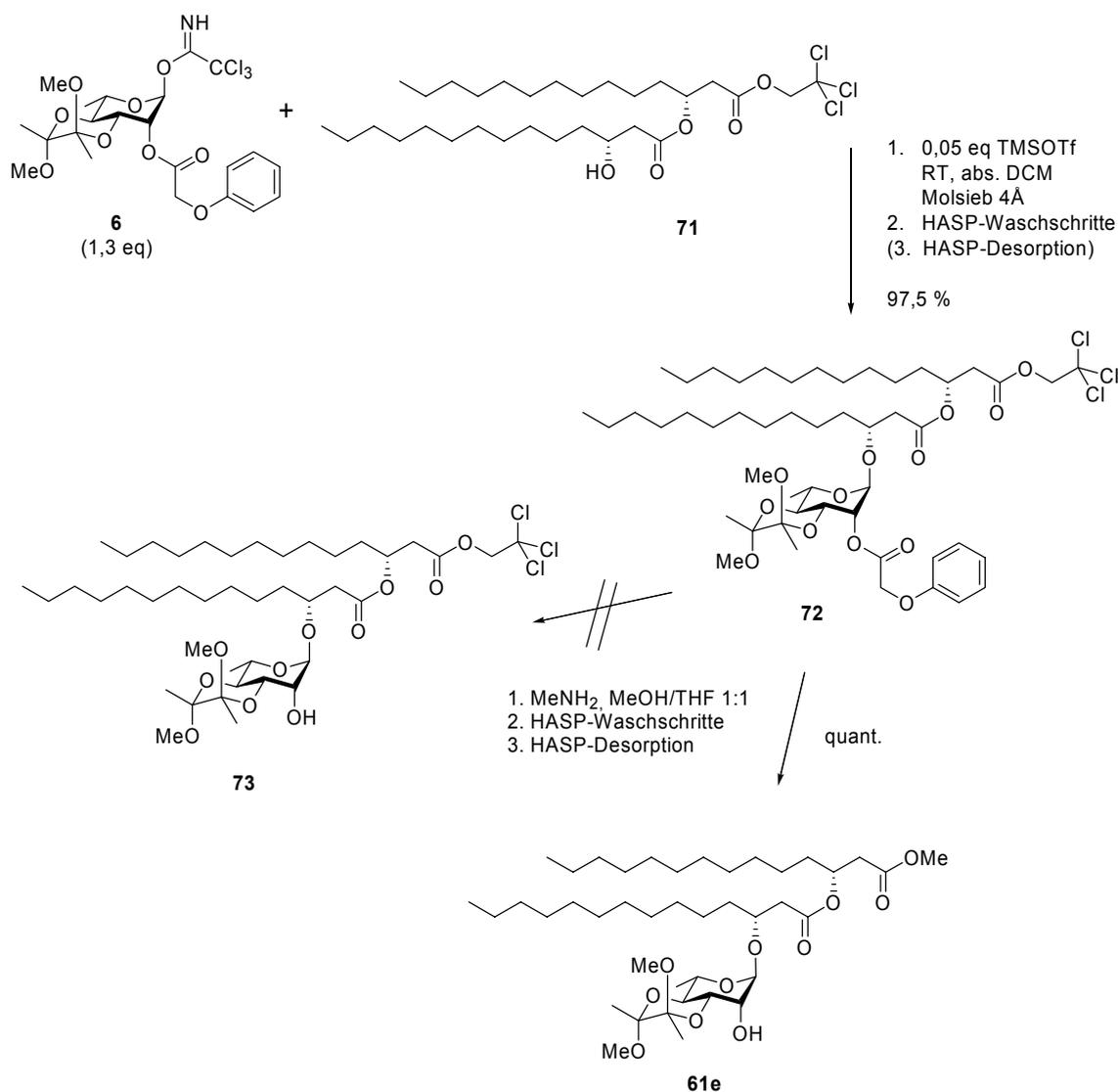


Abb. 4-68: Glykosylierung des Trichlorethylidilipides **71** und basenkatalysierte Umesterung des reaktiven Trichlorethylesters zum BDA-Rhamnolipidmethylester **61e** während der POAc-Entschützung.

Gegenüber schwachen (Lösungsmittel-) Nukleophilen scheint **72** durch die CCl_3 -Gruppe zu stark aktiviert zu sein. Dies schließt insbesondere vor dem Hintergrund der methanolischen HASP-Aufarbeitung, welche auf Alkohol/Wasser-Gemische festgelegt ist, die Verwendung der reaktiv spaltbaren TCE-Ester als temporäre terminale Rhamnolidester-schutzgruppe gänzlich aus.

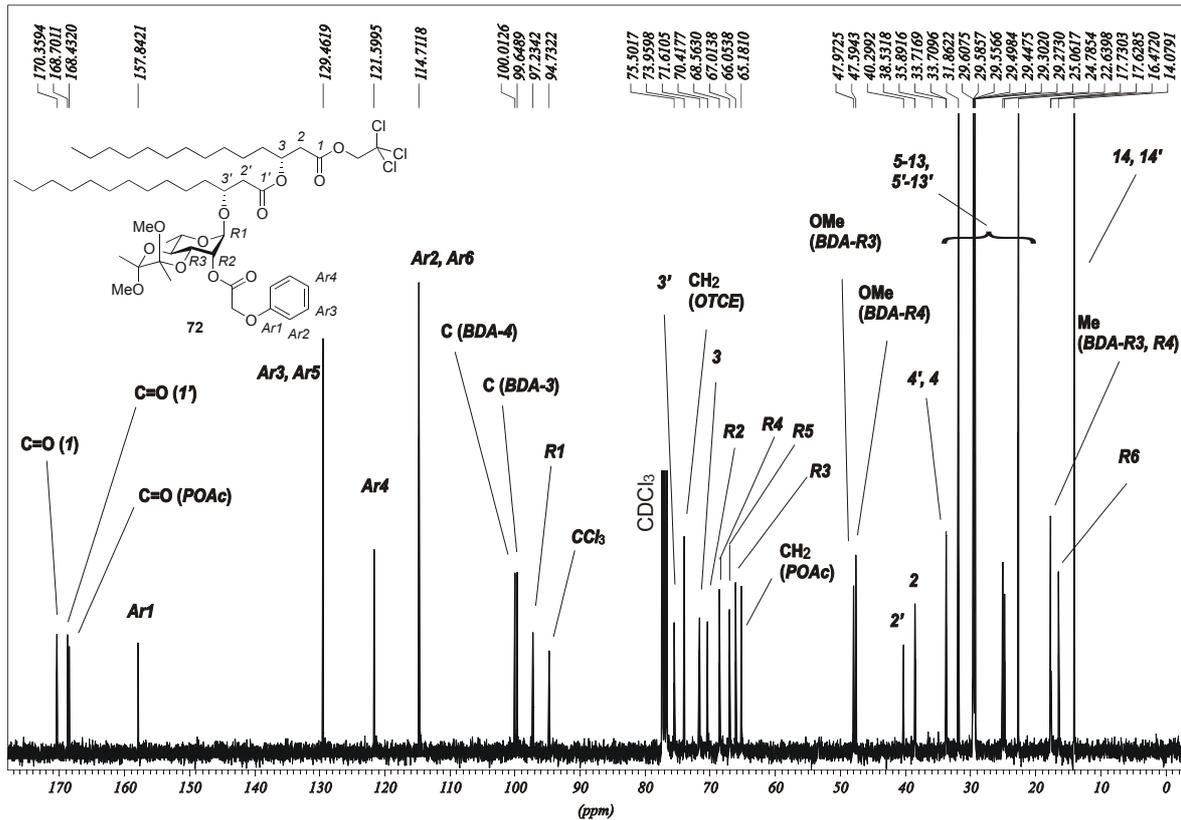


Abb. 4-69: ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) des BDA- und POAc-geschützten OTCE-Rhamnolidestes BDA-POAc-RL-1,2,4-COOTCE **72**. Gezeigt ist das NMR des Produktes direkt nach der HASP-Elution. Es ist kein β -Anomer und kein unglykosyliertes Edukt-Lipid erkennbar.

4.7.8 Methylester als terminale Rhamnolipid-Schutzgruppe – Enzymatische Esterhydrolyse

Die notwendige hydrolytische Selektivität, die chemisch gegenüber den Rhamnolipid-methylestern nicht erreicht werden konnte, sollte durch die Verwendung hydrolytisch aktiver Enzyme, den Hydrolasen (EC 3), erreichbar sein. Die dafür in Frage kommenden Carboxylesterhydrolasen (EC 3.1.1) gehören zu den Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1), den Triacylglycerin-Hydrolasen (EC 3.1.1.3) und den Sterolesterasen (EC 3.1.1.13), doch es sind auch esterhydrolytisch aktive Proteasen (Peptidhydrolasen, EC 3.4) bekannt. Aufgrund ihrer wesentlichen natürlichen Rolle, Komponenten aus Nahrungsmitteln zu verdauen, zeichnen sich Hydrolasen meist durch eine breite Substratspezifität aus. Auch gegenüber unnatürlichen Substraten weisen sie oft hohe Stereoselektivitäten auf.^[261-263]

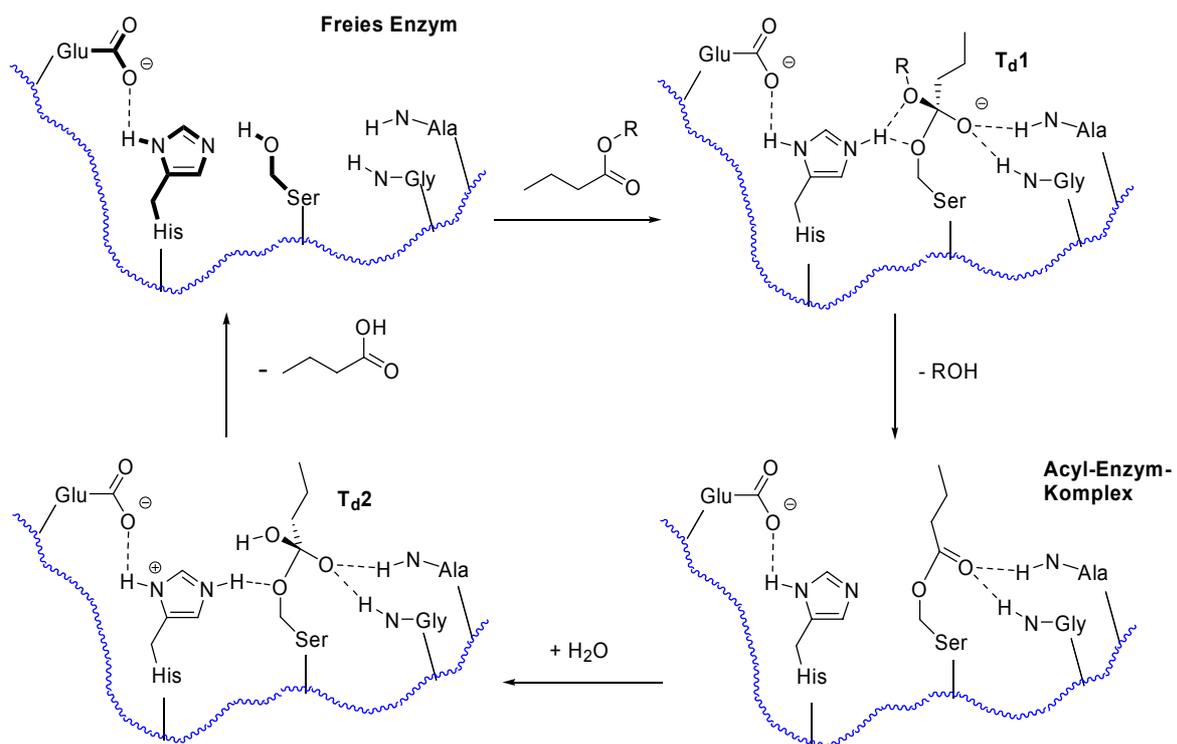


Abb. 4-70: Schema der Hydrolyse eines Buttersäureesters an der katalytischen Triade einer Lipase (oben links dick hervorgehoben) über den ersten tetrahedralen Übergangszustand T_{D1} , den Acyl-Enzym Komplex und den zweiten tetrahedralen Übergangszustand T_{D2} .^[264]

Lipasen sind Serinesterasen, ihre katalytische Triade (Abb. 4-70) besteht aus den drei Aminosäureresten von Ser, His und Asp(Glu). Weitere Aminosäuren bilden als Wasser-

stoffbrückenbildner die Oxyanion-Bindetasche (*oxyanion hole*), die das entstehende Oxyanion des tetrahedralen Übergangszustandes T_{D1} stabilisiert.^[264;265]

Die Kristallstrukturen von Lipasen zeigen für gewöhnlich die „geschlossene“ Konformation, in der ein Deckel, ein amphiphiles helikales Peptidsegment, das aktive Zentrum blockiert. Lipasen, die mit ihrem Substrat kokristallisiert wurden, zeigen die „offene“ Konformation. Das katalytisch aktive Zentrum ist nur in Gegenwart eines Lipidsubstrates zugänglich, da eine Grenzflächenaktivierung in Gestalt einer Lipid-induzierten Konformationsänderung durch Anbindung an eine hydrophobe Grenzfläche eintritt. Durch diesen allosterischen Effekt wird der „Deckel“ geöffnet und einer der Oxyanionen-stabilisierenden Reste in die katalytisch aktive Position platziert.^[266;267]

Im Gegensatz zu Proteasen benötigen fast alle Lipasen als grenzflächenaktive Enzyme kein homogen gelöstes Substrat, sondern hydrolysieren nur Substrate überhalb der kritischen micellaren Konzentration (CMC).^[268] Die einfachste Hydrolyse eines Lipides wird daher in wässriger Emulsion durchgeführt. Hier stellen micellare Aggregate bzw. die Tröpfchen der Emulsion die Phasengrenzfläche dar. Oft zeigt sich bei Verwendung von ~5–30 % eines wassermischbaren organischen Kosolvens oder durch Zusatz eines Detergens eine auf denselben allosterischen Effekt zurückzuführende gesteigerte Aktivität. Eine andere Vorgehensweise, die aufgrund der Grenzflächenaktivität von Enzymen oft zu einer starken Steigerung der Reaktionsraten führt, ist die Hydrolyse in biphasigen Systemen aus organischem Lösungsmittel und Puffer.^[269] Insbesondere die Enzymeigenschaften von Lipasen hängen also in entscheidendem Maße v.a. vom verwendeten Lösungsmittelsystem ab. Die Untersuchung der Beeinflussung des Lösungsmittels auf die aktiven Hydrolasen – das Medienengineering – muß daher im Anschluß an das Primärscreening den nächsten Schritt in der Auffindung der optimalen enzymatischen Parameter darstellen.^[270]

Mit einer Reihe kommerziell erhältlicher Hydrolasen wurde in einem Primärscreening (Tab. 4-12) nach esterhydrolytisch aktiven Enzymen gegenüber dem primären Ester des Modellsubstrates RL-2,2₁₄-COOMe **67b** gesucht. Zwei unterschiedliche Reaktionssysteme wurden untersucht. Als einphasiges System wurde aufgrund der Substratlöslichkeit ACN/Na_iPO₄-Puffer (pH 7.0) bei 40 °C gewählt, in einem zweiphasigen System wurde *n*-Hexan/Na_iPO₄-Puffer (pH 7.0) bei 40 °C verwendet. Das Screening wurde in einer Büchi® Syncore Plattform unter den in Tab. 4-12 angegebenen Bedingungen durchgeführt und die Umsetzung zur Säure **79** nach 72 h anhand von MALDI-TOF-MS-Spektren (Abb. 4-73) und mit RP-18-Dünnschichtchromatogrammen bewertet (Tab. 4-12).

Tab. 4-12: Enzymatische Hydrolyse des Methylesters von Rhamnolipid RL-2,2₁₄-COOMe **67b**. Verglichen wurden verschiedene esterhydrolytisch aktive Lipasen, Esterasen und Proteasen (L, E, P). Gezeigt sind die Ergebnisse für die OMe-Hydrolyse von je 3 µmol (2.3 mg) RL-2,2₁₄-COOMe **67b** mit je 3 mg Enzym im einphasigen Medium (8 ml ACN/Na₂PO₄-Puffer 1:3 v/v) sowie im zweiphasigen Medium (5 ml n-Hexan/Na₂PO₄-Puffer 3:1 v/v) bei RT und 72 h Reaktionsdauer. Eingesetzt wurden kommerziell erhältliche Standardenzyme von Fluka, Sigma Aldrich und Roche-Diagnostics (L-2 bis L-10 sowie E-1 und E-2 des CHIRAZYME[®] Screening Set 2). Die über MALDI-MS und RP-18-DC bewertete Umsetzung wurde wie folgt eingestuft: (-o-) = kein Umsatz erkennbar; (+) = Umsatz < 1/3; (++) = 1/3 < Umsatz < 2/3; (+++) = Umsatz > 2/3. * *Candida Cylindracea* wird seit 1992 als *Candida Rugosa* bezeichnet.

| Quelle der Hydrolase | | 79 einphasig (ACN/Puffer) | 79 zweiphasig (n-Hexan/Puffer) |
|---|--------|---------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Alcaligines sp.</i> (L-10) | ASL | -o- | -o- |
| <i>Aspergillus Niger</i> (Fluka, L) | ANL | -o- | -o- |
| <i>Candida Antarctica</i> , Frakt. A (L-5) | CAL-A | -o- | + |
| <i>Candida Antarctica</i> , Frakt. B (L-2) | CAL-B | + | + |
| <i>Candida Antarctica</i> (Fluka, immob.) | CAL-B | ++ | -o- |
| <i>Candida Rugosa</i> * (L-3) | CRL | -o- | ++ |
| <i>Candida Rugosa</i> * (L-3P) | CRL | -o- | +++ |
| <i>Candida Cylindracea</i> * (Fluka, L) | CRL | -o- | + |
| <i>Rinderpankreas-Chymotrypsin</i> (Fluka, P) | CHYM | -o- | -o- |
| <i>Pferdeleber</i> (Fluka, E) | HLE | -o- | -o- |
| <i>Rhizomucor Miehei</i> (L-9) | RML | -o- | +++ |
| <i>Rhizomucor Miehei</i> (Lipozym [®] , L) | RML | -o- | + |
| <i>Schweineleber</i> (E-1) | PLE-E1 | -o- | -o- |
| <i>Schweineleber</i> (E-2) | PLE-E2 | -o- | -o- |
| <i>Schweineleber</i> (Aldrich, E) | PLE | -o- | -o- |
| <i>Schweinepankreas</i> (L-7) | PPL | -o- | -o- |
| <i>Rhizopus Arrhizus</i> (Fluka, L) | RAL | -o- | ++ |
| <i>Thermomyces Lanuginosa</i> (L-8) | TLL | + | + |

Tab. 4-13: Medienscreening auf die optimale Aktivität der aktivsten Lipasen des Primärscreenings: Enzymatische Hydrolyse des Methylesters von Rhamnolipid RL-1,2₁₂-COOMe **66e** mit je 8 µmol (5.0 mg) RL-1,2₁₂-COOMe **66e** und 3 mg Enzym bei RT und 72 h Reaktionsdauer. Als Puffer wurde Na₂PO₄-Puffer verwendet. Die über MALDI-MS und RP-18-DC bewertete Umsetzung wurde wie folgt eingestuft: (-o-) = kein Umsatz erkennbar; (+) = Umsatz < 1/3; (++) = 1/3 < Umsatz < 2/3; (+++) = Umsatz > 2/3.

| Reaktionsmedium | 76 Candida Antarctica, immob. | 76 Rhizomucor Miehei (L-9) | 76 Candida Rugosa (L-3P) |
|--|--|-------------------------------------|-----------------------------------|
| CHCl ₃ /Puffer (3:1, v/v, 4 ml) | | + | + |
| Cyclohexan/Puffer (3:1, v/v, 4 ml) | | +++ | +++ |
| Diisopropylether/Puffer (3:1, v/v, 4 ml) | | + | + |
| n-Hexan/Puffer (3:1, v/v, 4 ml) | | +++ | +++ |
| 2-Octanol/Puffer (3:1, v/v, 4 ml) | | -o- | -o- |
| TBME/Puffer (3:1, v/v, 4 ml) | | + | + |
| Toluol/Puffer (3:1, v/v, 4 ml) | | + | -o- |
| Aceton/Puffer(1:4, v/v, 5 ml) | ++ | | |
| ACN/Puffer(1:4, v/v, 5 ml) | ++ | | |
| DMSO/Puffer(1:4, v/v, 5 ml) | +++ | | |
| Methanol/Puffer(1:4, v/v, 5 ml) | ++ | | |
| THF/Puffer(1:4, v/v, 5 ml) | + | | |
| ACN/Puffer(1:4, v/v, 5 ml) | + | | |
| tert.-Butanol/Puffer(1:4, v/v, 5 ml) | -o- | | |

Die im Primärscreening (Tab. 4-12) gefundenen, gegenüber RL-2,2₁₄-COOMe **67b** aktiven Hydrolasen sind die immobilisierte Lipase B aus *Candida Antarctica* (CAL-B) sowie die Lipasen aus *Candida Rugosa* und *Rhizomucor Miehei*. Für die Auffindung der optimalen Solvensbedingungen, dem Medienscreening (Tab. 4-13), wurde RL-1,2₁₄-COOMe **66e** als Substrat verwendet. Die im ersten Screening zufällig gewählten Bedingungen (n-Hexan/Puffer) erwiesen sich dabei für die zweiphasige Hydrolyse mit *Candida Rugosa* und *Rhizomucor Miehei* als Optimum. Im Falle der einphasigen Reaktionsführung mit Lipase aus *Candida Antarctica B* (Fluka bzw. Novozym 435, kovalent immobilisiert auf Eupergit[®]-Acrylharzperlen, Aktivität > 2 U/mg) konnte die Umsetzung zur Säure **76** durch Zusatz von 20 % DMSO (v/v) anstelle von ACN nochmals verbessert werden.

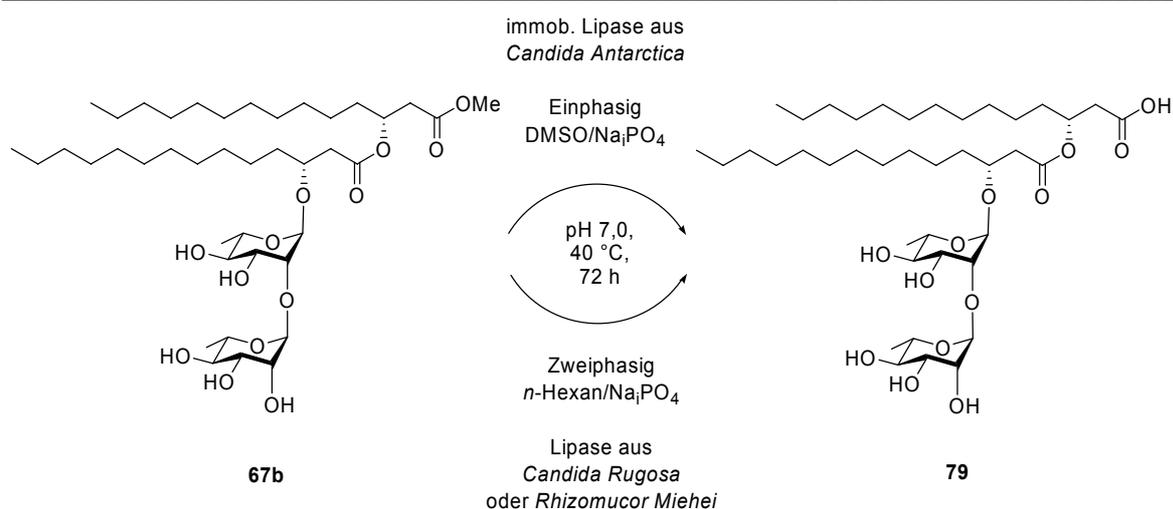


Abb. 4-71: Selektive enzymatische Hydrolyse des Methylesters von Rhamnolipid RL-2,2₁₄-COOMe **67b**.

Da die Enzyme *Candida Rugosa* (L-3P) und *Rhizomucor Miehei* (L-9) des CHIRAZYME[®] Screening Sets gegenwärtig nicht mehr kommerziell erhältlich sind und die eigentlich identischen Enzymhydrolyasen eines anderen Herstellers eine signifikant herabgesetzte Aktivität zeigten (Tab. 4-12), wurde die Variante der Hydrolyse mit immobilisierter Lipase aus *Candida Antarctica* (CAL-B) in DMSO/Puffer (1:4, v/v, 5 ml) für die Umsetzung einer Auswahl der Rhamnolipidmethyl ester **66n**, **67n** und **68** verwendet.

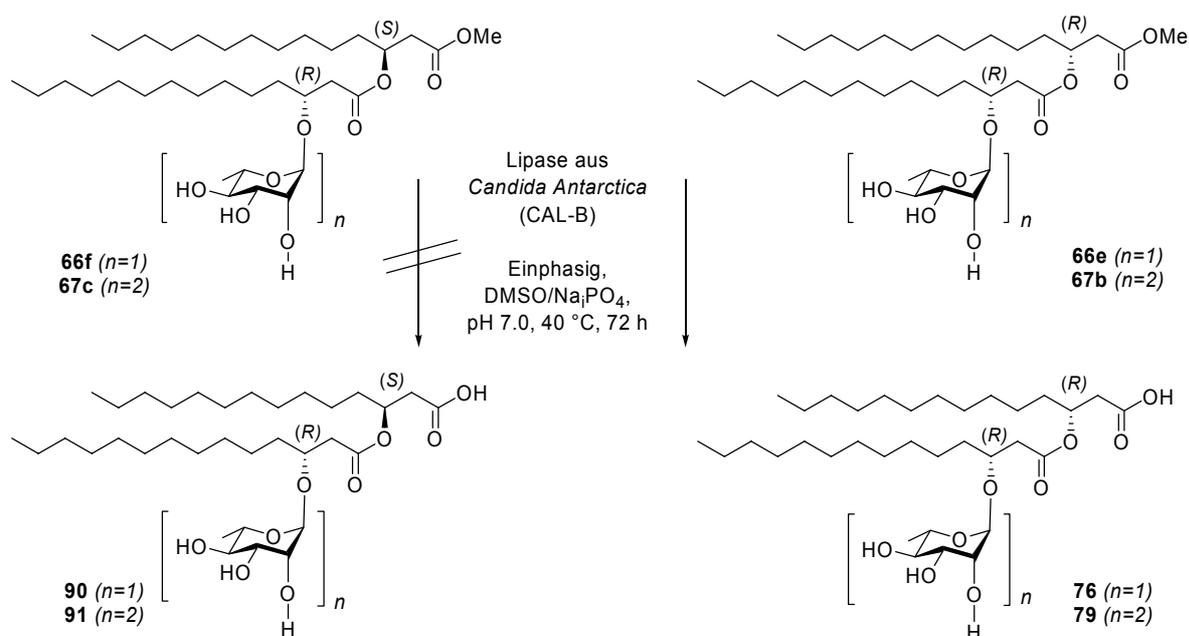


Abb. 4-72: Kinetische Racematspaltung von (3'R,3R) und (3'R,3S)-Rhamnolipidmethyl estern durch CAL-B.

Hierbei zeigte sich, daß alle Rhamnolipide, die im terminalen Fettsäuremethylester eine 3-(*R*)-Konfiguration aufweisen, von *Candida Antarctica*-Lipase (CAL-B) selektiv zu den freien Säuren **74-82** gespalten werden. Für den Fall einer 3-(*S*)-Konfiguration im terminalen Fettsäuremethylester beobachtet man erwartungsgemäß keine Reaktion aufgrund der nicht gegebenen Substraterkennung (Abb. 4-72). Diese Beobachtung kann zur kinetischen Racematspaltung von racemischen Rhamnolipiden verwendet werden, so daß unter Inkaufnahme von 50 % Substanzverlust eine enantioselektive Darstellung der Fettsäurebausteine nicht notwendig ist. CAL-B weist gegenüber Rhamnolipidmethylestern eine bemerkenswert breite Substratspezifität auf. Der relevante Erkennungsbereich ist unabhängig von der Rhamnosenzahl, der Fettsäurenlängen und -anzahl. Allein die 3-Konfiguration ist für die Erkennung ausschlaggebend. Die Erkennungsabhängigkeit der 3'-Konfiguration der zweiten, nicht-terminalen Lipidkette wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Tab. 4-14: Ausbeuten der freien Rhamnolipidsäuren **74-82** durch enzymatische Hydrolyse der korrespondierenden Methylester **66n**, **67n** und **68** mit *Candida Antarctica*-Lipase. (3'*R*,3*S*)-RL-Substrate werden nicht erkannt. Angegeben sind die Ausbeuten nach chromatographischer Aufreinigung und die verwendete isokratische Laufmittelzusammensetzung (CHCl₃:MeOH:HOAc). Zur Produktcharakterisierung vgl. Kap. 4.7.11.

| Rhamnolipid RL-N,M _k -COOH | | Ausbeute [%] | SC-Bedingungen |
|---|-----------|--------------|----------------|
| RL-1,2 _{14,4} -COOH | 74 | 46.6 | 35:1:1 |
| RL-1,2 _{4,14} -COOH | 75 | 44.6 | 35:1:1 |
| RL-1,2 ₁₄ -COOH | 76 | 57.0 | 40:1:1 |
| RL-1,2 _{(<i>R</i>)14,(<i>S</i>)14} -COOH | 90 | - | - |
| RL-1,3 ₁₄ -COOH | 77 | 68.4 | 40:1:1 |
| RL-2,2 ₁₂ -COOH | 78 | 64.8 | 30:3:1 |
| RL-2,2 ₁₄ -COOH | 79 | 83.4 | 30:3:1 |
| RL-2,2 _{(<i>R</i>)14,(<i>S</i>)14} -COOH | 91 | - | - |
| RL-2,2 ₁₈ -COOH | 80 | 31.4 | 30:2:1 |
| RL-2,3 ₁₄ -COOH | 81 | 73.0 | 20:1:1 |
| RL-3,2 ₁₄ -COOH | 82 | 85.6 | 20:3:2 |

Da die enzymatische Hydrolyse der Rhamnolipidmethylester **74-82** nicht quantitativ ablief, war ein abschließender chromatographischer Aufreinigungsschritt der freien Säuren an Normalphasen-Kieselgel (isokratisch mit Chloroform/Methanol/Essigsäure) notwendig.

Die als Säuren vorliegenden freien Rhamnolipide **74-82** zeigten einen noch stärker ausgeprägten amphiphilen Charakter als die vorhergehenden Rhamnolipidmethylester **66n**, **67n** und **68**, so daß auch hier eine NMR-spektroskopische Charakterisierung schwierig war. Alle Produkte wurden daher zunächst im Rahmen der Routineanalytik per MALDI-TOF-MS auf ihre Reinheit hin untersucht, in dem sie als $[M+Na]^+$ - und $[M-H+2Na]^+$ -Addukte detektierbar waren (Abb. 4-73). Zur endgültigen NMR-Charakterisierung vgl. Kap. 4.7.11.

Die Rhamnolipide **74-82** zeigten das erwartete Verhalten eines Detergens. In Wasser bildeten sie eine opaleszent-trübe Emulsion und zeigten starke Schaumbildung. Durch Lyophilisation aus einem *tert.*-Butanol-/Wassergemisch (4:1), in dem sie sich mit geringer Opaleszenz lösten, ließen sich die Rhamnolipide zu farblosen Verbindungen lyophilisieren.

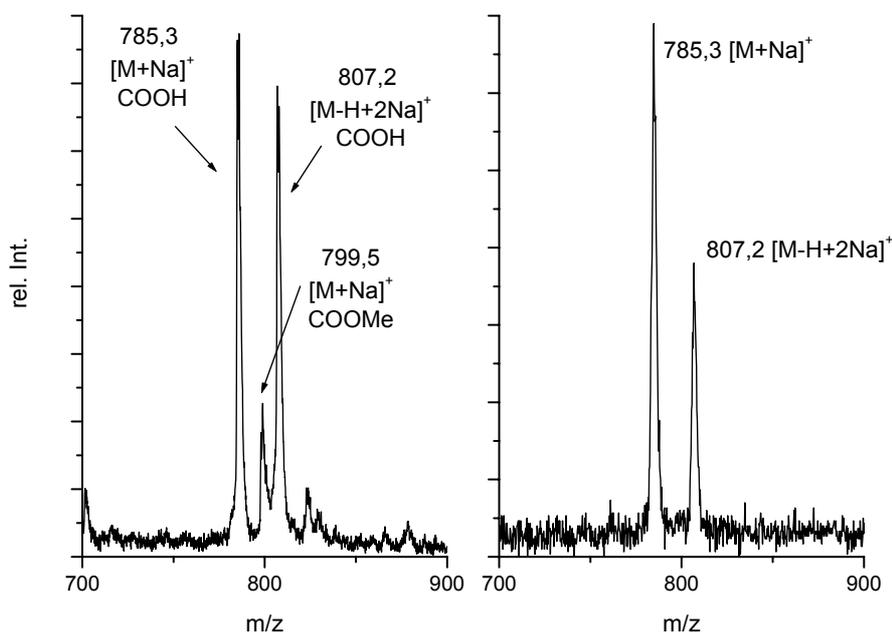


Abb. 4-73: Enzymatische Hydrolyse im zweiphasigen Medium (5 ml *n*-Hexan/ Na_2PO_4 -Puffer 3:1 v/v) von RL-2,2₁₄-COOMe **67b** mit Lipase aus *Rhizomucor Miehei* zur Säure **79**. Links: MALDI-TOF-MS des unaufgereinigten Reaktionsgemisches; Rechts: MALDI-TOF-MS von aufgereinigtem RL-2,2₁₄-COOH **79**.

Ausgehend vom (*S*)-3-HO-Myristinsäurebenzylester **25** und der (*R*)-3-*O*-TES-Myristinsäure **22c** wurde das Benzyl-dilipid **83** in einer zweistufigen HASP-Synthese in 94.4 % Ausbeute dargestellt. Die Glykosylierungs- und Phenoxyacetatabspaltungsschritte wurden gemäß den Vorschriften durchgeführt, die für die Rhamnolipidmethylester detailliert beschrieben sind. Mit Glykosylierungsausbeuten von > 95 % waren die 2-OH-freien BDA-Rhamnolipidbenzylester **85** und **87** durch die HASP-Strategie ebenfalls in sehr guten Ausbeuten darstellbar. Die anschließende BDA-Abspaltung zu **88** und **89** wurde übereinstimmend mit dem Entschützungs-schritt der Verbindungen **61a-h**, **62a-e** und **63** mit TFA/Wasser (90/10, 3 x 10 min) durchgeführt (Abb. 4-75). Die so dargestellten Benzylester zeigten ein starkes Aggregationsverhalten und waren wiederum nur bedingt NMR-spektroskopisch auflösbar. (Abb. 4-76).

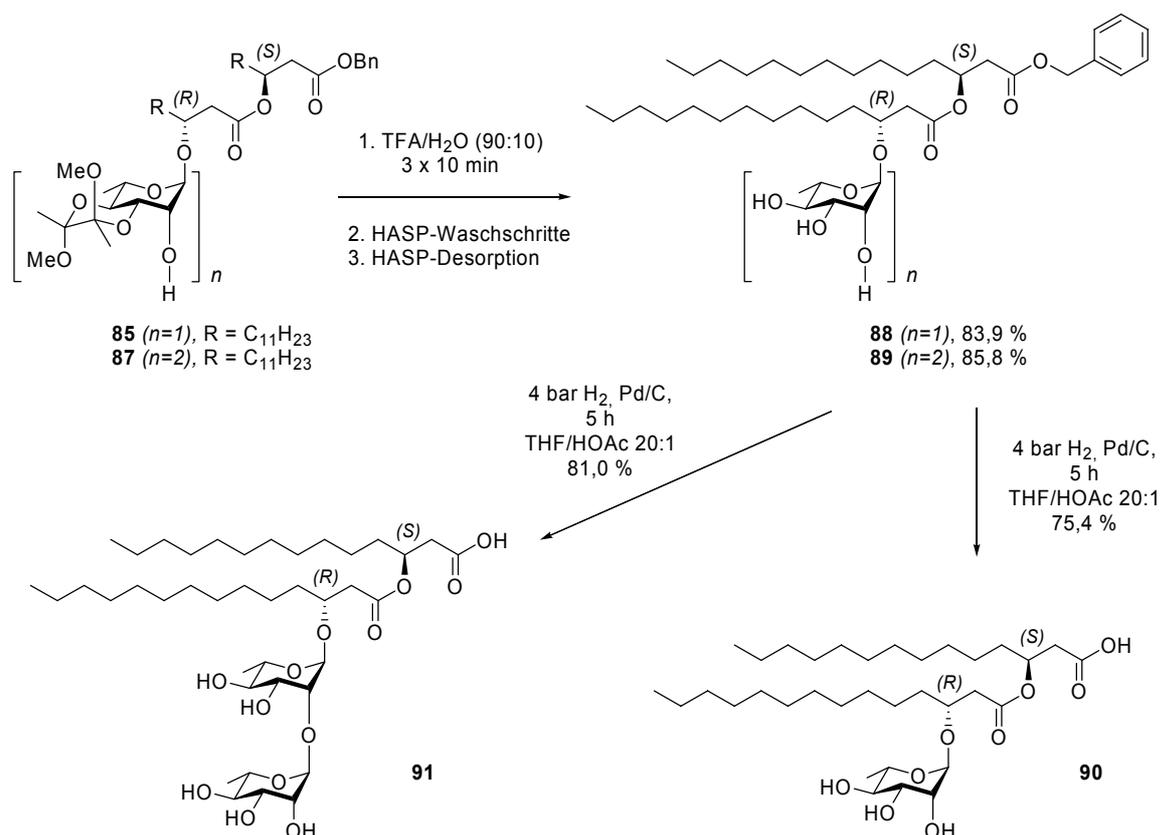


Abb. 4-75: HASP-Entschützung der BDA-Schutzgruppe und Debenzylierung der terminalen Benzylesterschutzgruppe zu den (3'*R*,3*S*)-Rhamnolipiden **90** und **91** mit 4 bar H₂ über Pd/C.

Die finale Debenzylierung zu den erwünschten (3'*R*,3*S*)-konfigurierten Rhamnolipiden **90** und **91** wurde hydrogenolytisch mit 4 bar H₂-Druck in THF/HOAc (je 21 ml, 20:1, v/v) in

Gegenwart von Pd/C-Katalysator (je 30 mg) durchgeführt (Abb. 4-75) und führte mit 75.4 % (RL-1,2_(R)14,_(S)14-COOH **90**) bzw. 81.0 % Ausbeute (RL-2,2_(R)14,_(S)14-COOH **91**) direkt zu den freien Säuren. Der Substanzverlust von bis zu 25 % im Debenzylierungsschritt war auf die starken Adsorptionseffekte der hydrophoben Substrate am Aktivkohleträger des verwendeten Pd-Katalysators zurückzuführen. Nach einer einfachen Filtration der Reaktionslösung und zweimaligem Nachspülen mit THF waren von **90** nur ca. 50 % Produkt erhältlich. Erst durch mehrmaliges, sehr gründliches Waschen (insgesamt ca. 400 ml Lösungsmittel) des verwendeten Pd/C-Katalysators mit THF, HOAc und CHCl₃, konnte der Großteil des Produktes erhalten werden. Etwa 20-25 % der Rhamnolipidsäuren verblieben aufgrund ihrer hohen Affinität gegenüber Aktivkohle im Träger, was eine gewisse Einschränkung des vorgestellten Benzylesterweges darstellt.

Die NMR- und MS-Charakterisierung der debenzylierten Rhamnolipide **90** und **91** wird in Kap. 4.7.11 besprochen.

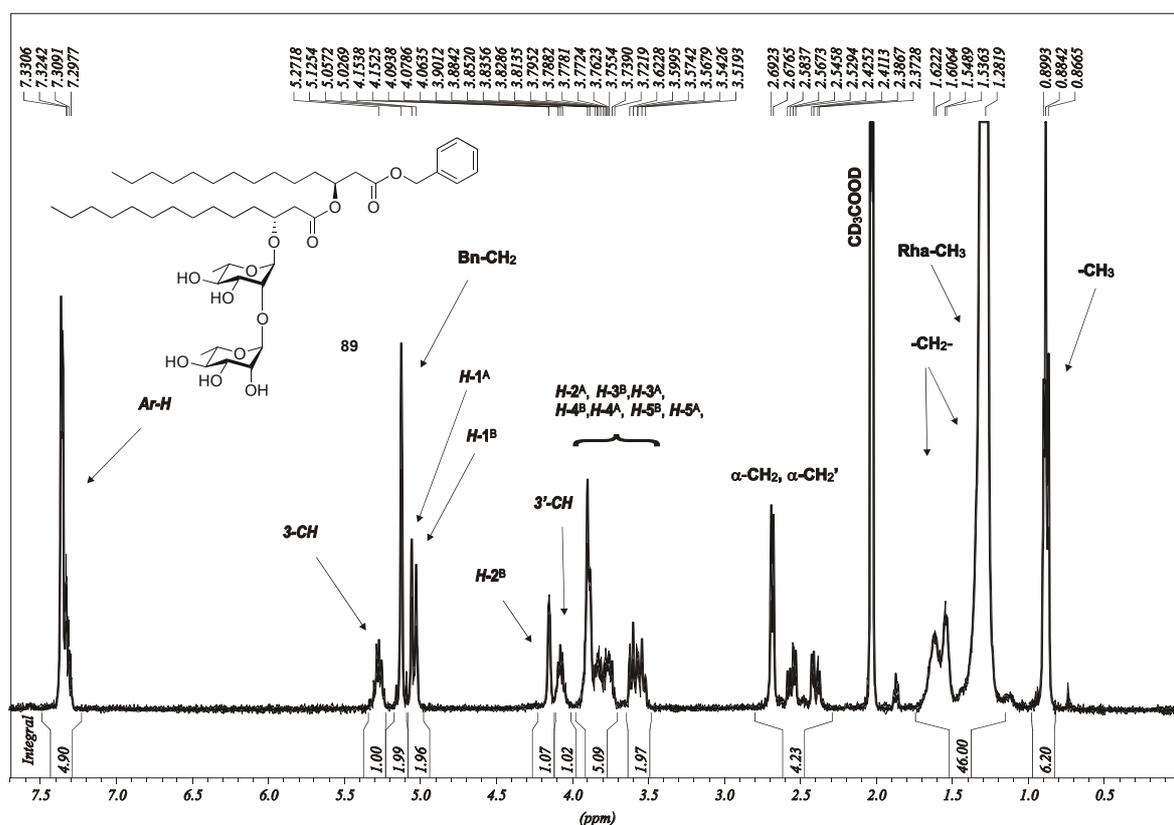


Abb. 4-76: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CD₃COOD) RL-2,2_(R)14,_(S)14-COOBn **89**; aufgrund von Aggregationseffekten werden einige Signale bei RT nicht vollständig aufgelöst.

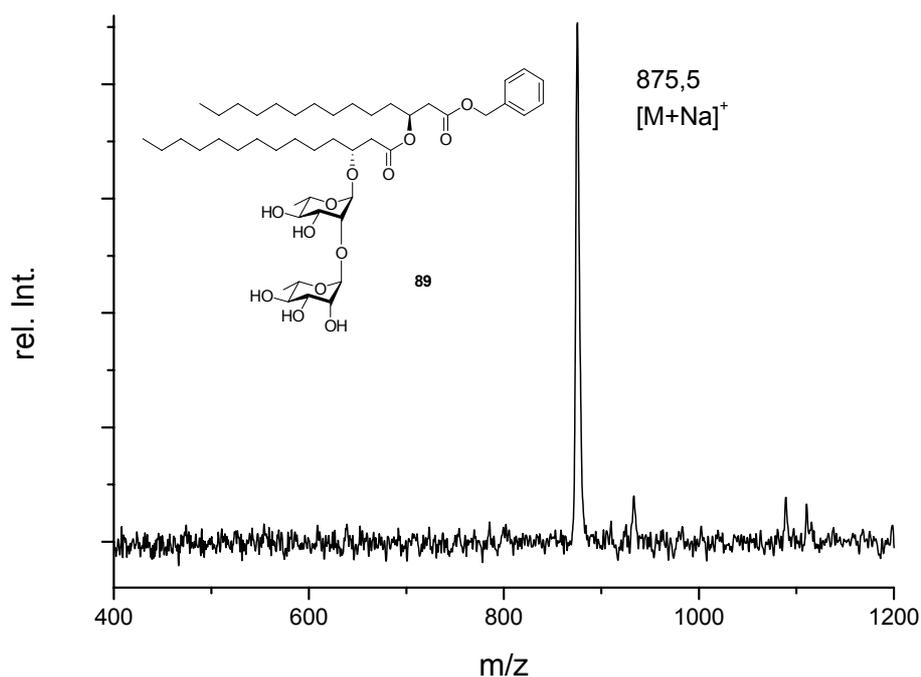


Abb. 4-77: MALDI-TOF-MS-Spektrum (CHCA) des Rhamnolipidbenzylesters **89**.

4.7.10 Darstellung von Rhamnolipidalkohol-Varianten

Als geeigneter Lipidbaustein für die Synthese der Rhamnolipidalkohol-Strukturvarianten ohne polare Carboxylatkopfgruppe diente das in Kap. 4.3.7 über die MEM-Schutzgruppe dargestellte (*R*)-3-HO-Myristylacetat **29**. Alle chemischen Bedingungen und HASP-Parameter der in Abb. 4-78 gezeigten Syntheseschritte zu den Rhamnolipidalkohol-acetylestern **97** bzw. **98** konnten direkt aus der Synthese der korrespondierenden Rhamnolipidmethylester **66a-h**, **67a-e** und **68** übernommen werden.

Die Schwierigkeit in der Synthese der Rhamnolipidalkohole bestand darin, zwei der insgesamt bis zu drei Ester selektiv chemisch zu modifizieren, ohne dabei die jeweils anderen Ester zu beeinträchtigen. Insbesondere die Labilität der beiden Acetatester ist im ersten Esterhydrolyseschritt von POAc-BDA-RL-1,2₁₄-CH₂OAc **93** bzw. POAc-BDA-RL-2,2₁₄-CH₂OAc **95** kritisch. Durch α -Substitution des einfachen Acetates reagiert ein α -Phenoxyacetat ca. 50 mal schneller.^[249] Die aufgrund dieser Erkenntnis gewählte POAc-Schutzgruppe erwies sich nicht nur gegenüber dem sekundären Dilipidester als selektiv hydrolysierbar. Ohne Abwandlung des bereits für **60n**, **64n** und **65** beschriebenen Proto-

kolles mit Methylamin (40 eq einer 40 %igen, 11.5 M wässrigen Lösung in THF/MeOH) konnte bei einer Reaktionsdauer von 1 h auch eine selektive POAc-Entschützung zu **94** (89.1 %) und **96** (91.0 %) in Gegenwart des unsubstituierten primären Acetates erreicht werden. Das ESI-MS-Spektrum (Abb. 4-79) der Verbindung POAc-BDA-RL-2,2₁₄-CH₂OAc **95**, die im Anschluß an die POAc-Entschützung erneut glykosyliert wurde, belegt deutlich, daß während der Methylamin-Hydrolyse keine Entschützung der terminalen OAc-Gruppe eintrat und infolge dessen kein fehlglykosyliertes Produkt entstand.

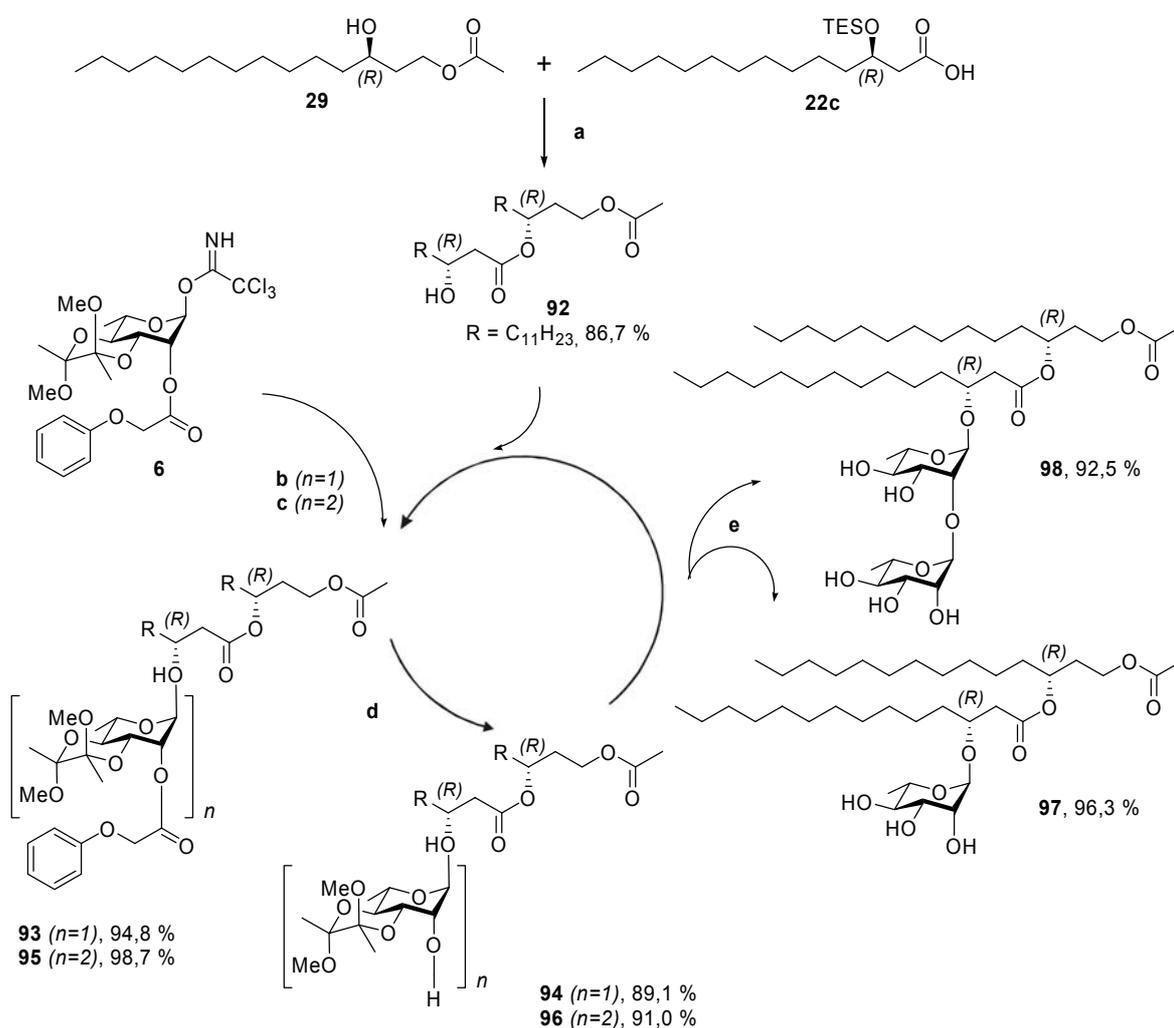


Abb. 4-78: HASP-Aufbau der Rhamnolipidalkoholacetate RL-1,2-CH₂OAc **97** und RL-2,2-CH₂OAc **98**. Bedingungen: a) EDC, kat. DMAP, HASP, 5 %TFA/DCM, HASP; b) 1.3 eq Donor **6**, 0.05 eq TMSOTf, RT, abs. DCM, Molsieb 4 Å, HASP; c) analog (b) mit 2 eq Donor **6**; d) 40 eq MeNH₂ (40 %, MeOH/THF 1:1), HASP; e) TFA/Wasser (90/10, 3 x 10 min), HASP.

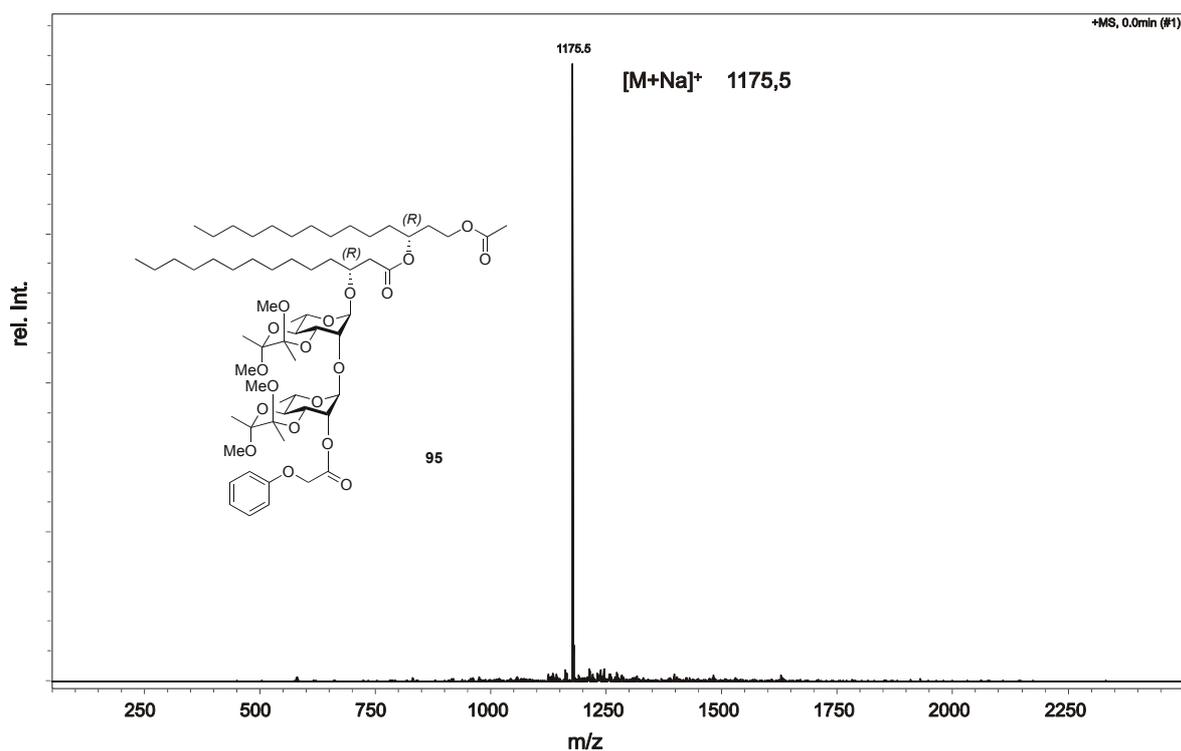


Abb. 4-79: Routine-ESI-MS des rohen HASP-Eluates nach dem zweiten Glykosylierungsschritt des POAc-BDA-RL-2,2,1,4-CH₂OAc **95** (als Na⁺-Addukt).

Nach der wie bereits für **61a-h**, **62a-e** und **63** beschriebenen Entfernung der BDA-Maskierung wurde im weiteren Verlauf der Synthese versucht, die primäre Esterschutzgruppe selektiv zu hydrolysieren. Die Reaktivitäten zwischen primärem Acetat und sekundärem Dilipidester unterscheiden sich nicht mehr so deutlich wie im vorhergehenden Hydrolyseproblem, so daß in Vorversuchen zunächst versucht wurde, RL-1,2-CH₂OAc **97** mit einer katalytischen Menge NaOMe nach *Zemplen* zu deacetylieren, was in einer vollständigen Hydrolyse beider Ester resultierte. Mit 1.05 eq Hydrazinacetat in DMF war nach 24 h eine ungefähre (anhand der MALDI-TOF-Spektren geschätzte) Produkt-/Edukt-Verteilung von ca. 1:3 erhältlich, eine Erhöhung der Äquivalentzahl des Hydrazinacetats hydrolysierte beide Ester annähernd gleich. Als überlegen erwies sich die Hydrolyse in MeOH/H₂O/THF (70:20:10) mit einer katalytischen Menge LiOH; der pH-Wert der Reaktionslösung wurde dabei auf pH 8.5 eingestellt. Unter diesen Bedingungen wurde das jeweilige Edukt in 2 h zu den erwünschten Rhamnolipidalkoholen RL-1,2-CH₂OH **99** und RL-1,2-CH₂OH **100** (Abb. 4-80) umgesetzt, eine Spaltung des Dilipidesters geschah dabei nur in geringem Ausmaß. Eine TRIS-Abpufferung der Reaktionslösung auf pH 8.5 verbes-

serte die Umsetzung gegenüber der nicht abgepufferten Lösung nicht. Nach chromatographischer Aufreinigung der beiden Reaktionsansätze waren so 72.1 % des RL-1,2-CH₂OH **99** und 70.2 % des RL-2,2-CH₂OH **100** erhältlich.

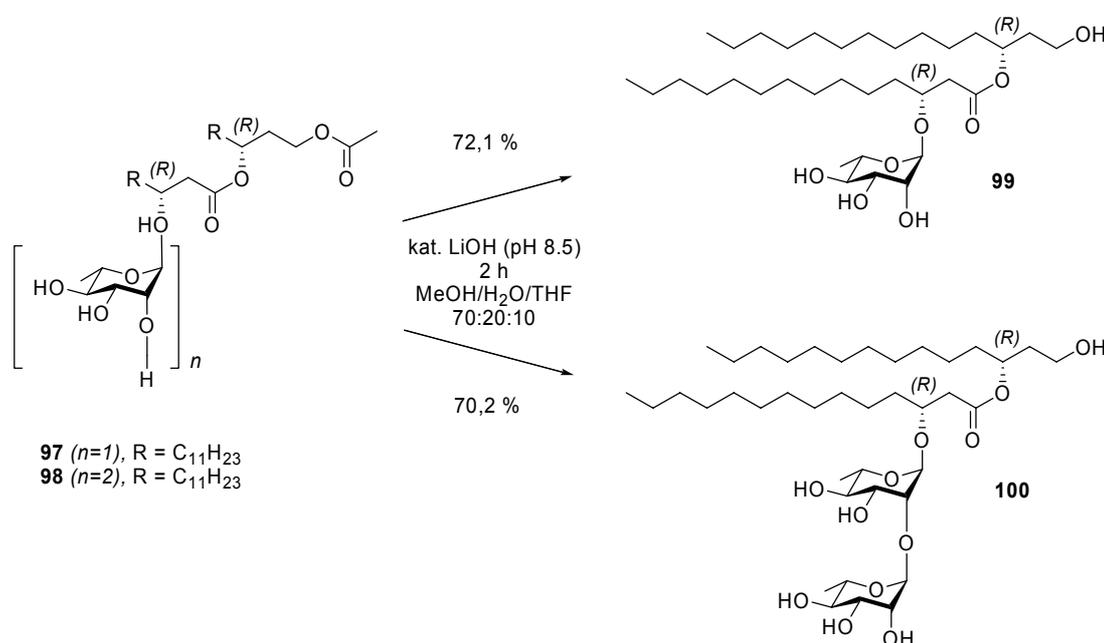


Abb. 4-80: Selektive Hydrolyse der OAc-Schutzgruppe zu den Rhamnolipidalkoholen RL-1,2-CH₂OH **99** und RL-2,2-CH₂OH **100** mittels einer auf pH 8.5 eingestellten LiOH-Lösung in THF/Wasser/MeOH.

Wie bereits von den anderen Rhamnolipid-Strukturvarianten bekannt, aggregieren die Verbindungen sehr stark, so daß beispielsweise ein ¹³C-NMR des Diglykosyllipides RL-2,2-CH₂OH **100** nicht mehr aufgelöst werden konnte. Unter entsprechenden Meßbedingungen ist das ¹H-NMR-Spektrum des Monoglykosyllipides RL-1,2-CH₂OH **99** noch genügend hoch aufgelöst, um ³J-Kopplungen des Kohlenhydratgerüsts ausmessen zu können (Abb. 4-81). Eine eindeutige Reinheits- und Identitätskontrolle von **100** gelang per MALDI-TOF-MS (Abb. 4-82). Eine weitergehende NMR- und MS-Charakterisierung der Rhamnolipide **99** und **100** befindet sich in Kap. 4.7.11, wo die Problematik der Aggregation von Rhamnolipiden bei NMR-Messungen allgemein behandelt wird.

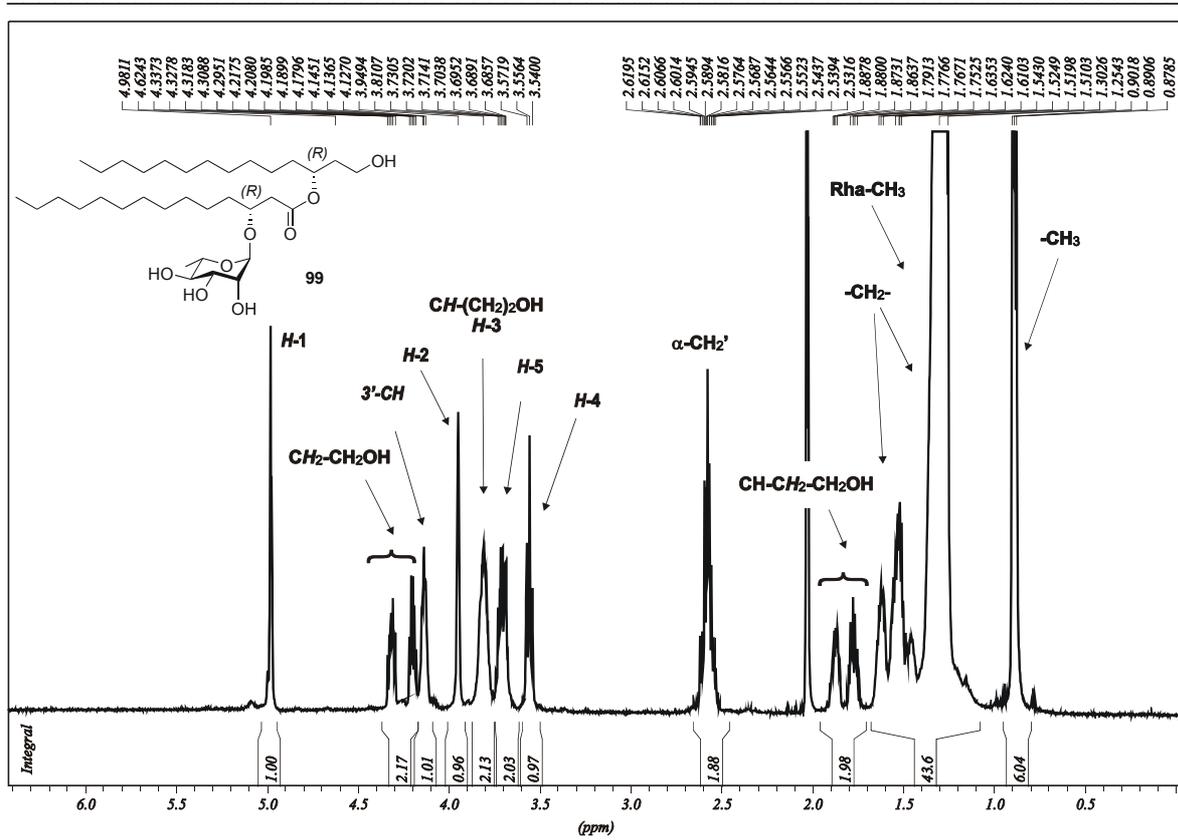


Abb. 4-81: ¹H-NMR Spektrum (600 MHz, CD₃COOD) des Rhamnolipidalkoholes RL-1,2-CH₂OH **99**.

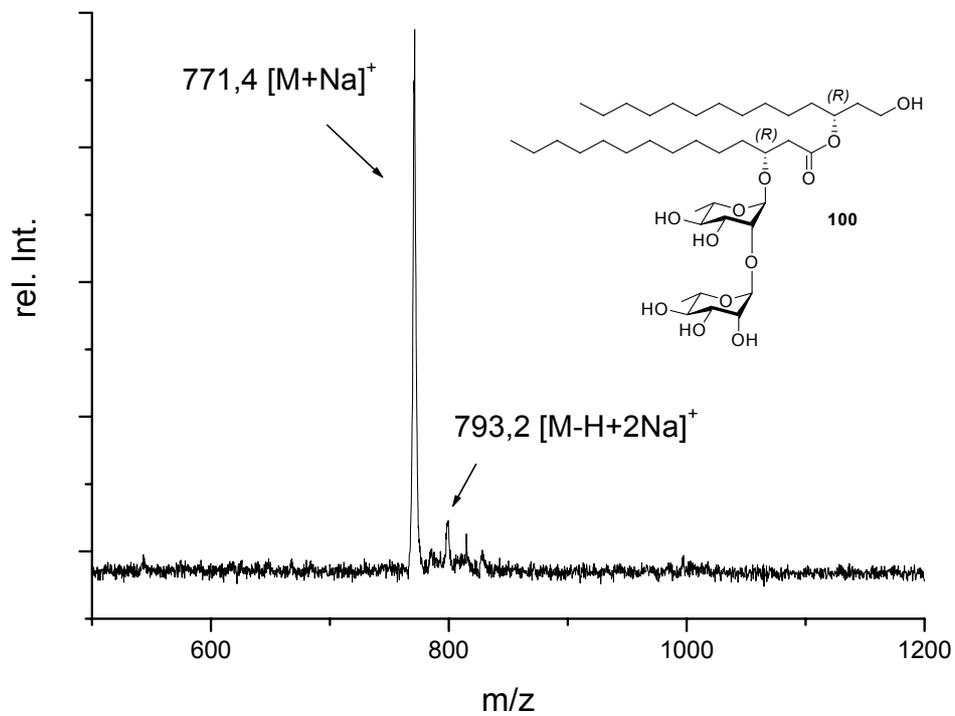


Abb. 4-82: MALDI-TOF-MS (CHCA) des Rhamnolipidalkoholes RL-2,2-CH₂OH **100**.

4.7.11 NMR- und MS-Charakterisierung amphiphiler Rhamnolipide

Die dargestellte Rhamnolipidkollektion aus den Verbindungen **74-82**, **90**, **91**, **99** und **100** besteht durchweg aus hoch amphiphilen Substanzen, die hohe Tendenz zur Bildung micellarer Aggregate auch in organischen Lösungsmitteln besitzen. In Chloroform und/oder Methanol, in denen sich die Verbindungen für synthetische Zwecke ausreichend lösen, ist bei $^1\text{H-NMR}$ -üblichen Konzentrationen eine leichte Opaleszenz zu erkennen, die indiziert, daß die kritische micellare Konzentration (CMC) bereits überschritten ist. Wie in Abb. 4-83 für RL-1,2₁₄-COOH **76** gezeigt ist, konnte unter diesen Bedingungen kein aussagekräftiges $^1\text{H-NMR}$ Spektrum erhalten werden.

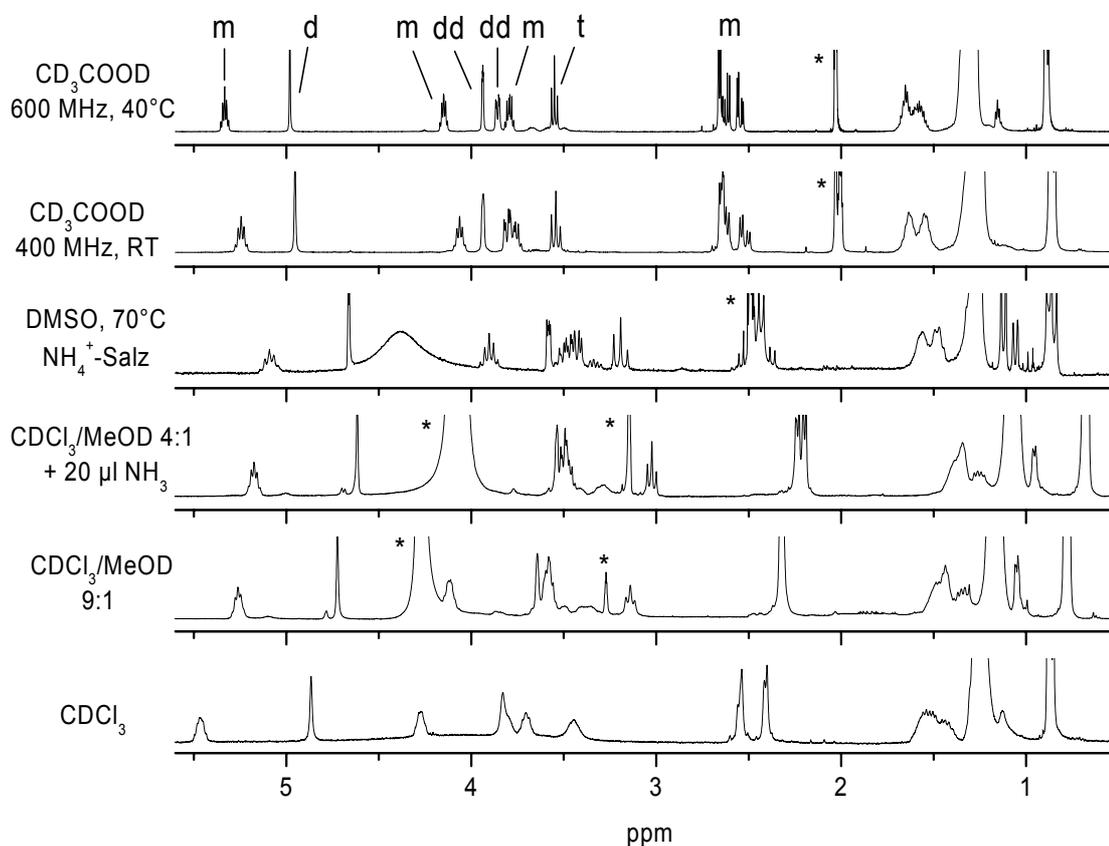


Abb. 4-83: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Signalauflösung von Rhamnolipiden. Gezeigt ist der Einfluß verschiedener Solvens- und Temperaturparameter auf das Ausmaß der Aggregation und damit auf die Signalgüte der Spektren der amphiphilen Rhamnolipide am Beispiel des Rhamnolipides RL-1,2₁₄-COOH **76**. Solvenssignale sind mit (*) gekennzeichnet. Die durch Messungen bei 40 °C mit 600 MHz erreichbare Signalauflösung (oben) kann durch die Druckauflösung nicht mehr deutlich dargestellt werden und ist daher mit den üblichen Abkürzungen kommentiert.

Eine Verbesserung der Signalauflösung wird durch eine Homogenisierung der Probenlösung, also einer Solvatisierung der Lipidaggregate erreicht. Dies konnte im einfachsten Fall durch den Zusatz von 10 % MeOD erreicht werden, wodurch jedoch nur eine geringfügige Auflösungsverbesserung festzustellen war. Besser löslich scheinen die jeweiligen Rhamnolipid-Ammoniumsalze zu sein, die eine nochmals gesteigerte Signalauflösung zeigen. Im einfachsten Fall sind diese durch Zugabe von 20 μl NH_3 zur NMR-Probe darstellbar, allerdings stört das breite Solvenssignal. Weiterhin führt die starke pH-Abhängigkeit der Signallage dabei zu einer Überlagerung der Kohlenhydratsignale von Rha- H_2 , Rha- H_3 und Rha- H_4 . Das Spektrum lässt sich durch die Verwendung der stöchiometrischen Ammoniumsalze jedoch entzerren; die verwendeten Ammoniumsalze wurden durch dreimaliges Lyophilisieren der Rhamnolipide aus einer wässrigen Ammoniumacetatlösung erhalten. Gegenüber den Spektren in $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ zeigen die in $[\text{D}_6]$ -DMSO bei 70 °C aufgenommenen Hochtemperatur-NMR-Spektren eine weitere Verbesserung. Bei 70 °C ist das Aggregationsverhalten der Rhamnolipide bereits soweit herabgesetzt, daß ^3J -Kopplungskonstanten des Kohlenhydratringes ermittelt werden konnten. Allerdings wird auch durch diese Bedingungen noch keine günstige Trennung der Signale von Rha- H_2 , Rha- H_3 und Rha- H_4 erreicht.

Durch die Verwendung von CD_3COOD konnten zwei nachteilige Effekte anderer NMR-Lösungsmittelsysteme vermieden werden: Durch Protonierung der polaren Kopfgruppe des Rhamnolipides verliert dieses in DAc einen Großteil seiner Amphiphilie und zeigt demzufolge eine sehr gute Signalauflösung; weiterhin ist durch die pH-Abhängigkeit die Signallage steuerbar, so daß durch Verwendung von deuterierter Essigsäure bereits bei 40 °C alle Signale des Rhamnolipides RL-1,2₁₄-COOH **76** basisliniengetrennt aufgelöst werden konnten (Abb. 4-83). Alle Verbindungen wurden daher bei 40 °C und 600 MHz in CD_3COOD NMR-spektroskopisch charakterisiert.

Die höheren Di- und Trirhamnosyllipide zeigten naturgemäß ein noch ausgeprägteres Aggregationsverhalten, was insbesondere die Aufnahme von ^{13}C -Spektren beeinträchtigte, so daß in manchen Fällen eine ^{13}C -NMR-Signaluordnung nur noch über die 2D-Korrelationsspektroskopiearten HSQC und HMBC möglich war, bei denen durch Polarisationstransfer allgemein eine gesteigerte Intensität der ^{13}C -Signale beobachtet werden kann.

Zur ergänzenden eindeutigen Bestätigung der Identität wurden alle Verbindungen mittels hochauflösender HR-FTICR-ESI-MS vermessen (Tab. 4-15); eine vollständige Abbildung der MALDI-TOF-Massenspektren aller Rhamnolipide findet man im Anhang.

Tab. 4-15: Experimentelle Massen (HR-FTICR-ESI-MS), Massengenauigkeiten und dargestellte Substanzmengen der Rhamnolipidkollektion in Form der 13 Verbindungen **74-82, 90, 91, 99 und 100**.

| Rhamnolipid | Summenformel [M+Na] | [M+Na] ⁺ ber. m/z gef. m/z | δ [ppm] | n [mg] |
|--|---|---|------------|-----------|
| RL-1,2 _{14,4} -COOH 74 | C ₂₄ H ₄₄ O ₉ Na | 499.28775 499.28798 | 0.46 | 32.7 |
| RL-1,2,4,14-COOH 75 | C ₂₄ H ₄₄ O ₉ Na | 499.28775 499.28772 | 0.06 | 39.1 |
| RL-1,2 ₁₄ -COOH 76 | C ₃₄ H ₆₄ O ₉ Na | 639.44425 639.44457 | 0.50 | 84.4 |
| RL-1,3 ₁₄ -COOH 77 | C ₄₈ H ₉₀ O ₁₁ Na | 865.63753 865.63779 | 0.30 | 140.2 |
| RL-2,2 ₁₂ -COOH 78 | C ₃₆ H ₆₆ O ₁₃ Na | 729.43956 729.44061 | 1.44 | 75.4 |
| RL-2,2 ₁₄ -COOH 79 | C ₄₀ H ₇₄ O ₁₃ Na | 785.50216 785.50155 | 1.20 | 85.7 |
| RL-2,2 ₁₈ -COOH 80 | C ₄₈ H ₉₀ O ₁₃ Na | 897.62736 897.62701 | 0.39 | 44.4 |
| RL-2,3 ₁₄ -COOH 81 | C ₅₄ H ₁₀₀ O ₁₅ Na | 1011.69544 1011.69578 | 0.34 | 32.6 |
| RL-3,2 ₁₄ -COOH 82 | C ₄₆ H ₈₄ O ₁₇ Na | 931.56007 931.55964 | 0.46 | 89.3 |
| RL-1,2 _{(R)14,(S)14} -COOH 90 | C ₃₄ H ₆₄ O ₉ Na | 639.44425 639.44499 | 1.20 | 41.3 |
| RL-2,2 _{(R)14,(S)14} -COOH 91 | C ₄₀ H ₇₄ O ₁₃ Na | 785.50216 785.50176 | 0.51 | 55.7 |
| RL-1,2 ₁₄ -CH ₂ OH 99 | C ₃₄ H ₆₆ O ₈ Na | 625.46499 625.46522 | 0.37 | 52.4 |
| RL-2,2 ₁₄ -CH ₂ OH 100 | C ₄₀ H ₇₆ O ₁₂ Na | 771.52290 771.52263 | 0.35 | 26.7 |

Alle dargestellten Rhamnolipide wurden bei 40 °C in CD₃COOD NMR-spektroskopisch eindeutig charakterisiert. Stellvertretend sind im folgenden die HHCOZY-, TOCSY-, HSQC- und HMBC-NMR-Spektren des Rhamnolipides RL-2,2_{(R)14,(S)14}-COOH **91** gezeigt.

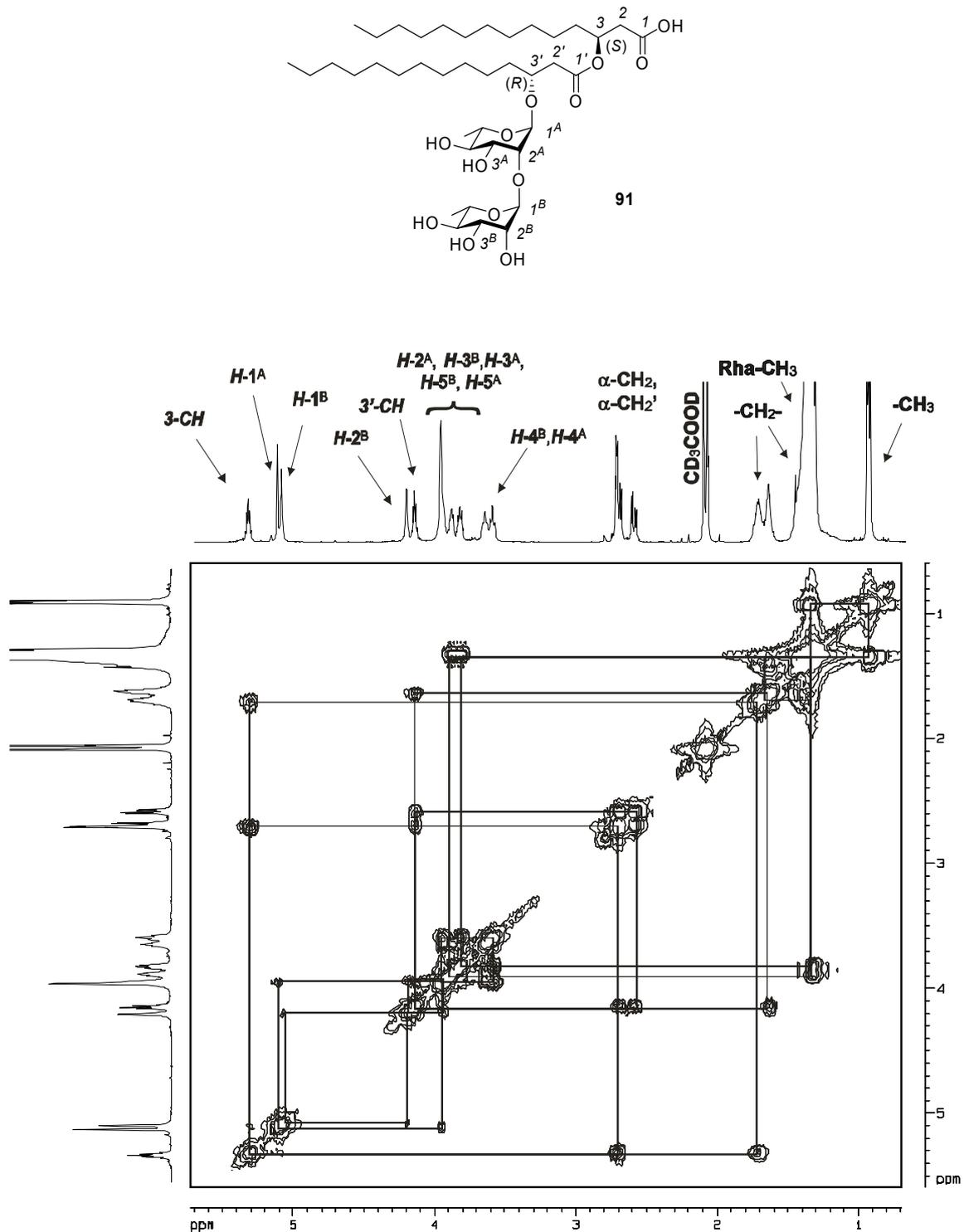


Abb. 4-84: H,H-COSY-NMR Spektrum (600 MHz, CD₃COOD, 40 °C) von RL-2,2_{(R)14,(S)14}-COOH **91**. Aufgrund der Übersichtlichkeit sind die ³J-H,H-Kontakte im Bereich von 3.5-4.2 ppm nicht gekennzeichnet.

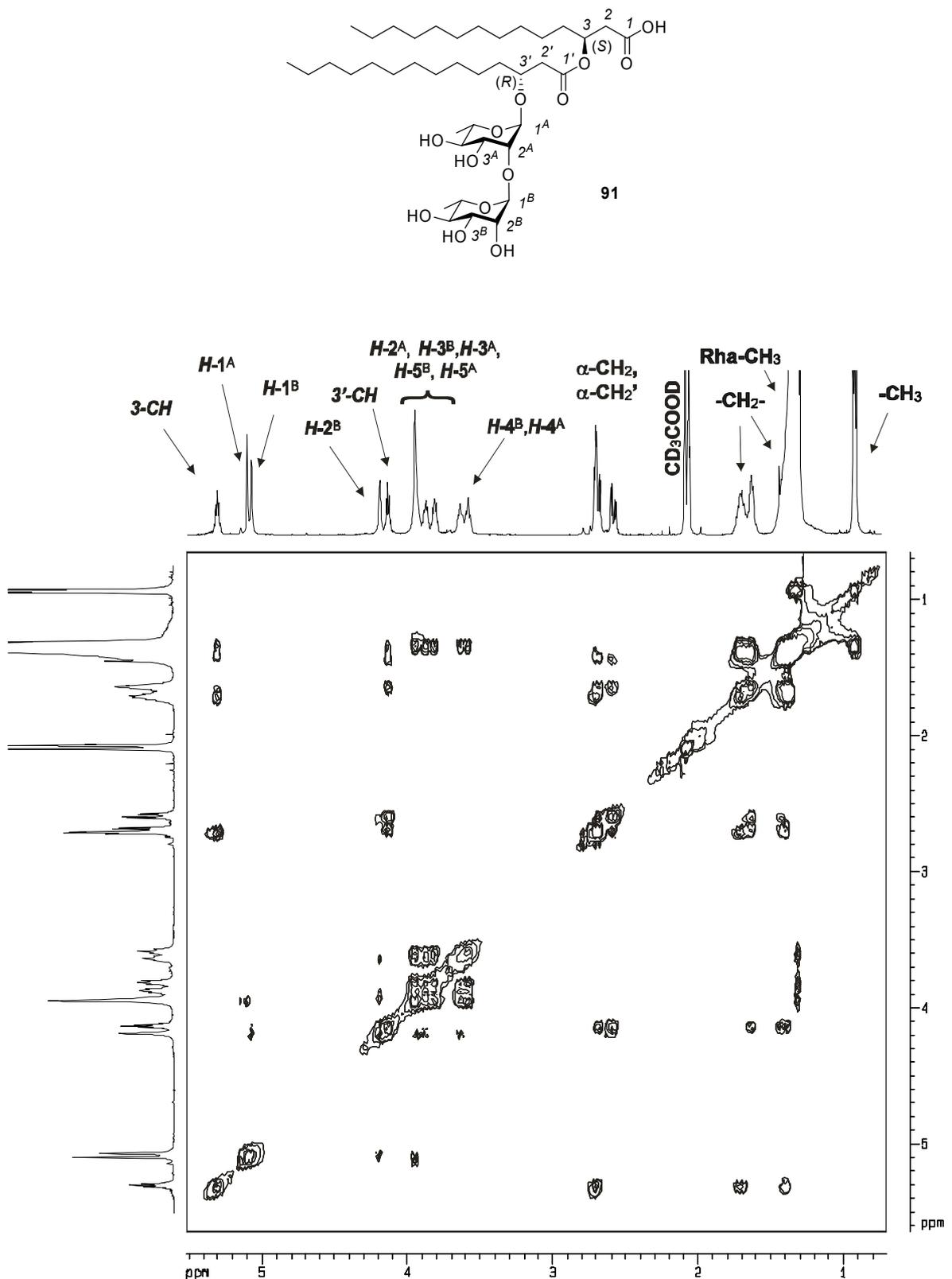


Abb. 4-85: TOCSY-NMR Spektrum (600 MHz, CD₃COOD, 40 °C) von Rhamnolipid RL-2,2(R)14,(S)14'-COOH 91. Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit sind die H,H-Konnektivitäten nicht schematisch eingezeichnet.

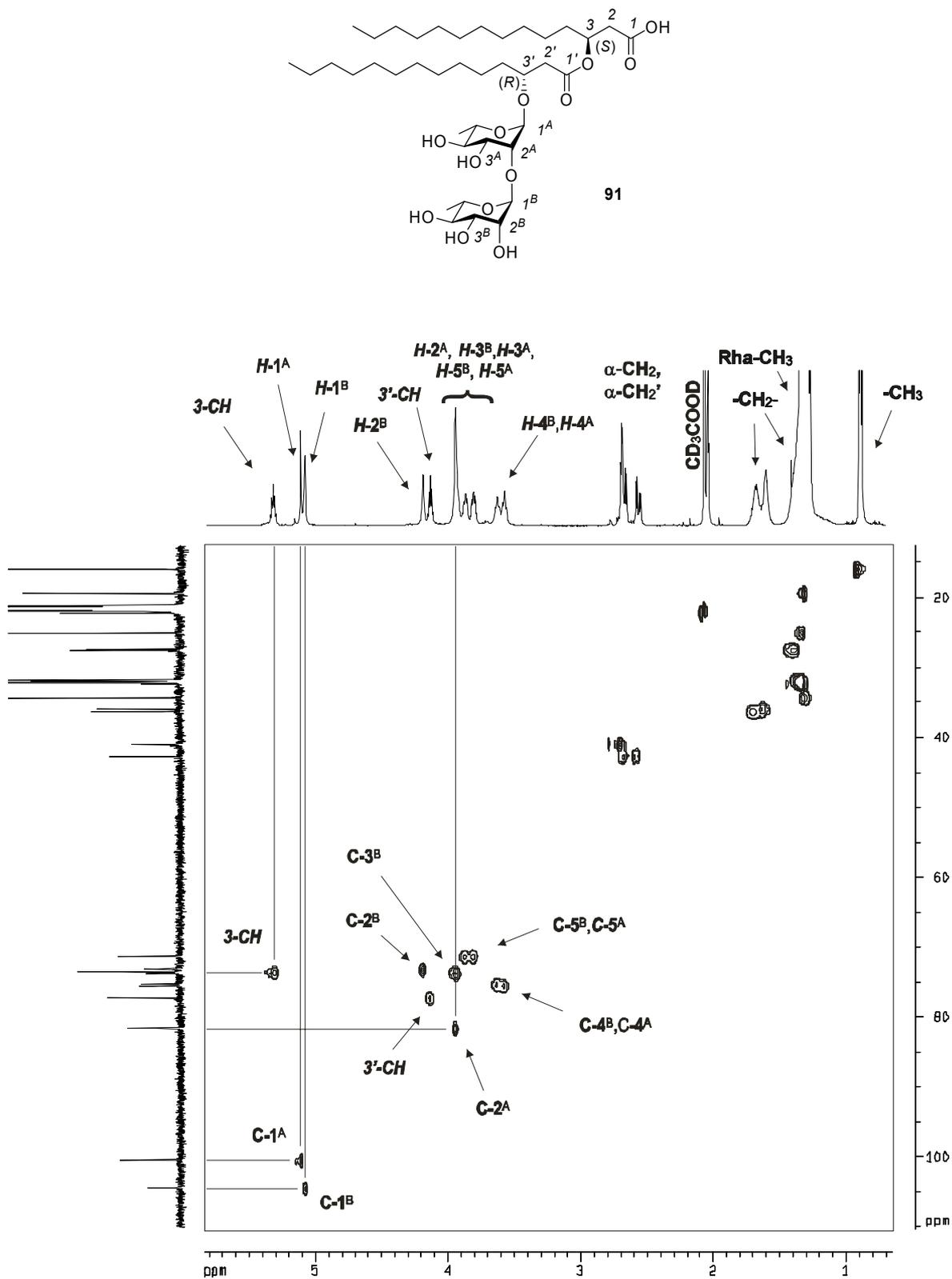


Abb. 4-86: HSQC-NMR Spektrum (600 MHz/150 MHz, CD₃COOD, 40 °C) des Rhamnolipides RL-2,2_(R)14_(S)14'-COOH 91. Die ¹J-C,H-Kopplungen aller Kerne sind vollständig und eindeutig zuzuordnen.

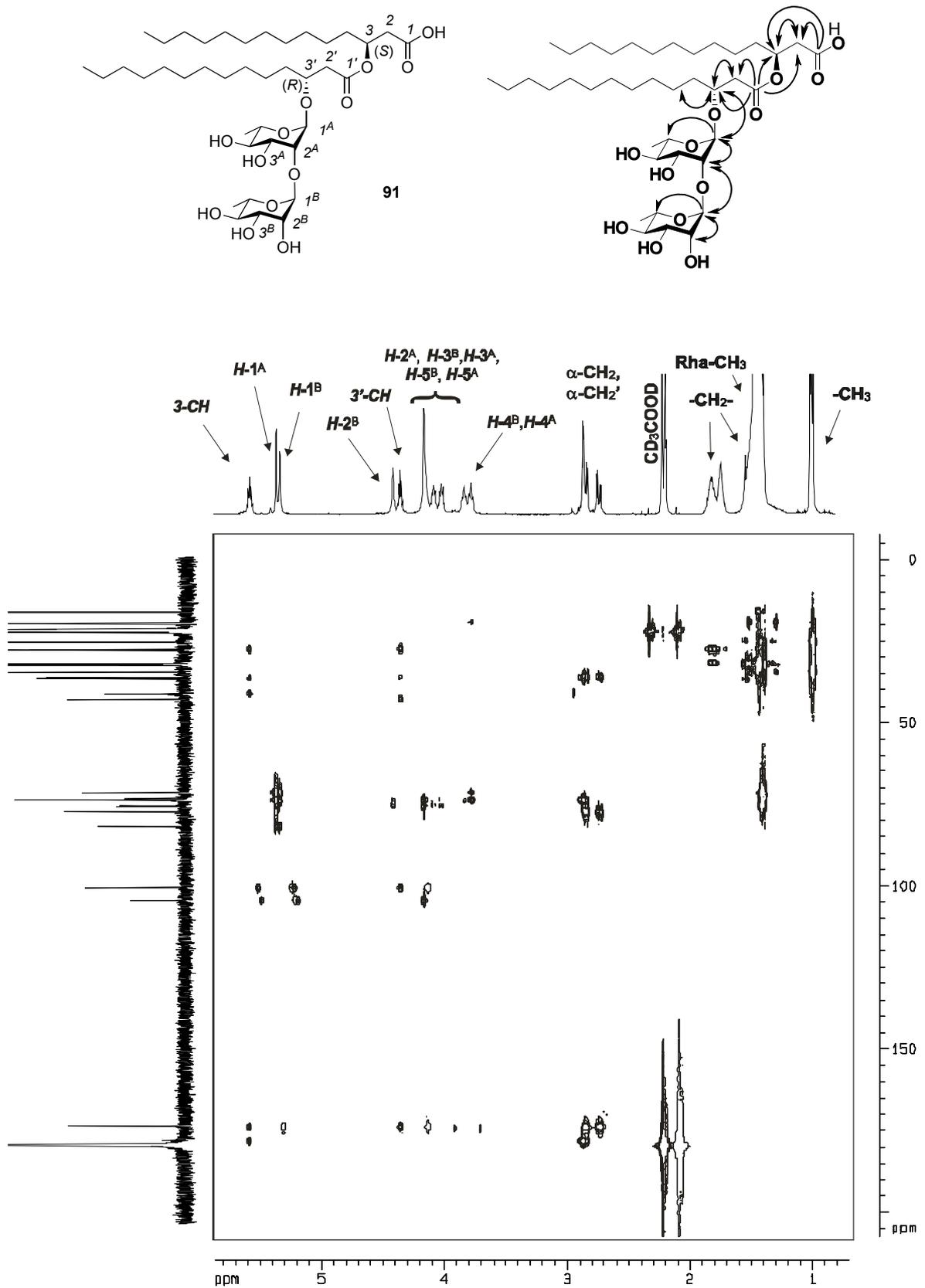


Abb. 4-87: HMBC-NMR Spektrum (600 MHz/150 MHz, CD_3COOD , 40 °C) des Rhamnolipides RL-2,2_{(R)14,(S)14}-COOH **91**. Eine Auswahl der HMBC-Kontakte ist in obiger Strukturformel dargestellt.

4.8 Immunologische und biophysikalische Charakterisierung synthetischer Rhamnolipide

Alle in Kap. 4.8 gezeigten immunologischen und biophysikalischen Experimente wurden mit Stammlösungen (20 mM) der Rhamnolipide in HEPES-Puffer (pH 7.2) durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurden die Rhamnolipide im HEPES-Puffer mittels einer Ultraschallsonde homogen dispergiert. Eine so dargestellte Probe der Rhamnolipidsäure RL-2,2₁₄-COOH **79** (20 mM) zeigte einen pH-Wert von 7.0, während das als Ammoniumsalz vorliegende natürliche Isolat RL-2,2₁₄-COO⁻NH₄⁺ (20 mM) einen pH-Wert von 6.8 aufwies. Es muß darauf hingewiesen werden, daß sämtliche biologische Aktivität nur dann vorhanden war, wenn die jeweiligen Verdünnungsreihen mit HEPES-Puffer angesetzt wurden. Verdünnt man mit RPMI-1640 Zellkulturmedium, zeigen sowohl die synthetischen Rhamnolipide als auch das natürliche Isolat keinerlei Aktivität mehr.^[23]

4.8.1 Stimulation mononukleärer Zellen: TNF- α -Assay

Als wichtige und typische biologische *in vitro* und *in vivo* Reaktion von Monozyten und Makrophagen infolge einer Endotoxin-Stimulation gilt die Produktion proinflammatorischer Cytokine wie z.B. IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α .^[139]

Mit den endotoxisch aktiven Exotoxinen, den Rhamnolipiden, wurde die Produktion von TNF- α durch Zellen des Immunsystems (humane mononukleäre Zellen, MNC) untersucht. RL-2,2₁₄-COO⁻NH₄⁺ zeigte in noch unveröffentlichten früheren Untersuchungen eine TNF- α -Produktion, die bis in den RL-Konzentrationsbereich von 10 ng/ml signifikant war, während sich Re-LPS als potenter und bis zu einer Konzentration von 1 ng/ml signifikant aktiv zeigte. Mit PMB konnte die Cytokin-Induktion von LPS und RL-2,2₁₄-COO⁻NH₄⁺ gleichermaßen inhibiert werden.^[23]

Zur Ermittlung immunologischer Struktur-Wirkungsbeziehungen der synthetischen Rhamnolipide wurden MNC des peripheren Blutes gesunder Spender (100 μ l/well, MNC-Zellkonzentration: 1×10^6 N/ml) mit verschiedenen Konzentrationen (100 μ g/ml bis 0.01 μ g/ml) der synthetischen Rhamnolipide versetzt. Nach Inkubation der Kultur für 4 h bei 37 °C unter 5% CO₂ wurden die cytokinhaltigen Überstände dann im Sandwich-ELISA mittels einer quantifizierbaren Farbreaktion auf ihren Gehalt an TNF- α untersucht. Die Details der Assayführung sind einer früheren Publikation entnehmbar.^[271]

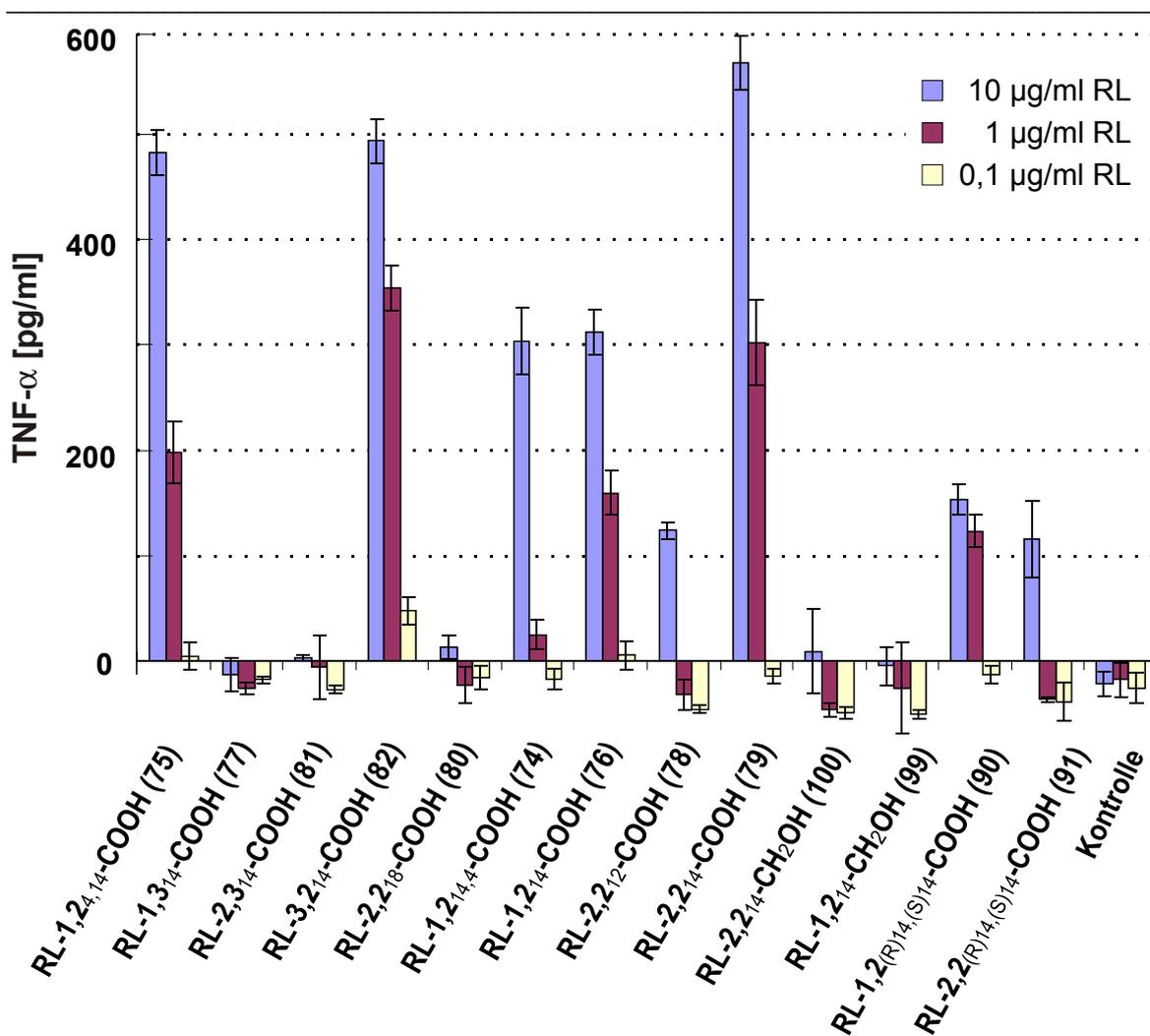


Abb. 4-88: TNF- α -Produktion humaner mononukleärer Zellen, induziert durch Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen (10, 1, 0.1 $\mu\text{g/ml}$) der synthetisierten Rhamnolipide 74-82, 90, 91, 99 und 100.

Anhand des TNF- α -Assays (Abb. 4-88) konnte eine Reihe von Rhamnolipiden identifiziert werden, die bis in den RL-Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{g/ml}$ signifikant aktiv sind. Das synthetische Analogon des natürlich vorkommenden Rhamnolipides RL-2,2₁₄-COOH **79** zeigte sich dabei am aktivsten. Darüber hinaus konnten mit RL-1,2,4,14-COOH **75** und RL-3,2,14-COOH **82** weitere potente, nicht natürliche Rhamnolipide gefunden werden. Zu den Rhamnolipiden mittlerer Aktivität ist das RL-1,2,14-COOH **76** und das RL-1,2,14,4-COOH **74** zu zählen.

Für die Aktivität von Rhamnolipiden ist die polare Säure-Kopfgruppe essentiell. Variierte man die aktiven Verbindungen **79** und **76** zu den korrespondierenden Alkoholen RL-1,2,14-CH₂OH **99** und RL-2,2,14-CH₂OH **100**, ging die Aktivität gänzlich verloren. Ebenso führte die formale Einführung einer dritten Lipidkette an die Verbindungen **79** und

76 zu den Rhamnolipiden RL-1,3₁₄-COOH **77** und RL-2,3₁₄-COOH **81** zur vollständigen Desaktivierung. Erhöhte man, wie mit Verbindung RL-3,2₁₄-COOH **82** gezeigt ist, die Anzahl der Rhamnosens auf drei, war kein Verlust an Aktivität zu beobachten; im Falle der RL-Konzentration von 1 µg/ml war sogar eine Steigerung der Aktivität zur aktivsten Verbindung der Meßreihe beobachtbar.

Sehr sensitiv reagierte die TNF- α -Produktion auf Variationen innerhalb der Rhamnolipid-Dilipideinheit. Wurden mit der Verbindung RL-2,2₁₂-COOH **78** die Kettenlängen der beiden Lipidketten von RL-2,2₁₄-COOH **79** von C₁₄ auf C₁₂ reduziert, führte dies zu einem dramatischen Aktivitätsverlust. Eine Verlängerung auf C₁₈ in Form von Verbindung RL-2,2₁₈-COOH **80** resultierte in völliger Inaktivität. Wurde mit Verbindung RL-1,2,4,1₄-COOH **75** die „innere“ Lipidkette von RL-1,2₁₄-COOH **76** von C₁₄ auf C₄ verkürzt, war eine deutliche Zunahme der zugehörigen TNF- α -Produktion zu beobachten. Die analoge Variation der terminalen Lipidkette von **76** in Form der Verbindung RL-1,2_{14,4}-COOH **74** führte zu einer deutlichen Reduzierung der Aktivität.

Eine Variation der 3-(*R*)-konfigurierten Stereozentren der terminalen Lipidketten von **79** und **76** zu den analogen 3-(*S*)-konfigurierten Verbindungen **90** und **91** resultierte jeweils in einem umfangreichen aber nicht vollständigen Verlust der Aktivität.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die Cytokin-Stimulation durch die untersuchten Rhamnolipide nahezu unabhängig von der Rhamnosenzahl zu sein scheint. Die Abänderung der polaren Kopfgruppe oder die Einführung einer zusätzlichen Lipidkette führten zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Eine gewisse Toleranz bestand innerhalb des Dilipidmusters: Eine der Kohlenwasserstoffketten konnte ohne dramatische Aktivitätseinbußen verkürzt werden, die gleichzeitige Variation beider Lipidketten führte zu deutlich stärkeren Aktivitätseinbußen als die Variation nur einer Kette. Die Inversion der terminalen 3-(*R*)-Konfiguration hatte einen aktivitätsvermindernden Effekt auf die RL-Cytokinstimulation mononukleärer Zellen, allerdings geringer als er durch die Längenvariation des Dilipidmusters zu beobachten war.

4.8.2 Stimulation mononukleärer Zellen: O₂-Chemilumineszenz-Assay

Eine Aktivierung von Monozyten durch Stimulation mit Endotoxin oder endotoxisch aktiven Exotoxinen wie den Rhamnolipiden führt nicht unmittelbar zur TNF- α -Produktion, sondern läuft über eine Reihe von Mediatoren ab. Die Produktion von Cytokinen gehört zu den durch Oxidantien getriggerten Reaktionen, so daß eine beispielsweise LPS-induzierte Sauerstoffradikalbildung in humanen Monozyten beobachtet werden kann, die die Transkriptionsvorgänge der Cytokine im Zellkern reguliert.^[272;273] Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetabolite aus aktivierten Monozyten kann mittels Luminol-verstärkter Chemilumineszenzmessung (Abb. 4-89) beobachtet werden.^[274-276]

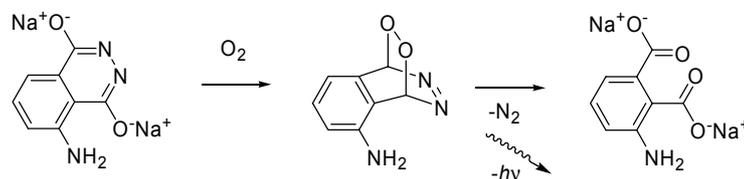


Abb. 4-89: Chemilumineszenz während der Luminoloxidation zur Detektion reaktiver Sauerstoffmetabolite.

Zur Untersuchung der immunologisch induzierten Freisetzung von oxidativ wirksamen Mediatoren wurde eine Auswahl der synthetischen Rhamnolipide (**76**, **79**, **82**, **91**, **99**) sowie LPS, eine unstimulierte Probe und das natürliche Rhamnolipidisolat in einer Konzentration von 3 μ g/ml 45 min unter ansonsten gleichen Parametern wie in Kap. 4.8.1 beschrieben gemessen. Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetabolite wurde anhand der Luminol-Chemilumineszenz parallel und zeitaufgelöst detektiert (Abb. 4-90).

Da die Stimulation und Chemilumineszenz-Messung nur 45 min lang durchgeführt wurde, war ein direkter Vergleich mit der vierstündigen Stimulation und dem anschließend Sandwich-ELISA (16 h) des TNF- α -Assays (Abb. 4-88) nicht möglich. Die zeitaufgelöste Detektion der Immunantwort während der ersten 45 min bestätigte jedoch die Richtigkeit der Ergebnisse des TNF- α -Assays. In guter Übereinstimmung erwiesen sich erneut die Rhamnolipide RL-1,2,14-COOH **76**, RL-2,2,14-COOH **79** und RL-3,2,14-COOH **82** als die aktivsten Vertreter der synthetischen Verbindungen. Das Isolat von RL-2,2,14-COOH zeigte sich identisch mit der synthetisierten Probe. Weiterhin erwiesen sich die RL-Alkoholverbindung RL-2,2,14-CH₂OH **100** und das (3'R,3S)-Rhamnolipid **91** in sehr guter Übereinstimmung mit dem TNF- α -Assay als nahezu inaktiv. Im Vergleich zu LPS wiesen

die Rhamnolipide eine deutlich geringere Aktivität auf (Abb. 4-90). Da in der gezeigten Messung nur die ersten 45 min dargestellt sind, während im TNF- α -Assay die Summe der Cytokinproduktion über den Zeitraum von 4 h wiedergegeben wird, ist die gegenüber der TNF- α -Messung andere Aktivitätsreihenfolge innerhalb der drei aktivsten Rhamnolipide evt. auf unterschiedliche kinetische Effekte von RL-1,2₁₄-COOH **76**, RL-2,2₁₄-COOH **79** und RL-3,2₁₄-COOH **82** untereinander zurückzuführen. Der in Abb. 4-90 dargestellte zeitliche Verlauf der Produktion von oxidativen Mediatoren deutet darauf hin, daß **76** schneller als die Verbindungen **79** und **82** eine Immunantwort auszulösen scheint.

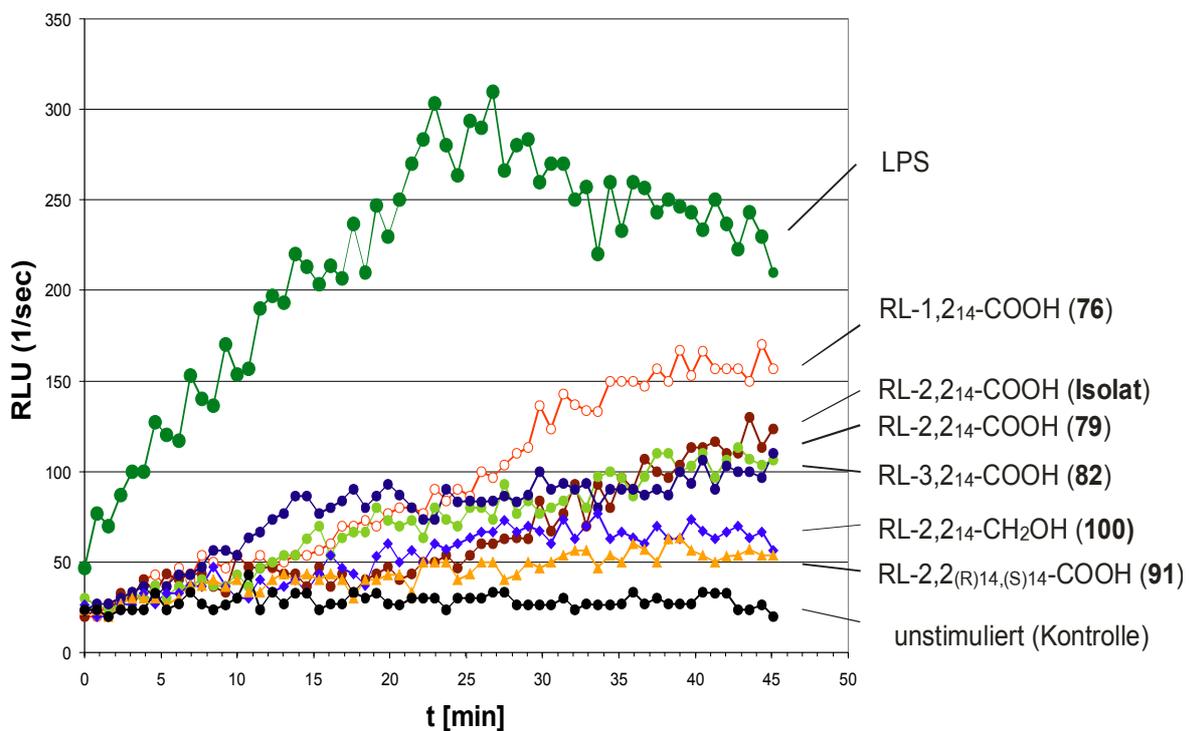


Abb. 4-90: Chemilumineszenz-Assay auf oxidative Mediatoren an humanen mononukleären Zellen. Stimulation erfolgte mit 3 $\mu\text{g/ml}$ der synthetisierten Rhamnolipide **76**, **79**, **82**, **91**, **100** bzw. des Isolates und LPS.

4.8.3 Gel-Flüssigkristallines Phasenverhalten der Rhamnolipide

Lipidmembranen sind flüssig-kristalline Lipiddoppelschichten, in denen die Lipide und die in ihnen eingelagerten Proteine eine hohe laterale Beweglichkeit erfahren, weshalb Membranen als zweidimensionale Flüssigkeiten betrachtet und mit dem Fluid-Mosaik-Modell beschrieben werden können.^[277;278]

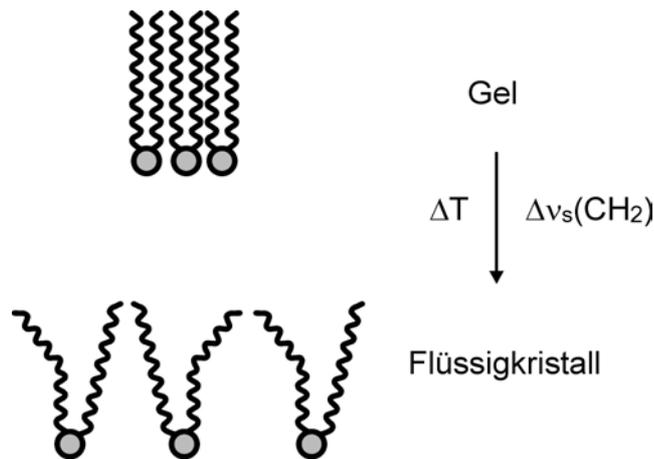


Abb. 4-91: Schematisierter temperaturabhängiger Phasenübergang von Lipiden aus der Gelphase in die flüssigkristalline Phase: Anordnung der Lipidketten innerhalb einer Monolayer der Doppelschicht.

Zur biophysikalischen Charakterisierung der Rhamnolipide **74-82**, **90**, **91**, **99** und **100** wurde ermittelt, bei welcher Temperatur T_p ein Phasenübergang von der Gelphase in die flüssigkristalline Phase eintritt (Abb. 4-91). Die Bestimmung der Membranfluidität und des Schmelzpunktes erfolgte über die Auswertung der beim Schmelzen der Lipidketten beobachtbaren typischen Verschiebung der Bandenlage der symmetrischen Streckschwingung der Methylengruppen $v_s(\text{CH}_2)$ im Bereich von $2849\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$ nach Standardverfahren. Die Bestimmung der Acylkettenschmelzpunkte wurde anhand von FT-ATR-IR-Temperaturscans mit einer Heizrate von 0.6 °C/min durchgeführt. Alle Rhamnolipide wurden dazu aus einer 1 mM Lösung als Film (ca. 95% Wassergehalt) in einer CaF_2 -Küvette vermessen. In Abb. 4-92 sind die Positionen der Peakmaxima der symmetrischen Streckschwingung $v_s(\text{CH}_2)$ in Abhängigkeit der jeweiligen Temperatur gezeigt. Der Wendepunkt der Kurven markiert dabei die jeweilige Phasenübergangstemperatur T_p .

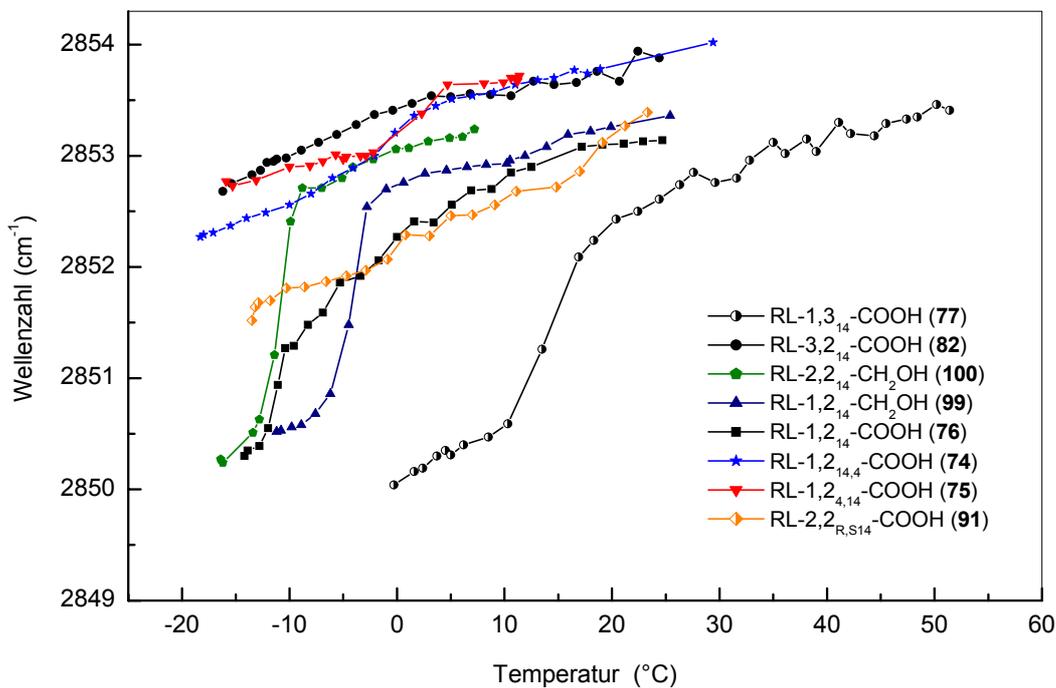
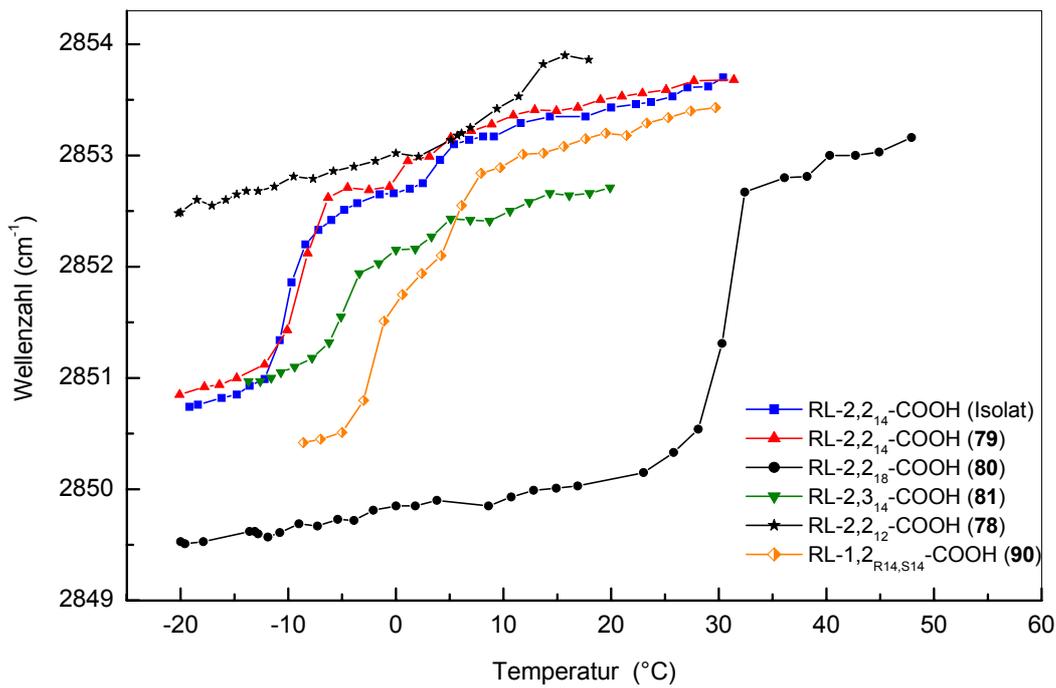


Abb. 4-92: Phasenübergangsverhalten der Rhamnolipid-Acylketten: FT-ATR-IR-Temperaturscans der IR-Peakmaxima der symmetrischen Streckschwingung $\nu_s(\text{CH}_2)$ zur Bestimmung von T_p . In der Gelphase liegt das Maximum von $\nu_s(\text{CH}_2)$ bei ca. 2850 cm^{-1} , in der flüssigkristallinen Phase bei ca. 2853 cm^{-1} .

Einige der Verbindungen zeigten einen Phasenübergang, der unterhalb von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lag und deshalb apparativ nicht mehr erfasst werden konnte. Das Rhamnolipid RL-2,2₁₄-COOH **79** zeigte eine mit dem zugehörigen Rhamnolipid-Isolat identische Kurve mit einer Phasenübergangstemperatur von ca. $T_p = -9\text{ }^{\circ}\text{C}$. Alle untersuchten Verbindungen lagen unter physiologischen Bedingung ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) eindeutig in der flüssigkristallinen Phase vor und wiesen damit eine sehr hohe Motilität der Lipidketten auf.

4.8.4 FRET zur Bewertung der Inkorporation von Rhamnolipiden in Liposomenmembranen

Zur Prüfung der Frage, ob die untersuchten Rhamnolipide in Zielzellmembranen wie eine der Makrophagenmembran nachgebildeten Phospholipidmembran inkorporieren können und damit evt. ein detergensartiger Mechanismus der Cytokinfreisetzung vorliegt, wurden Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Messungen (FRET) durchgeführt. Dafür wurden Phospholipid-Liposomen (entsprechend der Zusammensetzung der Makrophagenmembran aufgebaut aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin) mit zwei geeigneten Fluoreszenz-Farbstoffen (Donor NBD-PE (*N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4yl)-phosphatidylethanolamin) und Akzeptor Rh-PE (*N*-(Lisamin-rhodamin B-sulfonyl)-phosphatidylethanolamin)) doppelt markiert.

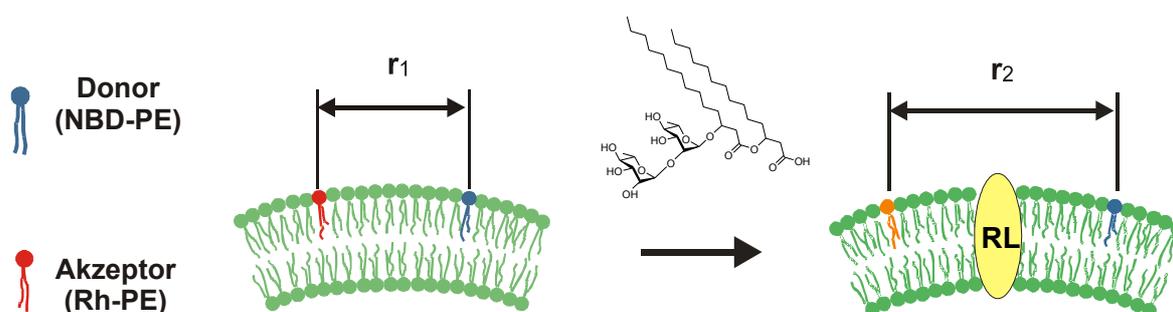


Abb. 4-93: Schematische Darstellung der Verdünnung einer Liposomenmembran durch Einbau von Fremdmolekülen (hier: RL) und resultierende Änderung des mittleren Abstandes der fluoreszenzmarkierten Farbstoffe NBD- und Rh-Phosphatidylethanolamin, die als FRET-Sonden fungieren.

Die Exzitationswellenlänge des zweiten Farbstoffes entspricht der Emissionswellenlänge des ersten, so daß es bei genügender Nähe der beiden Farbstoffe zu einem Förster-

Energietransfer kommt.^[279;280] Durch Inkorporation von Fremdmolekülen in die markierte Liposomenmembran findet eine Verdünnung innerhalb der Lipidmembran statt (Abb. 4-93). Hierdurch ergibt sich ein verändertes FRET-Signal in Form der Zunahme der Emissionsintensität des Donor-Farbstoffes I_D und der Abnahme der Akzeptorintensität I_A . Der Quotient I_D/I_A ist dann ein empfindliches Maß für die Inkorporation der Substanzen in die Membran. Das FRET-Experiment wurde mit allen synthetisierten Rhamnolipiden jeweils mindestens 600 s lange durchgeführt, die detaillierten Parameter entsprechen denen einer früheren Veröffentlichung.^[281]

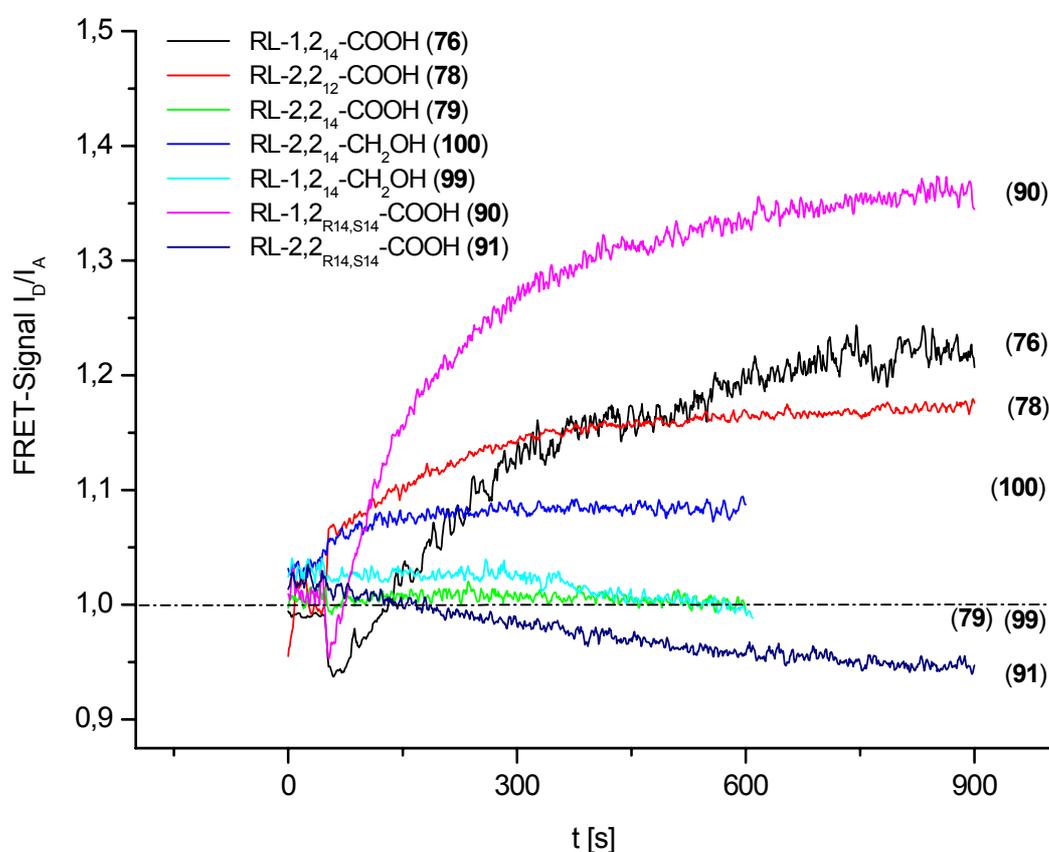


Abb. 4-94: Auswahl einiger FRET-Messungen (rel. Quotient I_D/I_A) von fluoreszenzgelabelten Liposomen, die aufgrund von Rhamnolipid-Inkorporation einen veränderten Förster-Energietransfer zeigen (RL-Zugabe bei $t = 50$ s).

Nicht alle synthetischen Rhamnolipide 74-82, 90, 91, 99 und 100 erwiesen sich in den durchgeführten FRET-Experimenten als Verbindungen, die in die Membran inkorporiert

wurden. Die in Abb. 4-94 nicht aufgeführten Verbindungen waren inaktiv und zeigten auch nach 900 s ein unverändertes I_D/I_A -Signal von ± 1 . Die Verbindung, die am stärksten in die nachgebildete Phospholipidmembran eingebaut wurde, war RL-1,2₁₄-COOH **76**. RL-2,2_{(R)14,(S)14}-COOH **91** und RL-2,2₁₂-COOH **78** inkalierten ebenfalls noch, alle anderen Verbindungen müssen als nicht-inkorporationsfähig angesehen werden. Hervorzuheben ist die Beobachtung, daß das RL-2,2₁₄-COOH-analoge Naturstoffisolat, das in Form des Ammoniumsalzes RL-2,2₁₄-COO⁻NH₄⁺ vorlag, unter identischen Bedingungen (im verwendeten HEPES-Puffer, pH 7.2) nach 300 s ein FRET-Signal von $I_D/I_A = 1.5$ zeigte (Kurve nicht gezeigt), und damit wesentlich stärker inkalierte, als das als freie Säure verwendete nicht inkalierende synthetische Analogon, das ein FRET-Signal von $I_D/I_A = 1.0$ zeigte. Damit ähneln die untersuchten Rhamnolipide auch bezüglich ihres Inkorporationsverhaltens dem LPS, das lediglich LBP-vermittelt inkorporiert werden kann.^[282]

4.8.5 Schlußbetrachtung der Ergebnisse der Rhamnolipid-Testung

Innerhalb der Reihe der synthetischen Rhamnolipide konnte bei einer Betrachtung aller angestellten immunologischen und biophysikalischen Untersuchungen keine Korrelation zwischen biologischen und biophysikalischen Ergebnissen gefunden werden. Alle immunologisch aktiven synthetischen Rhamnolipide wiesen eine nur gering bis gar nicht ausgeprägte Inkorporation in die Zielzellmembran auf, was eine unspezifische Interaktion mit Membranen und damit einen detergensartigen Wirkmechanismus der getesteten Verbindungen eher unwahrscheinlich macht. Darüberhinaus scheinen die für eine erfolgreiche Monocytenaktivierung gefundenen strukturellen Anforderungen an das Rhamnolipidsubstrat zu restriktiv zu sein, um mit dem Bild einer unspezifischen Aktivierung übereinzustimmen. Die vor allem im Lipidrest eingeschränkte Toleranz gegenüber Modifikationen deutet eher auf eine selektiv ablaufende Erkennung des Lipidmusters hin.

Zur eindeutigen Klärung der Frage nach dem Wirkprinzip von Rhamnolipiden müssen weitere immunologische und biophysikalische Untersuchungen folgen, die über die hier vorgestellten ersten Schritte hinausgehen. Hierzu zählen u.a. Inhibitionsexperimente sowie die Überprüfung auf eine Abhängigkeit der Stimulation von bestimmten TLR-Typen. Weiterhin sollte eine detaillierte physikochemische Charakterisierung durchgeführt werden, v.a. die Bestimmung der Aggregatstruktur der Rhamnolipide, die im Rahmen des konformativen Konzeptes als hinreichende Bedingung für deren endotoxische Aktivität gedeutet werden kann.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Entwicklung neuer Konzepte für die festphasenunterstützte Kohlenhydratchemie zum parallelisierbaren Aufbau von Oligosacchariden und Glykokonjugaten.

Ausgehend von der Aufgabenstellung, einen effizienten Zugang in Form einer Festphasenmethode zu entwerfen, die eine parallele Synthese struktureller Varianten des hoch amphiphilen und komplexen Rhamnolipides RL-2,2₁₄-COOH erlaubt, wurde im ersten Teil der Arbeit ein maßgeschneiderter Rhamnosedonor entworfen. Mit der Synthese des POAc-BDA-Rhamnose-Trichloracetimidates gelang die Darstellung großer Mengen eines Donors, der bezüglich der Schutzgruppenorthogonalität, der Reaktivität u.v.a. der Stereoselektivität an die Syntheseanforderungen angepaßt wurde.

Im weiteren Vorgehen wurde eine Vielzahl von Lipidbausteinen dargestellt, mit denen die strukturelle Vielfalt der Dilipideinheit der anvisierten Rhamnolipide bezüglich der Lipidlänge, der Lipidkopfgruppe und der Stereozentren des Lipides variiert werden konnte. Weitere Lipidstrukturen wurden zur Auffindung alternativer Synthesewege dargestellt. Sämtliche Lipidbausteine wurden in Autoklavenreaktionen mittels der *Noyori*-Reduktion unter BINAP-Ru-Katalyse enantioselektiv gewonnen. Ein wesentlicher Bestandteil dieses Teiles der Arbeit war die Auffindung geeigneter Methoden der Enantiomerenanalytik, um die diastereomerenreine Darstellung der Rhamnolipide zu gewährleisten. Durch diastereomere MTPA-Derivatisierung und ¹H-NMR-Analytik der Derivate konnte dies erreicht werden, während chromatographische Methoden nicht anwendbar waren.

Der folgende zentrale Anspruch dieser Arbeit war es, eine Methode zu entwerfen, die die Verknüpfung der dargestellten Kohlenhydrat- und Lipidbausteine auf effektive Art und Weise mittels einer Festphasensynthese erlaubte.

Hierzu wurde zunächst das *TAL*-System^[229] (Trimellitsäureanhydrid-Linker) als neues Linkersystem der Festphasenchemie in polymeren Gelen entwickelt. Dieses besteht in der Kombination zweier glykosylierungsbeständiger Schutzgruppen, der Phthalimid- und Benzylgruppe, die sich beide in der Lösungssynthese von Zuckern bewährt haben. Es wurden ausgehend von polymerem Phthalanhydrid, dem eigentlichen *TAL*-Harz, jeweils orthogonale Protokolle zur Immobilisierung und Abspaltung von Aminosubstraten entwickelt. Eine Immobilisierung konnte entweder thermisch über Mikrowellensynthese oder mittels

einer Zweischnittreaktion von Acylierung und MSNT-Cyclokondensaton erreicht werden. Die Produktfreisetzung wurde entweder hydrazinolytisch erreicht oder durch eine Zweischnittreaktion von LiBH_4 -Reduktion und anschließender Lactonisierung, was dem TAL-System die Funktionalität eines Safety-Catch Linkers verlieh. Im Falle von nicht-*Lewis*-sauren Reaktionsbedingungen während der Synthesen am TAL-Harz konnten die jeweiligen Produkte in guten Ausbeuten und Reinheiten erhalten werden. Wurden Glykosylierungsschritte bzw. allgemein *Lewis*-saure Reaktionen durchgeführt, waren nur reduzierte Ausbeuten von ca. 50 % der Theorie erhältlich. Der Grund hierfür war die nicht ausreichende Stabilität des zentralen Bausteines, des Dibenzyl-Phthalimid-Konstruktes. Zusätzlich negativ wirkte sich das labile PS-Grundgerüst aus, das während der *Lewis*-sauren Bedingungen unter Desalkylierung depolymerisierte.

Aufgrund dieses für eine iterative Glykosylierung negativen Befundes wurde ein weiteres Festphasenkonzept entwickelt, das Konzept der Hydrophob-unterstützten Phasenwechsel-Synthese (*HASP* – Hydrophobically assisted switching phase synthesis).^[243] Dieses neue Konzept einer Phasenwechselmethode hat den Vorteil, als Hybridstrategie zu jedem beliebigen Zeitpunkt einer Synthese das Arbeiten sowohl in Lösung als auch an fester Phase zu erlauben, da eine Substratanbindung reversibel über einen hydrophoben Marker geschieht. Als hydrophober Träger kam kommerziell erhältliches RP-18-Silica zum Einsatz. Die *HASP*-Methode wurde zunächst im Hinblick auf quantitative Wiederfindungsraten der immobilisierten Substrate optimiert. Wie in Vorversuchen bereits durch RP-18-DCs zu erkennen war, war dieses Konzept mit Dilipiden als Phasenmarkierung umsetzbar, die wesentlich hydrophober als vergleichbare Monolipide sind.

Nach der Ermittlung geeigneter Protokolle für die reversible und quantitative Lipid-Immobilisierung auf RP-18-Silica wurde basierend auf den gemachten Beobachtungen ein Bis-*n*-octadecyl-benzylalkohol-Label als Glykosylierungsanker entworfen.

Um die Effizienz der *HASP*-Strategie zu demonstrieren wurde am dargestellten *HASP*-Anker eine mehrstufige Oligosaccharid-Synthese durchgeführt. Hierbei wurden jeweils die Glykosylierungsschritte in Lösung und die Schutzgruppenmodifikationen am Polymer als Festphasenschritt durchgeführt. So gelang der zwölfstufige *HASP*-Aufbau eines Pentasaccharides mit durchschnittlich 93.6 % pro Schritt in exzellenten Ausbeuten, was die Leistungsfähigkeit der gefundenen Methode deutlich unterstreicht.^[243]

Mit der HASP-Strategie als bewährter Methode wurde die Synthese der anvisierten Rhamnolipidbibliothek umgesetzt: Die Rhamnolipid-Zielmoleküle verfügen nun selbst über ein Dilipidmuster, dessen Hydrophobizität als intrinsische Phasenmarkierung zur Anreicherung in einer hydrophoben Phase verwendet wurde. Ausgehend von den anfangs dargestellten Kohlenhydrat- und Lipidbausteinen wurde erst eine Di-/Trilipid- und eine Rhamnolipidkollektion mit ein- bis dreifach glykosylierten Verbindungen in repetitiver HASP-Synthese mit nahezu quantitativen Ausbeuten aufgebaut. Auch auf die Schwierigkeit der analytischen Erfassung im Rahmen von Routinemethoden wurde in diesem Teil eingegangen. Die so dargestellte Rhamnolipidmethylesterkollektion wurde im letzten Schritt zu den korrespondierenden freien Säuren umgesetzt, was mit chemischen Methoden nicht gelang, sondern durch Verwendung von Lipasen erreicht werden konnte. Als Erkennungsmuster für die verwendete *Candida Antarctica*-Lipase war die 3-(*R*)-Konfiguration der terminalen Lipidkette ausschlaggebend. Aufgrund der sehr breiten Substratspezifität konnten alle 3-(*R*)-konfigurierten Methylester so hydrolysiert werden. 3-(*S*)-konfigurierte Substrate waren erwartungsgemäß nicht hydrolysierbar, so daß diese Verbindungen über den Umweg der hydrogenolytisch spaltbaren Benzylesterlipide dargestellt werden mußten.

Die so dargestellten dreizehn Vertreter der Rhamnolipidkollektion wurden per NMR- und HR-MS eindeutig charakterisiert und im weiteren Verlauf immunologisch und biophysikalisch untersucht. Anhand eines TNF- α -Assays konnten Rhamnolipide identifiziert werden, die bis in den Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{g/ml}$ signifikant aktiv waren. Ein Chemilumineszenz-Assay auf oxidative Mediatoren bestätigte diese Ergebnisse. Ein Struktur-Wirkungs-Zusammenhang war v.a. bezüglich der Änderung der polaren Kopfgruppe oder der Einführung einer zusätzlichen Lipidkette zu erkennen, was jeweils zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führte. Die Cytokin-Stimulation zeigte sich nahezu unabhängig von der Rhamnosenzahl, eine gewisse Toleranz bestand innerhalb des Dilipidmusters. Abschließend wurden die Rhamnolipide hinsichtlich ihres Gel-flüssigkristallinen Phasenverhaltens untersucht und per FRET ihre Inkorporierung in fluoreszenzmarkierte Phosphatidylethanolamin-Liposomenmembranen untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung war, daß alle immunologisch aktiven synthetischen Rhamnolipide nur gering bis gar nicht inkorporieren, was eine unspezifische Interaktion unwahrscheinlich machte. Da die gefundenen strukturellen Anforderungen an das Rhamnolipidsubstrat sehr restriktiv waren, deutete dies eher auf eine selektiv ablaufende Erkennung des Lipidmusters hin.

6 Experimenteller Teil

6.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Lancaster (Mühlheim am Main), Acros (Ulm) und Aldrich (Taufkirchen) in p.a. Qualität bezogen und wenn nicht anderst erwähnt ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Entionisiertes Wasser wurde über eine Filtrationsanlage (Millipore, Eschborn) erhalten. Für HPLC-Analytik wurde Acetonitril und Methanol der Reinheit LiChrosolv Gradient Grade der Firma Merck (Darmstadt) sowie Trifluoressigsäure der Reinheit Uvasol (Merck, Darmstadt) verwendet. Für NMR-Spektroskopie wurden deuterierte Lösungsmittel von Merck (Darmstadt) und Deutero GmbH (Herresbach) verwendet.

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden von Aldrich (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm), Lancaster (Mühlheim am Main), Acros (Ulm), Maybridge (Trevillet, UK), NovaBiochem (Schwalbach), Orpegen (Heidelberg) und Merck (Darmstadt) bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Die verwendeten funktionalisierten Polystyrol-Harze stammten von NovaBiochem (Schwalbach) und Rapp Polymere (Tübingen). Hydrophob unterstützte Synthesen wurden mit Reversed Phase Grom-Sil ODS-4 HE Kieselgel (50 μ , 120 Å) (Grom, Tübingen) durchgeführt. Säulenchromatographie wurde als Flash-Chromatographie (Überdruck von 0.1 bis 0.3 bar) in zylindrischen Glassäulen an Kieselgel 60 (Merck, 0.04-0.063 mm) durchgeführt.

6.2 Geräte und Analytische Methoden

6.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur DC-Analytik wurden Kieselgel-Fertigfolien 60 F₂₅₄ (Merck, 0.04-0.063 mm) und RP-18 F₂₅₄ (Merck) benutzt. Die Detektion erfolgte über UV Absorption (254 nm) sowie durch Anfärben mittels Eintauchen in ein Tauchbad und anschließende Wärmebehandlung mittels eines Heizföns. Als universelles Tauchbad zum Einsatz kamen das Molybdat-Cer-Reagenz (10 g Cer(IV)sulfat • 4 H₂O, 25 g Ammoniumheptamolybdat • 4 H₂O, 100 ml konz. Schwefelsäure 900 ml Wasser) und das Permanganat-Reagenz (9 g KMnO₄, 60 g

K₂CO₃, 15 ml 5 % NaOH, 900 ml Wasser). Kohlenhydrate wurden mittels des Anthron-Reagenzes^[238] detektiert (50 mg Anthron, 490 ml Ethanol, 10 ml konz. Schwefelsäure).

6.2.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Eindimensionale ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden an den Spektrometern Bruker AC 250, Bruker AVANCE 400 und Bruker AMX 600 (Bruker Analytik, Karlsruhe) aufgenommen. Alle ¹³C-Spektren sind ¹H-Breitband-entkoppelt. Die Spektren wurden sofern nicht anderst erwähnt bei 295K aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm relativ zum jeweiligen Lösungsmittelsignal als internem Standard angegeben.^[283] Die Zuordnung der Peaks wurde durch Doppelresonanz- und homo- und heteronukleare Korrelations-Experimente gesichert.

6.2.3 Polarimetrie

Drehwerte wurden bei 20 °C in einer 10 cm langen Küvette auf einem Perkin Elmer 341 Polarimeter gemessen. Soweit nicht anderst angegeben bezieht sich der angegebene spezifische Drehwert auf die Konzentration von $c = 1.0$ (1g/100 ml) in Chloroform bei 20 °C auf die Natrium-D-Linie (589 nm).

6.2.4 GC-EI-MS Analytik

Gaschromatographie-Elektronenstoßionisations-Massenspektrometrie wurde auf einer GC-EI-MS-Anlage, bestehend aus einem HP 6890 Series GC-System (HP Waldstetten) gekoppelt mit einem Mass Selective Detector HP 5973 (EI-Ionisation) mit Trägergas Helium durchgeführt. Gaschromatographie wurde an einem Gaschromatograph CP 9000 (Chrom-pack) mit Trägergas Wasserstoff und Flammenionisationsdetektion durchgeführt.

6.2.5 FT-ICR-Massenspektrometrie

Höchstauflösende ES-FTICR-MS-Messungen wurden an einem 4.7 Tesla Daltonic APEXTM II Spektrometer der Firma Bruker (Karlsruhe) durchgeführt

6.2.6 ES-Massenspektrometrie

ES-MS-Messungen wurden mit einem Bruker Esquire 3000plus LC-ES-MSⁿ-System (Bruker Daltonics, Karlsruhe) durchgeführt. Das Massenspektrometer wurde mit der Esquire-Control-Software gesteuert.

6.2.7 MALDI-Massenspektrometrie

MALDI-Massenspektren wurden mit einem Bruker Autoflex MALDI-TOF-System (Bruker, Karlsruhe) durchgeführt. Als Ionisationsmatrix wurde CHCA (α -Cyano-4-hydroxycinnosäure) verwendet.

6.2.8 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Analytische HPLC-Untersuchungen wurden mit einer System Gold-Anlage (Beckman Coulter, Krefeld) durchgeführt. Als Trennsäule diente eine Nucleosil C₁₈-Säule (5 μ m, 2×250 mm) der Firma Grom (Rottenburg). Die Elutionsmittel waren ACN / 0.1 % TFA (Laufmittel A) und H₂O / 0.1 % TFA (Laufmittel B) bei einer Flußrate von 0.3 ml/min. Alle Untersuchungen wurden mit einem Gradienten von 10 % A / 90 % B in 45 min auf 100 % A durchgeführt. Die UV-Detektion erfolgte bei $\lambda = 214$ nm und 280 nm und die Reinheit der Produkte wurde anhand der Peakflächen errechnet. Eine absolute Gehaltsangabe ist aufgrund der unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der Verbindungen nicht möglich.

6.2.9 Infrarotspektroskopie (FT-ATR-IR)

FT-ATR-IR-Spektren der Harze bzw. polymergebundener Verbindungen wurden mit einem Bruker Vector 22 aufgenommen. Das Gerät ist mit einer SplitPea[®] ATR-Einheit der Firma Harrick versehen. Die Polymere wurden durch direktes Aufpressen auf einen Si-Kristall vermessen. In einem Meßbereich von 4000-400 cm⁻¹ wurden die Spektren mit 16 Scans aufgenommen; Background- und ATR-Korrektur erfolgten automatisch. Kohlendioxid-Absorptionsbanden wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit aus den Spektren entfernt.

6.2.10 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV-Spektren zur quantitativen Fmoc-Bestimmung wurden am Lambda-5 UV/VIS-Spektrometer von Perkin-Elmer (Überlingen) in Quarzküvetten Suprasil 0.1 aufgenommen.

6.2.11 Mikrowellenunterstützte Synthesen

Mikrowellenunterstützte Synthesen wurden auf einem SmithSynthesizerTM der Firma Personal Chemistry, Uppsala, Schweden durchgeführt. Es handelt sich um ein Single-Mode Gerät, das mit einem automatischen Probengeber ausgestattet ist. Das Probenvolumen beträgt zwischen 0.5 und 5 ml in mit Septen verschlossenen druckstabilen Reaktionsgefäßen. Ein Magnetron mit einer Leistung von 15 – 300 W erzeugt Mikrowellenstrahlung bei einer Frequenz von 2.45 GHz. Der Temperaturbereich erstreckt sich von 60 – 250 °C bei einer Heizrate von 2 – 5 °C/min. Der zulässige Druck im Inneren der Reaktionsgefäße beträgt 20 bar. Während der Reaktion wird die Temperatur im Reaktionsgefäß durch kurze Mikrowellenpulse konstant gehalten. Schnelles Abkühlen nach der Reaktion wird mit Druckluft erreicht.

6.2.12 Chloraniltest

Zur Kontrolle der Umsetzung polymergebundener sekundärer Amine wurde der Chloranil-Test verwendet. Dazu werden einige Harzkörner in einem Eppendorf-Cup mit je einem Tropfen einer Lösung von Acetaldehyd in DMF (2% (v/v)) und Chloranil in DMF (2% (w/v)) versetzt. Bei Anwesenheit sekundärer Amine beobachtet man nach 2-10 min eine Blaufärbung des Harzes.^[284]

6.2.13 Kaisertest

Die Vollständigkeit von Acylierungsreaktionen auf primäre Amine wurde mittels Kaiser-Test (Nachweis primärer Amine mit Ninhydrin) auf vollständige Umsetzung der freien Aminofunktionen untersucht. Dazu werden wenige Harzkugeln in einem Eppendorf-Cup mit je einem Tropfen der drei Reagenzlösungen versetzt und die Suspension 5 min bei 110 °C erhitzt. Sind freie Aminogruppen vorhanden, so tritt Blaufärbung der Harzkugeln und/oder der Lösung auf.^[285]

Für den Kaiser-Test wurden folgende Reagenzlösungen verwendet:

Kaiser I: 50 µl 0.01 M wässrige KCN-Lösung, mit Pyridin auf 25 ml aufgefüllt

Kaiser II: 5 g Ninhydrin in 100 ml *n*-Butylalkohol

Kaiser III: 80 g Phenol in 20 ml *n*-Butylalkohol.

6.2.14 UV-spektroskopische Ermittlung von Harzbeladungen

Zur Bestimmung der Harzbelegung von Fmoc-Aminosäuren wurden ca. 10 mg trockenes Harz genau in einen 10 ml-Meßkolben eingewogen und 30 min mit ca. 2 ml 20 % Piperidin in DMF behandelt. Die Abspaltung wurde mit DMF auf genau 10 ml aufgefüllt. Im UV-Spektrum der Abspaltung wurde anhand der Extinktionswerte an den drei Absorptionsmaxima des N-(9-Fluorenylmethyl)-piperidinadduktes bei $\lambda_1 = 267 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 289 \text{ nm}$ und $\lambda_3 = 301 \text{ nm}$ der Belegungsgrad des Harzes bestimmt. Die wahre Beladung x wurde als Mittelwert der drei Maxima angenommen. Unter Berücksichtigung der Umrechnungsfaktoren und Küvettenabmessungen ergibt sich die Beladung x nach Lambert-Beer zu:

$$x \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{100000 \cdot E_\lambda}{\epsilon_\lambda \cdot (\text{Einwaage})}$$

x = Harzbelegung [mmol/g]

E_λ = Extinktion

ϵ_λ = Extinktionskoeffizient

(Einwaage) = Harzmenge [mg]

Dabei werden folgende Extinktionskoeffizienten verwendet:

$$\epsilon_{267} = 17500 \text{ cm}^2/\text{mol}, \quad \epsilon_{289} = 5800 \text{ cm}^2/\text{mol}, \quad \epsilon_{301} = 7800 \text{ cm}^2/\text{mol}.$$

Die Harzbelegung ergibt sich durch Mittelung über die drei bei den unterschiedlichen Wellenlängen berechneten Werte.

6.3 Synthesevorschriften

6.3.1 Synthesen von Kohlenhydratbausteinen

6.3.1.1 Ethyl-2,3,4-Tetra-O-acetyl-1-thio- α -L-rhamnopyranosid

Zu einer Lösung von 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl- α,β -L-rhamnopyranose **1** (70 g, 210.7 mmol) in 200 ml DCM abs. werden 1.1 eq Ethanthiol (17.14 ml, 231.7 mmol) gegeben. Die Lösung wird langsam mit 1.1 eq Bortrifluorid-Diethyletherat (29.16 ml, 231.7 mmol) versetzt, 5 h bei RT gerührt und anschließend unter Eiskühlung mit Triethylamin neutralisiert. Die Reaktionslösung wird am Vakuum eingeeengt und mit 200 ml 0.2 M HCl-Lösung und 200 ml Chloroform gewaschen. Die wässrige Phase wird dreimal mit 200 ml Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen nach Trocknen über Natriumsulfat im Vakuum eingeeengt. Das Ethyl-2,3,4-tri-O-acetyl-1-thio- α -L-rhamnopyranosid wird säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 3:1).

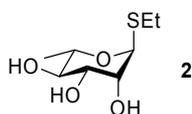
Ausbeute: 56.27 g (79.9 %), C₁₄H₂₂O₇S, M = 334.39 g/mol.

DC: R_f = 0.5 (PE/EE 1:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.20 (s, 1 H, *H-1*), 5.34 (d, 1 H, ³J_{2,3} = 3.3 Hz, *H-2*), 5.23 (dd, 1 H, ³J_{2,3} = 3.3 Hz, ³J_{3,4} = 9.9 Hz, *H-3*), 5.10 (t, 1 H, ³J_{4,5} = 9.9 Hz, *H-4*), 4.23 (m, 1 H, *H-5*), 1.24 (d, 3 H, ³J = 6.3 Hz, *H-6*), 2.64 (m, 2 H, Et-CH₂), 2.16, 2.06, 1.99 (s, 9 H, OAc-CH₃), 1.30 (t, 3 H, ³J = 7.3 Hz, Et-CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.0, 169.9, 169.8, 81.9, 77.3, 76.7, 71.5, 71.3, 69.4, 25.4, 20.9, 20.8, 20.6, 17.3, 14.8.

6.3.1.2 Ethyl-1-thio- α -L-rhamnopyranosid (**2**)



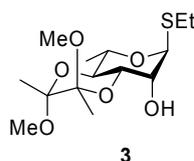
Zu einer Lösung des Ethyl-2,3,4-tri-O-acetyl-1-thio- α -L-rhamnopyranosids (37.98 g, 113.58 mmol) in 300 ml Methanol werden 30 ml einer 0.5 M Natriummethanolat-Lösung in Methanol gegeben und 30 min bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit saurem Ionentauscher (Amberlite IR-120, H⁺-Form) neutralisiert, die Lösung filtriert und am Vakuum zum Ethyl-1-thio- α -L-rhamnopyranosid **2** eingeeengt.

Ausbeute: 23.34 g (98.7 %), C₈H₁₆O₄S, M = 208.28 g/mol.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.25$ (s, 1 H, *H-1*), 4.04 (d, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, *H-2*), 3.72 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, $^3J_{3,4} = 9.3$ Hz, *H-3*), 3.50 (t, 1 H, $^3J_{4,5} = 9.3$ Hz, *H-4*), 4.00 (m, 1 H, *H-5*), 1.32 (d, 3 H, $^3J = 6.1$ Hz, *H-6*), 2.62 (m, 2 H, Et- CH_2), 1.28 (t, 3 H, $^3J = 7.3$ Hz, Et- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 84.8, 73.4, 72.9, 72.4, 69.1, 25.6, 17.9, 15.3$.

6.3.1.3 Ethyl-3,4-O-(2,3-Dimethoxybutan-2,3-diyl)-1-thio- α -L-rhamnopyranosid (3)



Zu einer Lösung von Ethyl-1-thio- α -L-rhamnopyranosid **2** (23.24 g, 112.06 mmol), Trimethylorthoformiat (49.0 ml, 448.2 mmol) und Butan-2,3-dion (11.8 ml, 134.5 mmol) in 60 ml abs. Methanol werden 500 mg p-Toluolsulfonsäure gegeben. Die Reaktionslösung wird unter Argon 24 h bei 70 °C am Rückfluß gerührt und mittels DC kontrolliert. Die abgekühlte rötlich-braune Reaktionslösung wird mit TEA neutralisiert, im Vakuum eingengt und über Kieselgel chromatographiert (PE/EE 2:1).

Ausbeute: 34.25 g, (94.8 %), $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{S}$ $M = 322.42$ g/mol.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -249.3^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl_3).

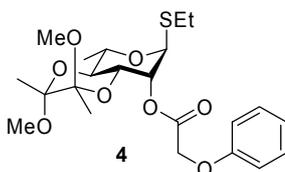
DC: $R_f = 0.2$ (PE/EE 2:1).

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{SNa}$: 345.13423, gef. 345.13437 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), $\Delta m/z = 0.4$ ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.24$ (s, 1 H, *H-1*), 3.99 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.0$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, *H-2*), 3.91 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, $^3J_{3,4} = 10.1$ Hz, *H-3*), 3.73 (t, 1 H, $^3J_{4,5} = 10.1$ Hz, *H-4*), 4.13 (m, 1 H, *H-5*), 1.27 (m, 6 H, *H-6*, Et- CH_3), 3.23, 3.25 (s, 6 H, OMe- CH_3), 2.61 (m, 2 H, Et- CH_2), 2.15 (s, 1 H, 2-OH), 1.28, 1.29, (s, 6 H, Acetal- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 100.2, 99.8, 84.1, 71.4, 68.7, 68.6, 66.8, 48.0, 47.7, 25.1, 17.8, 17.6, 16.5, 15.0$.

6.3.1.4 Ethyl-3,4-O-(2,3-Dimethoxybutan-2,3-diyl)-2-O-phenoxyacetyl-1-thio- α -L-rhamnopyranosid (4)



Das Ethyl-3,4-O-(2,3-Dimethoxybutan-2,3-diyl)-1-thio- α -L-rhamnopyranosid **3** (10.0 g, 31.02 mmol) wird in 100 ml Pyridin gelöst und die Lösung mittels eines Eisbades auf 0 °C gekühlt. Phenoxyacetanhydrid (11.54 g, 40.33 mmol) wird langsam zugegeben. Die Reaktionslösung wird unter Zusatz einer katalytischen Menge DMAP (0.5 g) 16 h gerührt, wobei die Temperatur nach 2 h auf RT erhöht wird. Nach Beendigung der Reaktion wird der Ansatz eingengt und das Produkt über eine Kieselgelsäule (n-Hexan/Toluol/EE 5:4:1) gereinigt. Nach Entfernen der Laufmittel am Hochvakuum erhält man ein klares Öl.

Ausbeute: 13.54 g (95.6 %), C₂₂H₃₂O₈S M = 456.56 g/mol.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -178,5^\circ$ (c = 1.0 in CHCl₃).

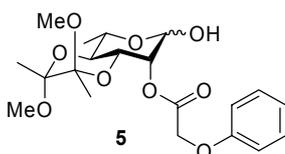
DC: R_f = 0.4 (Toluol/EE 10:1).

MALDI-TOF-MS: m/z ber. für C₂₂H₃₂O₈S: 456.18, gef. 479.21 ([M+Na]⁺).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.21$ (s, 1 H, H-1), 5.31 (dd, 1 H, ³J_{1,2} = 1.0 Hz, ³J_{2,3} = 3.0 Hz, H-2), 4.05 (dd, 1 H, ³J_{2,3} = 3.0 Hz, ³J_{3,4} = 10.1 Hz, H-3), 3.67 (t, 1 H, ³J_{4,5} = 10.1 Hz, H-4), 4.15 (m, 1 H, H-5), 1.27 (m, 6 H, H-6, Et-CH₃), 7.31-6.93 (m, 5 H, Phenyl-H), 4.73 (s, 2 H, CH₂), 3.23, 3.25 (s, 6 H, OMe-CH₃), 2.64 (m, 2 H, Et-CH₂), 1.28, 1.29, (s, 6 H, Acetal-CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 168.4, 157.9, 129.5, 121.6, 114.8, 100.1, 99.7, 82.7, 72.2, 68.9, 67.2, 66.8, 65.3, 48.0, 47.6, 25.8, 17.7, 17.6, 16.5, 15.0$.

6.3.1.5 3,4-O-(2,3-Dimethoxybutan-2,3-diyl)-2-O-phenoxyacetyl- α,β -L-rhamnose (5)



Zu einer Lösung von Ethyl-3,4-O-(2,3-Dimethoxybutan-2,3-diyl)-2-O-phenoxyacetyl-1-thio- α -L-rhamnopyranosid **4** (12.0 g, 26.28 mmol) in 200 ml Aceton/Wasser 9:1 wird

N-Brom-succinimid (18.71 g, 105.12 mmol) langsam zugeben und die Reaktionslösung 2 h bei RT gerührt. Nach Einengen der Reaktionslösung am Vakuum wird zwischen 200 ml Natriumthiosulfatlösung (5 %) und 4 x 150 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Fraktionen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Rohprodukt über Kieselgel chromatographiert (PE/EE 3:2). Nach Entfernen der Lösungsmittel am Hochvakuum erhält man farblose Kristalle. ($\alpha:\beta = 4.3 : 1$ aus ^1H -Integration).

Ausbeute: 9.89 g (91.2 %), $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_9$, $M = 412.44$ g/mol.

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -123.2^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl_3).

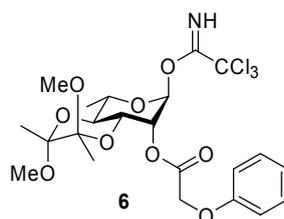
DC: $R_f = 0.3$ (PE/EE 3:2).

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_9\text{Na}$: 435.16255, gef. 435.16255 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), $\Delta m/z = 0.02$ ppm.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) des α -Anomeren: $\delta = 5.17$ (s, 1 H, $H-1$, $^3J_{1,2} < 1.0$ Hz), 5.24 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} < 1.0$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, $H-2$), 4.05 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, $^3J_{3,4} = 10.2$ Hz, $H-3$), 3.64 (t, 1 H, $^3J_{4,5} = 10.2$ Hz, $H-4$), 4.05 (m, 1 H, $H-5$), 1.26 (m, 3 H, $H-6$), 7.29-6.92 (m, 5 H, Ar- H), 5.29 (b, 1 H, OH), 4.71 (s, 2 H, CH_2), 3.23, 3.25 (s, 6 H, OMe- CH_3), 1.28, 1.29 (s, 6 H, Acetal- CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) des α -Anomeren: $\delta = 168.1, 157.9, 129.5, 121.7, 114.8, 100.1, 99.7, 92.7, 71.5, 70.9, 68.7, 66.9, 65.7, 65.2, 48.1, 47.7, 17.8, 17.6, 16.6$.

6.3.1.6 3,4-O-(2,3-Dimethoxybutan-2,3-diyl)-2-O-phenoxyacetyl- α -L-rhamnopyranosyl-trichloracetimidat (6)



Zu einer Lösung von 3,4-O-(2,3-Dimethoxybutan-2,3-diyl)-2-O-phenoxyacetyl- α -L-rhamnopyranose **5** (2.55 g, 6.18 mmol) in 100 ml DCM abs. werden Trichloracetonitril (2.48 ml, 24.70 mmol) und 300 μl DBU gegeben und 12 h gerührt. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingengt und über eine kurze Kieselgelsäule (PE/EE 3:2, Zusatz von 1% TEA) gereinigt. Man erhält einen farblosen spröden Feststoff.

Ausbeute: 2.48 g (72.2 %), $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{Cl}_3\text{NO}_9$, $M = 556.83$ g/mol.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -199.8^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl_3).

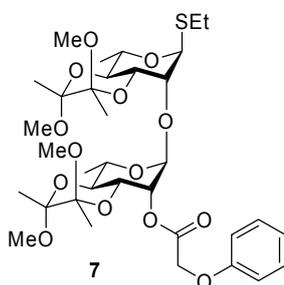
DC: $R_f = 0.6$ (PE/EE 3:2 + 1% TEA).

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{Cl}_3\text{NO}_9\text{Na}$: 578.07219, gef. 578.07219 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), $\Delta m/z = 0.0$ ppm, ^{37}Cl -Peak bei m/z : 580.07000.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.23$ (s, 1 H, $H-1$, $^3J_{1,2} = 1.0$ Hz), 5.41 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.0$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.3$ Hz, $H-2$), 4.17 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.3$ Hz, $^3J_{3,4} = 10.4$ Hz, $H-3$), 3.73 (t, 1 H, $^3J_{4,5} = 10.2$ Hz, $H-4$), 4.05 (m, 1 H, $H-5$), 1.29 (m, 3 H, $H-6$), 8.69 (s, 1 H, NH), 7.31-6.91 (m, 5 H, Ar-H), 4.74 (s, 2 H, CH_2), 3.23, 3.24 (s, 6 H, OMe-CH_3), 1.27, 1.30 (s, 6 H, Acetal-CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 168.1, 160.1, 157.9, 129.5, 121.7, 114.8, 100.1, 99.8, 95.2, 90.8, 70.0, 69.5, 68.0, 66.2, 65.1, 48.0, 47.8, 17.8, 17.6, 16.6$.

6.3.1.7 Ethyl-3,4-*O*-(2,3-Dimethoxybutan-2,3-diyl)-2-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-3',4'-*O*-(2,3-Dimethoxybutan-2,3-diyl)-2'-*O*-phenoxyacetyl-1-thio- α -L-rhamnopyranosid (7)



Zu einer Lösung von Donor **6** (385 mg, 0.691 mmol) in abs. DCM (10 ml) wird Ethyl-3,4-*O*-(2,3-Dimethoxybutan-2,3-diyl)-1-thio- α -L-rhamnopyranosid **3** (202.5 mg, 0.628 mmol) gegeben und die Lösung unter Ar -Atmosphäre mittels eines Eisbades auf 0°C gekühlt. Nach 10 min werden 0.02 eq einer frisch zubereiteten 0.5 M TMSOTf-Lösung in abs. DCM (25.1 μl) hinzugegeben und 2 h bei 0°C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird der Ansatz zwischen 100 ml Ethylacetat und 3 x 50 ml Wasser ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Natriumsulfat getrocknet, eingengt und das Rohprodukt über Kieselgel chromatographiert (H/EE 10:1). Nach Entfernen der Laufmittel am Hochvakuum erhält man ein klares Öl.

Ausbeute: 284.6 mg (63 %), $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_{14}\text{S}$, $M = 716.83$ g/mol.

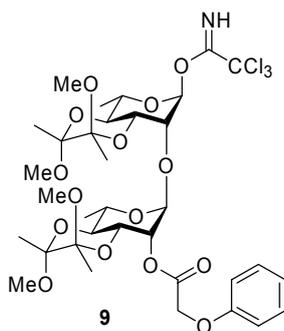
DC: $R_f = 0.2$ (H/EE 10:1).

MALDI-TOF-MS: m/z ber. für $C_{34}H_{52}O_{14}SNa$: 739.82, gef. 739.49 ($[M+Na]^+$).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.40 (dd, 1 H, $H-2^B$), 5.11 (s, 1 H, $H-1^B$), 5.05 (s, 1 H, $H-1^A$), 4.62 (s, 2 H, CH_2), 4.21-3.67 (m, 7 H, Ring- H), 7.21-6.85 (m, 5 H, Phenyl- H), 3.22-3.13 (m, 12 H, $OMe-CH_3$), 2.54 (m, 2 H, $Et-CH_2$), 1.24-1.14 (m, 21 H, $H-6^A$, $H-6^B$, $Et-CH_3$, Acetal- CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 167.6, 157.9, 129.4, 121.4, 114.6, 99.9, 99.8, 99.7, 99.6, 99.4, 99.1, 83.8, 74.9, 70.9, 69.0, 68.8, 98.7, 67.2, 67.1, 66.3, 65.1, 47.9, 47.8, 47.6, 25.4, 17.7, 17.6, 17.5, 17.4, 16.6, 16.5, 14.9.

6.3.1.8 3,4-O-(2,3-Dimethoxybutan-2,3-diyl)-2-O- α -L-rhamnopyranosyl-3,4-O-(2,3-dimethoxybutan-2,3-diyl)-2-O-phenoxyacetyl-rhamnopyranosyl-trichloracetimidat (9)



Das durch NBS-Hydrolyse analog 6.3.1.5 aus Thiorhamnosid **7** in 81.4 % Ausbeute (215 mg, 0.32 mmol) erhaltene Hemiacetal **8** (R_f = 0.2, T/EE 4:1) wird in 30 ml abs. DCM gelöst. Trichloroacetonitril (96 μ l, 0.96 mmol) und 40 μ l DBU werden zugegeben und 12 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingedunstet und über eine kurze Kieselgelsäule (H/EE 5:1, Zusatz von 1% TEA) gereinigt. Man erhält ein farbloses Öl.

Ausbeute: 167 mg (64 %), $C_{34}H_{48}Cl_3NO_{15}$, $M = 817.10$ g/mol.

DC: R_f = 0.2 (H/EE 3:1 + 1% TEA).

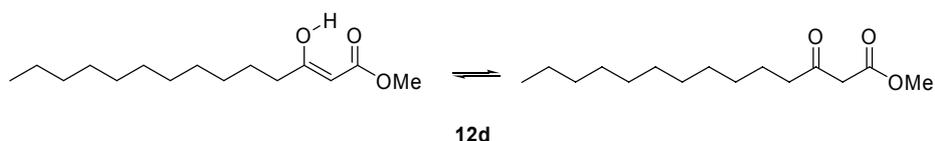
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.59 (s, 1 H, NH), 7.36-6.79 (m, 5 H, Ar- H), 6.19 (d, 1 H, $H-1^A$, $^3J_{1,2} = 1.0$ Hz), 5.44 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.0$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, $H-2^B$), 5.16 (s, 1 H, $H-1^B$, $^3J_{1,2} = 1.0$ Hz), 4.67 (s, 2 H, CH_2), 4.14 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, $^3J_{3,4} = 10.1$ Hz, $H-3^B$), 4.10 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.0$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.3$ Hz, $H-2^A$), 4.02 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.3$ Hz, $^3J_{3,4} = 10.1$ Hz, $H-3^A$), 4.01-3.97 (m, 2 H, $H-5^A$, $H-5^B$), 3.74 (t, 1 H, $^3J_{4,5} = 10.1$ Hz, $H-4^A$),

3.63 (t, 1 H, $^3J_{4,5} = 10.1$ Hz, $H-4^B$), 3.29-3.20 (4 s, 12 H, OMe- CH_3), 1.29-1.21 (m, 18 H, $H-6^A$, $H-6^B$, Acetal- CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 167.4, 160.2, 157.1, 132.3, 116.6, 113.9, 100.0, 99.8, 99.7, 99.6, 99.0, 97.2, 91.0, 73.2, 71.0, 70.3, 68.6, 68.2, 67.9, 67.4, 66.3, 65.3, 47.9, 47.9, 47.7, 47.6, 17.7, 17.7, 17.6, 17.4, 16.7, 16.6$.

6.3.2 Synthesen von Lipidbausteinen

6.3.2.1 3-Oxomyristinsäuremethylester (12d)



Zu einer Lösung von Meldrumsäure **10** (200 mmol, 28.83 g) in 200 ml abs. DCM wird Pyridin (32.2 ml, 400 mmol) langsam zugegeben. Die Reaktionslösung wird mittels eines Eisbades auf 0 °C gekühlt. Laurinsäurechlorid (220 mmol, 52.20 ml) wird in 100 ml abs. DCM gelöst und innerhalb 1 h unter Ar-Atmosphäre zur Reaktionslösung zugetropft, 1 h bei 0 °C und weitere 2 h bei RT gerührt, wobei sich die Lösung rot-orange verfärbt. Die Reaktionslösung wird viermal mit je 150 ml 1 N HCl ausgeschüttelt, die organische Phase mit 200 ml Wasser neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, und im Vakuum von Lösungsmitteln befreit.

Das acylierte Rohprodukt **11d** wird in 250 ml Methanol aufgenommen und 3 h am Rückfluß erhitzt. Nach Entfernung des überschüssigen Methanols aus der Reaktionslösung wird der β -Ketoester **12d** säulenchromatographisch (H/EE 5:1) zu einem farblosen Feststoff aufgereinigt.

Ausbeute: 39.9 g (77.9 %), $C_{15}H_{28}O_3$, $M = 256.38$ g/mol.

DC: $R_f = 0.3$ (H/EE 5:1).

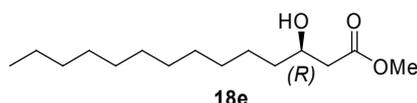
(GC-)EI-MS: 285, 254, 212, 158, 145, 126, 113, 74, 55, 41.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) der Ketoform: $\delta = 3.70$ (s, 1 H, OMe- CH_3), 3.41 (s, 2 H, CO- CH_2 -CO), 2.49 (t, 2 H, α - CH_2), 1.56 (m, 2 H, β - CH_2), 1.56 (m, 16 H, CH_2), 0.85 (t, 3 H, CH_3). Zusätzliche Signale der Enolform: $\delta = 11.98$ (s, Enol-OH), 4.95 (s, (HO)C= CH -CO), 3.69 (s, OMe- CH_3), 2.16 (t, CH_2 -C(OH)=CH). Die Integration der Si-

gnale zeigt übereinstimmend, daß die Verbindung zu ca. 15 % als Enol vorliegt. Die Summe der Keton- und Enol-Integrale ist für die Ketoform angegeben.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 203.1, 179.5, 173.4, 168.0, 88.9, 52.6, 51.3, 49.3, 43.4, 35.4, 32.3, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 26.6, 23.8, 23.0, 14.4$.

6.3.2.2 (*R*)-3-Hydroxymyristinsäuremethylester (**18e**)



Die benötigte Menge (*R*)-BINAP-RuCl₂-Katalysator **17** (0.1 mol %) wird kurz vor der Reduktion in einem Schlenkrohr unter Ar hergestellt.^[196] Das Lösungsmittel DMF wird am Vakuum entfernt, wobei darauf zu achten ist, daß nicht bis zur vollständigen Trockne eingegangen wird.

Abs. MeOH (30 ml) wird unter Ar-Gegenstrom in einem geeigneten Autoklaven vorgelegt. 3-Oxomyristinsäuremethylester **12d** (7.50 g, 29.25 mmol) und frisch hergestellter (*R*)-BINAP-RuCl₂-Katalysator (29.3 μmol , 0.1 mol%) werden unter Ar-Gegenstrom hinzugegeben und gelöst. Der Autoklav wird dicht verschlossen, mehrmals mit Wasserstoff gespült und mit 5 bar Wasserstoff beladen. Der Autoklav wird im Ölbad erhitzt. Nach Erreichen einer Temperatur von 100 °C wird die Reaktionslösung 5 h stark gerührt. Nach Einengen der Reaktionslösung am Vakuum wird das Rohprodukt über Kieselgel chromatographiert (H/EE 5:1). Nach Entfernen der Lösungsmittel am Hochvakuum erhält man einen farblosen Feststoff.

Ausbeute: 7.22 g (95.6 %), C₁₅H₃₀O₃, M = 258.40 g/mol.

Enantiomerenreinheit: 98.3 % dr aus ^1H -NMR-Integration des (*R,R*)-MTPA-Esters
97.7 % dr aus chiraler GC.

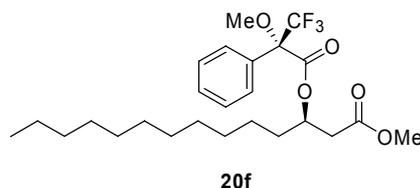
Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -13.9^\circ$ (c = 1.0 in CHCl_3).

DC: R_f = 0.2 (H/EE 5:1).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.98$ (m, 1 H, CH-OH), 3.69 (s, 3 H, OMe-CH₃), 2.87 (b, 1 H, OH), 2.52-2.36 (m, 2 H, CH-CH₂-CO), 1.52-1.24 (m, 20 H, CH₂), 0.86 (t, 3 H, CH₃).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 173.5, 68.0, 51.7, 41.1, 36.5, 31.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 25.5, 22.7, 14.1$.

6.3.2.3 (*R*)-3-O-[(*R*)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenylacetyl]-myristinsäuremethylester (20f)



Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit des reduzierten (*R*)-3-Hydroxymyristinsäuremethylester **18e** mittels Derivatisierung zum Moscherester werden 3-Hydroxymethylester **18e** (51.7 mg, 0.2 mmol), EDC (77 mg, 0.4 mmol) und Moschers Säure (*R*)-(+)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenylelessigsäure **19** (0.3 mmol, 70 mg) in Gegenwart einer katalytischen Menge DMAP (5 mg) in abs. DCM (1 ml) unter Argonatmosphäre 12 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingengt und über eine kurze Kieselgelsäule (DCM) gereinigt. Man erhält ein klares Öl.

Ausbeute: 63.6 mg (67 %), C₂₅H₃₇F₃O₅, M = 474.55 g/mol.

DC: R_f = 0.5 (DCM).

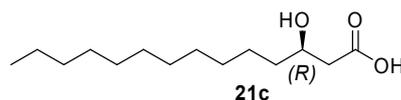
Enantiomerenreinheit: 98.3 % dr aus ¹H-NMR-Integration des (*R,R*)-MTPA-Esters
97.7 % dr aus chiraler GC.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, Werte des (*R,R*)-Diastereomeren): δ = 7.53-7.36 (m, 5 H, Ar-H), 5.46 (m, 1 H, CH-O-CO), 3.65 (s, 3 H, CH₂-OCH₃), 3.54-3.53 (b, 3 H, CH-OCH₃), 2.72-2.57 (m, 2 H, CH-CH₂-CO), 1.66-1.19 (m, 20 H, CH₂), 0.87 (t, 3 H, CH₃).

Abweichende OMe-Werte des (*R,S*)-Diastereomeren: δ = 3.37 (s, 3 H, CH₂-OCH₃), 3.52-3.51 (b, 3 H, CH-OCH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.5, 166.0, 132.3, 130.0, 129.5, 128.7, 128.3, 127.3, 126.6, 121.8, 84.3, 73.3, 55.4, 51.9, 38.6, 33.6, 31.9, 29.6, 29.4, 29.3, 29.2, 24.6, 22.7, 14.1.

6.3.2.4 (*R*)-3-Hydroxymyristinsäure (21c)



Zu einer Lösung von (*R*)-3-Hydroxymyristinsäuremethylester **18e** (11.61 mmol, 3.0 g) in 100 ml MeOH/H₂O (4:1, v/v) Lithiumhydroxid-Monohydrat (23.22 mmol, 974 mg) langsam zugegeben. Die Reaktionslösung wird 12 h bei RT stark gerührt. Bereits nach wenigen min fällt Produkt aus. Es muß darauf geachtet werden, daß der Rührvorgang dadurch nicht

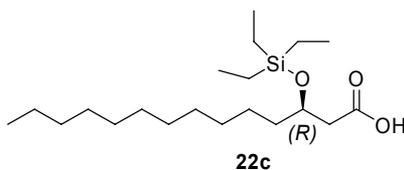
beeinträchtigt wird (als günstig hat sich ein Rührkruz erwiesen). Nach Beendigung der Reaktion wird das Gemisch mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 1 angesäuert, wodurch sich der Niederschlag auflöst. Die Reaktionslösung wird mit 100 ml Wasser verdünnt und dreimal mit 200 ml CHCl₃ extrahiert. Die organische Phase wird nochmals mit 200 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum von Lösungsmitteln befreit. Man erhält ein farbloses Wachs.

Ausbeute: 2.77 g (97.6 %), C₁₄H₂₈O₃, M = 244.37 g/mol.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.0-6.5 (b, 1 H, COOH), 4.02 (m, 1 H, CH-OH), 3.48 (b, 1 H, OH), 2.58-2.42 (m, 2 H, α-CH₂), 1.55-1.25 (m, 20 H, CH₂), 0.85 (t, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 177.9, 68.0, 41.0, 36.5, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 25.4, 22.7, 14.1.

6.3.2.5 (R)-3-O-TES-Myristinsäure (22c)



(R)-3-Hydroxymyristinsäure **21c** (2.5 g, 10.23 mmol) wird in 60 ml Pyridin gelöst und die Lösung mittels eines Ölbades auf 60 °C erhitzt. Mittels eines Tropftrichters wird unter Rühren Triethylsilylchlorid (1.80 ml, 10.74 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird unter 2 h gerührt. Die Reaktionslösung wird nach Abkühlen eingeeengt, das Rohprodukt mit 200 ml CHCl₃ aufgenommen und dreimal mit 200 ml wässriger NaHCO₃-Lösung (5 %) gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat werden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine kurze Kieselgelsäule (H/EE 3:1, Zusatz von 1 % TEA) gereinigt. Nach Entfernen der Laufmittel am Hochvakuum erhält man ein weiches Wachs.

Ausbeute: 3.14 g (85.6 %), C₂₀H₄₂O₃Si, M = 358.63 g/mol.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -3,1^\circ$ (c = 1.0 in CHCl₃).

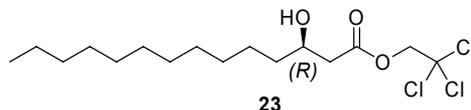
DC: R_f = 0.4 (H/EE 3:1).

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für C₂₀H₄₂O₃SiNa: 381.27954, gef. 381.27959 ([M+Na]⁺), Δm/z = 0.13 ppm.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.07 (m, 1 H, CH-OH), 2.59-2.44 (m, 2 H, α-CH₂), 1.54-1.24 (m, 20 H, CH₂), 0.98-0.92 (m, 12 H, CH₃, TES-CH₃), 0.61 (q, 6 H, TES-CH₂).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 175.4, 69.4, 41.8, 37.3, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.3, 25.3, 22.7, 14.1, 6.8, 4.8$.

6.3.2.6 (*R*)-3-Hydroxymyristinsäuretrichlorethylester (**23**)



Trichlorethanol (5 ml) und (*R*)-3-*O*-TES-Myristinsäure **22c** (1.18 mg, 3.3 mmol) werden in DCM abs. (25 ml) gelöst. Nach Zugabe von EDC (822 mg, 4.29 mmol) und einer katalytischen Menge DMAP (10 mg) wird 12 h bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird zum Reaktionsgemisch TFA (1 ml) zugegeben und weitere 10 min gerührt. Die Reaktionslösung wird zweimal mit je 25 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum von Lösungsmitteln befreit und chromatographisch über eine Kieselgelsäule (DCM) gereinigt. Man erhält ein klares Öl.

Ausbeute: 767.4 mg (62 %), $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{O}_3\text{Cl}_3$, $M = 375.76$ g/mol.

DC: $R_f = 0.4$ (DCM).

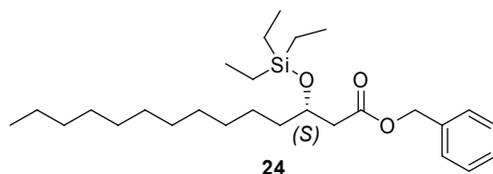
Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -7.8^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl_3).

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{O}_3\text{Cl}_3\text{Na}$: 397.10745, gef. 397.10753 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), $\Delta m/z = 0.2$ ppm.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.74$ (2 d, 2 H, $\text{CH}_2\text{-CCl}_3$, AB-System, $^2J_{\text{A,B}} = 11.9$ Hz), 4.04 (m, 1 H, CH-OH), 2.73 (b, 1 H, OH), 2.65-2.52 (m, 2 H, $\alpha\text{-CH}_2$), 1.54-1.22 (m, 20 H, CH_2), 0.84 (t, 3 H, CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.0, 94.7, 73.9, 67.9, 41.3, 36.5, 31.8, 29.6, 29.5, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 25.4, 22.6, 14.1$.

6.3.2.7 (*S*)-3-*O*-TES-Myristinsäurebenzylester (**24**)



Zu einer Lösung von (*S*)-3-*O*-TES-Myristinsäure **22d** (502 mg, 1.40 mmol) und EDC (805 mg, 4.20 mmol) in abs. DCM (5 ml) wird Benzylalkohol (435 μl , 4.2 mmol) und eine katalytische Menge DMAP gegeben. Die Reaktionsmischung wird 12 h bei RT gerührt. Nach

Evaporation der Lösungsmittel wird das Produkt säulenchromatographisch (H/EE 30:1) zu einer klaren viskosen Flüssigkeit aufgereinigt.

Ausbeute: 511 mg (81 %), $C_{27}H_{48}O_3Si$, $M = 448.75$ g/mol.

DC: $R_f = 0.3$ (H/EE 30:1).

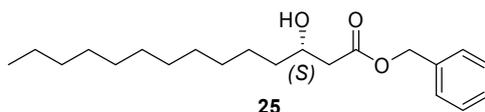
Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +10.3^\circ$ ($c = 1.0$ in $CHCl_3$).

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für $C_{27}H_{48}O_3SiNa$: 471.32649, gef. 471.32456 ($[M+Na]^+$), $\Delta m/z = 0.15$ ppm.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.36-7.31$ (m, 5 H, Ar-H), 5.11 (s, 2 H, Bn- CH_2), 4.16 (m, 1 H, CH-OSi), 2.57-2.42 (m, 2 H, α - CH_2), 1.53-1.25 (m, 20 H, CH_2), 0.96-0.87 (m, 12 H, CH_3 , TES- CH_3), 0.59 (q, 6 H, TES- CH_2).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 171.6, 135.9, 128.5, 128.2, 128.1, 69.4, 66.1, 42.8, 37.7, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 25.1, 22.7, 14.1, 6.8, 4.9$.

6.3.2.8 (S)-3-Hydroxymyristinsäurebenzylester (25)



Zu einer Lösung von (S)-3-O-TES-Myristinsäurebenzylester **24** (505 mg, 1.05 mmol) in abs. DCM (50 ml) wird TFA (2.5 ml) zugegeben und 10 min gerührt. Die Reaktionslösung wird dreimal mit je 50 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum von Lösungsmitteln befreit und chromatographisch über eine Kieselgelsäule (H/EE 8:1) gereinigt. Man erhält ein farbloses Wachs.

Ausbeute: 357 mg (98 %), $C_{21}H_{34}O_3$, $M = 334.49$ g/mol.

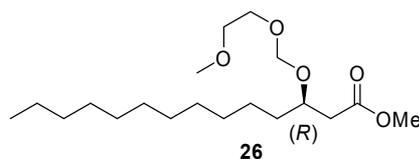
DC: $R_f = 0.25$ (H/EE 8:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +12.9^\circ$ ($c = 1.0$ in $CHCl_3$).

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für $C_{21}H_{34}O_3Na$: 357.24002, gef. 357.23980 ($[M+Na]^+$), $\Delta m/z = 0.6$ ppm.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.36-7.32$ (m, 5 H, Ar-H), 5.15 (s, 2 H, Bn- CH_2), 4.01 (m, 1 H, CH-OH), 2.77 (b, 1 H, OH), 2.55-2.45 (m, 2 H, α - CH_2), 1.49-1.26 (m, 20 H, CH_2), 0.87 (t, 3 H, CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 172.9, 135.6, 128.6, 128.4, 128.2, 68.0, 66.5, 41.3, 36.5, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 25.4, 22.7, 14.1$.

6.3.2.9 (R)-3-MEM-Myristinsäuremethylester (26)

Zu einer Lösung von (*R*)-3-Hydroxymyristinsäuremethylester **18e** (2.50 g, 9.68 mmol) in abs. DCM (25 ml) wird DIPEA (2.12 ml, 12.6 mmol) gegeben. Unter Rühren wird langsam 2-Methoxy-ethoxymethylchlorid (1.43 ml, 12.6 mmol) zugegeben. Es wird 20 h gerührt. Nach Einengen der Reaktionslösung am Vakuum wird das Rohprodukt über Kieselgel chromatographiert (H/EE 3:1). Nach Entfernen der Lösungsmittel am Hochvakuum erhält man ein klares Öl.

Ausbeute: 3.11 g (93 %), C₁₉H₃₈O₅, M = 346.50 g/mol.

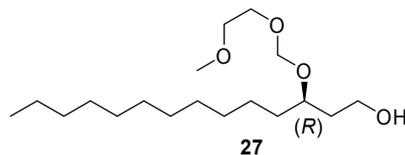
Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -6.7^\circ$ (c = 1.0 in CHCl₃).

DC: R_f = 0.25 (H/EE 6:1).

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für C₁₉H₃₈O₅Na: 369.26115, gef. 369.26153 ([M+Na]⁺), Δm/z = 1.0 ppm.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.73 (2 d, 2 H, O-CH₂-O (AB-System)), 4.00 (m, 1 H, CH-O-MEM), 3.67 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂), 3.65 (s, 3 H, COOCH₃), 3.52 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂), 3.37 (s, 3 H, OCH₃), 2.57-2.43 (m, 2 H, α-CH₂), 1.58-1.23 (m, 20 H, CH₂), 0.85 (t, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 172.0, 94.7, 74.5, 71.7, 67.0, 59.0, 51.5, 39.9, 34.6, 31.9, 29.6, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.3, 25.1, 22.7, 14.1.

6.3.2.10 (R)-3-MEM-Myristylalkohol (27)

Zu einer mittels Eisbad auf 0 °C gekühlten Lösung des MEM-Myristylmethylesters **26** (3.1 g, 8.95 mmol) in abs. THF (100 ml) langsam Lithiumaluminiumhydrid (374 mg, 9.84 mmol) gegeben. Es wird 10 min unter Eiskühlung und anschließend 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird nach dem Abkühlen vorsichtig mit einem THF/Wassergemisch (50 ml) gelöscht und mit 1 N HCl neutralisiert. Das Reaktionsgemisch wird dreimal mit 200 ml CHCl₃ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsul-

fat getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Trocknen am Hochvakuum erhält man ein klares Öl.

Ausbeute: 2.83 g (99 %), C₁₈H₃₈O₄, M = 318.49 g/mol.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -56.6^\circ$ (c = 1.0 in CHCl₃).

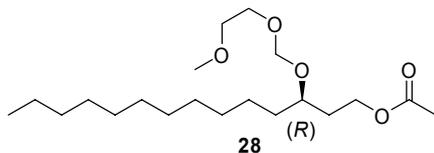
DC: R_f = 0.2 (H/EE 1:2).

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für C₁₈H₃₈O₄Na: 341.26623, gef. 341.26596 ([M+Na]⁺), Δm/z = 0.8 ppm.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.73 (2 d, 2 H, O-CH₂-O (AB-System)), 3.84-3.77 (m, 3 H, CH-O-MEM, CH₂-OH), 3.63 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂), 3.54 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂), 3.37 (s, 3 H, OCH₃), 2.80 (b, 1 H, OH), 1.78 (m, 2 H, CH₂-CH₂-OH), 1.63-1.23 (m, 20 H, CH₂), 0.85 (t, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 94.1, 75.2, 71.7, 67.1, 59.2, 59.0, 36.7, 34.3, 31.9, 29.8, 29.6, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 25.1, 22.6, 14.1.

6.3.2.11 (R)-3-MEM-Myristylacetat (28)



Der (R)-3-MEM-Myristylalkohol **27** (2.25 g, 7.06 mmol) wird in 50 ml Pyridin gelöst. Acetanhydrid (6.67 ml, 70.6 mmol) wird langsam zugegeben. Die Reaktionslösung wird unter Zusatz einer katalytischen Menge DMAP (15 mg) 12 h gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird der Ansatz eingengt, der Rückstand in 100 ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit 100 ml KHSO₄-Lösung (5 %) gewaschen. Das Rohprodukt wird über eine kurze Kieselgelsäule (H/EE 4:1) gereinigt. Nach Entfernen der Laufmittel am Hochvakuum erhält man ein klares Öl.

Ausbeute: 2.34 g (92 %), C₂₀H₄₀O₅, M = 360.53 g/mol.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -16.1^\circ$ (c = 1.0 in CHCl₃).

DC: R_f = 0.2 (H/EE 4:1).

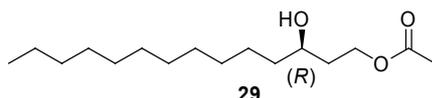
HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für C₂₀H₄₀O₅Na: 383.27680, gef. 383.27654 ([M+Na]⁺), Δm/z = 0.7 ppm.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.72 (2 d, 2 H, O-CH₂-O (AB-System)), 4.12 (m, 2 H, CH₂-OAc), 3.70-3.66 (m, 3 H, CH-O-MEM, O-CH₂-CH₂), 3.53 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂),

3.37 (s, 3 H, OCH₃), 2.02 (s, 3 H, OAc), 1.79 (m, 2 H, CH₂-CH₂-OAc), 1.54-1.24 (m, 20 H, CH₂), 0.86 (t, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.1, 94.4, 74.5, 71.7, 67.1, 61.4, 59.0, 34.4, 33.2, 31.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.6, 29.3, 25.0, 22.7, 21.0, 14.1.

6.3.2.12 (R)-3-Hydroxymyristylacetat (29)



Zu einer Lösung von (R)-3-MEM-Myristylacetat **28** (2.30 g, 6.38 mmol) in abs. DCM (50 ml) unter Argon gibt man feingepulvertes wasserfreies Zinkbromid (7.18 g, 31.9 mmol). Die Suspension wird 16 h bei RT stark gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionslösung mit 100 ml Chloroform versetzt, dreimal mit je 200 ml Wasser gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Nach Einengen der Reaktionslösung am Vakuum wird das Rohprodukt über Kieselgel chromatographiert (H/EE 2:1). Nach Entfernen der Lösungsmittel am Hochvakuum erhält man ein farbloses Wachs.

Ausbeute: 1.51 g (87 %), C₁₆H₃₂O₃, M = 272.42 g/mol.

Drehwert: [α]_D²⁰ = -2.7° (c = 1.0 in CHCl₃).

DC: R_f = 0.3 (H/EE 2:1).

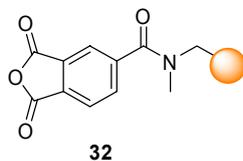
HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für C₁₆H₃₂O₃Na: 295.22437, gef. 295.22418 ([M+Na]⁺), Δm/z = 0.6 ppm.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.25-4.05 (m, 2 H, CH₂-OAc), 3.58 (m, 1 H, CH-OH), 2.54 (b, 1 H, OH), 1.97 (s, 3 H, OAc), 1.77-1.54 (m, 2 H, CH₂-CH₂-OAc), 1.37-1.18 (m, 20 H, CH₂), 0.80 (t, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.3, 68.4, 67.1, 37.4, 36.1, 31.8, (29.5), (29.4), 29.2, 25.5, 22.5, 20.8, 13.9.

6.3.3 Festphasensynthesen am TAL-Harz

6.3.3.1 Trimellitsäureanhydrid-Linker (TAL-Harz 32)



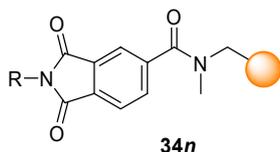
In einer Kunststoffspritze mit Fritte wird *N*-Methylaminomethyl-Polystyrolharz **31** (500 mg, 1.36 mmol/g) in abs. DCM (3 mL) suspendiert. Nachdem das Reaktionsgefäß auf 0 °C gekühlt wurde, wird Trimellitsäureanhydrid-chlorid **30** (430 mg, 2.04 mmol) und DIPEA (0.82 mmol, 140 µl) zugegeben. Die Suspension wird 2 h bei 0 °C gerührt. Nach Abfiltrieren der Reaktionslösung wird das Harz mit DCM (2x), MeOH (1x) und DCM (2x) gründlich gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Die vollständige Umsetzung wird anhand des Chloranil-Testes verifiziert.

EA (N-Analyse): ber.: 1.541 %, gef.: 1.540 %.

Beladung: 1.10 mmol/g.

FT-ATR-IR: ν [cm⁻¹] = 3060, 3025, 2920, 2851, 1584, 1782, 1640, 1601, 1493, 1452, 1264, 1027, 897, 735, 699, 536.

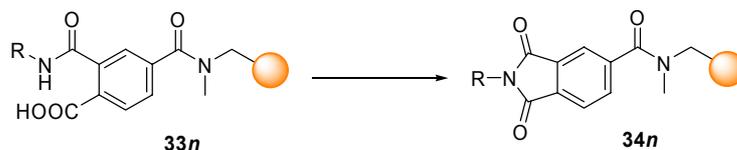
6.3.3.2 MW-Immobilisierung von Aminen als polymeres Phthalimid (**34n**)



TAL-Harz **32** (500 mg, 1.10 mmol/g) und Amin (3 eq, 1.65 mmol) werden in ein Mikrowellen-Reaktorgefäß eingewogen und in abs. DMF (2 ml) suspendiert. Die Suspension wird mittels eines Mikrowellenreaktors 5 min auf 200 °C erhitzt. Alternativ kann die Reaktion in konventioneller Festphasensynthese durch Rühren der Suspension für 4 h bei 90 °C erfolgen. Weniger nukleophile Aniline erfordern 110 °C. Nach Abkühlen des Reaktionsgefäßes wird dieses geöffnet und die Suspension in eine Kunststoffspritze mit Fritte überführt. Nach Abfiltrieren der Reaktionslösung wird das Harz mit DMF (2x), DCM (2x), MeOH (2x) and Et₂O (2x) gründlich gewaschen und am Hochvakuum getrocknet.

FT-ATR-IR: ν [cm⁻¹] = 3055, 3026, 2922, 2852, 1716, 1639, 1601, 1492, 1451, 1391, 1362, 1264, 1180, 1104, 1028, 822, 738, 698, 554.

6.3.3.3 Immobilisierung von Aminen über Acylierung und anschließender Cyclokondensation zum polymeren Phthalimid (**34n**)



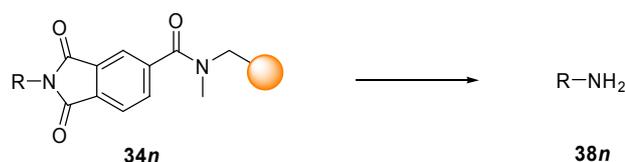
TAL-Harz **32** (500 mg, 1.10 mmol/g) und Amin (3 eq, 1.65 mmol) werden in einer Kunststoffspritze mit Fritte eingewogen und in abs. DMF (2 ml) suspendiert. Eine katalytische Menge DMAP (10 mg) wird hinzugefügt. Die Suspension wird 2 h bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Reaktionslösung wird das Harz **33n** mit DMF (2x), DCM (2x), MeOH (2x) und Et₂O (2x) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet.

FT-ATR-IR: ν [cm⁻¹] = 3057, 3025, 2920, 2852, (1720), 1637 (breit), 1601, 1493, 1451, 1361, 1265, 1066, 1028, 755, 698, 541.

Für die Cyclisierung zu polymerem Phthalimid **34n** wird das sekundäre Amidharz **33n** in abs. DCM suspendiert. 1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol (MSNT, 3 eq) und *N*-Methylimidazol (3 eq) werden zugefügt und die Suspension 2 h bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Reaktionslösung wird das Harz **34n** mit DMF (2x), DCM (2x), MeOH (2x) und Et₂O (2x) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet.

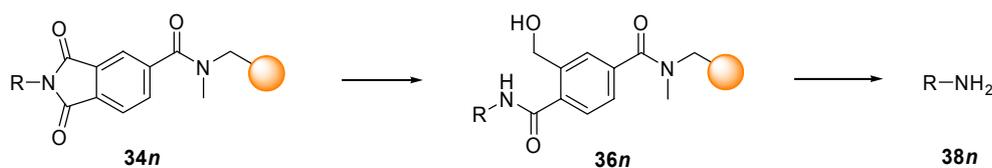
FT-ATR-IR: ν [cm⁻¹] = 3059, 3024, 2926, 2850, 1715, 1638, 1601, 1493, 1451, 1393, 1365, 1247, 1169, 1028, 737, 698, 543.

6.3.3.4 Hydrazinolytische Produktabspaltung von TAL-Phthalimid (**38n**)



Zur Abspaltung der Amine **38n** mittels Hydrazinolyse wird polymergebundenes Phthalimid **34n** in abs. THF (1 mL) in einer Kunststoffspritze mit Fritte vorgequollen. Zu der Suspension wird Hydrazin (4 eq, 25%ige Lösung von Hydrazin in Wasser) gegeben und die Reaktionsmischung 6 h bei 65 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird abfiltriert und das Harz jeweils zweimal mit DCM und MeOH gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum getrocknet, mit *tert.*-Butylalkohol/H₂O (4:1, v/v, 3 ml) versetzt und gefriergetrocknet. Alternative kann diese Abspaltung mit 8 eq Ethylendiamin anstelle von 4 eq Hydrazin durchgeführt werden.

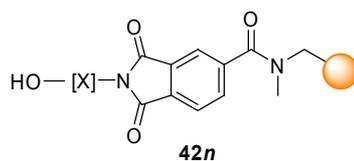
6.3.3.5 Lactonisierungs-Produktabspaltung von TAL-Phthalimid (**38n**)



Für den Reduktionsschritt der Lactonisierungsmethode wird polymergebundenes Phthalimid **34n** in einer Kunststoffspritze mit Fritte in abs. THF vorgequollen. Zur Suspension wird Lithiumborhydrid (3 eq) zugegeben und 90 min bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Reaktionslösung wird das Hydroxymethyldiamid-Harz **36n** mit DMF (2x), DCM (2x), MeOH (2x) und Et₂O (2x) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Die Vollständigkeit der Reaktion wird durch das Verschwinden der IR-Absorptionsbande des Phthalimides angezeigt.

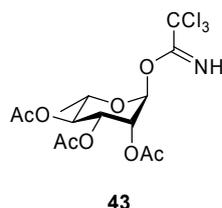
Zur cyclisierenden Abspaltung der Amine **38n** von Hydroxymethyldiamid-Harz **36n** wird dieses 2 h bei RT in DCM/TFA/H₂O (1 mL, 18:1:1 (v/v) - TFA und Wasser wurden vorgemischt, um Trifluoressigsäure zu quenchen) geschüttelt. Die Reaktionslösung wird abfiltriert und das Harz jeweils zweimal mit DCM und MeOH gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum getrocknet, mit *tert.*-Butylalkohol/H₂O (4:1, v/v, 3 ml) versetzt und gefriergetrocknet.

6.3.3.6 Silylether-Spaltung von TES-Aminoalkohol auf TAL (**42n**)



Polymergebundener Triethylsilyl-geschützter Aminoalkohol **41n** wird in Pyridin vorgequollen (2 mL). HF-Pyridin (500 µl) wird zugegeben und die Suspension 30 min bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Reaktionslösung wird das Harz **42n** mit DMF (2x), DCM (2x), MeOH (2x) und Et₂O (2x) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet.

6.3.3.7 2,3,4-Tri-O-acetyl- α -L-rhamnopyranosyl-trichloracetimidat (**43**)



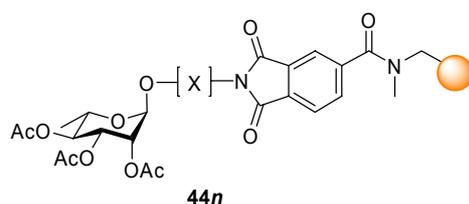
Zu einer Lösung von 2,3,4-Tri-O-acetyl- α,β -L-rhamnopyranose (5.00 g, 17.2 mmol) in abs. DCM (250 ml) werden Trichloracetimidat (5.17 ml, 51.6 mmol) und 300 μ l DBU gegeben und 4 h gerührt. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingedunstet und über eine kurze Kieselgelsäule (H/EE 2:1, Zusatz von 1% TEA) gereinigt. Man erhält ein klares Öl.

Ausbeute: 6.15 g (82.3 %), $C_{14}H_{18}Cl_3NO_8$, $M = 434.66$ g/mol.

DC: $R_f = 0.4$ (H/EE 2:1).

1H -NMR-Werte (400 MHz, $CDCl_3$) stimmen mit Literaturangaben überein.^[286]

6.3.3.8 Festphasenglykosylierung von TAL-Aminoalkoholen (44n)

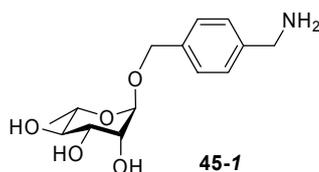


Die polymeren TAL-Aminoalkohole **41n** werden am Hochvakuum getrocknet und anschließend unter Argonatmosphäre in abs. DCM suspendiert. Tri-O-acetyl-L-rhamnopyranosyl- α -trichloracetimidat **43** (3 eq) wird hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 10 min bei 0 °C geschüttelt. Dann wird 0.5 eq TMSOTf in Form einer frisch hergestellten 0.5 M TMSOTf-Lösung in abs. DCM zugegeben. Die Suspension wird 30 min bei 0 °C geschüttelt. Die Reaktionslösung wird abfiltriert, das Harz mit DCM (2x), MeOH (2x) und Et_2O (2x) gründlich gewaschen und am Hochvakuum getrocknet.

FT-ATR-IR: ν [cm^{-1}] = 3057, 3027, 2920, 2850, 1747, 1642, 1601, 1493, 1452, 1367, 1219, 1049, 758, 698.

6.3.3.9 Spektroskopische Charakterisierung der Amino-O-rhamnoside 45n

[4-(Aminomethyl)benzyl]- α -L-rhamnopyranosid (45-1)

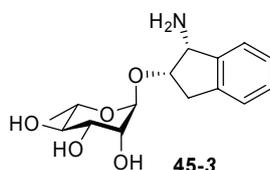


$C_{14}H_{21}NO_5$, $M = 283.33$ g/mol; ESI-MS: $[M+H]^+ = 284.2$ m/z.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): $\delta = 4.74$ (d, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.52$ Hz, *H-1*), 3.80 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.52$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.54$ Hz, *H-2*), 3.63 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.54$ Hz, $^3J_{3,4} = 9.60$ Hz, *H-3*), 3.38 (t, 1 H, $^3J_{4,5} = 9.60$ Hz, *H-4*), 3.58 (q, 1 H, $^3J_{5,6} = 6.3$ Hz, *H-5*), 1.24 (d, 3 H, *H-6*), 4.60 (s, 2 H, *H-7*), 7.36, 7.42 (d, 4 H, $^3J_{9,10} = 3.7$ Hz, *H-9,10*), 3.98 (s, 2 H, *H-12*).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD): $\delta = 100.9$ (*C-1*), 72.4 (*C-2*), 72.3 (*C-3*), 73.9 (*C-4*), 70.1 (*C-5*), 17.9 (*C-6*), 64.7 (*C-7*), 137.8 (*C-8*), 129.1, 128.3 (*C-9,10*), 142.8 (*C-11*), 45.3 (*C-12*).

[1-(*R*)-Amino-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-(*S*)-yl]- α -L-rhamnopyranosid (45-3)

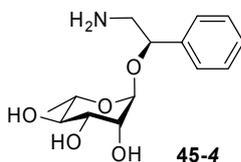


$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_5$, $M = 295.34$ g/mol; ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 296.3$ m/z.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 4.96$ (d, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.26$ Hz, *H-1*), 3.94 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.26$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.28$ Hz, *H-2*), 3.62 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.28$ Hz, $^3J_{3,4} = 9.60$ Hz, *H-3*), 3.38 (t, 1 H, $^3J_{4,5} = 9.60$ Hz, *H-4*), 3.56 (q, 1 H, $^3J_{5,6} = 6.57$ Hz, *H-5*), 1.24 (d, 3 H, *H-6*), 4.54 (dt, 2 H, *H-7*), 3.32 (m, 1 H, *H-8*), 4.32 (d, 1 H, *H-9*), 7.33 (d, 2 H, *H-10*), 7.17-7.26 (m, 4 H, *H-12,13,14,15*).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): $\delta = 101.4$ (*C-1*), 70.4 (*C-2*), 70.5 (*C-3*), 72.3 (*C-4*), 69.4 (*C-5*), 16.8 (*C-6*), 82.1 (*C-7*), 38.5 (*C-8*), 58.6 (*C-9*), 141.0, 140.7 (*C-10, 11*), 124.1, 125.8, 127.5, 126.4 (*C-12,13,14,15*).

[2-(*R*)-Amino-1-phenylethyl]- α -L-rhamnopyranosid (45-4)



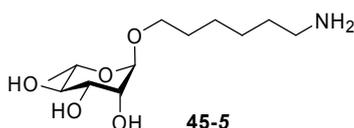
$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_5$, $M = 283.33$ g/mol; ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 284.2$ m/z.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 4.84$ (d, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.27$ Hz, *H-1*), 3.91 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.27$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.28$ Hz, *H-2*), 3.75 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.28$ Hz, $^3J_{3,4} = 9.60$ Hz, *H-3*),

3.30 (t, 1 H, $^3J_{4,5} = 9.60$ Hz, *H-4*), 3.43 (q, 1 H, $^3J_{5,6} = 6.32$ Hz, *H-5*), 1.20 (d, 3 H, *H-6*), 4.71 (dd, 1 H, *H-7*), 2.95 (m, 2 H, *H-8*), 7.29 (m, 5 H, *H-10,11,12*).

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): $\delta = 101.9$ (*C-1*), 70.7 (*C-2*), 70.5 (*C-3*), 72.3 (*C-4*), 69.5 (*C-5*), 17.2 (*C-6*), 77.4 (*C-7*), 46.4 (*C-8*), 140.5 (*C-9*), 127.7, 127.3, 126.4, (*C-10,11,12*).

[6-Aminohexyl]- α -L-rhamnopyranosid (45-5)



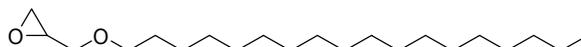
$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NO}_5$, $M = 263.34$ g/mol; ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 264.3$ m/z.

^1H -NMR (400 MHz, D_2O): $\delta = 4.75$ (d, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.1$ Hz, *H-1*), 3.88 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.1$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.3$ Hz, *H-2*), 3.66 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.3$ Hz, $^3J_{3,4} = 8.6$ Hz, *H-3*), 3.40 (t, 1 H, $^3J_{4,5} = 9.6$ Hz, *H-4*), 3.61 (q, 1 H, $^3J_{5,6} = 5.6$ Hz, *H-5*), 1.24 (d, 3 H, *H-6*), 3.51 (t, 2 H, $^3J_{7,8} = 6.4$ Hz, *H-7*), 1.58 (m, 4 H, *H-8,11*), 1.34 (m, 4 H, *H-9,10*), 2.89 (t, 2 H, $^3J_{11,12} = 6.4$ Hz, *H-12*).

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): $\delta = 100.2$ (*C-1*), 70.6 (*C-2*), 70.8 (*C-3*), 72.5 (*C-4*), 69.0 (*C-5*), 17.0 (*C-6*), 68.2 (*C-7*), 28.7 (*C-8*), 25.9, 25.1 (*C-9,10*), 27.7 (*C-11*), 40.1 (*C-12*).

6.3.4 Synthese des HASP-Benzylankers

6.3.4.1 1,2-Epoxy-3-octadecyloxypropan (47)



47

Epichlorhydrin **46** (222.0 mmol, 17.4 ml) und der Phasentransferkatalysator Tricaprylmethylammoniumchlorid (Aliquat[®]336, 1.0 g) werden in 100 ml Cyclohexan gelöst. Octadecanol (55.6 mmol, 15.0 g) wird zugegeben und die Reaktionsmischung mit Natriumhydroxidlösung (15 ml, 50% (w/w)) versetzt. Unter heftigem Rühren (Rührkreuz) wird das Zweiphasensystem 5 h am Rückfluß auf 90 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wird mit 300 ml Wasser versetzt und die wässrige Phase mit n-Hexan extrahiert (3 x 200 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit verdünnter Ammoniumchlorid-Lösung (1 x 200 ml) und mit Wasser (2 x 200 ml) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet.

Nach Evaporation der Lösungsmittel wird am Hochvakuum getrocknet. Man erhält ein farbloses Wachs.

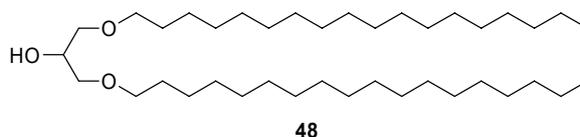
Ausbeute: 17.9 g (54.9 mmol, 99 %), $C_{21}H_{42}O_2$, $M = 326.57$ g/mol.

MALDI-TOF-MS: m/z ber. für $C_{21}H_{42}O_2$: 326.32, gef.: 349.3 ($[M+Na]^+$).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 3.67$ und 3.33 (AB-Teil im ABM-System der exozyklischen Glycidyl-Methylenprotonen, jeweils dd, 1H, $^2J_{A,B} = 11.5$ Hz, $^3J_{A,M} = 3.0$ Hz, $^3J_{B,M} = 5.8$ Hz), 3.44 (AB-Teil im ABX_2 -System von $O-CH_2-C_{18}$, m, 2 H, $^2J_{A,B} = 9.1$ Hz, $^3J_{A,X} = ^3J_{B,X} = 6.8$ Hz), 3.09 (m, 1H, Epoxid-CH), 2.74 und 2.56 (AB-Teil im ABX-System der Epoxid-Methylenprotonen, jeweils 1H, $^2J_{A,B} = 5.1$ Hz, $^3J_{A,X} = 4.5$ Hz, $^3J_{B,X} = 2.5$ Hz), 1.54 (m, 2H, CH_2), 1.21 (m, 30H, CH_2), 0.83 (t, 3H, CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 71.6, 71.4, 50.8, 44.2, 31.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 26.0, 22.6, 14.0$.

6.3.4.2 1,3-Bis-octadecyl-2-propanol (48)



1,2-Epoxy-3-octadecyloxypropan **47** (54.9 mmol, 17.9 g) und Octadecanol (16.3 g, 60.4 mmol) werden unter Ar in abs. DCM (250 ml) gelöst und mittels Wasserbad auf konstant 20 °C temperiert. Unter Rühren wird Bortrifluorid-diethyletherat (1.39 ml, 11 mmol) langsam mittels Tropftrichter zugetropft. Nach 1 h wird die Reaktionslösung langsam mit verd. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (200 ml) gelöscht und mit verd. Natriumhydrogencarbonat extrahiert (3 x 200 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser (1 x 200 ml) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Evaporation wird am Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hexan/EE 20:1) zu einem farblosen Wachs aufgereinigt.

Ausbeute: 13.46 g (22.5 mmol, 41 %), $C_{39}H_{80}O_3$, $M = 597.05$ g/mol.

DC: $R_f = 0.5$ (Hexan/EE 7:3).

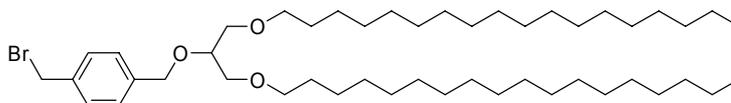
FD-MS: 597.8 (M^+).

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z: ber. für $C_{39}H_{80}O_3Na$: 619.59997, gef.: 619.59989 ($[M+Na]^+$), $\Delta m/z = 0.13$ ppm.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 3.87$ (m, 1H, $CH(OH)$), 3.38 (m, 8H, $O-CH_2$), 2.40 (b, 1H, OH), 1.50 (m, 4H, CH_2), (m, 60H, CH_2), 0.81 (t, 6H, CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 71.8, 71.7, 69.5, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.1, 22.7, 14.1$.

6.3.4.3 2-[(4-Brommethylphenyl)-methoxy]-bis-1,3-octadecyl-2-propan (50)



50

Unter Argonatmosphäre wird 1,3-Bis-octadecyl-2-propanol **48** (7.54 mmol, 4.50 g) in einer Mischung aus abs. Toluol und abs. THF (500 ml, 1:1) vorgelegt. Natriumhydrid (30.16 mmol, 1.21 g 60%ige Suspension in Mineralöl) wird zugegeben und die Reaktionslösung bei 40 °C gerührt. Nach 0.5 h wird α, α' -Dibromxylyl **49** (22.62 mmol, 5.97 g) in abs. Toluol/abs. THF (100 ml, 1:1) gelöst und mittels Tropftrichter zugetropft. Die Reaktion wird für 5 h am Rückfluß auf 90 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Reaktion vorsichtig mit Wasser (100 ml) gelöscht und mit konz. HCl auf pH 7 neutralisiert. Die Reaktionslösung wird mit Chloroform (3 x 200 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen (2 x 200 ml) und über Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit reinem Dichlormethan als Laufmittel aufgereinigt. Man erhält ein farbloses Wachs.

Ausbeute: 4.20 g (5.38 mmol, 71 %), $C_{47}H_{87}BrO_3$, $M = 780.10$ g/mol.

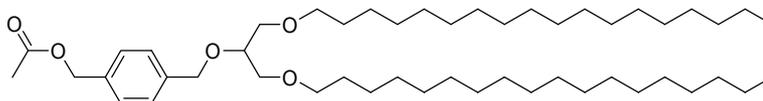
DC: $R_f = 0.45$ (DCM)

HR-MS (FT-ICR-ES-MS): m/z: ber. für $C_{47}H_{87}BrO_3Na$: 801.57308, gef.: 801.57342 ($[M+Na]^+$), $\Delta m/z = 0.4$ ppm, ^{81}Br -Isotopenpeak bei m/z: gef.: 803.57036.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.35$ (s, 4H, ArH), 4.70 (s, 2H, $O-CH_2-Ar$), 4.48 (s, 2H, $O-CH_2-Br$), 3.72 (m, 1H, $CH(OR)$), 3.53 (m, 4H, $O-CH_2$), 3.43 (t, 4H, $O-CH_2-C_{18}$), 1.57 (m, 4H, CH_2), 1.27 (m, 60H, CH_2), 0.89 (t, 6H, CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 139.3, 136.82, 128.9, 127.9, 77.3, 71.7, 71.6, 71.0, 33.3, 31.9, 29.6, 29.3, 26.1, 22.7, 14.1$.

6.3.4.4 2-[(4-Acetyloxymethylphenyl)-methoxy]-bis-1,3-octadecyl-2-propan (51)



51

2-[(4-Bromomethylphenyl)-methoxy]-bis-1,3-octadecyl-2-propan **50** (4.36 mmol, 3.40 g) und wasserfreies Natriumacetat (17.43 mmol, 1.43 g) werden in abs. DMF (200 ml) 8 h auf 100 °C erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionslösung mit Wasser (300 ml) versetzt, mit Chloroform (3 x 200 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Durch Erwärmen des Rohproduktes am Hochvakuum entfernt man die Lösungsmittelrückstände und erhält die NMR-saubere Verbindung als farbloses Wachs.

Ausbeute: 3.29 g (4.33 mmol, 99 %), $\text{C}_{49}\text{H}_{90}\text{O}_5$, $M = 759.24$ g/mol.

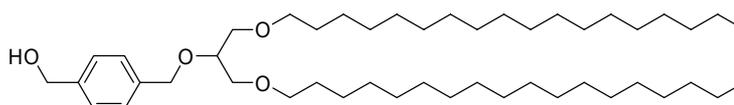
DC: $R_f = 0.2$ (DCM)

MALDI-TOF-MS: m/z ber. für $\text{C}_{49}\text{H}_{90}\text{O}_5$: 758.68, gef.: 781.6 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.36$ (d, 2H, ArH, $^3J = 8.1$ Hz), 7.30 (d, 2H, ArH, $^3J = 8.1$ Hz), 5.08 (s, 2H, O- CH_2 -Ar), 4.69 (s, 2H, O- CH_2 -OAc), 3.70 (m, 1H, CH(OR)), 3.52 (m, 4H, O- CH_2), 3.42 (t, 4H, O- CH_2 - C_{18}), 2.08 (s, 3H, Ac- CH_3), 1.55 (m, 4H, CH_2), 1.24 (m, 60H, CH_2), 0.87 (t, 3H, CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.8, 139.1, 135.0, 128.3, 127.8, 77.2, 71.7, 71.6, 71.0, 66.1, 31.9, 29.6, 29.3, 26.1, 22.7, 21.0, 14.1$.

6.3.4.5 2-[(4-Hydroxymethylphenyl)-methoxy]-bis-1,3-octadecyl-2-propan



52

2-[(4-Acetyloxymethylphenyl)-methoxy]-bis-1,3-octadecyl-2-propan **51** (4.33 mmol, 3.27 g) wird in abs. DCM (20 ml) gelöst. Natriummethanolat (4.33 mmol, 8.66 ml einer 0.5 M

Lösung in Methanol) wird zugegeben und 0.5 h gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 10%iger Kaliumhydrogensulfatlösung (100 ml) versetzt und mit DCM (3 x 200 ml) extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat wird das Rohprodukt über eine kurze Kieselgelsäule (erst DCM, dann CHCl_3) filtriert. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden im Hochvakuum zur NMR-sauberen Verbindung eingengt. Man erhält ein farbloses Wachs.

Ausbeute: 2.79 g (3.89 mmol, 90 %), $\text{C}_{47}\text{H}_{88}\text{O}_4$, $M = 717.20$ g/mol.

DC: $R_f = 0.05-0.2$ (CHCl_3).

MALDI-MS (CHCA): m/z : ber. für $\text{C}_{47}\text{H}_{88}\text{O}_4\text{Na}$: 739.66, gef.: 739.64 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

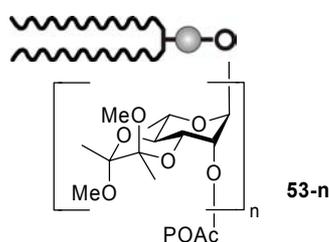
HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für $\text{C}_{47}\text{H}_{88}\text{O}_4\text{Na}$: 739.65748, gef.: 739.65819 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), $\Delta m/z = 0.96$ ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.36$ (d, 2H, ArH, $^3J = 8.1$ Hz), 7.31 (d, 2H, ArH, $^3J = 8.1$ Hz), 4.69 (s, 2H, O- CH_2 -Ar), 4.66 (s, 2H, O- CH_2 -OH), 3.70 (m, 1H, CH(OR)), 3.51 (m, 4H, O- CH_2), 3.42 (t, 4H, O- CH_2 - C_{18}), 1.66 (b, 1H, -OH), 1.55 (m, 4H, CH_2), 1.24 (m, 60H, CH_2), 0.87 (t, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 140.1, 138.3, 127.9, 126.9, 77.1, 71.9, 71.7, 71.0, 65.1, 31.9, 29.7, 29.3, 26.1, 22.7, 14.1$.

6.3.5 HASP-Synthesen von Oligorhamnanen

6.3.5.1 1-O-[bis-1,3-Octadecyl-oxy-propyl-(2-oxymethyl-(phenyl-4-methoxy))]-2-O-phenoxyacetyl-oligo-(3,4-O-(2,3-dimethoxybutan-2,3-diyl))-(1→2)- α -L-rhamnopyranosid (53-n)



(Exemplarisch für $n = 1$): Unter Argonatmosphäre werden 2-[(4-Hydroxymethylphenyl)-methoxy]-bis-1,3-octadecyl-2-propan **52** (0.117 mmol, 93.8 mg) und der Rhamnosendonor 3,4-O-(2,3-Dimethoxybutan-2,3-diyl)-2-O-phenoxyacetyl- α -L-rhamnopyranosyl-trichloracetimidat **6** (2 eq, 0.234 mmol, 130.3 mg) in abs. DCM (1.0 ml pro 100 mg Donor) vorge-

legt. Bei RT werden 0.05 eq einer frisch zubereiteten TMSOTf-Lösung in abs. DCM (112 μ l, 0.05 M) zugegeben. Es wird 30 min gerührt und nach Beendigung der Reaktion mit DIPEA (10 μ l) neutralisiert.

Die Reaktionslösung wird im Reaktionsgefäß mit Reversed-Phase-Kieselgel (1.5 g, Grom-Sil ODS-4 HE, 50 μ Korngröße, 120 Å Porengröße) aufgenommen und zur Adsorption der Lipid-getaggten Verbindung durch Evaporation am Büchi-Syncore von Lösungsmitteln befreit. Das trockene Kieselgel wird daraufhin in ein verschraubbares Glasgefäß mit Fritte und Hahn (modifizierte Schüttelente) überführt und jeweils dreimal mit einer Methanol/Wasser-Mischung (8 ml, 80:20) durch starkes Schütteln (3 min) gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift mittels Druckluft abfiltriert wird. Nach dem dritten Waschschrift wird wasserfreies Magnesiumsulfat (einfaches Bettvolumen) und DCM (10 ml) zugegeben und die Suspension geschüttelt (30 min). Die desorbierten Verbindungen werden durch Filtration mit Druckluft eluiert und in einem geeigneten Gefäß aufgefangen. Zur vollständigen Produktfreisetzung spült man nochmals zweimal mit DCM (10 ml, 3 min), befreit die vereinigten Filtrate am Vakuum von Lösungsmitteln und trocknet am Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz. Man erhält eine wachsartige Verbindung, die für $n = 1$ farblos bis gelblich ist, für höhere n zunehmend die für Kohlenhydrate typische bräunliche Färbung zeigt.

Allgemein: $C_{55+12n}H_{94+20n}O_{6+6n}$, $M = 851.36 + 260.29n$ g/mol.

Ausbeuten: $n = 1$: 129.6 mg (0.1167 mmol, $M = 1111.65$ g/mol, 99.7 %),
 $n = 2$: 138.9 mg (0.1012 mmol, $M = 1371.94$ g/mol, 97.2 %),
 $n = 3$: 146.7 mg (0.0898 mmol, $M = 1632.23$ g/mol, 95.7 %),
 $n = 4$: 157.8 mg (0.0834 mmol, $M = 1892.52$ g/mol, 98.0 %),
 $n = 5$: 162.6 mg (0.0755 mmol, $M = 2152.81$ g/mol, 99.2 %).

MALDI-TOF-MS (CHCA):

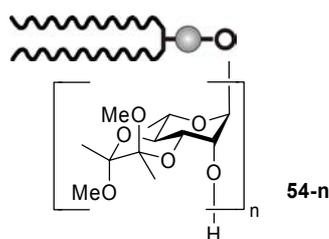
$n = 1$: m/z: ber. 1133.82, gef.: 1133.80 ($[M+Na]^+$),
 $n = 2$: m/z: ber. 1393.95, gef.: 1393.70 ($[M+Na]^+$),
 $n = 3$: m/z: ber. 1654.07, gef.: 1654.23 ($[M+Na]^+$),
 $n = 4$: m/z: ber. 1914.20, gef.: 1914.36 ($[M+Na]^+$),
 $n = 5$: m/z: ber. 2174.32, gef.: 2174.58 ($[M+Na]^+$).

$n = 1$: 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.34$ (d, 2H, ArH, $^3J = 7.8$ Hz), 7.27 (d, 2H, ArH, $^3J = 7.8$ Hz), 6.99-6.79 (m, 5H, ArH), 5.25 (d, 1H, $^3J_{1,2} < 1$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.1$ Hz, H-2), 4.82

(s, 1H, $^3J_{1,2} < 1$ Hz, *H-1*), 4.70 - 4.66 (m, 4H, POAc-CH₂ und Pr-O-CH₂), 4.66 (d, 1H, $^2J = 11.8$ Hz, H_A von Rha-O-CH₂-Ar), 4.48 (d, 1H, $^2J = 11.8$ Hz, H_B von Rha-O-CH₂-Ar), 4.13 (dd, 1H, $^3J_{2,3} = 3.1$ Hz, $^3J_{3,4} = 10.1$ Hz, *H-3*), 3.89 (m, 1H, *H-5*), 3.70 (m, 1H, CH(OR)), 3.66 (t, 1 H, $^3J_{4,5} = 10.1$ Hz, *H-4*), 3.53 (m, 4H, CH-O-CH₂), 3.43 (t, 4H, O-CH₂-C₁₈), 3.23 (s, 6H, OMe), 1.56 (m, 4H, CH₂), 1.26 (m, 3H, *H-6*), 1.25 (m, 60H, CH₂), 0.87 (t, 3H, CH₃).

n = 1: ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 168.3, 157.9, 138.7, 135.8, 132.4, 129.4, 128.1, 127.7, 121.6, 116.6, 114.7, 100.0, 99.7, 97.1, 77.1, 71.8, 71.6, 71.0, 69.2, 68.6, 66.8, 66.3, 65.1, 48.1, 47.6, 31.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 26.1, 22.6, 17.1, 17.6, 16.5, 14.1.

6.3.5.2 1-O-[bis-1,3-Octadecyl-oxy-propyl-(2-oxymethyl-(phenyl-4-methoxy))]-oligo-(3,4-O-(2,3-dimethoxybutan-2,3-diyl))-(1→2)-α-L-rhamnopyranosid (54-*n*)



(Exemplarisch für *n* = 1): Glykosylierter bis-Octadecyl-Tag 2-*O*-POAc-3,4-*O*-BDA-α-L-Rhap-(1→O-C₁₈-Tag) **53-1** (0.115 mmol, 128.0 mg) wird in DCM (4 ml) gelöst und mit 2 eq Natriummethanolat (0.230 mmol, 460 µl einer 0.5 M Lösung in Methanol) 30 min gerührt. Die Reaktionslösung wird wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Man erhält eine wachsartige farblose bis gelbliche Verbindung. Die Verbindungen für *n* = 4, 5 sind nach Aufschäumen am Hochvakuum spröde, farblose Feststoffe.

Allgemein: C_{47+12n}H_{88+20n}O_{4+6n}, M = 717.22 + 260.29*n* g/mol

Ausbeuten: *n* = 1: 103.0 mg (0.1054 mmol, M = 977.51 g/mol, 91.6 %),
 n = 2: 120.0 mg (0.0975 mmol, M = 1237.80 g/mol, 96.8 %),
 n = 3: 127.8 mg (0.0853 mmol, M = 1498.09 g/mol, 95.0 %),
 n = 4: 134.4 mg (0.0764 mmol, M = 1758.38 g/mol, 91.7 %),
 n = 5: 145.0 mg (0.0718 mmol, M = 2018.67 g/mol, 95.1 %).

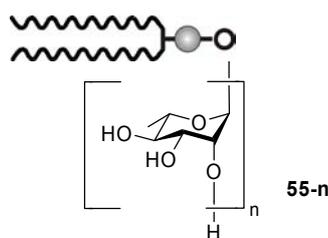
MALDI-TOF-MS (CHCA):

- n = 1: m/z: ber. 999.78 gef.:999.84 ($[M+Na]^+$),
 n = 2: m/z: ber. 1259.91, gef.:1259.95 ($[M+Na]^+$),
 n = 3: m/z: ber. 1520.04, gef.:1520.15 ($[M+Na]^+$),
 n = 4: m/z: ber. 1780.16, gef.:1780.35 ($[M+Na]^+$),
 n = 5: m/z: ber. 2040.29, gef.:2040.60 ($[M+Na]^+$).

n = 1: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.33 (d, 2H, ArH, $^3J = 7.8$ Hz), 7.27 (d, 2H, ArH, $^3J = 7.8$ Hz), 4.83 (s, 1H, $^3J_{1,2} < 1$ Hz, H-1), 4.68 (s, 2H, Pr-O- CH_2), 4.66 (d, 1H, $^2J = 11.6$ Hz, H_A von Rha-O- CH_2 -Ar), 4.46 (d, 1H, $^2J = 11.6$ Hz, H_B von Rha-O- CH_2 -Ar), 3.97 (dd, 1H, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, $^3J_{3,4} = 10.0$ Hz, H-3), 3.92 (d, 1H, $^3J_{1,2} < 1$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, H-2), 3.86 (m, 1H, H-5), 3.72 (t, 1H, $^3J_{3,4} = ^3J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4), 3.69 (m, 1H, CH(OR)), 3.52 (m, 4H, CH-O- CH_2), 3.42 (t, 4H, O- CH_2 - C_{18}), 3.24 (s, 3H, OMe), 3.23 (s, 3H, OMe), 2.44 (b, 1H, OH), 1.55 (m, 4H, CH_2), 1.28 (m, 3H, H-6), 1.24 (m, 60H, CH_2), 0.87 (t, 6H, CH_3).

n = 1: $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 138.6, 136.3, 128.1, 127.1, 100.1, 99.8, 99.0, 77.1, 71.8, 71.6, 71.0, 69.9, 68.9, 68.3, 68.2, 66.7, 48.1, 47.6, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 26.1, 22.7, 17.8, 17.6, 16.5, 14.1.

6.3.5.3 1-O-[bis-1,3-Octadecyl-oxy-propyl-(2-oxymethyl-(phenyl-4-methoxy))]-oligo-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (55-n)



(Exemplarisch für das Trisaccharid n = 3): Geschütztes bis- C_{18} -Benzyl-Tag-Trirhamnosid 3,4-O-BDA- α -L-Rhap-(1 \rightarrow O- C_{18} -Tag) **54-3** (143.2 mg, 0.0956 mmol) wird wie beschrieben auf 1.5 g RP-18-Silica immobilisiert und in ein verschraubbares Glasgefäß mit Fritte und Hahn überführt. Es wird TFA/Wasser (4 ml, 90:10) zugegeben und 10 min geschüttelt. Anschließend wird Wasser (5 ml) zugegeben, geschüttelt (3 min) und abfiltriert. Nach insgesamt drei analogen Abspaltungsschritten wird einmal mit MeOH/Wasser (4 ml, 60:40) gewaschen, wasserfreies Magnesiumsulfat (einfaches Bettvolumen) und DCM (10 ml) zugegeben und die Suspension geschüttelt (30 min). Die desorbierten Verbindungen werden

durch Filtrat mit Druckluft eluiert und in einem geeigneten Gefäß aufgefangen. Zur vollständigen Produktfreisetzung spült man nochmals zweimal mit DCM (10 ml, 3 min), befreit die vereinigten Filtrate am Vakuum von Lösungsmitteln und trocknet am Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz.

Das entschützte Trisaccharid wird in 106.2 mg Rohausbeute (0.0919 mmol, 96.1%) erhalten. Nach chromatographischer Aufreinigung (Chloroform/Methanol 8:1) erhält man einen farblosen Feststoff.

Ausbeute (für $n = 3$): 81.7 mg (0.0707 mmol, 73.9 %), $C_{65}H_{118}O_{16}$, $M = 1154.84$ g/mol.

MALDI-TOF-MS (CHCA): m/z ber. für $C_{65}H_{118}O_{16}Na$: 1177.83, gef.: 1177.84 ($[M+Na]^+$).

$n = 3$: 1H -NMR (250 MHz, $[D_6]$ -DMSO, 80 °C): $\delta = 7.29$ (s, 4H, Ar- H), 4.92 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 1.2$ Hz, H^a1), 4.82 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 1.2$ Hz, H^a2), 4.73 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 1.2$ Hz, H^a3), 4.62 (d, 1H, $^2J = 12.2$ Hz, H_A von Rha-O- CH_2 -Ar), 4.59 (s, 2H, Pr-O- CH_2), 4.45 (d, 1H, $^2J = 12.2$ Hz, H_B von Rha-O- CH_2 -Ar), 3.85-3.15 (m, 21H), 1.58-1.40 (m, 4H, CH_2), 1.35-1.15 (m, 69H, $H-6$, CH_2), 0.86 (t, 6H, CH_3).

$n = 3$: ^{13}C -NMR (100 MHz, $[D_6]$ -DMSO, 80 °C): $\delta = 126.9$, 126.8, 101.3 (C^c1), 100.3 (C^b1), 97.8 (C^a1), 76.9, 76.8, 76.4, (72.0), (71.9), (70.5), (70.4), (70.2), (70.0), (69.9), (68.3), 68.1, 67.6, 30.7, 28.7, (28.4), (28.2), 28.1, 28.0, 25.3, 25.1, 21.5, 17.4, 17.2, 17.1, 13.2.

Pentasaccharid ($n = 5$): Die analoge Acetal-Spaltung zum Pentasaccharid **55-5** wurde durchgeführt wie oben für das getaggte Trisaccharid **55-3** beschrieben. Die chromatographische Aufreinigung (Chloroform/Methanol 5:1) ergab einen farblosen Feststoff.

Ausbeute (für $n = 5$): 74.0 mg (0.0511 mmol, 72.4 %), $C_{77}H_{138}O_{24}$, $M = 1446.96$ g/mol.

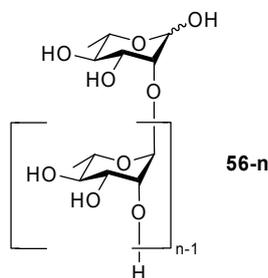
MALDI-TOF-MS (CHCA): m/z ber. für $C_{77}H_{138}O_{24}Na$: 1469.95, gef.: 1469.99 ($[M+Na]^+$).

$n = 5$: 1H NMR (250 MHz, $[D_6]$ -DMSO, 80 °C) $\delta = 7.29$ (d, 4H, Ar- H), 4.92 (m, 3H, $H-I^B$, $H-I^C$, $H-I^D$), 4.83 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 1.2$ Hz, $H-I^C$), 4.73 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 1.2$ Hz, $H-I^A$), 4.63 (d, 1H, $^2J = 12.2$ Hz, H_A von Rha-O- CH_2 -Ar), 4.59 (s, 2H, Pr-O- CH_2), 4.45 (d, 1H, $^2J = 12.2$ Hz, H_B von Rha-O- CH_2 -Ar), 3.85-3.15 (m, 29H), 1.51-1.46 (m, 4H, CH_2), 1.37-1.05 (m, 75H, $H-6$, CH_2), 0.86 (t, 6H, CH_3).

$n = 5$: ^{13}C NMR (100 MHz, $[D_6]$ -DMSO, 80 °C) $\delta = 138.0$, 136.4, 126.9, 126.8, 101.29 ($C-I^E$), 100.34, 100.14, 100.12 ($C-I^B$, $C-I^C$, $C-I^D$), 97.82 ($C-I^A$) 77.0, 76.8, 76.6, 76.5,

72.1, 72.0, 71.9, 70.5, 70.4, 70.3, 70.2, 70.1, 70.0, 69.9, 68.3, 68.2, 68.2, 68.1, 67.6, 30.8, 28.7, 28.5, 28.3, 28.1, 25.2, 21.5, 17.38, 17.32, 17.29, 17.23, 17.21, 13.2.

6.3.5.4 *Oligo-2-O-(α -L-rhamnopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)- α/β -L-rhamnose (56-n)*



(Exemplarisch für $n = 5$): Mit dem HASP-Anker 1-*O*-getaggetes Pentarhamnosid **55-5** (0.031 mmol, 44.82 mg) wurde in THF (20 ml) gelöst. Essigsäure (1 ml) wurde hinzugefügt. Nach der Zugabe von Palladium/Aktivkohle (10 % Pd⁰/C, 15 mg) wurde die Reaktionslösung in einem Standard-Hydrierapparat bei einem Wasserstoffdruck von 4 bar 16 h bei RT geschüttelt. Die Reaktionsmischung wurde durch Celite abfiltriert und das Filterbett mit Methanol (3 x 4 ml) nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden am Vakuum von den Lösungsmitteln befreit und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Chloroform/Methanol 5:4) aufgereinigt. Man erhält die bezüglich des A-Ringes anomere Mischung des vollentschützten Pentarhamnanes **56-5** als farblosen Feststoff.

Ausbeute ($n = 3$, Trirhamnan **56-3**): 30.6 mg (0.067 mmol, 96.5 %), C₁₈H₃₂O₁₃, M = 456.18 g/mol.

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für C₁₈H₃₂O₁₃Na: 479.17351, gef.: 479.17327 ([M+Na]⁺), $\Delta m/z = 0.5$ ppm.

$n = 3$: $[\alpha]_D^{20} = -27.4^\circ$ ($c = 1.0$ in H₂O).

¹H NMR (600 MHz, D₂O, Signale des α -Anomeren, $\alpha:\beta = 5:1$) $\delta = 5.12$ (d, 1H, ³J_{1,2} = 1.0 Hz, *H-1^A*), 5.05 (d, 1H, ³J_{1,2} = 1.6 Hz, *H-1^B*), 4.90 (d, 1H, ³J_{1,2} = 1.6 Hz, *H-1^C*), 4.01 (dd, 1H, ³J_{2,3} = 3.1 Hz, *H-2^B*), 3.99 (dd, 1H, ³J_{2,3} = 3.6 Hz, *H-2^C*), 3.84 (dd, 1H, ³J_{3,4} = 9.3 Hz, *H-3^B*), 3.84 (dd, 1H, ³J_{3,4} = 9.3 Hz, *H-3^C*), 3.83 (dd, 1H, ³J_{2,3} = 3.6 Hz, *H-2^A*), 3.79 (m, 1H, ³J_{5,6} = 6.2 Hz, *H-5^A*), 3.71 (dd, 1H, ³J_{3,4} = 9.8 Hz, *H-3^A*), 3.68 (m, 1H, ³J_{5,6} = 6.7 Hz, *H-5^B*), 3.65 (m, 1H, ³J_{5,6} = 6.2 Hz, *H-5^C*), 3.40 (t, 1H, ³J_{4,5} = 9.8 Hz, *H-4^B*), 3.39 (t, 1H, ³J_{4,5} = 9.3 Hz, *H-4^C*), 3.37 (t, 1H, ³J_{4,5} = 9.3 Hz, *H-4^A*), 1.21 (m, 3H, *H-6^A*), 1.20 (m, 3H, *H-6^B*), 1.19 (m, 3H, *H-6^C*).

n = 3: ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O , Signale des α -Anomeren, $\alpha:\beta = 5:1$) $\delta = 103.01$ ($C\text{-I}^C$), 101.49 ($C\text{-I}^B$), 93.48 ($C\text{-I}^A$), 79.63, 79.08, 73.06, 72.87, 72.76, 70.81, 70.62, 70.58, 70.02, 69.92, 69.21, 17.56, 17.37.

Ausbeute (n = 5, Pentarhamnan **56-5**): 21.8 mg (0.029 mmol, 93.9 %), $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_{21}$, $M = 748.30$ g/mol.

n = 5: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -28.5^\circ$ (c = 1.0 in H_2O).

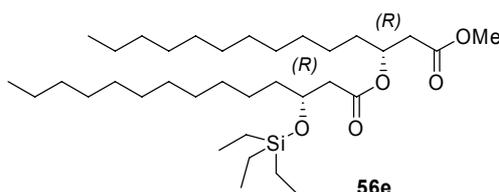
HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber.für $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_{21}\text{Na}$: 771.289329, gef.: 771.28898 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), $\Delta m/z = 0.4$ ppm.

n = 5: ^1H NMR (600 MHz, D_2O , Signale des α -Anomeren, $\alpha:\beta = 6:1$) $\delta = 5.12$ (d, 1H, $^3J_{1,2} = 1.0$ Hz, $H\text{-I}^A$), 5.05 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 1.6$ Hz, $H\text{-I}^B$), 5.02 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 1.6$ Hz, $H\text{-I}^C$), 5.02 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 1.6$ Hz, $H\text{-I}^D$), 4.89 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 1.6$ Hz, $H\text{-I}^E$), 4.01 (dd, 1H, $^3J_{2,3} = 3.6$ Hz, $H\text{-2}^C$), 4.01 (dd, 1H, $^3J_{2,3} = 3.6$ Hz, $H\text{-2}^D$), 4.00 (dd, 1H, $^3J_{2,3} = 3.6$ Hz, $H\text{-2}^B$), 3.99 (dd, 1H, $^3J_{2,3} = 3.6$ Hz, $H\text{-2}^E$), 3.84 (dd, 1H, $^3J_{2,3} = 3.6$ Hz, $H\text{-2}^A$), 3.83 (dd, 1H, $^3J_{3,4} = 9.3$ Hz, $H\text{-3}^B$), 3.82 (dd, 1H, $^3J_{3,4} = 9.3$ Hz, $H\text{-3}^C$), 3.82 (dd, 1H, $^3J_{3,4} = 9.3$ Hz, $H\text{-3}^D$), 3.81 (dd, 1H, $^3J_{3,4} = 9.3$ Hz, $H\text{-3}^E$), 3.80 (m, 1H, $^3J_{5,6} = 6.2$ Hz, $H\text{-5}^A$), 3.71 (dd, 1H, $^3J_{3,4} = 9.8$ Hz, $H\text{-3}^A$), 3.68 (m, 1H, $H\text{-5}^B$), 3.67 (m, 1H, $H\text{-5}^C$), 3.66 (m, 1H, $H\text{-5}^D$), 3.65 (m, 1H, $H\text{-5}^E$), 3.42 (t, 1H, $^3J_{4,5} = 9.8$ Hz, $H\text{-4}^B$), 3.41 (t, 1H, $^3J_{4,5} = 9.8$ Hz, $H\text{-4}^C$), 3.40 (t, 1H, $^3J_{4,5} = 9.8$ Hz, $H\text{-4}^D$), 3.39 (t, 1H, $^3J_{4,5} = 9.8$ Hz, $H\text{-4}^E$), 3.36 (t, 1H, $^3J_{4,5} = 9.3$ Hz, $H\text{-4}^A$), 1.21 (m, 3H, $H\text{-6}^A$), 1.20 (m, 9H, $H\text{-6}^B$, $H\text{-6}^C$, $H\text{-6}^D$), 1.19 (m, 3H, $H\text{-6}^E$).

n = 5: ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O , Signale des α -Anomeren, $\alpha:\beta = 6:1$): $\delta = 102.98$ ($C\text{-I}^E$), 101.59 ($C\text{-I}^D$), 101.56 ($C\text{-I}^C$), 101.51 ($C\text{-I}^B$), 93.48 ($C\text{-I}^A$), 79.69, 79.01, 78.89, 78.77, 73.09, 72.90, 72.79, 72.61, 70.87, 70.85, 70.83, 70.74, 70.71, 70.64, 70.06, 69.92, 69.23, 17.58, 17.41, 17.38.

6.3.6 HASP-Synthesen von Rhamnolipiden

6.3.6.1 (*R*)-3-*O*-((*R*)-3'-*O*-TES-Myristyl)-myristinsäuremethylester (**56e**)



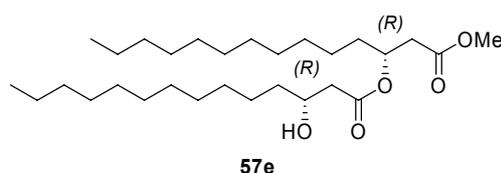
Zu einer Lösung von (*R*)-3-Hydroxymyristinsäuremethylester **18e** (103.4 mg, 0.4 mmol), (*R*-3-*O*-TES-Myristinsäure **22c** (286.9 mg, 0.8 mmol) in abs. DCM (3 ml) wird EDC (230 mg, 1.2 mmol) gegeben und in Gegenwart einer katalytischen Menge DMAP (15 mg) 12 h bei RT geschüttelt (Büchi Syncore Plattform). Nach Beendigung der Reaktion wird RP-18 Kieselgel (ca. 2 g - 2.5 g; 8-10 % Retentionskapazität) zugegeben, die Suspension kurz geschüttelt um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten und das Lösungsmittel durch vorsichtige Evaporation entfernt. Die adsorbierte Reaktionslösung wird dreimal mit einer Methanol/Wasser-Mischung (8 ml, 80:20) durch starkes Schütteln (3 min) gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift abfiltriert wird. Das trägergebundene Dilipid wird ohne Isolation direkt weiterumgesetzt.

Zur Charakterisierung wurde **56e** wie folgt isoliert: Nach dem dritten Waschschrift wird wasserfreies Magnesiumsulfat (einfaches Bettvolumen) und DCM (10 ml) zugegeben und die Suspension geschüttelt (30 min). Die desorbierten Verbindungen werden durch Filtration eluiert und in einem geeigneten Gefäß aufgefangen. Zur vollständigen Produktfreisetzung spült man nochmals zweimal mit DCM (10 ml, 3 min), befreit die vereinigten Filtrate am Vakuum von Lösungsmitteln und trocknet am Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz. Man erhält ein farbloses, klares Öl.

Ausbeute: 233.6 mg (97.5 %), C₃₅H₇₀O₅Si, M = 599.0 g/mol.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.18 (m, 1 H, CH-O), 4.07 (m, 1 H, CH-OSi), 3.65, (s, 3 H, OMe), 2.62-2.40 (m, 4 H, α-CH₂, α'-CH₂), 1.58-1.24 (m, 40 H, CH₂), 0.93 (t, 9 H, CH₃, TES-CH₃), 0.86 (t, 6 H, CH₃), 0.58 (q, 6 H, TES-CH₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.0, 170.8, 70.5, 69.1, 51.7, 42.9, 38.9, 37.5, 33.9, 31.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 25.1, 22.7, 14.1, 6.8, 4.9.

6.3.6.2 (R)-3-O-((R)-3'-Hydroxymyristyl)-myristinsäuremethylester (57e)

(R)-3-O-[(R)-3'-O-TES-Myristyl]-myristinsäuremethylester **56e** (239.6 mg, 0.40 mmol), der nach der vorhergehenden Umsetzung und Aufarbeitung auf RP-18 Träger immobilisiert ist, wird in Methanol/Wasser (3.8 ml, 80/20, v/v) suspendiert. Zur Suspension werden 200 μ l TFA gegeben (Endkonzentration 5 % TFA v/v) und die Suspension wird für 20 min geschüttelt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionslösung abfiltriert und das Produkt wie in Kap. 6.3.6.1 beschrieben nach dreimaligem Waschen mit MgSO_4 getrocknet und drei Mal mit DCM eluiert. Man erhält ein farbloses, klares Öl.

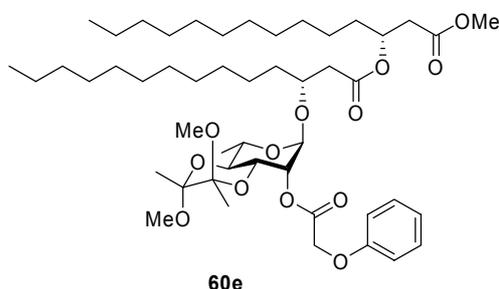
Ausbeute: 190.4 mg (98.2 %), $\text{C}_{29}\text{H}_{56}\text{O}_5$, $M = 484.75$ g/mol.

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{56}\text{O}_5\text{Na}$: 507.40200, gef.: 507.40241 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), $\Delta m/z = 0.8$ ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.25$ (m, 1 H, CH-O-C=O), 3.98 (m, 1 H, CH-OH), 3.66, (s, 3 H, OMe), 2.81 (b, 1 H, OH) 2.57-2.34 (m, 4 H, $\alpha\text{-CH}_2$, $\alpha'\text{-CH}_2$), 1.61-1.24 (m, 40 H, CH_2), 0.87 (t, 6 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 172.5$, 171.1, 70.9, 68.3, 51.9, 41.8, 39.0, 36.5, 34.0, 31.9, 29.6, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 25.5, 25.1, 22.7, 14.1.

6.3.6.3 1-*O*-((*R*)-3'-Oxymyristyl-(*R*)-3-*O*-myristinsäuremethylester)-2-*O*-phenoxyacetyl-(3,4-*O*-(2,3-dimethoxybutan-2,3-diyl))- α -L-rhamnopyranosid (**60e**)



Zu einer Lösung des Dilipides (*R*)-3-*O*-[(*R*)-3'-Hydroxymyristyl]-myristinsäuremethylester **57e** (104.2 mg, 0.215 mmol) und des Donors 3,4-*O*-(2,3-Dimethoxybutan-2,3-diyl)-2-*O*-phenoxyacetyl- α -L-rhamnopyranosyl-trichloracetimidat **6** (155.6 mg, 0.28 mmol) in abs. DCM (3 ml) werden 5 Kügelchen Molsieb (4 Å) gegeben und die Reaktionslösung geschüttelt (Büchi Syncore Plattform). Nach 10 min wird TMSOTf (0.05 eq, 215 μ l einer frisch zubereiteten 0.05 M Lösung in abs. DCM) zugegeben und weitere 30 min bei RT geschüttelt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionslösung mit DIPEA (ca. 10 μ l; Zugabe bis zur Entfärbung) neutralisiert. Die Aufarbeitung erfolgt mit RP-18 Kieselgel (ca. 2 g - 10 % Retentionskapazität) und Methanol/Wasser (8 ml, 80:20) wie bereits oben beschrieben. Zur spektroskopischen Charakterisierung und zur Quantifizierung wurde **60e** wie bereits oben beschrieben isoliert. Man erhält ein leicht gelbliches, klares Öl.

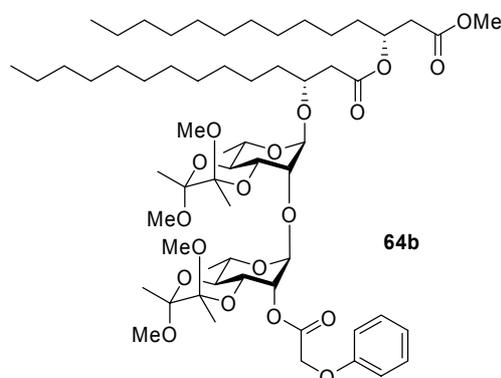
Ausbeute: 177.3 mg (93.8 %), C₄₉H₈₂O₁₃, M = 879.16 g/mol.

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für C₄₉H₈₂O₁₃ Na: 901.56476, gef.: 901.46425 ([M+Na]⁺), $\Delta m/z = 0.57$ ppm.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.29$ - 6.91 (m, 5 H, ArH), 5.14 (m, 1 H, CH-O-C=O), 5.09 (d, 1 H, ³J_{1,2} < 1 Hz, ³J_{2,3} = 2.8 Hz, H-2), 4.80 (s, 1 H, ³J_{1,2} < 1 Hz, H-1), 4.65 (s, 2 H, POAc-CH₂), 3.97 (dd, 1 H, ³J_{2,3} = 2.8 Hz, ³J_{3,4} = 10.1 Hz, H-3), 3.96 (m, 1 H, CH-O-Rha), 3.80 (m, 1 H, H-5), 3.60, (s, 3 H, OMe), 3.54 (t, 1 H, ³J_{4,5} = 10.1 Hz, H-4), 3.17 (s, 3 H, BDA-OMe), 3.15 (s, 3 H, BDA-OMe), 2.60-2.34 (m, 4 H, α -CH₂, α' -CH₂), 1.54-1.18 (m, 49 H, CH₂, H-6, BDA-Me), 0.81 (t, 6 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.8$, 170.4, 168.5, 157.9, 129.5, 121.6, 114.8, 100.0, 99.7, 97.2, 75.4, 71.7, 70.8, 68.6, 67.0, 66.1, 65.2, 51.7, 48.0, 47.6, 40.3, 38.9, 33.9, 31.9, 31.8, 29.6, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.5, 29.3, 29.3, 25.1, 24.8, 22.7, 17.7, 17.6, 16.5, 14.1.

6.3.6.4 1-O-((R)-3'-Oxymyristyl-(R)-3-O-myristinsäuremethylester)-3,4-O-(2,3-dimethoxybutan-2,3-diyl)-2-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(3',4'-O-(2,3-dimethoxybutan-2,3-diyl))-2'-O-phenoxyacetyl]-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (64b)



Zur Glykosylierung der 2-OH-Gruppe des Rhamnolipides BDA-HO-RL-1,2₁₄-COOMe werden zu einer Lösung von **61e** (160.0 mg, 0.215 mmol) in abs. DCM (3 ml) zwei Äquivalente des Donors 3,4-O-(2,3-Dimethoxybutan-2,3-diyl)-2-O-phenoxyacetyl- α -L-rhamnopyranosyl-trichloracetimidat **6** (239.2 mg, 0.43 mmol) gegeben. Die Glykosylierung wird mit TMSOTf (0.05 eq, 215 μ l einer frisch zubereiteten 0.05 M Lösung in abs. DCM) wie für die Erstglykosylierung zu **60e** beschrieben durchgeführt. Auch die HASP-Aufarbeitung wird direkt übernommen. Man erhält ein am Hochvakuum aufschäumbares, zähes leicht gelbliches Öl.

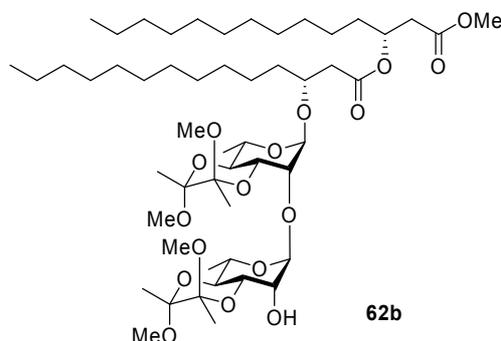
Ausbeute: 240.45 mg (98.3 %), C₆₁H₁₀₂O₁₉, M = 1139.45 g/mol.

ESI-MS: [M+Na]⁺ = 1161.3 m/z.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.35-6.78 (m, 5 H, ArH), 5.43 (dd, 1 H, ³J_{1,2} < 1 Hz, ³J_{2,3} = 2.8 Hz, H-2^A), 5.18 (m, 1 H, CH-O-C=O), 5.10 (d, 1 H, ³J_{1,2} < 1 Hz, H-1^A), 4.77 (d, 1 H, ³J_{1,2} < 1 Hz, H-1^B), 4.67 (s, 2 H, POAc-CH₂), 3.96 (dd, 1 H, ³J_{2,3} = 2.8 Hz, ³J_{3,4} = 10.1 Hz, H-3^A), 4.03-3.59 (m, 10 H, H-2^B, H-3^B, H-4^B, H-5^B, H-4^A, H-5^A, CH-O-Rha, OMe), 3.26-3.16 (4s, 12 H, BDA-OMe), 2.63-2.35 (m, 4 H, α -CH₂, α' -CH₂), 1.58-1.18 (m, 58 H, CH₂, H-6^A, H-6^B, BDA-Me), 0.85 (t, 6 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.8, 170.4, 167.7, 158.0, 129.4, 121.5, 114.7, 100.0, 99.8, 99.7, 99.4, 99.0, 98.8, 75.6, 74.7, 71.0, 70.7, 68.7, 68.5, 68.4, 67.3, 67.1, 66.4, 65.2, 51.8, 47.9, 47.8, 47.6, 47.4, 40.4, 38.9, 33.9, 33.7, 31.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 25.1, 24.9, 22.7, 17.8, 17.8, 17.7, 17.7, 17.6, 17.5, 14.1.

6.3.6.5 1-O-((R)-3'-Oxymyristyl-(R)-3-O-myristinsäuremethylester)-3,4-O-(2,3-dimethoxybutan-2,3-diyl)-2-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(3',4'-O-(2,3-dimethoxybutan-2,3-diyl))]- (1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (62b)



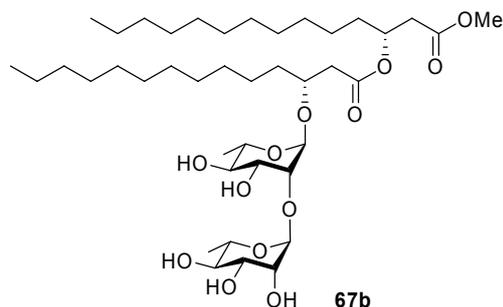
Glykosyliertes Rhamnolipid BDA-POAc-RL-2,2₁₄-COOMe **64b** (224.0 mg, 0.197 mmol), das nach der vorhergehenden Umsetzung und Aufarbeitung auf RP-18 Träger immobilisiert ist, wird in Methanol/THF (4 ml, 1:1) suspendiert. Zur Suspension werden 684 μ l Methylamin (40 eq einer 40 %igen, 11.5 M wässrigen Lösung) gegeben und die Suspension wird 60 min geschüttelt. Nach Beendigung der Reaktion wird Wasser zugegeben (12 ml), die Reaktionslösung abfiltriert und das Produkt wie in Kap. 6.3.6.1 beschrieben nach dreimaligem Waschen (MeOH/Wasser, 80/20) mit MgSO₄ getrocknet und dreimal mit DCM eluiert. Man erhält ein zähes Öl, das am Hochvakuum aufschäumbar ist.

Ausbeute: 182.8 mg (92.5 %), C₅₃H₉₆O₁₇, M = 1005.32 g/mol.

ESI-MS: [M+Na]⁺ = 1027.7 m/z.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.19 (m, 1 H, CH-O-C=O), 5.09 (d, 1 H, ³J_{1,2} < 1 Hz, H-1^A), 4.77 (d, 1 H, ³J_{1,2} < 1 Hz, H-1^B), 4.07 (dd, 1 H, ³J_{1,2} < 1 Hz, ³J_{2,3} = 2.8 Hz, H-2^A), 3.99-3.96 (m, 2 H, CH-O-Rha, H-3^A), 3.87-3.83 (m, 3 H, H-5^A, H-2^B, H-3^B), 3.77-3.64, (m, 5 H, H-5^B, H-4^A, OMe), 3.56 (t, 1 H, ³J_{4,5} = 10.1 Hz, H-4^B), 3.28-3.17 (4s, 12 H, BDA-OMe), 2.64-2.36 (m, 4 H, α -CH₂, α' -CH₂), 2.08 (b, 1 H, OH), 1.59-1.17 (m, 58 H, CH₂, H-6^A, H-6^B, BDA-Me), 0.86 (t, 6 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.8, 170.4, 101.0, 100.0, 99.7, 99.5, 99.4, 99.0, 75.2, 74.6, 70.6, 69.6, 68.6, 68.4, 68.3, 67.9, 67.1, 66.8, 51.7, 47.8, 47.7, 47.6, 47.4, 40.4, 38.9, 33.9, 33.6, 31.9, 29.6, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.3, 25.1, 24.8, 22.6, 17.8, 17.7, 17.6, 17.6, 16.5, 16.6, 14.1.

6.3.6.6 1-O-((R)-3'-Oxymyristyl-(R)-3-O-myristinsäuremethylester)-2-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (67b)

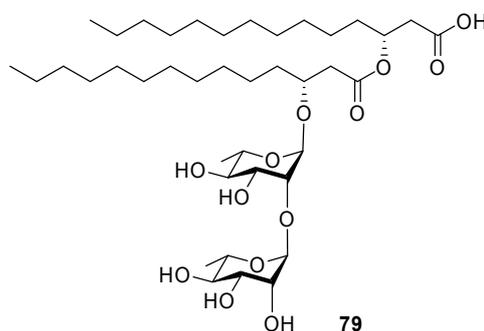
Acetalgeschützter Rhamnolipidmethylester BDA-RL-2,2₁₄-COOMe **62b** (144.6 mg, 0.144 mmol), der von der vorhergehenden Umsetzung und Aufarbeitung auf RP-18 Träger (ca. 2 g) immobilisiert ist, wird in TFA/Wasser (4 ml, 90:10 v/v) suspendiert. Die Suspension wird 10 min geschüttelt, anschließend Wasser (5 ml) zugegeben und die Reaktionslösung abfiltriert. Die BDA-Abspaltung wird insgesamt dreimal durchgeführt. Nach dem letzten Filtrationsschritt wird wie in Kap. 6.3.6.1 beschrieben dreimal gewaschen (MeOH/Wasser, 80/20), mit MgSO₄ getrocknet und dreimal mit DCM eluiert. Man erhält ein zähes Öl, das am Hochvakuum aufschäumbar ist.

Ausbeute: 109.6 mg (98.1 %), C₄₁H₇₆O₁₃, M = 776.53 g/mol.

MALDI-TOF-MS: [M+Na]⁺ = 799.1 m/z.

Auf eine vollständige NMR-spektroskopische Charakterisierung wurde aufgrund des stark amphipilen Charakters der Verbindung verzichtet, da das damit verbundene Aggregationsverhalten eine genügende Signalauflösung unter NMR-Routinebedingungen unterbindet.

6.3.6.7 1-O-((R)-3'-Oxymyristyl-(R)-3-O-myristinsäure)-2-O- α -L-rhamno- pyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (79)



Der vollständig geschützte Methylester RL-2,2₁₄-COOMe **67b** (104.6 mg, 0.135 mmol) und Lipase aus *Candida Antarctica* (270 mg, 2 g/mmol; CAL-B, Fluka bzw. Novozym 435, kovalent immobilisiert auf Eupergit[®]-Acrylharzperlen, Aktivität > 2 U/mg) werden in DMSO/Na_iPO₄-Puffer(5 ml, 1:4, v/v, Puffer auf pH 7 eingestellt) suspendiert. Die Hydrolysereaktion wird 72 h bei 40 °C mit einer Büchi[®]Syncore-Syntheseplattform geschüttelt (300 Upm), wobei das Substrat anfänglich nicht vollständig emulgiert wird. Nach Beendigung der Reaktion wird das Wasser durch Evaporation entfernt und der Rückstand über eine Kieselgelsäule (60 ml SiO₂, CHCl₃/MeOH/HOAc 30:3:1) isokratisch chromatographiert. Nach Entfernen der Lösungsmittel am Hochvakuum und dreimaligem Lyophilisieren aus *tert.*-Butanol/Wasser (4:1, v/v) erhält man einen farblosen Feststoff.

Ausbeute: 85.7 mg (83.4 %), C₄₀H₇₄O₁₃, M = 763.01 g/mol.

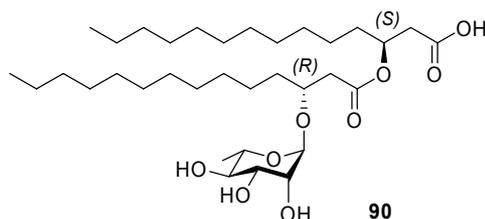
MALDI-TOF-MS: [M+Na]⁺ = 785.4 m/z, [M-H+2Na]⁺ = 807.5 m/z.

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für C₄₀H₇₄O₁₃Na: 785.50216, gef.: 785.50155 ([M+Na]⁺), Δm/z = 1.20 ppm.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃COOD): δ = 5.32 (m, 1 H, CH³-O), 5.04 (s, 1 H, ³J_{1,2} < 1 Hz, H-1^A), 5.00 (s, 1 H, ³J_{1,2} < 1 Hz, H-1^B), 4.13 (m, 2 H, CH³'-O-Rha, H-2^B), 3.91-3.86 (m, 3 H, H-3^A, H-3^B, H-2^A), 3.81 (m, 1 H, H-5^A), 3.75 (m, 1 H, H-5^B), 3.57 (t, 1 H, ³J_{4,5} = 9.3 Hz, H-4^A), 3.50 (t, 1 H, ³J_{4,5} = 9.3 Hz, H-4^B), 2.64-2.50 (m, 4 H, α-CH₂, α'-CH₂), 1.65-1.24 (m, 46 H, CH₂, H-6^A, H-6^B), 0.87 (t, 6 H, CH₃).

¹³C-NMR (150 MHz, CD₃COOD): δ = 104.6, 99.5, 81.8, 76.4, 75.8, 75.4, 73.8, 73.7, 73.5, 73.2, 71.4, 71.1, 42.5, 41.6, 36.5, 35.4, 34.4, 32.2, 32.1, 32.1, 32.0, 32.0, 31.9, 31.8, 27.5, 27.2, 25.1, 19.4, 19.3, 16.0.

6.3.6.8 1-O-((R)-3'-Oxymyristyl-(S)-3-O-myristinsäure)- α -L-rhamno- pyranosid (90)



Der (3'R,3S)-Rhamnolidbenzylester RL-1,2_{(R)14,(S)14}-COOBn **88** (0.089 mmol, 62.8 mg) wurde in THF (20 ml) gelöst. Essigsäure (1 ml) wurde hinzugefügt. Nach der Zugabe von Palladium/Aktivkohle (10 % Pd⁰/C, 30 mg) wurde die Reaktionslösung in einem Standard-Hydrierapparat bei einem Wasserstoffdruck von 4 bar 5 h bei RT geschüttelt. Die Reaktionsmischung wurde durch Celite abfiltriert und das Filterbett gründlichst mit THF, HOAc und CHCl₃ nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden am Vakuum von den Lösungsmitteln befreit und das Rohprodukt isokratisch chromatographiert (60 ml SiO₂, CHCl₃/MeOH/HOAc 40:1:1). Nach Entfernen der Lösungsmittel am Hochvakuum und dreimaligem Lyophilisieren aus *tert.*-Butanol/Wasser (4:1, v/v) erhält man einen farblosen Feststoff.

Ausbeute: 41.3 mg (75.4 %), C₃₄H₆₄O₉, M = 616.87 g/mol.

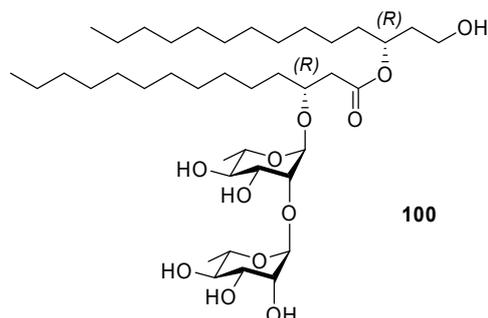
MALDI-TOF-MS: [M+Na]⁺ = 639.9 m/z, [M-H+2Na]⁺ = 661.6 m/z.

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für C₃₄H₆₄O₉Na: 639.44425, gef.: 639.44499 ([M+Na]⁺), $\Delta m/z = 1.20$ ppm.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃COOD): $\delta = 5.27$ (m, 1 H, CH³-O), 4.98 (s, 1 H, ³J_{1,2} = 1.0 Hz, H-1), 4.09 (m, 1 H, CH^{3'}-O-Rha), 3.96 (dd, 1 H, ³J_{1,2} = 1.0 Hz, ³J_{2,3} = 3.1 Hz, H-2), 3.83 (dd, 1 H, ³J_{2,3} = 3.1 Hz, ³J_{3,4} = 9.3 Hz, H-3), 3.79 (m, 1 H, H-5), 3.56 (t, 1 H, ³J_{4,5} = 9.3 Hz, H-4), 2.68-2.54 (m, 4 H, α -CH₂, α' -CH₂), 1.69-1.26 (m, 43 H, CH₂, H-6), 0.89 (t, 6 H, CH₃).

¹³C-NMR (150 MHz, CD₃COOD): $\delta = 176.8, 172.5, 100.1, 75.9, 73.9, 72.5, 72.4, 72.2, 69.8, 41.3, 39.5, 34.8, 34.4, 32.9, 30.7, 30.6, 30.6, 30.5, 30.4, 30.3, 26.1, 25.9, 23.6, 27.7, 14.4$.

6.3.6.9 1-O-((R)-3'-Oxymyristyl-(R)-3-O-myristylalkohol)-2-O- α -L-rhamno- pyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (100)



Die Reaktionslösung THF/H₂O/MeOH (8 ml, 70:20:10, v/v) wurde mit einer 0.1 N LiOH-Lösung am pH-Meter auf pH 8.5 eingestellt und zum vorgelegten Rhamnolipidalkohol-acetylesther RL-2,2-CH₂OAc **98** (0.051 mmol, 40.2 mg) gegeben. Es wird 2 h bei RT gerührt; die Reaktion wird per DC-Kontrolle überwacht. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionslösung mit einer verdünnten KHSO₄-Lösung neutralisiert und in einem einmaligen HASP-Schritt (MeOH/H₂O 80:20) von Salzen befreit. Das Rohprodukt wird isokratisch chromatographiert (60 ml SiO₂, CHCl₃/MeOH/HOAc 25:2:1). Nach Entfernen der Lösungsmittel am Hochvakuum und dreimaligem Lyophilisieren aus *tert.*-Butanol/Wasser (4:1, v/v) erhält man einen farblosen Feststoff.

Ausbeute: 26.7 mg (70.2 %), C₄₀H₇₆O₁₂, M = 749.04 g/mol.

MALDI-TOF-MS: [M+Na]⁺ = 771.4 m/z.

HR-MS (FT-ICR-MS): m/z ber. für C₄₀H₇₆O₁₂Na: 771.52290, gef.: 771.52263 ([M+Na]⁺), Δ m/z = 0.35 ppm.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃COOD): δ = 5.04 (s, 1 H, ³J_{1,2} < 1 Hz, H-1^A), 5.01 (s, 1 H, ³J_{1,2} < 1 Hz, H-1^B), 4.30-4.16 (m, 2 H, CH₂-OH), 4.14-4.11 (m, 2 H, CH^{3'}-O-Rha, H-2^B), 3.89-3.65 (m, 6 H, CH-CH₂OH, H-2^A, H-3^A, H-3^B, H-5^A, H-5^B), 3.57 (t, 1 H, ³J_{4,5} = 9.3 Hz, H-4^A), 3.51 (t, 1 H, ³J_{4,5} = 9.3 Hz, H-4^B), 2.59-2.52 (m, 4 H, α -CH₂, α' -CH₂), 1.89-1.69 (m, 2 H, CH₂-CH₂OH), 1.61-1.24 (m, 46 H, CH₂, H-6^A, H-6^B), 0.86 (t, 6 H, CH₃).

¹³C-NMR (150 MHz, CD₃COOD, ausgewählte Signale via 2D-HMBC-NMR, da eine vollständige Auflösung des ¹³C-NMR durch die Aggregation der amphipilen Verbindung unterbunden wird): δ = 102.7, 97.6, 79.6, 74.9, 73.5, 73.3, 71.6, 71.1, 69.3, 69.3, 69.1, 69.0, 65.5, 52.0, 41.0.

6.3.7 Rückgewinnung von RP-18 Kieselgel

Das gesammelte verunreinigte RP-18 Kieselgel der HASP-Synthesen wurde in einer großen Glasfilternutsche (Por. 3) mit 200 ml Methanol suspendiert und mit 200 ml heißem Wasser versetzt. Nach kurzem Rühren wurde das Filtrat mittels einer Saugflasche abgesaugt. Diese Prozedur wurde fünf Mal wiederholt. Anschließend wurde mit Methanol gewaschen. Das so von Magnesiumsulfat (Löslichkeit in Wasser: MgSO_4 anh.– 450 g/l bei 40 °C, MgSO_4 -Heptahydrat – 710 g/l bei 20 °C) und anderen Salzen befreite RP-18 Kieselgel wurde in der Nutsche durch Absaugen von Lösungsmitteln befreit und in die Extraktionshülse eines 500 ml Soxhlet-Extraktors überführt. Durch 48-stündiges Extrahieren mit Dichlormethan konnte das RP-18 Material von organisch löslichen Bestandteilen befreit werden (ein Extraktionszyklus dauerte bei 65 °C Ölbadtemperatur ca. 75 min, d.h. insgesamt ca. 40 Extraktionsvorgänge). Das so gereinigte Kieselgel wurde am Hochvakuum von Dichlormethan befreit.

Rückgewinnungsrate: Von insgesamt 100 g in der Synthese eingesetztem RP-18 konnten nach obiger Aufreinigung 96 g sauberes RP-18 wiedergewonnen werden.

7 Anhang

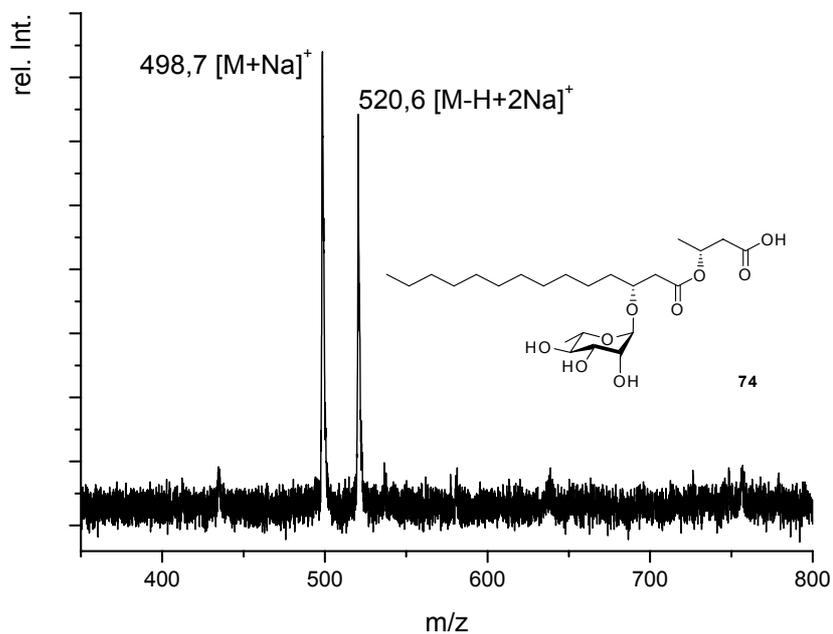


Abb. 7-1: MALDI-TOF-MS der Verbindung 74.

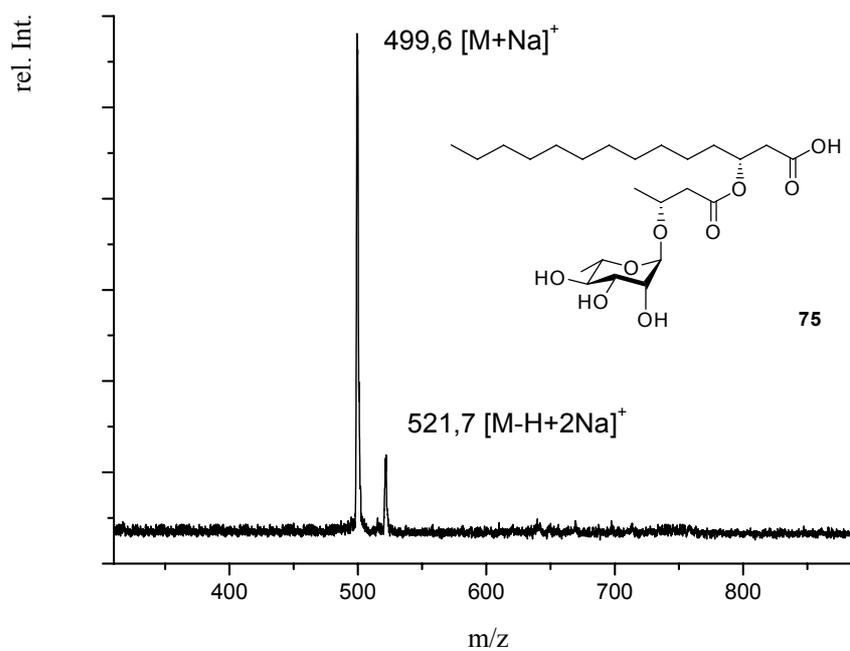


Abb. 7-2: MALDI-TOF-MS der Verbindung 75.

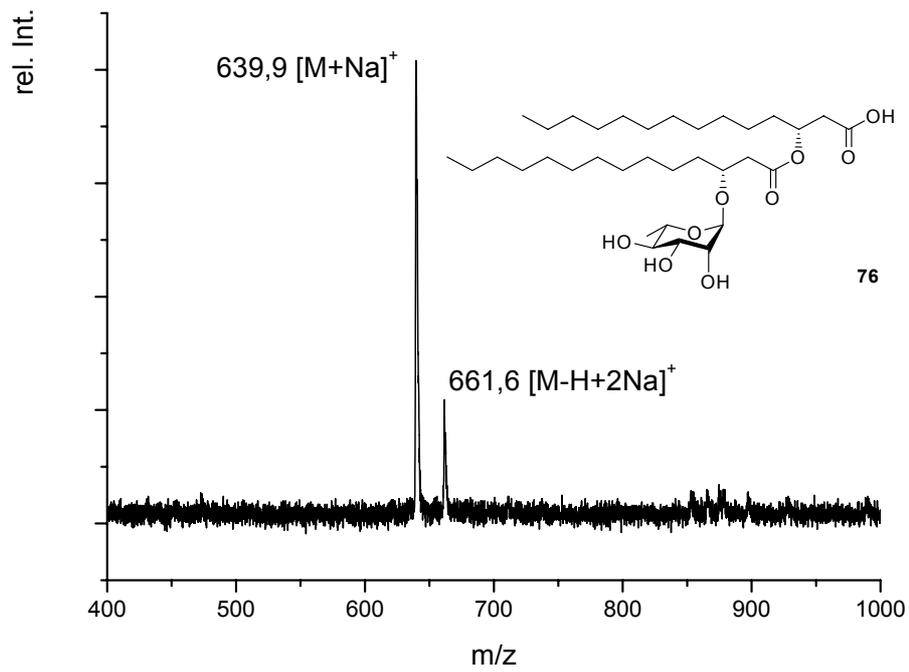


Abb. 7-3: MALDI-TOF-MS der Verbindung 76.

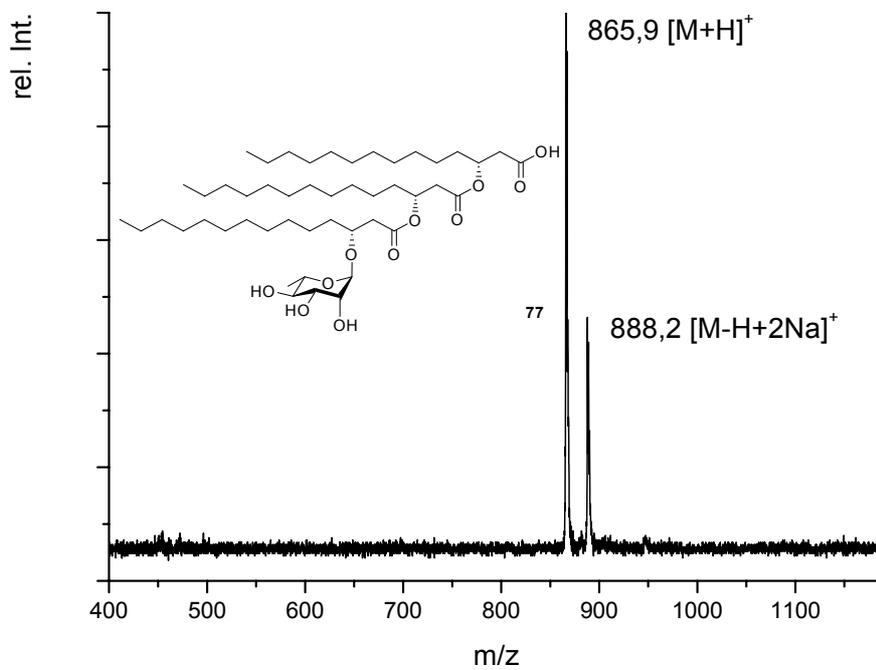


Abb. 7-4: MALDI-TOF-MS der Verbindung 77.

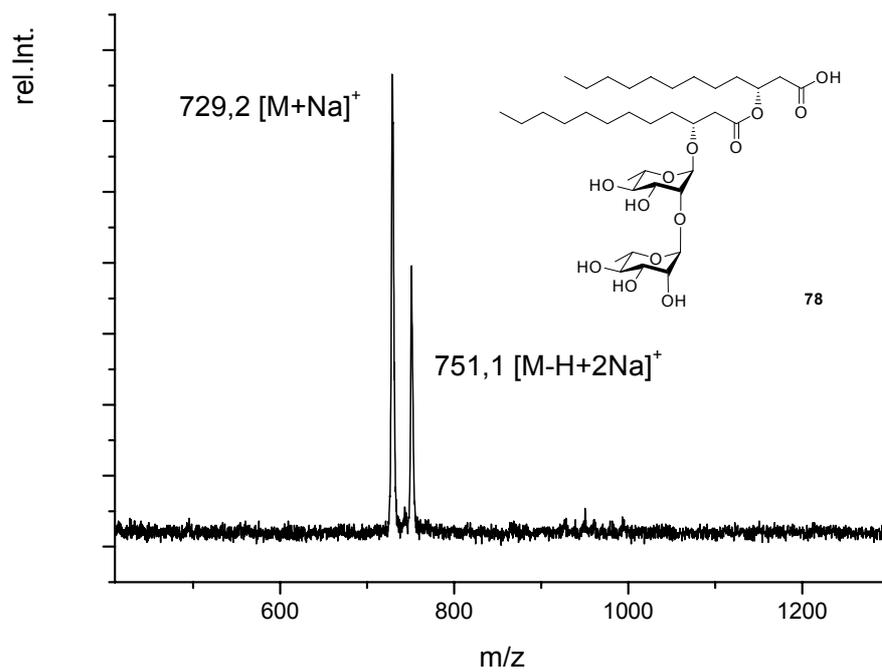


Abb. 7-5: MALDI-TOF-MS der Verbindung 78.

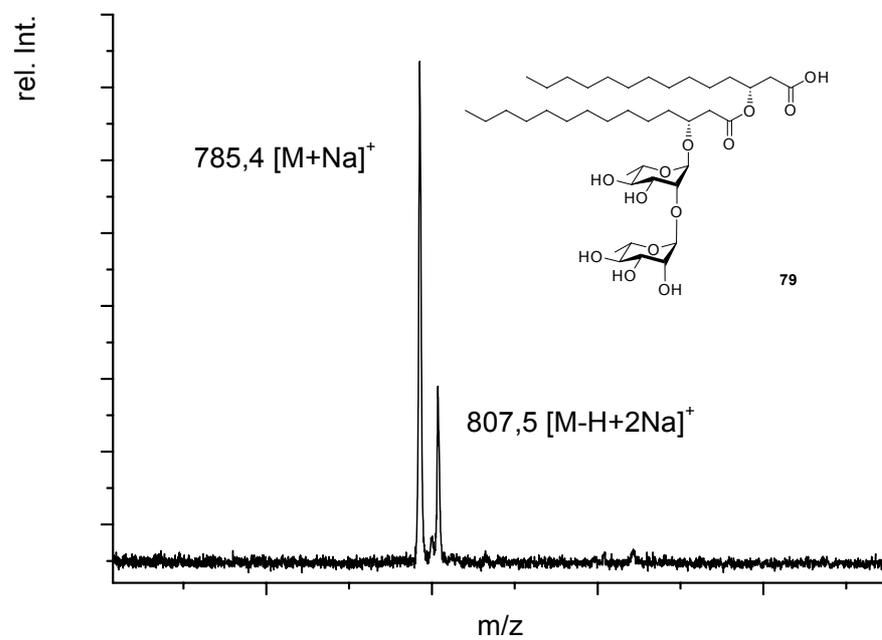


Abb. 7-6: MALDI-TOF-MS der Verbindung 79.

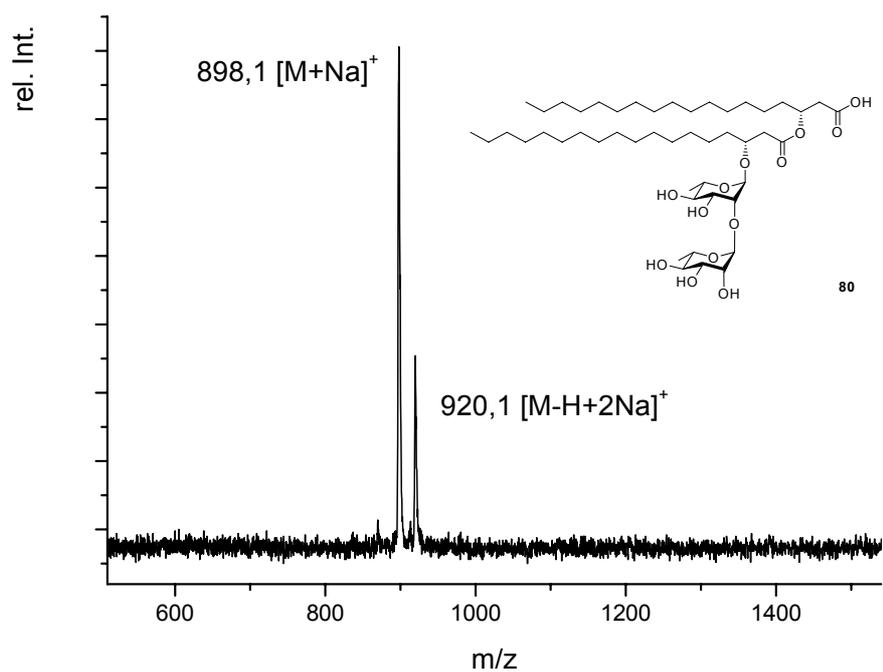


Abb. 7-7: MALDI-TOF-MS der Verbindung **80**.

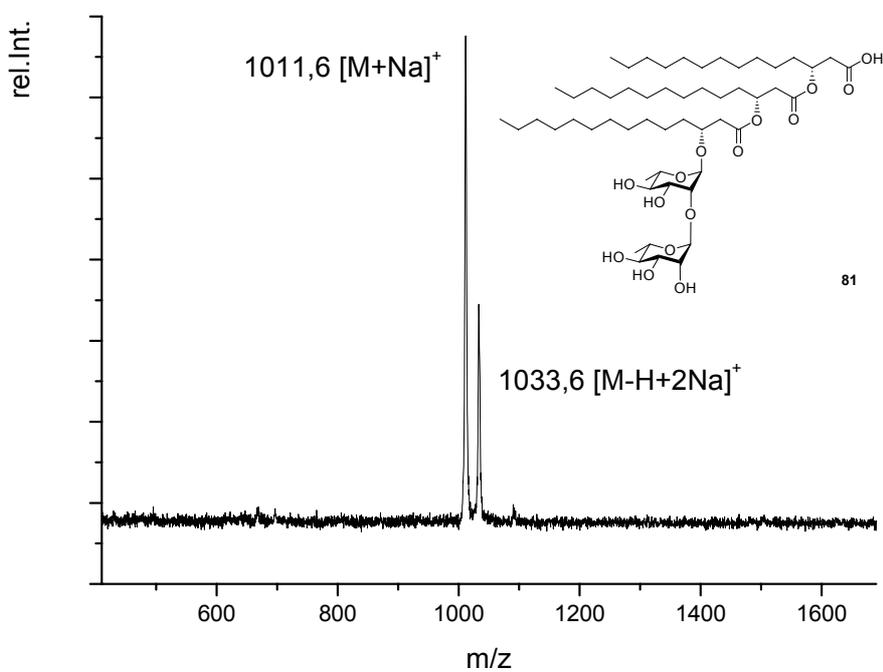


Abb. 7-8: MALDI-TOF-MS der Verbindung **81**.

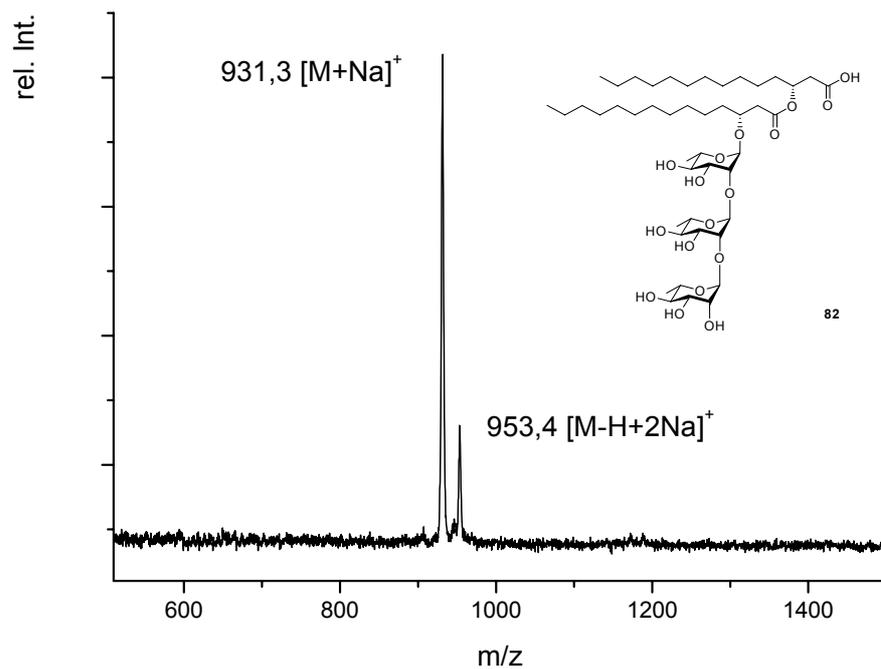


Abb. 7-9: MALDI-TOF-MS der Verbindung 82.

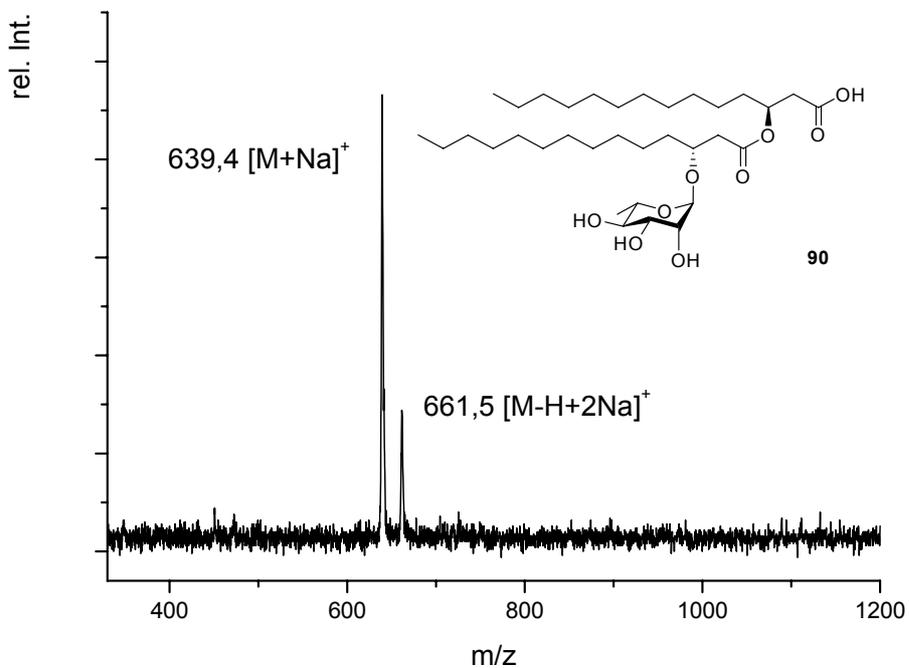


Abb. 7-10: MALDI-TOF-MS der Verbindung 90.

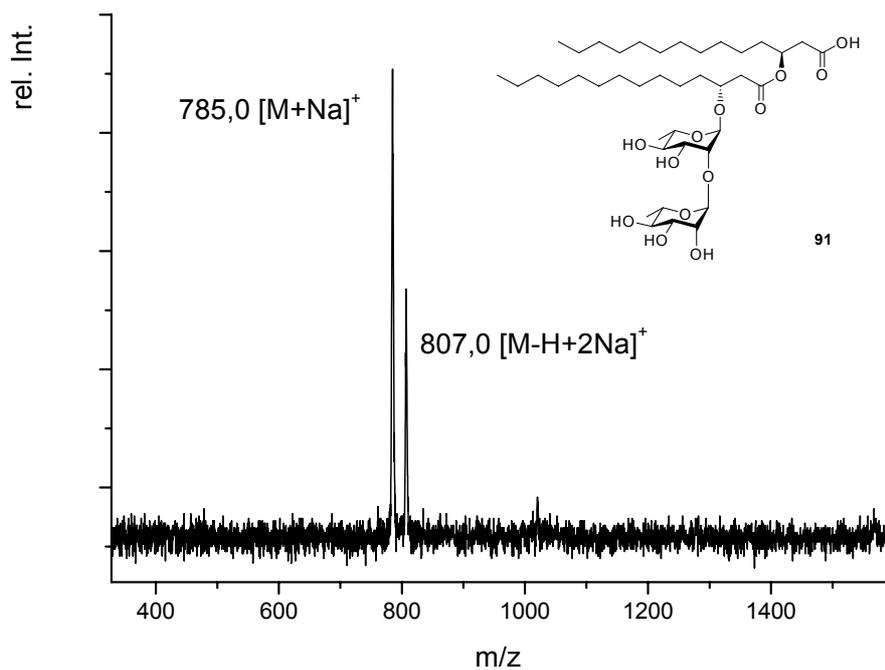


Abb. 7-11: MALDI-TOF-MS der Verbindung 91.

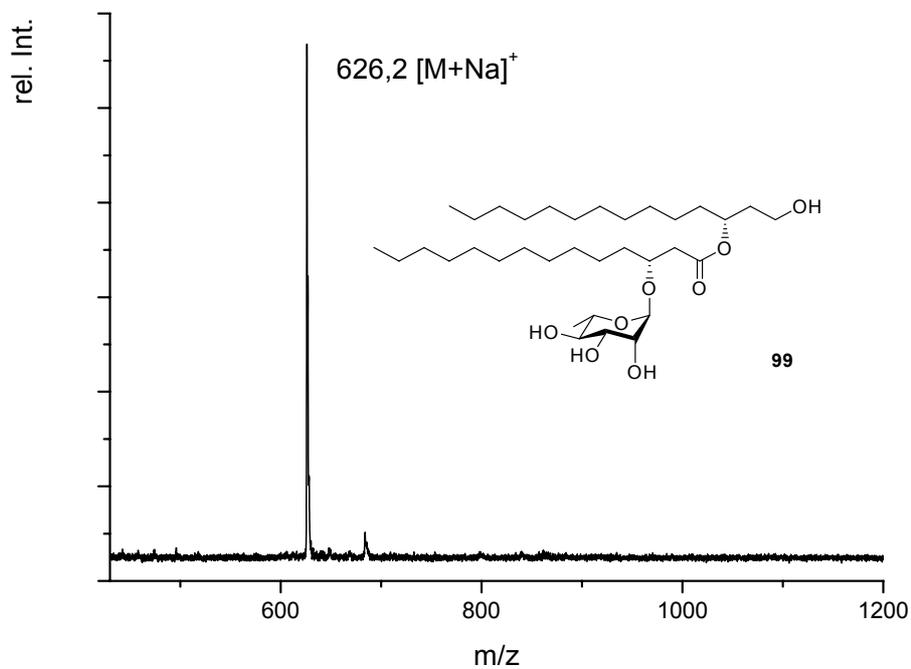


Abb. 7-12: MALDI-TOF-MS der Verbindung 99.

8 Literaturverzeichnis

- [1] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* 2149-2160.
- [2] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, *97* 801-812.
- [3] G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **1992**, *4* 375-500.
- [4] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87* 3526-3527.
- [5] M. H. Caruthers, *Science* **1985**, *230* 281-285.
- [6] G. Jung (ed.), *Combinatorial peptide and nonpeptide libraries*, Wiley-VCH, Weinheim **1996**.
- [7] K. Kroger, J. Bauer, B. Fleckenstein, J. Rademann, G. Jung, G. Gauglitz, *Biosensors & Bioelectronics* **2002**, *17* 937-944.
- [8] O. Birkert, R. Tuennemann, G. Jung, G. Gauglitz, *Anal. Chem.* **2002**, *74* 834-840.
- [9] J. S. Fruechtel, G. Jung, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35* 17-42.
- [10] C. Schuerch, J. M. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* 492-496.
- [11] I. J. Goldstein, H. C. Winter, R. D. Poretz, *New Comprehensive Biochemistry* **1997**, *29b* 403-474.
- [12] M. D. Lee, T. S. Dunne, C. C. Chang, M. M. Siegel, G. O. Morton, G. A. Ellestad, W. J. McGahren, D. B. Borders, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* 985-997.
- [13] P. H. Seeberger, W. C. Haase, *Chem. Rev.* **2000**, *100* 4349-4393.
- [14] J. Rademann, A. Geyer, R. R. Schmidt, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37* 1241-1245.
- [15] H.-J. Gabius, *Naturwissenschaften* **2000**, *87* 108-121.
- [16] R. A. Lane, in *The Information-Storing Potential of the Sugar Code*, Eds.: H.-J. Gabius, S. Gabius, Chapman & Hall, London; **1997**, 1-2.
- [17] H. M. I. Osborn, P. G. Evans, N. Gemmell, S. D. Osborne, *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56* 691-702.
- [18] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2000**, *39* 836-863.
- [19] Schmidt, Karen, *New Scientist* **2002**, *176* 34-39.
- [20] Z. Shriver, S. Raguram, R. Sasisekharan, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* 863-873.
- [21] T. Leisinger, R. Margraff, *Microbiol. Rev.* **1979**, *43* 422-442.
- [22] S. Haussler, M. Nimtz, T. Domke, V. Wray, I. Steinmetz, *Infect. Immun.* **1998**, *66* 1588-1593.
- [23] J. Andrä, J. Rademann, J. Howe, M. J. H. Koch, H. Heine, U. Zähringer, K. Brandenburg, *submitted* **2005**.
- [24] P. Sears, C. H. Wong, *Science* **2001**, *291* 2344-2350.
- [25] R. U. Lemieux, K. B. Hendriks, R. V. Stick, K. James, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97* 4056-4062.
- [26] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **1980**, *92* 763-764.
- [27] L. Yan, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* 9239-9248.
- [28] T. Mukaiyama, Y. Murai, S. Shoda, *Chem. Lett.* **1981**, 431-432.
- [29] G. J. S. Lohman, P. H. Seeberger, *J. Org. Chem.* **2003**, *68* 7541-7543.

- [30] B. Fraser-Reid, U. E. Udodong, Z. Wu, H. Ottosson, J. R. Merritt, C. S. Rao, C. Roberts, R. Madsen, *Synlett* **1992**, 927-942.
- [31] W. Koenigs, E. Knorr, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1901**, 34 957-981.
- [32] J. Dahmen, T. Frejd, G. Groenberg, T. Lave, G. Magnusson, G. Noori, *Carbohydr. Res.* **1983**, 116 303-307.
- [33] O. J. Plante, R. B. Andrade, P. H. Seeberger, *Organic Letters* **1999**, 1 211-214.
- [34] H. Kondo, Y. Ichikawa, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114 8748-8750.
- [35] S. Mehta, B. M. Pinto, *J. Org. Chem.* **1993**, 58 3269-3276.
- [36] V. Wittmann, C. H. Wong, *J. Org. Chem.* **1997**, 62 2144-2147.
- [37] S. Pan, H. Li, F. Hong, B. Yu, K. Zhao, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 6139-6142.
- [38] M. Imamura, H. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37 1451-1454.
- [39] W. R. Roush, X. F. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117 2236-2250.
- [40] A. Kirschning, G. W. Chen, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40 4665-4668.
- [41] K. Toshima, H. Nagai, S. Matsumura, *Synlett* **1999**, 1420-1422.
- [42] A. Vasella, *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65 731-752.
- [43] P. H. Seeberger, S. J. Danishefsky, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31 685-695.
- [44] L. Panza, L. Lay, in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Eds. B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, 195-233.
- [45] G. J. Boons, S. Isles, *J. Org. Chem.* **1996**, 61 4262-4271.
- [46] B. Fraser-Reid, Z. Wu, U. E. Udodong, H. Ottosson, *J. Org. Chem.* **1990**, 55 6068-6070.
- [47] R. Roy, F. O. Andersson, M. Letellier, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33 6053-6056.
- [48] R. R. Schmidt, M. Reichrath, *Angew. Chem.* **1979**, 91 497-499.
- [49] G. Hodosi, P. Kovac, *Carbohydr. Res.* **1998**, 308 63-75.
- [50] G. Hodosi, P. Kovac, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119 2335-2336.
- [51] F. Barresi, O. Hindsgaul, *Can. J. Chem.* **1994**, 72 1447-1465.
- [52] T. Iimori, T. Shibazaki, S. Ikegami, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37 2267-2270.
- [53] H. Ohtake, N. Ichiba, S. Ikegami, *J. Org. Chem.* 65 8171-8179.
- [54] G. Stork, G. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114 1087-1088.
- [55] Y. Ito, Y. Ohnishi, T. Ogawa, Y. Nakahara, *Synlett* **1998**, 1102-1104.
- [56] G. Lemanski, T. Ziegler, *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83 2676-2697.
- [57] D. R. Mootoo, P. Konradsson, U. Udodong, B. Fraser-Reid, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110 5583-5584.
- [58] N. L. Douglas, S. V. Ley, U. Lucking, S. L. Warriner, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 51-66.
- [59] Z. Zhang, I. R. Ollmann, X. S. Ye, R. Wischnat, T. Baasov, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121 734-753.
- [60] J. Pietruszka, H. M. I. Osborn (Ed.), Academic Press, **2003**, 195-216.
- [61] S. I. Hashimoto, H. Sakamoto, T. Honda, H. Abe, S. I. Nakamura, S. Ikegami, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 8969-8972.
- [62] T. Zhu, G. J. Boons, *Org. Lett.* **2001**, 3 4201-4203.

-
- [63] D. K. Baeschlin, A. R. Chaperon, L. G. Green, M. G. Hahn, S. J. Ince, S. V. Ley, *Chem.Eur.J.* **2000**, *6* 172-186.
- [64] Z. Zhang, I. R. Ollmann, X. S. Ye, R. Wischnat, T. Baasov, C. H. Wong, *J.Am.Chem.Soc.* **1999**, *121* 734-753.
- [65] X. S. Ye, C. H. Wong, *J.Org.Chem.* **2000**, *65* 2410-2431.
- [66] A. Reidel, H. Waldmann, *J.Prakt.Chem.* **1993**, *335* 109-127.
- [67] H. Waldmann, D. Sebastian, *Chem.Rev.* **1994**, *94* 911-937.
- [68] J. F. Tolborg, L. Petersen, K. J. Jensen, C. Mayer, D. L. Jakeman, R. A. Warren, S. G. Withers, *J.Org.Chem.* **2002**, *67* 4143-4149.
- [69] D. J. Vocadlo, S. G. Withers, in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Eds. B. Ernst, G.W. Hart, P. Sinay, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, 723-844.
- [70] E. J. Hehre, *Carbohydr.Res.* **2001**, *331* 347-368.
- [71] J. Nahalka, Z. Liu, X. Chen, P. G. Wang, *Chem.Eur.J.* **2003**, *9* 372-377.
- [72] M. J. Davies, *Trends in Biotechnology* **2001**, *19* 164-169.
- [73] A. Byra, K. Dworniczak, T. Szumilo, *Acta Biochim.Pol.* **1991**, *38* 101-105.
- [74] S. Koizumi, T. Endo, K. Tabata, A. Ozaki, *Nat Biotechnol.* **1998**, *16* 847-850.
- [75] X. Chen, Z. Liu, J. Zhang, W. Zhang, P. Kowal, P. G. Wang, *ChemBioChem* **2002**, *3* 47-53.
- [76] S. V. Ley, I. R. Baxendale, R. N. Bream, P. S. Jackson, A. G. Leach, D. A. Longbottom, M. Nesi, J. S. Scott, R. I. Storer, S. J. Taylor, *Perkin 1* **2000**, 3815-4195.
- [77] O. Kanie, G. Grotenbreg, C. H. Wong, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl* **2000**, *39* 4545-4547.
- [78] D. J. Gravert, K. D. Janda, *Chem.Rev.* **1997**, *97* 489-509.
- [79] S. P. Douglas, D. M. Whitfield, J. J. Krepinsky, *J.Am.Chem.Soc.* **1995**, *117* 2116-2117.
- [80] J. J. Krepinsky, S. P. Douglas, in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Eds. B. Ernst, G.W. Hart, P. Sinay, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, 239-262.
- [81] R. D. Guthrie, A. D. Jenkins, J. Stehlicek, *Journal of the Chemical Society* **1971**, 2690-2696.
- [82] Schmidt, Richard and Rademann, Joerg. Patent, BASF AG, 19621177, 24-5-1996.
- [83] P. Seneci, *Solid Phase Synthesis and Combinatorial Technologies*, Wiley VCH, Weinheim **2000**.
- [84] E. Bayer, *Angew.Chem.* **1991**, *103* 117-133.
- [85] J. Rademann, M. Grotli, M. Meldal, K. Bock, *J.Am.Chem.Soc.* **1999**, *121* 5459-5466.
- [86] Y. C. Liang, F. Svec, J. M. J. Frechet, *J.Polym.Sci., Part A: Polym.Chem.* **1997**, *35* 2631-2643.
- [87] A. Heckel, E. Mross, K. H. Jung, J. Rademann, R. R. Schmidt, *Synlett* **1998**, 171-173.
- [88] S. Manabe, Y. Ito, T. Ogawa, *Synlett* **1998**, 628-630.
- [89] S. Mehta, D. Whitfield, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* 5907-5910.
- [90] D. Weigelt, G. Magnusson, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* 2839-2842.
- [91] L. Kononov, Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* 1599-1602.

- [92] K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, F. DeRoose, *J.Am.Chem.Soc.* **1997**, *119* 449-450.
- [93] L. Yan, C. M. Taylor, R. Goodnow, Jr., D. Kahne, *J.Am.Chem.Soc.* **1994**, *116* 6953-6954.
- [94] J. Rademann, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* 3989-3990.
- [95] K. C. Nicolaou, N. Watanabe, J. Li, J. Pastor, N. Winssinger, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl* **1998**, *37* 1559-1561.
- [96] R. B. Andrade, O. J. Plante, L. G. Melean, P. H. Seeberger, *Org.Lett.* **1999**, *1* 1811-1814.
- [97] A. K. Choudhury, I. Mukherjee, B. Mukhopadhyay, N. Roy, *J.Carbohydr.Chem.* **1999**, *18* 361-367.
- [98] S. P. Douglas, D. M. Whitfield, J. J. Krepinsky, *J.Am.Chem.Soc.* **1991**, *113* 5095-5097.
- [99] M. Adinolfi, G. Barone, L. De Napoli, L. Guariniello, A. Iadonisi, G. Piccialli, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* 2607-2610.
- [100] K. Fukase, Y. Nakai, K. Egusa, J. A. Porco, Jr., S. Kusumoto, *Synlett* **1999**, 1074-1078.
- [101] J. F. Tolborg, K. J. Jensen, *Chem.Comm.* **2000**, 147-148.
- [102] J. A. Hunt, W. R. Roush, *J.Am.Chem.Soc.* **1996**, *118* 9998-9999.
- [103] T. Doi, M. Sugiki, H. Yamada, T. Takahashi, J. A. Porco, Jr., *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* 2141-2144.
- [104] S. J. Danishefsky, K. F. McClure, J. T. Randolph, R. B. Ruggeri, *Science* **1993**, *260* 1307-1309.
- [105] Y. Ito, O. Kanie, T. Ogawa, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl.* **1996**, *35* 2510-2512.
- [106] J. Jaunzems, D. Kashin, A. Schoenberger, A. Kirschning, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3435-3446.
- [107] J. Jaunzems, E. Hofer, M. Jesberger, G. Sourkouni-Argirusi, A. Kirschning, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl* **2003**, *42* 1166-1170.
- [108] E. R. Palmacci, M. C. Hewitt, P. H. Seeberger, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl* **2001**, *40* 4433-4437.
- [109] H. Ando, S. Manabe, Y. Nakahara, Y. Ito, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl* **2001**, *40* 4725-4728.
- [110] S. Hanashima, S. Manabe, Y. Ito, *Synlett* **2003**, 979-982.
- [111] K. Egusa, S. Kusumoto, K. Fukase, *Synlett* **2001**, 777-780.
- [112] K. Egusa, K. Fukase, Y. Nakai, S. Kusumoto, *Synlett* **2000**, 27-32.
- [113] H. Ando, S. Manabe, Y. Nakahara, Y. Ito, *J.Am.Chem.Soc.* **2001**, *123* 3848-3849.
- [114] D. P. Curran, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl* **1998**, *37* 1175-1196.
- [115] C. C. Tzschucke, C. Markert, W. Bannwarth, S. Roller, A. Hebel, R. Haag, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl* **2002**, *41* 3964-4000.
- [116] S. Dandapani, D. P. Curran, S. V. Ley, A. Massi, F. Rodriguez, D. C. Harwell, R. A. Lewthwaite, M. C. Pritchard, A. M. Reid, S. Q. Zhang, K. Fukase, M. Izumi, Y. Fukase, S. Kusumoto, T. Bosanac, J. Yang, C. S. Wilcox, *Chemtracts* **2001**, *14* 635-641.
- [117] W. Zhang, *Curr.Opin.DrugDiscov.Devel.* **2004**, *7* 784-797.

- [118] J. H. Davis, Jr., *Chem.Lett.* **2004**, 33 1072-1077.
- [119] P. Lan, J. A. Porco, Jr., M. S. South, J. J. Parlow, *J.Comb.Chem.* **2003**, 5 660-669.
- [120] A. G. M. Barrett, B. T. Hopkins, J. Koeberling, *Chem.Rev.* **2002**, 102 3301-3323.
- [121] S. V. Ley, A. Massi, F. Rodriguez, D. C. Horwell, R. A. Lewthwaite, M. C. Pritchard, A. M. Reid, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl.* **2001**, 40 1053-1055.
- [122] S. Q. Zhang, K. Fukase, S. Kusumoto, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40 7479-7483.
- [123] S. Q. Zhang, K. Fukase, M. Izumi, Y. Fukase, S. Kusumoto, *Synlett* **2001**, 590-596.
- [124] Y. Fukase, S. Q. Zhang, K. Iseki, M. Oikawa, K. Fukase, S. Kusumoto, *Synlett* **2001**, 1693-1698.
- [125] J. Blodgett, T. Li, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45 6649-6652.
- [126] A. M. Hay, S. Hobbs-Dewitt, A. A. MacDonald, R. Ramage, *Synthesis* **1999**, 1979-1985.
- [127] L. Manzoni, *Chem.Comm.* **2003**, 2930-2931.
- [128] T. Miura, K. Goto, D. Hosaka, T. Inazu, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl.* **2003**, 42 2047-2051.
- [129] R. M. Kim, M. Manna, S. M. Hutchins, P. R. Griffin, N. A. Yates, A. M. Bernick, K. T. Chapman, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1996**, 93 10012-10017.
- [130] B. Beutler, E. T. Rietschel, *Nat.Rev. Immunol.* **2003**, 3 169-176.
- [131] D. C. Angus, W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, M. R. Pinsky, *Crit.Care Med.* **2001**, 29 1303-1310.
- [132] D. Pittet, D. Tarara, R. P. Wenzel, *JAMA* **1994**, 271 1598-1601.
- [133] H. F. Geerdes, D. Ziegler, H. Lode, M. Hund, A. Loehr, W. Fangmann, J. Wagner, *Clin Infect Dis.* **1992**, 15 991-1002.
- [134] A. J. Ulmer, E. Th. Rietschel, U. Zahringer, H. Heine, *TIGG* **2002**, 14 53-68.
- [135] E. T. Rietschel, H. Brade, O. Holst, L. Brade, S. Muller-Loennies, U. Mamat, U. Zahringer, F. Beckmann, U. Seydel, K. Brandenburg, A. J. Ulmer, T. Mattern, H. Heine, J. Schletter, H. Loppnow, U. Schonbeck, H. D. Flad, S. Hauschildt, U. F. Schade, F. Di Padova, S. Kusumoto, R. R. Schumann, *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **1996**, 216 39-81.
- [136] E. S. Van Amersfoort, T. J. C. Van Berkel, J. Kuiper, *Clin.Microbiol.Rev.* **2003**, 16 379-414.
- [137] K. Anderson, V. L. Bokla, C. Nüsslein-Volhard, *Cell* **1985**, 42 791-798.
- [138] S. Hauschildt, P. Hoffmann, H. U. Beuscher, G. Dufhues, P. Heinrich, K. H. Wiesmueller, G. Jung, W. G. Bessler, *Eur.J.Immunol.* **1990**, 20 63-68.
- [139] S. Akira, K. Takeda, *Nat.Rev. Immunol.* **2004**, 4 499-511.
- [140] E. Lien, T. K. Means, H. Heine, A. Yoshimura, S. Kusumoto, K. Fukase, M. J. Fenton, M. Oikawa, N. Qureshi, B. Monks, R. W. Finberg, R. R. Ingalls, D. T. Golenbock, *J.Clin.Invest.* **2000**, 105 497-504.
- [141] O. Takeuchi, K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, S. Akira, *Immunity* **1999**, 11 443-451.
- [142] A. Ozinsky, D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, A. Aderem, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **2000**, 97 13766-13771.
- [143] F. Hayashi, K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, A. Aderem, *Nature* **2001**, 410 1099-1103.

- [144] L. Alexopoulou, A. C. Holt, R. Medzhitov, R. A. Flavell, *Nature* **2001**, *413* 732-738.
- [145] H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, S. Akira, *Nature* **2000**, *408* 740-745.
- [146] S. E. Girardin, L. H. Travassos, M. Herve, D. Blanot, I. G. Boneca, D. J. Philpott, P. J. Sansonetti, D. Mengin-Lecreux, *J.Biol.Chem.* **2003**, *278* 41702-41708.
- [147] J. K. Bell, G. E. D. Mullen, C. A. Leifer, A. Mazzoni, D. R. Davies, D. M. Segal, *Trends Immunol.* **2003**, *24* 528-533.
- [148] R. R. Schumann, S. R. Leong, G. W. Flaggs, P. W. Gray, S. D. Wright, J. C. Mathison, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, *Science* **1990**, *249* 1429-1431.
- [149] S. Akashi, Y. Nagai, H. Ogata, M. Oikawa, K. Fukase, S. Kusumoto, K. Kawasaki, M. Nishijima, S. Hayashi, M. Kimoto, K. Miyake, *Int.Immunol.* **2001**, *13* 1595-1599.
- [150] S. D. Wright, R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, J. C. Mathison, *Science* **1990**, *249* 1431-1433.
- [151] H. Wesche, W. J. Henzel, W. Shillinglaw, S. Li, Z. Cao, *Immunity* **1997**, *7* 837-847.
- [152] X. Li, M. Commane, C. Burns, K. Vithalani, Z. Cao, G. R. Stark, *Mol.Cell.Biol.* **1999**, *19* 4643-4652.
- [153] N. Suzuki, S. Suzuki, G. S. Duncan, D. G. Millar, T. Wada, C. Mirtsos, H. Takada, A. Wakeham, A. Itie, S. Li, J. M. Penninger, H. Wesche, P. S. Ohashi, T. W. Mak, W. C. Yeh, *Nature* **2002**, *416* 750-756.
- [154] S. Bergstrom, H. Theorell, H. Davide, *Arkiv Kemi, Mineral.Geol.* **1946**, *A23* 12.
- [155] P. Westerduin, P. E. De Haan, M. J. Dees, J. H. Van Boom, *Carbohydr.Res.* **1988**, *180* 195-205.
- [156] H. I. Duynstee, M. J. Van Vliet, G. A. Van der Marel, J. H. Van Boom, *Eur.J.Org.Chem.* **1998**, 303-307.
- [157] M. Richter, J. M. Willey, R. Süßmuth, G. Jung, H. P. Fiedler, *FEMS Microbiol.Lett.* **1998**, *163* 165-171.
- [158] E. Z. Ron, E. Rosenberg, *Environ.Microbiol.* **2001**, *3* 229-236.
- [159] S. Lang, D. Wullbrandt, *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **1999**, *51* 22-32.
- [160] M. Benincasa, A. Abalos, I. Oliveira, A. Manresa, *Antonie Van Leeuwenhoek* **2004**, *85* 1-8.
- [161] E. Haba, A. Pinazo, O. Jauregui, M. J. Espuny, M. R. Infante, A. Manresa, *Bio-technol.Bioeng.* **2003**, *81* 316-322.
- [162] Goran, P. and Visnja, P., *Chem.Abstr.* **1996**, *124* 106655-106655.
- [163] W. H. Noordman, D. B. Janssen, *Appl.Environ.Microbiol.* **2002**, *68* 4502-4508.
- [164] S. C. U. Nwachukwu, P. James, T. R. Gurney, *Environ.Biol.* **2001**, *22* 153-162.
- [165] F. G. Jarvis, M. J. Johnson, *J.Am.Chem.Soc.* **1949**, *71* 4124-4126.
- [166] H. G. Hauthal, *Nachr.Chem.Tech.Lab* **1994**, *42* 285-287.
- [167] G. Döring, in *Chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection in cystic fibrosis patients*, Eds.: M. Campa, M. Bendinelli, H. Friedmann, Plenum Press, New York **1993**, 245-273.
- [168] M. K. Johnson, D. Boese-Marrazzo, *Infect.Immun.* **1980**, *29* 1028-1033.

- [169] C. Syldatk, S. Lang, F. Wagner, V. Wray, L. Witte, *Z.Naturforsch.[C]* **1985**, 40 51-60.
- [170] R. M. Maier, G. Soberon-Chavez, *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **2000**, 54 625-633.
- [171] T. Hirayama, I. Kato, *FEBS Lett.* **1982**, 139 81-85.
- [172] C. D. McClure, N. L. Schiller, *J.Leukocyte Biol.* **1992**, 51 97-102.
- [173] C. D. McClure, N. L. Schiller, *Curr.Microbiol* **1996**, 33 109-117.
- [174] S. Haussler, M. Rohde, N. von Neuhoff, M. Nimtz, I. Steinmetz, *Infect.Immun.* **2003**, 71 2970-2975.
- [175] A. Hall, *Science* **1998**, 279 509-514.
- [176] K. M. George, L. P. Barker, D. M. Welty, P. L. C. Small, *Infect.Immun.* **1998**, 66 587-593.
- [177] K. M. George, D. Chatterjee, G. Gunawardana, D. Welty, J. Hayman, R. Lee, P. L. C. Small, *Science* **1999**, 283 854-857.
- [178] A. B. Schromm, K. Brandenburg, H. Loppnow, A. P. Moran, M. H. J. Koch, E. T. Rietschel, U. Seydel, *Eur.J.Biochem.* **2000**, 267 2008-2013.
- [179] K. Brandenburg, F. Wagner, M. Mueller, H. Heine, J. Andrae, M. H. J. Koch, U. Zaehring, U. Seydel, *Eur.J.Biochem.* **2003**, 270 3271-3279.
- [180] S. Vogel, M. J. Hirschfeld, P. Y. Perera, *J.Endotoxin Res.* **2001**, 7 237-241.
- [181] P. Y. Perera, T. N. Mayadas, O. Takeuchi, S. Akira, M. Zaks-Zilberman, S. M. Goyert, S. N. Vogel, *J.Immunol.* **2001**, 166 574-581.
- [182] B. C. Jang, T. Y. Jung, J. H. Paik, Y. K. Kwon, S. W. Shin, S. P. Kim, J. S. Ha, M. H. Suh, S. I. Suh, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **2005**, 328 70-77.
- [183] T. Ziegler, *Angew.Chem.* **1994**, 106 2362-2365.
- [184] S. V. Ley, H. W. M. Priepeke, S. L. Warriner, *Angew.Chem.* **1994**, 106 2410-2412.
- [185] S. V. Ley, M. Woods, A. Zanotti-Gerosa, *Synthesis* **1992**, 52-54.
- [186] S. V. Ley, P. Michel, *Synlett* **2001**, 1793-1795.
- [187] V. Pozsgay, H. J. Jennings, *J.Org.Chem.* **1988**, 53 4042-4052.
- [188] M. Grathwohl, R. R. Schmidt, *Synthesis* **2001**, 2263-2272.
- [189] P. M. B. Barua, P. R. Sahu, E. Mondal, G. Bose, A. T. Khan, *Synlett* **2002**, 81-84.
- [190] E. Mondal, P. M. B. Barua, G. Bose, A. T. Khan, *Chem.Lett.* **2002**, 210-211.
- [191] M. S. Motawia, J. Marcussen, B. L. Moeller, *J.Carbohydr.Chem.* **1995**, 14 1279-1294.
- [192] Y. Oikawa, K. Sugano, O. Yonemitsu, *J.Org.Chem.* **1978**, 43 2087-2088.
- [193] I. Ciucanu, D. Pop, V. Timocanu, *J.Chromatogr.* **1988**, 436 219-228.
- [194] R. Noyori, T. Ohkuma, M. Kitamura, H. Takaya, N. Sayo, H. Kumobayashi, S. Akutagawa, *J.Am.Chem.Soc.* **1987**, 109 5856-5858.
- [195] M. Kitamura, M. Tokunaga, T. Ohkuma, R. Noyori, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32 4163-4166.
- [196] M. Kitamura, M. Tokunaga, T. Ohkuma, R. Noyori, *Org.Synth.* **1993**, 71 1-13.
- [197] E. Kuesters, C. Spoendlin, C. Volken, C. Eder, *Chromatographia* **1992**, 33 159-162.
- [198] D. Parker, *Chem.Rev.* **1991**, 91 1441-1457.
- [199] L. M. Sweeting, D. C. Crans, G. M. Whitesides, *J.Org.Chem.* **1987**, 52 2273-2276.

- [200] M. Utaka, H. Watabu, H. Higashi, T. Sakai, S. Tsuboi, S. Torii, *J.Org.Chem.* **1990**, 55 3917-3921.
- [201] J. A. Dale, H. S. Mosher, *J.Am.Chem.Soc.* **1973**, 95 512-519.
- [202] J. A. Dale, D. L. Dull, H. S. Mosher, *J.Org.Chem.* **1969**, 34 2543-2549.
- [203] A. J. Pearson, K. Lee, *J.Org.Chem.* **1994**, 59 2304-2313.
- [204] E. J. Corey, J. L. Gras, P. Ulrich, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 809-812.
- [205] A. M. Aronov, M. H. Gelb, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39 4947-4950.
- [206] M. H. Lyttle, H. Adams, D. Hudson, R. M. Cook, *Bioconjug.Chem.* **1997**, 8 193-198.
- [207] S. R. Waldvogel, W. Pfeleiderer, *Helv.Chim.Acta* **1998**, 81 46-58.
- [208] B. Thern, J. Rudolph, G. Jung, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43 5013-5016.
- [209] B. Blankemeyer-Menge, M. Nimtz, R. Frank, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31 1701-1704.
- [210] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis. 2nd Ed*, Wiley Interscience, New York **1991**.
- [211] H. Tsubouchi, K. Tsuji, H. Ishikawa, *Synlett* **1994**, 63-64.
- [212] I. Schumann, R. A. Boissonnas, *Helv.Chim.Acta* **1952**, 35 2235-2237.
- [213] H. H. Lee, D. A. Schwartz, J. F. Harris, J. P. Carver, J. J. Krepinsky, *Can.J.Chem.* **1986**, 64 1912-1918.
- [214] O. Kanie, S. C. Crawley, M. M. Palcic, O. Hindsgaul, *Carbohydr.Res.* **1993**, 243 139-164.
- [215] M. N. Khan, *J.Org.Chem.* **1995**, 60 4536-4541.
- [216] J. O. Osby, M. G. Martin, B. Ganem, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25 2093-2096.
- [217] D. L. Marshall, I. E. Liener, *J.Org.Chem.* **1970**, 35 867-868.
- [218] G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *Chem. Comm.* **1971**, 636-637.
- [219] M. Patek, M. Lebl, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32 3891-3894.
- [220] M. Furst, K. Ruck-Braun, *Synlett* **2002**, 1991-1994.
- [221] J. Rademann, R. R. Schmidt, *J.Org.Chem.* **1997**, 62 3650-3653.
- [222] F. Zaragoza (ed.), *Organic Synthesis on Solid Phase: Supports, Links, Reactions*, Wiley VCH, Weinheim **2000**.
- [223] N. G. Gaylord, D. S. Hoffenberg, B. Matyska, K. Mach, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1968**, 6 269-289.
- [224] H. P. Frank, *Makromol.Chem.* **1963**, 67 64-74.
- [225] H. P. Frank, *Makromol.Chem.* **1963**, 64 213-214.
- [226] S. M. Hutchins, K. T. Chapman, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37 4869-4872.
- [227] L. F. Tietze, A. Steinmetz, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl.* **1996**, 35 651-652.
- [228] S. Kobayashi, M. Moriwaki, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 4251-4254.
- [229] J. Bauer, J. Rademann, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44 5019-5023.
- [230] O. Kanie, F. Barresi, Y. Ding, J. Labbe, A. Otter, L. S. Forsberg, B. Ernst, O. Hindsgaul, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl.* **1996**, 34 2720-2722.
- [231] U. J. Nilsson, *J.Chromatography A* **2000**, 885 305-319.
- [232] U. J. Nilsson, E. J. Fournier, O. Hindsgaul, *Bioorg.Med.Chem.* **1998**, 6 1563-1575.

- [233] A. Hoff, T. Andre, T. E. Schaffer, G. Jung, K. H. Wiesmuller, R. Brock, *ChemBio-Chem* **2002**, *3* 1183-1191.
- [234] G. Lecollinet, R. Auzely-Velty, M. Danel, T. Benvegna, G. Mackenzie, J. W. Goodby, D. Plusquellec, *J.Org.Chem.* **1999**, *64* 3139-3150.
- [235] B. Cimetiere, L. Jacob, M. Julia, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* 6329-6332.
- [236] B. Cimetiere, L. Jacob, M. Julia, *Bull.Soc.Chim.Fr.* **1991**, 926-938.
- [237] N. O. Mahmoodi, *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat.Elem.* **2002**, *177* 2887-2893.
- [238] T. Momose, Y. Okura, K. Hirauchi, *Chem.Pharm.Bull* **1963**, *11* 1364-1368.
- [239] E. Bedini, M. Parrilli, C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* 8879-8882.
- [240] J. C. C. Palomino, M. H. Rensoli, V. V. Bencomo, *J.Carbohydr.Chem.* **1996**, *15* 137-146.
- [241] Kong, Fanzuo and Zhu, Yuliang, *Patent Peop. Rep. China.* 1338460, 7, 15-8-2000.
- [242] J. Zhang, Y. Zhu, F. Kong, *Carbohydr.Res.* **2001**, *336* 229-235.
- [243] J. Bauer, J. Rademann, *J.Am.Chem.Soc.* **2005**, *127* 7296-7297.
- [244] R. Wischnat, J. Rudolph, R. Hanke, R. Kaese, A. May, H. Theis, U. Zuther, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* 4393-4394.
- [245] K. Akaji, N. Kuriyama, T. Kimura, Y. Fujiwara, Y. Kiso, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33* 3177-3180.
- [246] D. Seebach, U. Braendli, P. Schnurrenberger, M. Przybylski, *Helv.Chim.Acta* **1988**, *71* 155-167.
- [247] M. K. Dhaon, R. K. Olsen, K. Ramasamy, *J.Org.Chem.* **1982**, *47* 1962-1965.
- [248] A. K. Singh, R. E. Weaver, G. L. Powers, V. W. Rosso, C. Wei, D. A. Lust, A. S. Kotnis, F. T. Comezoglu, M. Liu, K. S. Bembenek, B. D. Phan, D. J. Vanyo, M. L. Davies, R. Mathew, V. A. Palaniswamy, W. S. Li, K. Gadamssetti, C. J. Spagnuolo, W. J. Winter, *Org.Proc.Res.Dev.* **2003**, *7* 25-27.
- [249] C. B. Reese, J. C. Stewart, J. H. Van Boom, H. P. M. De Leeuw, J. Nagel, J. F. M. De Rooy, *J.Chem.Soc., Perkin Trans.1* **1975**, 934-942.
- [250] C. B. Reese, J. C. M. Stewart, *Tetrahedron Lett.* **1968**, 4273-4276.
- [251] P. Grice, S. V. Ley, J. Pietruszka, H. W. M. Priepke, S. L. Warriner, *J.Chem.Soc., Perkin Trans.1* **1997**, 351-363.
- [252] P. Magnus, T. Gallagher, J. Schultz, Y. S. Or, T. P. Ananthanarayan, *J.Am.Chem.Soc.* **1987**, *109* 2706-2711.
- [253] J. McMurry, *Org.React.* **1976**, *24* 187-224.
- [254] C. J. Salomon, E. G. Mata, O. A. Mascaretti, *J.Org.Chem.* **1994**, *59* 7259-7266.
- [255] A. E. Greene, M. J. Luche, J. P. Depres, *J.Am.Chem.Soc.* **1983**, *105* 2435-2439.
- [256] C. T. Ren, C. S. Chen, Y. P. Yu, Y. F. Tsai, P. Y. Lin, Y. J. Chen, W. Zou, S. H. Wu, *Chem.Eur.J.* **2003**, *9* 1085-1095.
- [257] P. D. G. Dean, *J.Chem.Soc.Abs.* **1965**, 6655-6656.
- [258] J. E. McMurry, G. B. Wong, *Synth.Commun.* **1972**, *2* 389-394.
- [259] G. A. Molander, *Org.React.* **1994**, *46* 211-367.
- [260] D. P. Curran, T. L. Fevig, C. P. Jasperse, M. J. Totleben, *Synlett* **1992**, 943-961.
- [261] U. Bornscheurer, R. Kazlauskas (eds.), *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- or Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim **1999**.
- [262] S. M. Roberts, *J.Chem.Soc., Perkin Trans.1* **2000**, 611-633.

- [263] S. M. Roberts, *J.Chem.Soc., Perkin Trans. I* **2001**, 1475-1499.
- [264] R. D. Schmid, R. Verger, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl.* **1998**, 37 1609-1633.
- [265] W. Boland, C. Froessl, M. Lorenz, *Synthesis* **1991**, 1049-1072.
- [266] S. Ransac, F. Carriere, E. Rogalska, R. Verger, F. Marguet, G. Buono, E. P. Melo, J. M. S. Cabral, M. P. Egloff, *NATO ASI Ser., Ser.E* **1996**, 317 143-182.
- [267] S. Ransac, F. Carriere, E. Rogalska, R. Verger, F. Marguet, G. Buono, E. P. Melo, J. M. S. Cabral, M. P. Egloff, *NATO ASI Ser., Ser.H* **1996**, 96 265-304.
- [268] R. Verger, *Trends Biotechnol.* **1997**, 15 32-38.
- [269] K. Faber (ed.), *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, **2004**.
- [270] G. Carrea, S. Riva, *Angew.Chem., Int.Ed.Engl.* **2000**, 39 2226-2254.
- [271] J. Andrae, P. Garidel, A. Majerle, R. Jerala, R. Ridge, E. Paus, T. Novitsky, M. H. J. Koch, K. Brandenburg, *Eur.J.Biochem.* **2004**, 271 2037-2046.
- [272] B. Halliwell, *Am.J.Med.* **1991**, 91 14S-22.
- [273] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge (eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, **1988**.
- [274] M. Ernst, M. Heberer, J. Ennen, *Proc. Int. Biolumin. Chemilumin. Symp., 4th.* **1987**.
- [275] M. Ernst, *Behring Inst.Mitt.* **1980**, 65 55-61.
- [276] M. Ernst, M. Heberer, H. Fischer, *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* **1983**, 21 555-560.
- [277] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, 175 720-731.
- [278] A. Lee, *Curr.Biol.* **2001**, 11 R811-R814.
- [279] T. Förster, *Naturwissenschaften* **1946**, 33 166-175.
- [280] T. Förster, *Ann.Physik* **1948**, 2 55-75.
- [281] T. Gutschmann, A. B. Schromm, M. H. J. Koch, S. Kusumoto, K. Fukase, M. Oikawa, U. Seydel, K. Brandenburg, *Phys.Chem.Chem.Phys.* **2000**, 2 4521-4528.
- [282] K. Brandenburg, G. Jurgens, M. Muller, S. Fukuoka, M. H. J. Koch, *Biol.Chem.* **2001**, 382 1215-1225.
- [283] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J.Org.Chem.* **1997**, 62 7512-7515.
- [284] T. Vojtkovsky, *Pept.Res.* **1995**, 8 236-237.
- [285] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. J. Carg, *Anal.Biochem.* **1970**, 34 35-38.
- [286] A. M. P. Van Steijn, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegthart, *Carbohydr.Res.* **1991**, 211 261-277.
- [287] G. Barany, R. B. Merrifield, *J.Am.Chem.Soc.* **1977**, 99 7363-7365.

Publikationsliste

„VOX AUDITA PERIT, LITTERA SCRIPTA MANET“

Quintus Horatius Flaccus

J. Bauer, J. Rademann; Parallel HASP-synthesis of a focused library of small rhamnolipids - structure-activity relationships and their immunological and biophysical characterization, *in Vorbereitung*, **2005**.

J. Bauer, J. Rademann; Hydrophobically Assisted Switching Phase Synthesis: The Flexible Combination of Solid-Phase and Solution-Phase Reactions Employed for Oligosaccharide Preparation, *J.Am.Chem.Soc.* **2005**, *127*, 7296-7297.

J. Bauer, J. Rademann; Trimellitic anhydride linker (TAL) - highly orthogonal conversions of primary amines employed in the parallel synthesis of labeled carbohydrate derivatives, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5019-5023.

O. Birkert, K. Kröger, R. Tünnemann, J. Bauer, G. Jung, G. Gauglitz; Parallelisierte reflektometrische Interferenzspektroskopie für das Hochdurchsatz-Screening, *Laborwelt* **2003**, *4*, 14-16.

K. Kröger, J. Bauer, B. Fleckenstein, J. Rademann, G. Jung, G. Gauglitz; Epitope-mapping of transglutaminase with parallel label-free optical detection, *Biosensors & Bioelectronics* **2002**, *17*, 937-944.

Diese Dissertation ist online auf den Seiten des Tübinger Online-Bibliotheksinformations- und Ausleihsystems TOBIAS-lib kostenlos erhältlich.

URL: <http://w210.ub.uni-tuebingen.de>

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, K.W. Bock, H. Brendle, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel[†],
G. Häfelinger, H.-P. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, W. Jäger, J. Jauch, G. Jung,
S. Kemmler-Sack[†], H. Kneifel, B. Koppenhöfer, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner,
M.E. Maier, H.A. Mayer, H.-J. Meyer, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug,
H. Pauschmann[†], H. Pommer, J. Rademann, G. Reinhardt, H. Schott, V. Schurig,
M. Schwarz, E. Schweda, F.F. Seelig, B. Speiser, H. Stegmann, J. Strähle, H. Straub,
W. Voelter, U. Weimar, K.-P. Zeller, C. Ziegler.

LEBENS LAUF

Jörg Bauer

Geburtsdatum 22.06.1973 in Tübingen.

Schul Ausbildung

1980 – 1984 Grundschule in Pliezhausen

1984 – 1993 Gymnasium Bildungszentrum-Nord, Reutlingen-Rommelsbach

05/1993 Abitur in Latein, Mathematik, Chemie und Geschichte

Zivildienst

08/1993 – 10/1994 Alten- und Pflegeheim der Gustav-Werner-Stiftung Reutlingen

Hochschulstudium

10/1994 – 02/2000 Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

08/1996 Chemie-Vordiplom

10/1998 Mündliche Diplomprüfung im Wahlfach Naturstoffchemie

02/2000 Mündliche Diplomprüfungen

03/2000 – 09/2000 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel „*Charakterisierung eines Transglutaminase-B-Zell-Epitopes mit reflektometrischer Interferenzspektroskopie und eines Myelin Basic Protein T-Zell-Epitopes mit Peptidanaloga*“ am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. G. Jung.

Dissertation

10/2000 – 06/2005 Anfertigung der Dissertation mit dem Titel „*Entwicklung neuer Konzepte für die festphasenunterstützte Kohlenhydratchemie und deren Anwendung in der Parallelsynthese von Oligosacchariden und Glykokonjugaten*“ am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. J. Rademann und Prof. Dr. G. Jung.

10/2000 – 08/2001 Promotionsstipendiat (10-12/2000) und Kollegiat (01-08/2001) im Graduiertenkolleg „Analytische Chemie“ der Universität Tübingen

10/2001 – 09/2004 Promotionsstipendiat im Graduiertenkolleg „Chemie in Interphasen“ der Universität Tübingen