

Kombinatorische SPOT-Synthese

neuer

aromatischer und aliphatischer *N*-Glycopeptidmimetika

zur Untersuchung von

Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen

DISSERTATION

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Markus Nörrlinger

aus Herrenberg

Tübingen

2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 06.04.2017

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Ziegler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. E. Maier

Für Isabella und Lisa

MEIN BESONDERER DANK GILT:

Herrn Prof. Dr. Thomas Ziegler für die Überlassung des Themas sowie die hervorragende Betreuung und Förderung dieser Arbeit und die vielen Freiheiten bei der Bearbeitung.

Herrn Dr. Gregor Lemanski für die Unterstützung, Diskussionsbereitschaft sowie für das Korrekturlesen.

Allen ehemaligen, sowie aktuellen Mitarbeitern des Arbeitskreises Ziegler, insbesondere Felix Bächle, Marius Bayer, Daniel Borowski, Per-André Franz, Michael Imrich, Thomas Klein, Thomas Kutter, Melchior Menzel, Jochen Neumaier sowie Jochen Kraft für die gute Atmosphäre und gute Zusammenarbeit.

Meinen Praktikanten für das Nachziehen der Edukte.

Frau Petra Krüger für die Durchführung der Elementaranalysen.

Frau Dr. Dorothee Wistuba für die Messung der FT-ICR- und ESI-TOF-Massenspektren.

Herrn Dr. Peter Haiss für die Messung der MALDI-TOF-Massenspektren.

Herrn Prof. Dr. Frank Böckler sowie Dr. Andreas Lange, für ihre umfangreiche Hilfe bei der Entwicklung des Lektin-Assays.

Der Firma Dr. Maisch HPLC GmbH für die finanzielle Unterstützung.

Meinen geliebten Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben.

PUBLIKATIONSLISTE

Teile dieser Arbeit wurden bereits in den folgenden Peer-Review Fachzeitschriften publiziert:

Synthesis of aromatic glycoconjugates. Building blocks for the construction of combinatorial glycopeptide libraries

M. Nörrlinger und T. Ziegler, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2453-2460.

Synthesis and NMR studies of malonyl-linked glycoconjugates of *N*-(2-aminoethyl)glycine. Building blocks for the construction of combinatorial glycopeptide libraries

M. Nörrlinger, S. Hafner und T. Ziegler, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1939-1948.

Folgende Postervorträge wurden auf internationalen Konferenzen präsentiert:

New aromatic und aliphatic glycoconjugates. Building blocks for the construction of combinatorial glycopeptide libraries

M. Nörrlinger und T. Ziegler, *XVIII. European Carbohydrate Symposium*, Moskau, Russland, August **2015**.

Aromatic und aliphatic glycoconjugates. Building blocks for the construction of glycopeptide mimetics

M. Nörrlinger, M. Imrich und T. Ziegler, *XV. Belgian Organic Synthesis Symposium*, Antwerpen, Belgien, Juli **2016**.

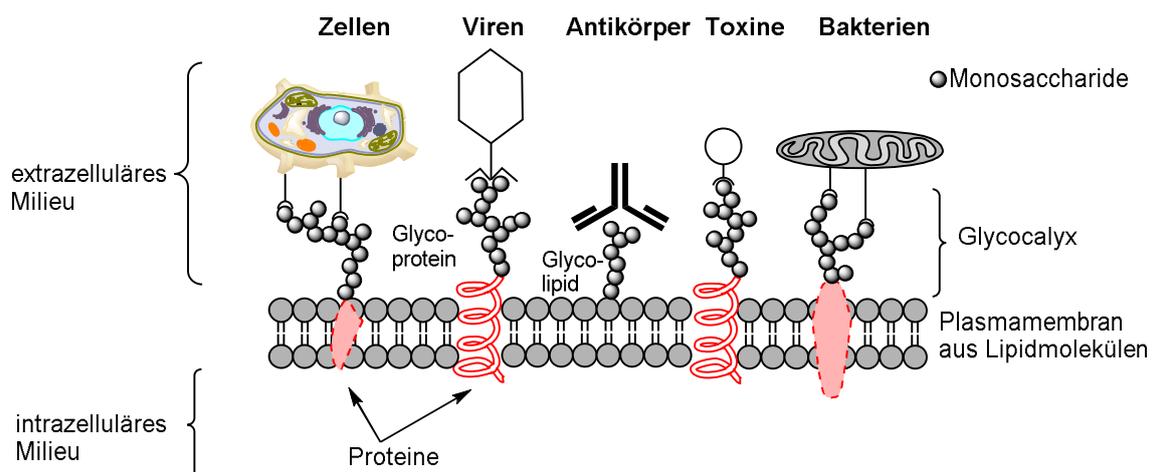
INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung und Aufgabenstellung	1
2 Allgemeiner Teil	5
2.1 Oligosaccharide auf der Zelloberfläche	5
2.1.1 Glycoproteine	5
2.2 Lektine als kohlenhydraterkennende Proteine	9
2.2.1 Historie und Definitionen	9
2.2.2 Lektin-Typen	10
2.2.3 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen	13
2.3 Oligosaccharidmimetika	16
2.4 Kombinatorische Festphasenpeptidsynthese	17
2.4.1 Kombinatorische Chemie	17
2.4.2 Festphasenpeptidsynthese	18
2.4.3 Kombinatorische Peptidbibliotheken	33
2.5 Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen	37
2.5.1 Enzymgekoppelter Lektin-Test (ELLA) und Lektin-Test (LA)	37
3 Ergebnisse und Diskussion	45
3.1 Synthesekonzept	45
3.1.1 Imitation von Oligosacchariden durch <i>N</i> -Glycopeptide	45
3.1.2 Aufbau der aromatischen und aliphatischen <i>N</i> -Glycopeptide	47
3.1.3 Darstellung der <i>N</i> -Glycopeptidmimetika	50
3.2 Retrosynthese der Kohlenhydrat-Bausteine	51
3.3 Synthese der Rückgrate	52
3.3.1 Aromatische Rückgrate	52
3.3.2 Aliphatisches PNA-Rückgrat	54
3.4 Synthese der Kohlenhydrat-Bausteine	55
3.4.1 Darstellung der Azide und Amine von Glucose, Galactose, Glucos- und Galactosamin	55
3.4.2 Peptidkupplung der Aminopyranosen mit den Malonsäurederivaten	56
3.4.3 Entschützung der <i>tert</i> -Butyl- und Benzylester	57
3.4.4 Peptidkupplung mit dem aromatischen- bzw. aliphatischen Rückgrat	58
3.4.5 Entschützung der <i>tert</i> -Butylester der Kohlenhydrat-Bausteine	61
3.5 Synthese von aromatischen und aliphatischen Dimeren	63
3.6 Rotamerstruktur der PNA-basierten Glykokonjugate	65
3.7 SPOT-Synthese und Screening der <i>N</i>-Glycopeptide	75
3.7.1 Auswahl eines geeigneten Trägers	75

3.7.2 Funktionalisierung der festen Phase	76
3.7.3 Auswahl der <i>N</i> -Glycopeptidmimetika und Lektine	83
3.7.4 SPOT-Roboter	87
3.7.5 Auswahl einer geeigneten Untersuchungsmethode	89
3.7.6 Aufspotten und Screening der <i>N</i> -Glycopeptide	96
3.7.7 Fehlerdiagnose des Screenings	116
4 Experimenteller Teil	121
4.1 Allgemeine Bemerkungen	121
4.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften	124
4.3 Synthese der aromatischen Rückgrate	126
4.4 Synthese der Kohlenhydrat-Bausteine	133
4.4.1 Peptidkupplung der Aminopyranosen mit den Malonsäurederivaten	133
4.4.2 Entschützung der <i>tert</i> -Butyl- und Benzylester	140
4.4.3 Peptidkupplung mit den aromatischen Rückgraten	143
4.4.4 Peptidkupplung mit dem aliphatischen Rückgrat	152
4.4.5 Entschützung der <i>tert</i> -Butylester der Kohlenhydrat-Bausteine	157
4.4.6 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe	170
4.5 Synthese der aromatischen und aliphatischen Dimere	172
4.6 SPOT-Synthese und Screening der <i>N</i>-Glycopeptide	178
4.6.1 Derivatisierung der Glas-Wellplate	178
4.6.2 Durchführung der Screenings	182
5 Zusammenfassung und Ausblick	185
6 Anhang	191
6.1 Bezifferung der Verbindungen	191
6.2 Abkürzungen	197
6.3 NMR-Spektren	201
6.4 Massenspektren	253
6.5 Literaturverzeichnis	259
6.6 Lebenslauf	274

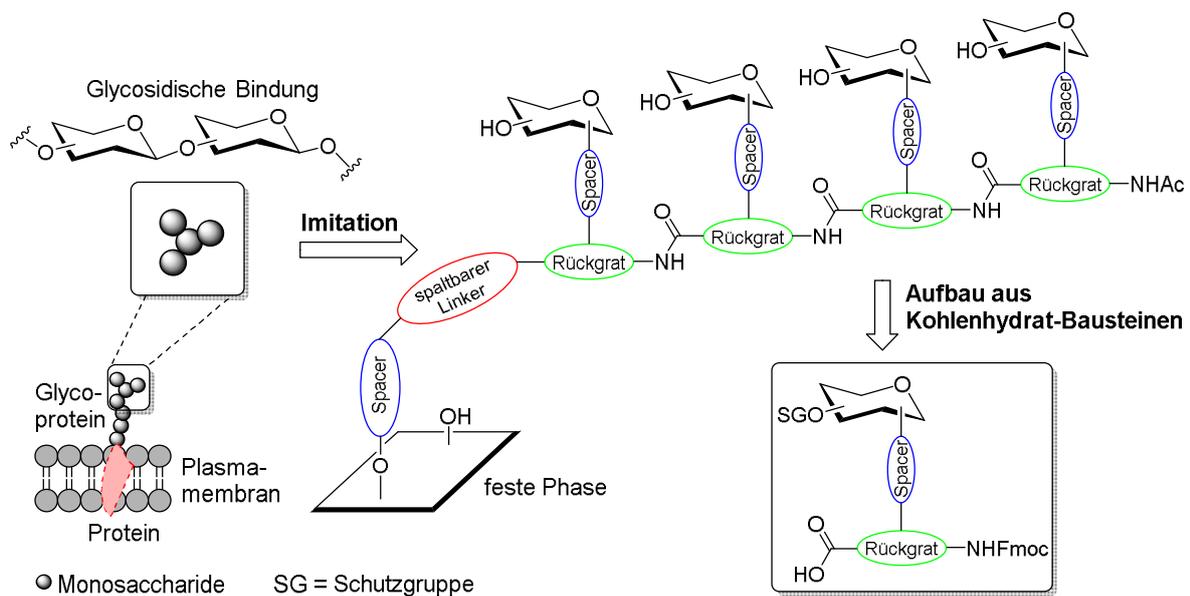
1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Kohlenhydrate sind neben Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden für nahezu alle Organismen von fundamentaler Bedeutung, da Saccharide zahlreiche Funktionen übernehmen^[1]. Bei Mensch und Tier fungieren Kohlenhydrate als Energielieferanten oder stellen eine schnell verfügbare Energiereserve dar. Pflanzen, welche Kohlenhydrate durch die Photosynthese produzieren, speichern deren Energie in Form von Stärke und nutzen Saccharide (z.B. Cellulose) zusätzlich als Gerüstbausteine. Zu Beginn der Kohlenhydrat-Forschung Ende des 19. Jahrhunderts war Wissenschaftlern wie E. Fischer jedoch noch nicht klar, dass Saccharide nicht nur als Energiespeicher und Gerüstsubstanzen dienen, sondern weitaus mehr Aufgaben erfüllen. Aufgrund der fünf Hydroxylgruppen eines Monosaccharids können bei Hexasacchariden bereits mehr als $1.05 \cdot 10^{12}$ lineare oder verzweigte Isomere vorliegen^[2]. Diese strukturelle Vielfalt erlaubt es, diverse Informationen zu verschlüsseln, weshalb Kohlenhydrate ein ideales Medium zur Informationsübertragung darstellen. Im Vergleich dazu sind bei Hexanucleotiden aus den vier Bausteinen der DNA oder Hexapeptiden aus den 20 natürlichen Aminosäuren lediglich $4^6 = 4096$ bzw. $20^6 = 6.4 \cdot 10^7$ Kombinationen möglich^[3]. Untersuchungen haben gezeigt, dass Oligosaccharide in Form von Glycoproteinen und anderen Glycokonjugaten, wie den Glycolipiden oder den Glycophospholipiden, auf der äußeren Zellmembran sowie -wand von eukaryotischen und prokaryontischen Zellen ubiquitär vorkommen^[4]. Die Oligosaccharide auf der Zelloberfläche, die Glycocalyx, fungieren z. B. als Rezeptoren, welche mit komplexen Proteinen, den sogenannten Lektinen^[5], anderen Zellen, Viren, Antikörpern, Toxinen oder Bakterien interagieren und so eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Erkennung, Zelldifferenzierung sowie der interzellulären Wechselwirkung spielen^[6-8] (**Schema 1**).



Schema 1: Multivalente Wechselwirkungen der Glycocalyx an der Zelloberfläche.

Die Entschlüsselung dieser Erkennungsprozesse ist von enormer wissenschaftlicher Bedeutung und von großem medizinischem Interesse^[1]. Die Interaktionen sind auf ihrer molekularen Ebene jedoch noch nicht vollständig erforscht, weswegen die Zusammenhänge von Kohlenhydratstruktur und Informationskodierung lediglich ansatzweise verstanden werden. Um die Wechselwirkungen der Glycocalyx zu untersuchen, ist es notwendig, dass die Oligosaccharide respektive Glykokonjugate in ausreichender Menge vorliegen. Jedoch ist die Isolierung von Glykanen aus natürlichen Ressourcen aufgrund der schlechten Verfügbarkeit und der strukturellen Diversität, der Mikroheterogenität, äußerst schwierig, weshalb die chemische Oligosaccharidsynthese die einzige Alternative darstellt, um biologischen Studien eine ausreichend große Menge an reinem Probenmaterial zur Verfügung zu stellen. In den letzten Dekaden kristallisierte sich hierbei heraus, dass die synthetisch hergestellten Oligosaccharide für diese Bindungsstudien geeignet sind, woraus sich ein neues, interdisziplinäres Forschungsgebiet, die „Glycobiologie“ entwickelte^[9]. Trotz großer Anstrengungen etablierte sich bis heute jedoch keine voll automatisierte Festphasensynthese, mit der Oligosaccharide gezielt hergestellt werden können^[10]. Die Ursache hierfür ist, dass eine selektive Verknüpfung von Monosacchariden nur mithilfe von diversen Glycosylierungs-, sowie Schutzgruppenstrategien möglich ist, sodass einheitliche, automatisierte Reaktionskaskaden äußerst selten herangezogen werden können. Daher werden komplexe Oligosaccharidsynthesen vorzugsweise „klassisch“ auf nasschemischem Wege durchgeführt, wobei jedoch zahlreiche, zeitaufwändige Optimierungsschritte den Syntheseyklus erschweren. Zur Lösung dieser Problematik können neuartige Oligosaccharidmimetika herangezogen werden, bei denen darauf verzichtet wird, die einzelnen Saccharide mittels glycosidischer Bindungen zu verknüpfen. Stattdessen werden die Monosaccharide über einen Spacer mit einem trifunktionalen Rückgrat verbunden, wodurch Kohlenhydrat-Bausteine generiert werden. Die Verknüpfung der einzelnen Bausteine zum Mimetikum erfolgt schließlich mittels Festphasenpeptidsynthese über das Rückgrat, sodass komplexe Oligosaccharidsynthesen vermieden werden können (**Schema 2**).



Schema 2: Oligosaccharidmimetika durch Verknüpfung einzelner Kohlenhydrat-Bausteine.

In vorausgegangenen Arbeiten konnten D. Rösling^[11-12], C. Schips^[13-17], J. Hörzer^[18], R. Daiber^[19-20], N. Pietrzik^[21], H. Schäfer^[22], sowie K. Günther^[16,23-24] zahlreiche Kohlenhydrat-Bausteine mit aliphatischen Rückgraten synthetisieren. Hierbei fanden sowohl Asparaginsäure- als auch PNA-Derivate Verwendung, wobei die Saccharidkomponenten (Glc, Gal, Man, GlcNAc, GalNAc, NeuNAc) mittels einfachen Alkylketten, Aminoalkoholen oder Triazolen mit dem jeweiligen Rückgrat verknüpft wurden. Aus diesen Kohlenhydrat-Bausteinen wurden unter Verwendung der Festphasenpeptidsynthese diverse Oligosaccharidmimetika dargestellt, wobei mit einfachen Farbreaktionen gezeigt werden konnte, dass diese oberflächengebundenen Glycokonjugate eine gewisse Affinität zu verschiedenen Lektinen aufweisen^[11,14,16].

In dieser Arbeit sollten nun mittels kombinatorischer SPOT-Synthese auf einer 384er Glas-Wellplatte neuartige *N*-Glycopeptidmimetika dargestellt werden, welche aromatische bzw. aliphatische Rückgrat-Strukturen beinhalten. Die einzelnen Kohlenhydrat-Bausteine sollten hierbei aus aromatischen Aminobenzoesäurederivaten bzw. der aliphatischen Peptid-Nukleinsäure (engl. *PNA - peptide nucleic acid*) bestehen, welche über ein Spacermolekül mit vier unterschiedlichen Sacchariden (Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc) verknüpft sind (**Abbildung 1**).

Desweiteren sollte evaluiert werden, inwiefern die Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung dieser glasphasen-gebundenen Saccharidmimetika mit einem Lektin-Assay untersucht werden kann.

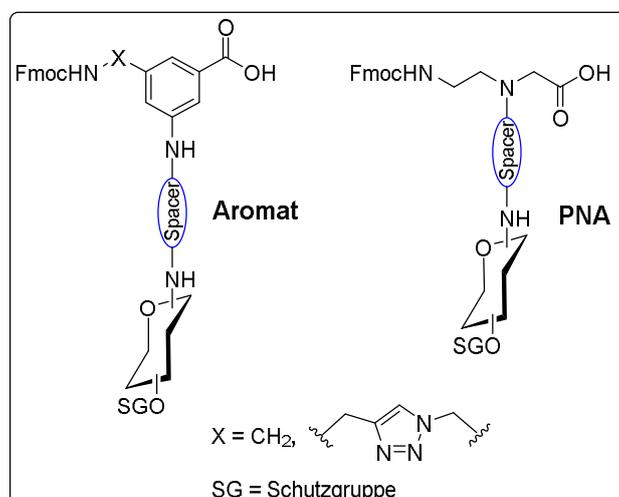


Abbildung 1: Kohlenhydrat-Bausteine mit aromatischen und aliphatischen Rückgrat-Strukturen.

2 ALLGEMEINER TEIL

2.1 OLIGOSACCHARIDE AUF DER ZELLOBERFLÄCHE

Bei eu- und prokaryontischen Zellen kommen Oligosaccharide in Form von Glycoproteinen, Glycolipiden oder Polysacchariden auf der äußeren Zellmembran bzw. -wand vor^[4]. Diese Oligosaccharidstrukturen, die sog. Glycocalyx, sorgen für den Schutz der Zelle und fungieren als Rezeptoren, welche mit anderen Zellen, Proteinen, Viren, Antikörpern, Toxinen oder Bakterien interagieren können.

2.1.1 GLYCOPROTEINE

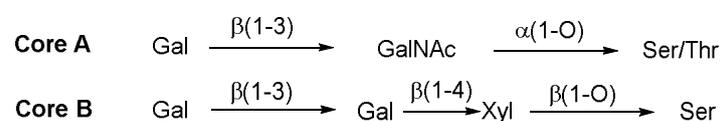
Glycoproteine sind Makromoleküle, welche aus einem Protein und einem oder mehreren glycosidisch gebundenen Saccharidkomponenten aufgebaut sind^[25]. Hierbei wird im Wesentlichen zwischen zwei Arten von Glycoproteinen unterschieden:

- 1) O-Glycoproteine
- 2) N-Glycoproteine

2.1.1.1 O-Glycoproteine

Strukturen und Funktionen

In der Natur erfolgt die *O*-glycosidische Verknüpfung über die Hydroxylgruppen der Aminosäuren L-Serin (Ser) bzw. L-Threonin (Thr). Bislang wurden zahlreiche Kernregion (*Core*-Regionen) nachgewiesen, wobei jedoch zwei Regionen (Core A und B) am häufigsten vorkommen. Bei der *Core*-Region A wird zunächst ein *N*-Acetyl-D-galactosamin (GalNAc) α -*O*-glycosidisch gebunden, woraufhin eine weitere D-Galactose (Gal) angefügt wird. Bei der *Core*-Region B erfolgt die Anbindung eines Galactosedimers sowie weiterer Saccharide über eine D-Xylose (Xyl), welche β -*O*-glycosidisch gebunden ist^[26] (**Schema 3**).



Schema 3: Core A und B der *O*-Glycoproteine.

O-Glycoproteine, welche den Core A beinhalten, sind in Mucinen weit verbreitet und werden aus diesem Grund auch als „Mucin-Typ“ klassifiziert^[26-27]. Mucine (lat.- *Mucus*, *Schleim*) sind Glycoproteine, welche in den Sekreten (z.B. Speichel, Magensaft) der meisten Epithelien vorkommen und eine Schmier- und Schutzfunktion bekleiden^[28]. Aufgrund der ausgeprägten Wasseraffinität sorgen Mucine dafür, dass die Zelloberflächen nicht austrocknen. Desweiteren stellen Mucine eine abweisende Barriere dar, sodass das Eindringen von Keimen in die jeweilige Zelle verhindert bzw. erschwert wird^[28]. Neben diesem „Mucin-Typ“ gibt es acht Unterstrukturen, welche sich anhand der Saccharide unterscheiden lassen, die mit dem primär gebundenen *N*-Acetyl-D-galactosamin verknüpft sind. Am weitesten sind jedoch *O*-Glycoproteine verbreitet, welche den Core A beinhalten. Auf gesunden, somatischen Zellen ist der Core A mit weiteren Sacchariden verknüpft, wohingegen die Oberfläche von Tumorzellen, bedingt durch eine unvollständige Glycosylierung, sog. TF- bzw. T_N-Antigenstrukturen^[29-30] aufweist (**Abbildung 2**).

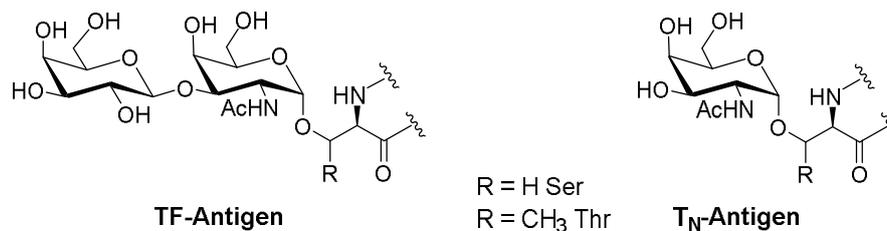


Abbildung 2: TF-Antigen und T_N-Antigen.

O-Glycoproteine, die den Core B enthalten, kommen beispielsweise in den Proteoglycanen des Bindegewebes (Knochen, Zähne, Knorpel, Sehnen, Bänder) vor^[31].

Darüber hinaus gibt es *Core*-Strukturen, bei denen neben L-Serin und L-Threonin andere Aminosäuren, glycosyliert werden, die ebenfalls eine freie Hydroxylgruppe besitzen. Im Kollagen erfolgt die Kohlenhydrat-Protein-Bindung beispielsweise über das 5-Hydroxy-L-lysin^[32], das mit einer D-Galactose verknüpft ist. In den Zellwänden höherer Pflanzen, den Kormophyten, wird die *O*-glycosidische Bindung unter anderem zwischen dem 4-Hydroxy-L-prolin und der L-Arabinose (Ara) ausgebildet^[33]. Überdies konnte die *O*-glycosidische Anbindung weiterer diverser Monosaccharide, wie D-Mannose (Man), D-Glucose (Glc), *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc), D-Galactose sowie L-Fructose (Fruc) beobachtet werden^[34-37], weshalb *O*-Glycoproteine daher eine beachtliche Mikroheterogenität aufweisen, wodurch die Charakterisierung der Saccharidsequenzen deutlich erschwert wird^[38].

2.1.1.2 N-Glycoproteine

Strukturen und Funktionen

Bei N-Glycoproteinen erfolgt die Anbindung komplexer Saccharidstrukturen ausschließlich über eine β -glycosidische Bindung zwischen einem D-Glucosamin und der Amido-Gruppe von L-Asparagin (Asn) oder der Amino-Gruppe von L-Lysin (Lys) (**Abbildung 3**), sodass die Strukturdiversität der N-Glycoproteine im Vergleich zu O-Glycoproteinen deutlich geringer ausfällt^[39].

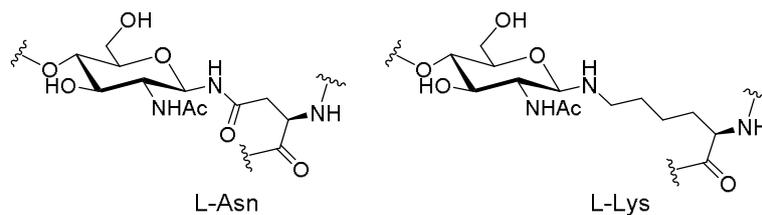
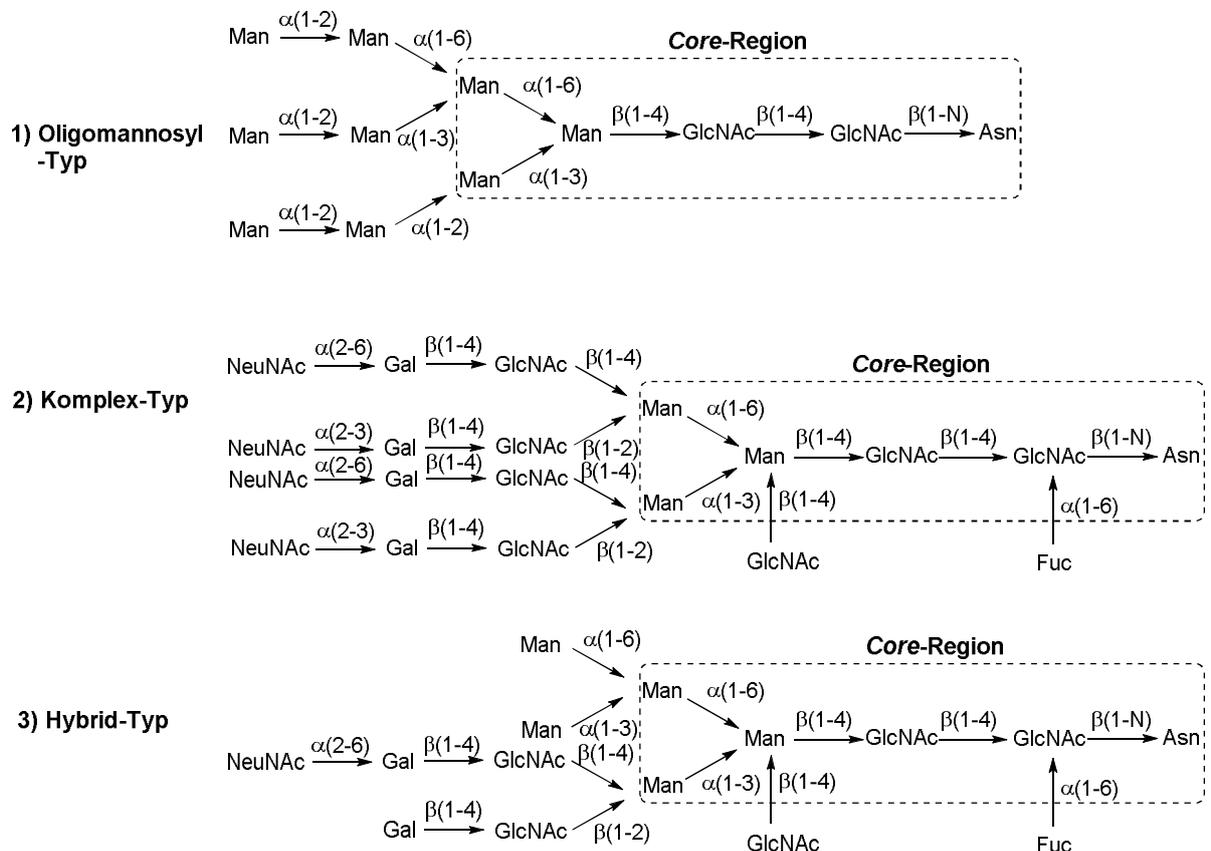


Abbildung 3: N-glycosidisch verknüpfte D-Glucosamineinheit.

Unterteilt werden N-Glycoproteine in drei Typen (Oligomannosyl-, Komplex- sowie Hybrid-Typ), welche eine gemeinsame, verzweigte pentasaccharidische Kernregion (Core-Region) der Struktur $\text{Man } \alpha(1-6)[\text{Man } \alpha(1-3)]\text{Man } \beta(1-4)\text{GlcNAc } \beta(1-4)\text{GlcNAc } \beta(1-N)\text{Asn}$ besitzen^[40] (**Schema 4**).



Schema 4: Die drei Typen der N-Glycoproteine^[40].

1) *N*-Glycoproteine des Oligomannosyl-Typs:

Glycosidische Verlängerungen der *Core*-Region (sog. Antennen) erfolgen ausschließlich durch weitere Mannosemoleküle.

2) *N*-Glycoproteine des Komplex-Typs:

Antennen der *Core*-Region bestehen aus dem Trisaccharid NeuNAc-Gal-GlcNAc, das beliebig verlängert werden kann (*repeating units*). Terminale Saccharide sind häufig *N*-Acetyl-D-neuraminsäure (NeuNAc), D-Galactose oder L-Fucose (Fuc). Je nach Anzahl der *Core*-gebundenen Antennen wird zwischen bi- bis hexaantennären Strukturen differenziert.

3) *N*-Glycoproteine des Hybrid-Typs:

Bei diesem Typ bestehen die Glycanseitenketten (Antennen) sowohl aus Mannose-, als auch aus *N*-Acetyl-D-neuraminsäure-, D-Galactose- sowie *N*-Acetyl-D-glucosamin-Molekülen.

Die *N*-Glycoside auf der Zelloberfläche sind bei diversen Erkennungsprozessen involviert. Beispielsweise spielen *N*-glycosylierte Proteine eine fundamentale Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation sowie der Adhäsion körpereigener Zellen^[40]. Desweiteren sind *N*-Glycoproteine für die Immunabwehr von zentraler Bedeutung, da sie für die Beladung, als auch korrekte Faltung der Proteine des *major histocompatibility complex* (MHC), sowie der T-Zell-Rezeptoren verantwortlich sind^[40].

2.2 LEKTINE ALS KOHLENHYDRATERKENNENDE PROTEINE

2.2.1 HISTORIE UND DEFINITIONEN

Bereits im Jahre 1875 beschrieb L. Landois die Agglutination von Erythrozyten durch Proteine tierischen Ursprungs^[41]. 1888 konnte H. Stillmark demonstrieren, dass auch pflanzliche Proteine, wie das toxische Rizin aus den Samen des Rizinusbaums (lat. - *Ricinus communis*), in der Lage sind rote Blutkörperchen zu verklumpen, weshalb diese Proteine auch als „Hämaggglutinine“ bezeichnet wurden^[42]. Im Jahre 1907 machte K. Landsteiner, während seiner Arbeit über die Blutgruppen (A, B, 0) die Entdeckung, dass die Verklumpung der roten Blutkörperchen auch durch „Phasine“ (nicht-toxische Phyttagglutine aus den Samen der Gartenbohne (lat. - *Phaseolus vulgaris*)) ausgelöst werden kann^[43]. 1936 lieferten Sumner und Howell schließlich den Beweis, dass Proteine Saccharidsequenzen erkennen können, wobei sich bei ihren Untersuchungen herauskristallisierte, dass das ConA (*Concanavalin A*) neben den roten Blutkörperchen auch Hefezellen und Glycogen agglutiniert^[44]. Daraufhin gelang W. Boyd die Isolation pflanzliche Proteine, welche nur bestimmte Blutgruppen zur Agglutination brachten^[45-46]. Diese Proteine bezeichnete Boyd, aufgrund ihres selektiven Verhaltens, als Lektine (lat. - *legere, lesen/auswählen*).

Definition von Goldstein *et al.* aus dem Jahre 1980^[47]:

„Ein Lektin ist ein zuckerbindendes Protein oder Glycoprotein nichtimmunogenen Ursprungs, das Zellen agglutiniert und/oder Glykokonjugate präzipitiert“.

Definition von Gabius *et al.* aus dem Jahre 2009^[48]:

„Lektine sind kohlenhydratspezifische Proteine, die sich deutlich von Antikörpern, ligandbindenden Enzymen und Zuckersensoren/Transportproteinen unterscheiden“.

2.2.2 LEKTIN-TYPEN

Bei Lektinen handelt es sich um oligomere Proteine, welche sich in Größe und Struktur stark voneinander unterscheiden. Diese Glycoproteine sind weit verbreitet und kommen in zahlreichen *Mikroorganismen, Pflanzen* sowie *Lebewesen* vor.

2.2.2.1 Pflanzliche Lektine

Pflanzliche Lektine bestehen meist aus zwei bis vier Untereinheiten, die mehrere kohlenhydraterkennende Bereiche (engl. *CRD - carbohydrate recognition domain*) besitzen. Die Einteilung der *Pflanzlichen Lektine* kann anhand der Affinität zu verschiedenen Sacchariden erfolgen, wobei unterschieden wird, ob Mono- oder Oligosaccharide erkannt werden können^[49]. Darüber hinaus leiten sich die jeweiligen Lektin-Bezeichnungen von den lateinischen Namen der jeweiligen Pflanzen ab, aus welchen die Lektine isoliert werden konnten. In der folgenden Tabelle sind exemplarisch einige *pflanzliche Lektine* gelistet, welche mit unterschiedlichen Sacchariden, bzw. –sequenzen wechselwirken (**Tabelle 1**).

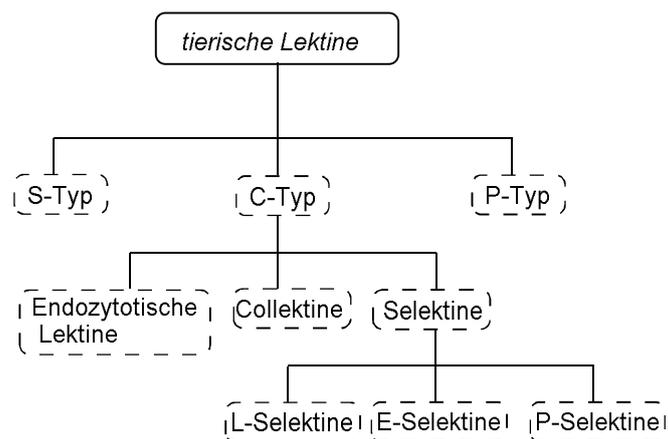
Tabelle 1: Einteilung der pflanzlichen Lektine^[48-50].

Eintrag	Lektin	Herkunft	Spezifität
1	Concanavalin Agglutinin (Con A)	<i>Canavalia ensiformis</i> (Riesenbohne)	
2	<i>Lens culinaris</i> Agglutinin (LCA)	<i>Lens culinaris</i> (Linse)	D-Mannose und
3	<i>Pisum sativum</i> Agglutinin (PSA)	<i>Pisum sativum</i> (Erbse)	D-Glucose
4	Peanut Agglutinin (PNA)	<i>Archais hypogaea</i> (Erdnuss)	
5	<i>Ricinus communis</i> Agglutinin (RCA)	<i>Ricinus communis</i> (Ricinusbohne)	
6	<i>Erythrina corallodendron</i> agglutinin (ECoRA)	<i>Erythrina corallodendron</i> (Korallenbaum)	D-Galactose
7	<i>Erythrina cristagalli</i> agglutinin (ECA)	<i>Erythrina cristagalli</i> (Korallenstrauch)	
8	<i>Viscum album</i> Agglutinin (VAA)	<i>Viscum album</i> (Mistel)	
9	<i>Griffonia simplicifolia</i> Agglutinin I (GSL I)	<i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrikanische Schwarzbohne)	
10	<i>Sophora japonica</i> Agglutinin (SJA)	<i>Sophora japonica</i> (Chinesischer Schnurbaum)	N-Acetyl-D-galactosamin

11	Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)	<i>Dolichos biflorus</i> (Afrikanische Pferdebohne)	
12	Soybean Agglutinin (SBA)	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)	
13	<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin (SNA)	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)	D-Galactose und N-Acetyl-D-galactosamin
14	Wheat germ Agglutinin (WGA)	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	N-Acetyl-D-glucosamin und N-Acetyl-D-neuraminsäure
15	<i>Ulex europaeus</i> Agglutinin I (UEA I)	<i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)	L-Fucose
16	<i>Phaseolus vulgaris</i> Erythroagglutinin (PHA-E)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	Oligosaccharide
17	<i>Phaseolus vulgaris</i> Leukoagglutinin (PHA-L)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	

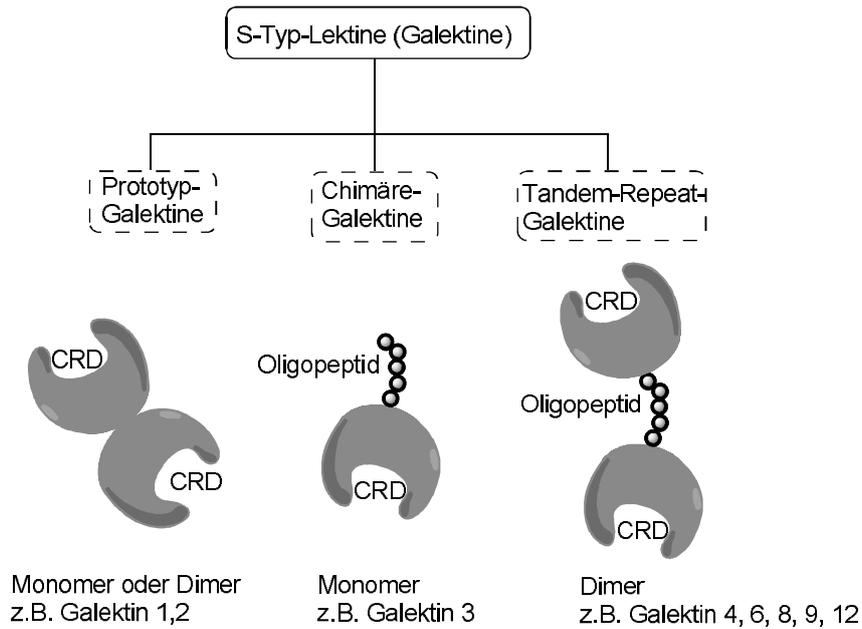
2.2.2.2 Tierische Lektine

Die *tierischen Lektine* werden hingegen in drei Gruppen unterteilt: S-Typ-, C-Typ- sowie P-Typ-Lektine (**Schema 5**).



Schema 5: Einteilung der tierischen Lektine^[51].

Lektine des S-Typs werden aufgrund ihrer Spezifität für β -Galactoside auch als Galectine bezeichnet^[52]. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Strukturen können Galectine in drei Typen unterteilt werden: Prototyp-, Chimäre-, sowie Tandem-Repeat-Galectine^[53] (**Schema 6**).



Schema 6: Einteilung der S-Typ Lektine (Galektine)^[53].

Die sog. **C-Typ Lektine**, welche die größte Gruppe kohlenhydratspezifischer Lektine bilden und in allen Organismen gefunden werden können, benötigen Ca^{2+} -Ionen, damit eine Protein-Substrat-Wechselwirkung ausgebildet werden kann^[9]. Unterteilt werden diese Lektine weiterhin in *endozytische Lektine*, *Collektine* sowie *Selektine*.

Die *endozytischen Lektine* sind membrangebundene Proteine, welche als Rezeptoren fungieren und eine fundamentale Rolle bei der Aufnahme von flüssigen oder festen Partikeln in eine eukaryotische Zelle (Endozytose) spielen. Ein wichtiger Vertreter ist hierbei der Asialoglycoproteinrezeptor (ASGP-R), ein leberspezifischer Membranrezeptor, der die Aufnahme von desialisierten Glycoproteinen mit terminalen Galactose- respektive *N*-Acetyl-D-galactosaminresten vermittelt^[9]. *Collektine* hingegen besitzen kollagen artige, kohlenhydraterkennende Domänen, welche gewöhnlich in komplexen Strukturen angeordnet sind und 9-27 Untereinheiten zerlegt werden können. Bislang wurden neun Arten von *Collektinen* identifiziert, wobei einige löslich und andere membrangebunden sind^[9]. Die *Selektine* sind Membranproteine, die auf Leukozyten (*L-Selektine*), Endothelzellen (*E-Selektine*) oder Blutplättchen (*P-Selektine*) exprimiert sind und eine wichtige Rolle bei adhäsiven Interaktionen zwischen diesen Zellen spielen^[9].

Die **P-Typ Lektine** (P von Phosphat) sind Transmembranproteine, die einen sog. Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR) besitzen, wodurch sie selektiv Mannose-6-Phosphat gelabelte Glycoproteine bzw. lysosomale Enzyme erkennen und vom Golgi-Apparat einer Zelle zu den Endosomen transportieren können^[9].

2.2.3 KOHLENHYDRAT-PROTEIN-WECHSELWIRKUNGEN

Lektine besitzen eine oder mehrere CRDs (engl. *CRD* - *carbohydrate recognition domain*), welche spezifische Wechselwirkungen mit den jeweiligen Sacchariden eingehen können. Für die Anbindung der entsprechenden Kohlenhydrate sind im Wesentlichen folgende Beiträge von Bedeutung:

- Wasserstoffbrücken
- Ionische Wechselwirkungen
- Hydrophobe Wechselwirkungen

2.2.3.1 Wasserstoffbrücken

Die freien Hydroxylgruppen der jeweiligen Saccharide sind in der Lage *direkte* Wasserstoffbrücken mit den Aminosäuren (Asn, Gln) der CRDs auszubilden. Einige Lektine benötigen zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken bivalente Kationen, wie Ca^{2+} oder Mn^{2+} , welche mit den Carbonyl-Sauerstoffen der jeweiligen Aminosäuren interagieren. Dadurch werden diese entsprechend ausgerichtet, sodass eine koordinative Bindung mit den Hydroxylgruppen der Saccharide möglich ist^[54] (**Abbildung 4**).

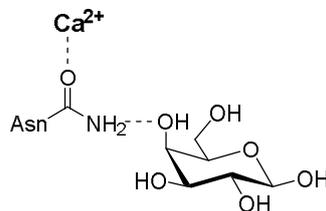


Abbildung 4: Wasserstoffbrückenbildungen mit bivalenten Kationen (Ca^{2+}).

Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass die Wasserstoffbrücken *indirekt* ausgebildet werden. Hierbei fungieren Wassermoleküle als Mediatoren, welche zwischen dem Kohlenhydrat und der entsprechenden Aminosäure angetroffen werden können^[55] (**Abbildung 5**).

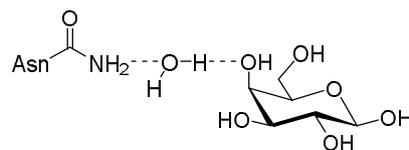


Abbildung 5: Wassermedierte Wasserstoffbrückenbildung.

2.2.3.2 Ionische Wechselwirkungen

Neben den Wasserstoffbrückenbinden tragen auch ionische Wechselwirkungen zur spezifischen Kohlenhydrat-Anbindung bei. Hierbei wechselwirken negativ geladene Saccharid-Regionen, wie z.B. Carboxylate bei der *N*-Acetyl-D-neuraminsäure (**Abbildung 6**), mit positiv geladenen Aminosäuren (Arg, Lys, His).

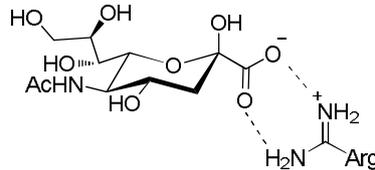


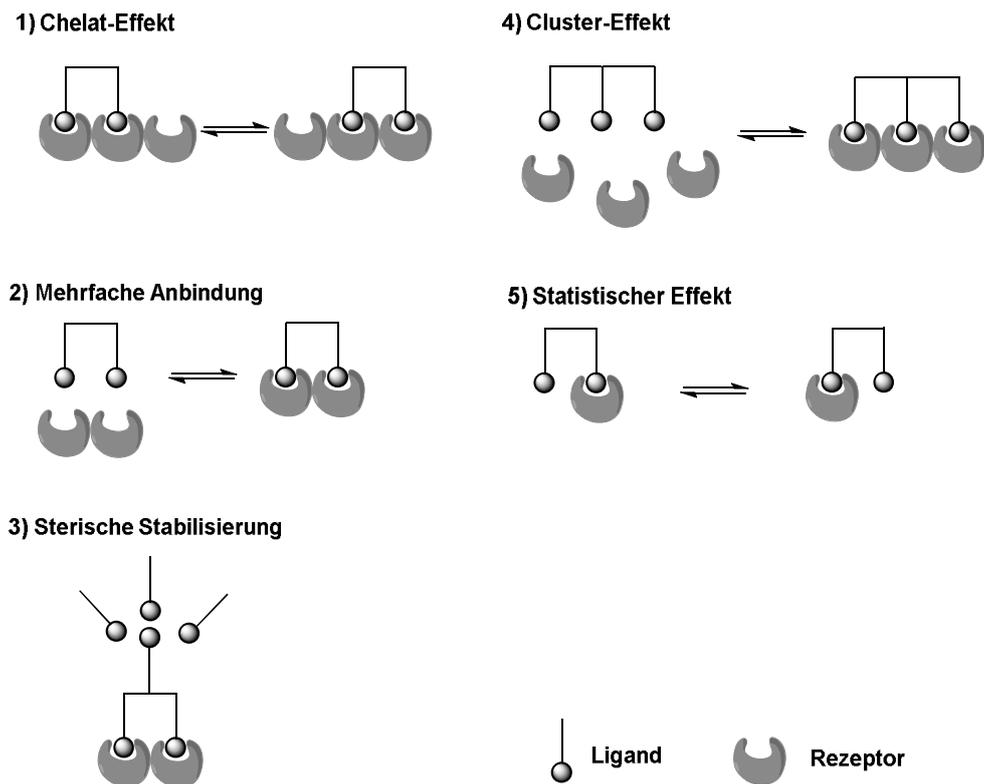
Abbildung 6: Ionische Wechselwirkungen am Beispiel der *N*-Acetyl-D-neuraminsäure.

2.2.3.3 Hydrophobe Wechselwirkungen

Überdies spielen auch hydrophobe Wechselwirkungen, wie Van-der-Waals-Kräfte zwischen aromatischen Seitenketten der Aminosäuren (Trp, His, Phe) und den unpolaren Bereichen der jeweiligen Saccharide (B-Face) eine wichtige Rolle. Durch diese Interaktionen können Kohlenhydrate über eine Art Stapel-effekt vororientiert werden, sodass die Anbindung in der CRD signifikant verstärkt werden kann^[56].

2.2.3.4 Multivalente Wechselwirkungen

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Wechselwirkung eines Monosaccharids mit einer einzelnen CRDs lediglich schwach ist, weshalb die korrespondierenden Bindungskonstanten (K_D -Werte) nur im millimolaren Bereich liegen. Um die Kohlenhydrat-Lektin-Anbindung zu verstärken, sind sogenannte „Multivalente Wechselwirkungen“ notwendig^[57]. Hierbei wechselwirken mehrere Mono- respektive Oligosaccharide mit zahlreichen CRDs. Die Anbindung eines multivalenten Liganden kann dabei bis zu drei Zehnerpotenzen größer sein als die Wechselwirkung mit einem entsprechenden Monosaccharid. Diese Affinitätssteigerung kann jedoch nicht nur durch eine schlichte Addition der einzelnen Bindungskonstanten erklärt werden. Diesbezüglich spielen weitere Effekte eine entscheidende Rolle^[58-59] (**Schema 7**).



Schema 7: Multivalente Wechselwirkungen^[60].

- 1) *Chelat-Effekt:*
Eine Verdrängung mehrerer Lösungsmittelmoleküle führt zu einer Entropiezunahme.
- 2) Eine *Mehrfachbindung* verhindert, bei einem Bruch einer einzelnen Bindung, die komplette Dissoziation des Liganden-Protein-Komplexes.
- 3) Eine *sterische Abschirmung* des Rezeptors erhöht die Anbindung des Liganden.
- 4) *Cluster-Effekt:* Eine Annäherung des Liganden verändert die Ausrichtung der Rezeptoren.
- 5) Eine *hohe Ligandenkonzentration* begünstigt eine Rückbindung zum Protein/Rezeptor.

2.3 OLIGOSACCHARIDMIMETIKA

Um Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen, ist es notwendig, dass die entsprechenden Oligosaccharide respektive deren Glycokonjugate in ausreichender Menge vorliegen. Die Isolierung komplexer Oligosaccharide aus natürlichen Ressourcen ist jedoch aufgrund der schlechten Verfügbarkeit und der Mikroheterogenität äußerst schwierig, weshalb die chemische Synthese die einzige Alternative ist, um biologischen Studien eine ausreichend große Menge an reinem Probenmaterial zur Verfügung zu stellen. Angesichts komplizierter Schutzgruppenstrategien ist die nasschemische Oligosaccharidsynthese jedoch sehr aufwendig und zeitintensiv.

Infolge dieser Problematik etablierten sich in den vergangenen Dekaden „Oligosaccharidmimetika“ (griech. *mimesis* – Nachahmung), wie neo-Glycopeptide^[61], Glycopolymere^[62] oder Glycodendrimere^[63] welche die natürlichen Saccharidstrukturen imitieren.

Die Entwicklung von Wirkstoffen wie Oligosaccharidmimetika, das sog. Wirkstoffdesign (engl. – *drug design*), erfolgt heutzutage üblicherweise auf Grundlage von computergestützten-, strukturbasierten- oder kombinatorischen Methoden. Das computergestützte Wirkstoffdesign setzt hierbei voraus, dass die Struktur des jeweiligen Rezeptors bekannt ist, woraufhin mittels molekularem Modellieren (engl. – *molecular modeling*) geeignete Wirkstoffe entworfen werden, welche nach ausgiebigen Bindungsstudien (engl. – *docking studies*) weiter optimiert werden^[64-66]. Beim strukturbasierten Wirkstoffdesign wird ein Wirkstoff durch gezielte Modifikation von Leitstrukturen, wie Saccharidsequenzen oder anderen Naturstoffen, entwickelt^[66]. Hierbei werden funktionelle Gruppen punktuell verändert, sodass die Affinität gegenüber dem entsprechenden Rezeptor sukzessive gesteigert wird. Da die dreidimensionale Struktur eines Saccharid-Lektin-Komplexes jedoch häufig unbekannt ist, liegen nur in wenigen Fällen genaue Informationen über die tatsächliche Bindungssituation vor, wodurch das rationale Wirkstoffdesign erschwert wird. Darüber hinaus haben weitumfassende Untersuchungen ergeben, dass es zwischen einem Wirkstoff, wie einem Oligosaccharid, und dem entsprechenden Mimetikum keine strukturelle Ähnlichkeit geben muss, entscheidend ist vielmehr eine enge „Funktionsverwandtschaft“^[67]. Daher hat sich alternativ der Einsatz von kombinatorischen Methoden als sinnvoll erwiesen, bei denen riesige Substanzbibliotheken generiert werden^[68-69]. Die Darstellung solcher Bibliotheken erfolgt häufig auf funktionalisierten Trägern aus Kügelchen oder planaren Oberflächen unter Verwendung der etablierten festphasenvermittelten Peptidsynthese (engl. *SPPS* – *solid phase peptide synthesis*), sodass die Screenings heutzutage meist automatisiert nach standardisierten Protokollen ablaufen können^[70].

2.4 KOMBINATORISCHE FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE

2.4.1 KOMBINATORISCHE CHEMIE

Die Kombinatorische Chemie beruht auf der Kombinatorik, einem Teilgebiet der Mathematik, welche sich mit der möglichen Anzahl an Anordnungen oder Auswahlen von gleichen oder unterscheidbaren Objekten unter Berücksichtigung (Permutation, lat. – *permutare, vertauschen*) oder Vernachlässigung der Reihenfolge (Kombination, lat. – *combinatio, zusammenfassen*) befasst^[71].

Im Gegensatz zur konventionellen, nasschemischen Synthese, bei der zwei Edukte (**A** und **B**) zu genau einem gewünschten Produkt **AB** umgesetzt werden, basiert die kombinatorische Synthese also auf der simultanen Verknüpfung von ähnlichen Synthesebausteinen (**A** und **B**), sodass alle möglichen Kombinationen (**A_{1-n}B_{1-m}**) in Form einer Substanzbibliothek (Kapitel 2.4.3) erhalten werden (**Schema 8**).



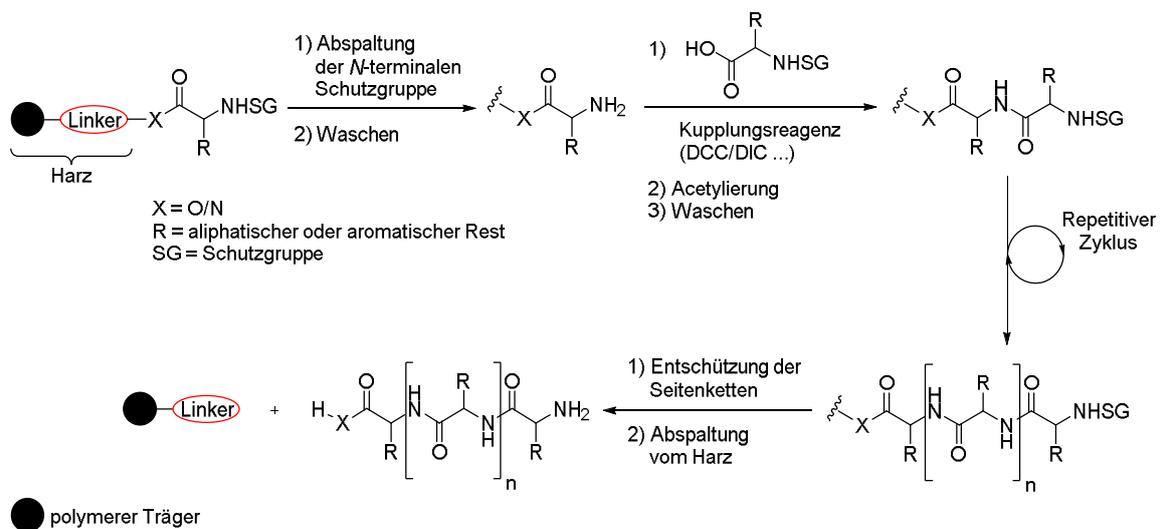
Schema 8: Konventionelle- und kombinatorische Synthese.

Werden beispielsweise fünf Bausteine des Typs **A** mit fünf Bausteinen des Typs **B** verknüpft, so ergeben sich mittels konventioneller Synthese lediglich fünf Produkte **AB**, wohingegen bei der kombinatorischen Synthese $5 \cdot 5 = 25$ verschiedene Verbindungen erhalten werden können. Werden diese Substanzen in einem weiteren Schritt mit fünf Bausteinen des Typs **C** umgesetzt, so wird die charakteristische Stärke der kombinatorischen Chemie deutlicher, da hierbei bereits $5 \cdot 5 \cdot 5 = 125$ unterschiedliche Produkte dargestellt werden können. Mathematisch lässt sich dies mit der allgemeinen Formel $p = n_A \cdot n_B \cdot n_C$ beschreiben, wobei n für die Anzahl der Bausteine des jeweiligen Typs und p für die Anzahl aller möglichen kombinatorischen Verknüpfungen steht. Bei Peptidsynthesen ist die Anzahl n bei allen Bausteintypen (**A**, **B**, **C** ...) üblicherweise identisch, sodass sich die Formel folgendermaßen verkürzt: $p = n^x$, wobei x die Anzahl der ausgeführten Reaktionsschritte angibt^[71].

2.4.2 FESTPHASENPEPTIDSYNTHESE

2.4.2.1 Prinzip

Bei der nasschemischen Synthese von komplexen Naturstoffen, wie beispielsweise Proteinen, ist die Aufreinigung mittels chromatographischer Methoden oft sehr aufwendig und kostenintensiv. Aufgrund dieser Problematik entwickelte R. B. Merrifield^[72-73] in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts eine festphasenvermittelte Peptidsynthese, bei der die Peptide an einem funktionalisierten, polymeren Träger schrittweise vom C- zum N-Terminus aus einzelnen Aminosäuren aufgebaut werden (**Schema 9**).



Schema 9: Prinzip der Festphasenpeptidsynthese.

Zu Beginn einer Festphasenpeptidsynthese wird die erste Aminosäure über ihre Carboxylgruppe an einen funktionalisierten Träger gebunden. Daraufhin wird die N-terminale Schutzgruppe abgespalten, wonach die Anbindung der nächsten Aminosäure erfolgt. Diese Reaktionssequenz wird so lange wiederholt, bis das Peptid mit der gewünschten Länge aufgebaut wurde. Zur Vermeidung von Mischsequenzen während der Synthese werden nicht abreagierte, terminale Aminogruppen nach jedem Kupplungsschritt mittels Acetanhydrid acetyliert. Nach Beendigung der festphasenvermittelten Synthese werden die Schutzgruppen der Seitenketten entschützt, woraufhin die Bindung zur festen Phase über den Linker mit einem geeigneten Reagenz selektiv gespalten wird.

Vorteile der Festphasensynthese gegenüber der Synthese in Lösung^[74-75]:*- Vereinfachung der Reaktionsdurchführung*

Festphasensynthesen vereinfachen Synthesen, welche aus mehreren sich wiederholenden Schritten bestehen, da alle Reaktionen in der Regel durch Schütteln des Polymers in demselben Glas- oder Plastik-Reaktor durchgeführt werden können. Die Aufreinigung erfolgt durch simples Abfiltrieren und Waschen des Polymers mit diversen Lösungsmitteln, sodass überschüssige Reaktanden leicht abgetrennt werden können.

- Thermodynamische Beeinflussung des Reaktionsverlaufes

Die entsprechenden Reagenzien werden im großen Überschuss eingesetzt, infolgedessen Anbindungen oder Abspaltungen nahezu quantitativ ablaufen, wodurch hohe Umsätze (> 90%) erzielt werden können.

- Prinzip der hohen Verdünnung

Bei Festphasensynthesen können auch Träger mit geringeren Beladungsgraden (< 0.8 mmol/g) eingesetzt werden, wodurch Nebenreaktionen zwischen bereits immobilisierten Produkten, wie Quervernetzungen oder Mehrfachkupplungen, reduziert werden.

- Automatisierung der einzelnen Reaktionsschritte

Nach der Optimierung der einzelnen Teilreaktionen kann die Synthese voll automatisiert werden.

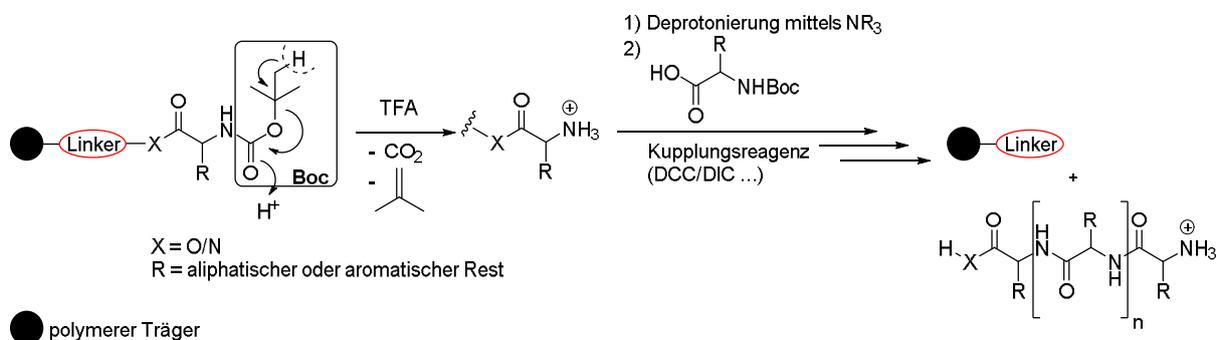
- Regeneration des Trägers

Nach der Abspaltung des Produkts vom Harz können einige Träger wieder verwendet werden.

2.4.2.2 Boc- und Fmoc-Strategie

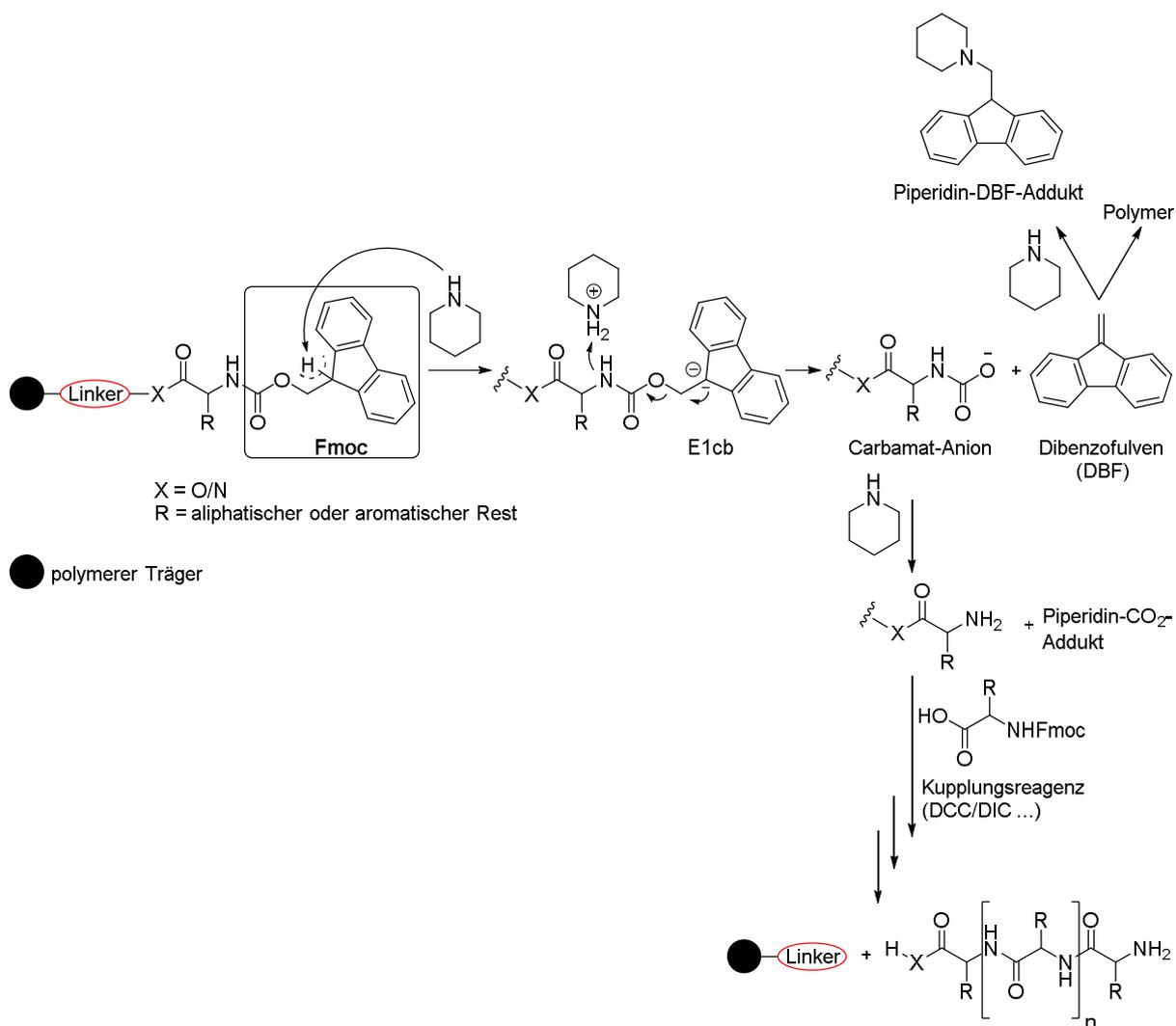
Bei der Festphasenpeptidsynthese kommen vorrangig zwei Schutzgruppenstrategien zur Anwendung: Die *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)- sowie die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Strategie.

Die Boc-Strategie, welche erstmals 1967 von R. B. Merrifield^[73,76] publiziert wurde, basiert auf der Verwendung von *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-geschützten Aminosäuren, welche unter sauren Bedingungen, beispielsweise mittels Trifluoressigsäure (TFA), entschützt werden können (**Schema 10**). Bei dieser protoneninduzierten Abspaltung entsteht zunächst ein *tert*-Butyl-Kation, welches entweder zum gasförmigen Isobuten oder mit den Peptidseitenketten weiterreagieren kann. Zur Reduzierung der elektrophilen Nebenreaktionen wird die Boc-Entschützung häufig unter Beteiligung von sogenannten Scavengern wie Thiolen oder Silanen durchgeführt, welche die *tert*-Butyl-Kationen abfangen^[77-78]. Darüber hinaus werden die terminalen Aminogruppen nach jeder sauer induzierten Abspaltung protoniert, sodass die korrespondierenden Ammoniumverbindungen vor einer erneuten Peptidkupplung zunächst mit einer Hilfsbase, wie NEt_3 oder DIPEA, deprotoniert werden müssen. Im Vergleich zur Hauptkette sind die Schutzgruppen der Peptidseitenketten gegenüber der Trifluoressigsäure beständig und werden erst nach dem Ende der Synthese, beispielsweise mittels Flusssäure (HF), entfernt.



Schema 10: Festphasenpeptidsynthese mittels Boc-Strategie.

Die sauren Bedingungen können dazu führen, dass die Peptide während der Synthesesequenz degenerieren. Infolgedessen entwickelte R. C. Sheppard^[79-80] im Jahre 1978, auf Grundlage der von Carpino und Han^[81] publizierten 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) – Gruppe, eine orthogonale Synthesestrategie, die auf Fmoc-geschützten Aminosäuren beruht, welche unter milden, basischen Bedingungen mittels sekundären Aminen, wie Piperidin oder Morpholin entschützt werden können (**Schema 11**). Die Schutzgruppen der Peptidseitenketten sind hierbei gegenüber den basischen Bedingungen stabil und können beispielsweise mittels Säuren entfernt werden.



Schema 11: Festphasenpeptidsynthese mittels Fmoc-Strategie.

Die Fmoc-Abspaltung erfolgt über einen E1cb-Mechanismus^[82], bei dem zunächst der acide Wasserstoff des Fluorenylrests abstrahiert wird, woraufhin ein durchkonjugiertes, aromatisches System entsteht. Diese Deprotonierung induziert eine Elektronenverschiebung, wobei sich ein Carbamat-Anion sowie Dibenzofulven (DBF) ausbilden, welche aufgrund des Piperidinüberschusses direkt weiterreagieren. Das Carbamat-Anion decarboxyliert zum entsprechenden Amin, wohingegen das Dibenzofulven, welches zur Polymerisation neigt, ein Addukt mit dem Piperidin bildet (Kapitel 2.4.2.2), sodass die Entstehung von unerwünschten Nebenprodukten reduziert wird. Da bei der basischen Fmoc-Entschützung mit einem großen Piperidinüberschuss gearbeitet wird, ist bei der Decarboxylierung häufig keine CO₂-Entwicklung zu beobachten, was durch ein Piperidin-CO₂-Addukt erklärt werden kann^[83].

Die Wahl der entsprechenden Schutzgruppenstrategie kann je nach vorliegender Thematik variieren, wobei die Boc-Strategie jedoch aufgrund der harschen Bedingungen immer seltener zur Anwendung kommt, weshalb festphasenvermittelte Peptidsynthesen heutzutage bevorzugt unter Verwendung der milderen Fmoc-Strategie durchgeführt werden.

2.4.2.3 Trägermaterialien

Seit den Anfängen der Festphasensynthese in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden bis dato zahlreiche Applikationen entwickelt, bei denen polymere Träger mit unterschiedlichen Eigenschaften (Beladungsgrad, Quellverhalten, chemische-, thermische- und mechanische Stabilität) zum Einsatz kommen. Die klassische Harz-Synthese basiert hierbei auf der Verwendung von funktionalisierten Kügelchen aus Styrol-Polymeren, wohingegen die Festphasensynthese mittels planaren Trägern hauptsächlich auf Cellulose, Polystyrol oder Glas erfolgt. Aufgrund der enormen Vielfalt an Trägern werden im folgenden Abschnitt nur einige wichtige Vertreter exemplarisch näher beschrieben.

Styrol-Polymere

Bei festphasenvermittelten, organischen Synthesen finden häufig Copolymere aus Styrol, Divinylbenzol (DVB) und Polyethylenglycol (PEG) Verwendung (**Abbildung 7**).

Das meistgenutzte Trägermaterial ist mikroporöses Polystyrol, welches mit 1-2% Divinylbenzol quervernetzt wird^[84-85]. Dieses Styrol-DVB-Copolymer zeichnet sich durch eine hohe mechanische und thermische Stabilität aus und kann in den organischen Solventien DCM, Dioxan, DMF, DMSO, THF, oder NMP gut aufquellen, sodass hohe Beladungsgrade von 0.5-1.5 mmol/g möglich sind. Finden hingegen protische Lösungsmittel wie MeOH oder H₂O Verwendung, bei denen das Harz nicht quillt, so muss ein Cosolvens mit gutem Quellverhalten zugesetzt werden. Aufgrund dieser Problematik modifizierten W. Rapp und E. Bayer das Styrol-DVB-Copolymer durch Pfropfcopolymerisation mit Polyethylenglycol (PEG), wodurch die Toleranz gegenüber protischen Lösungsmitteln signifikant gesteigert werden konnte^[86-90]. Dieses Polystyrol-PEG-Pfropfpolymer, welches aus ca. 30% einer DVB quervernetzten Polystyrolmatrix besteht, die mit ca. 70% PEG versetzt wurde, besitzt in Relation zu Styrol-DVB-Copolymeren verbesserte Quelleigenschaften, jedoch sind die möglichen Beladungen mit 0.2-0.5 mmol/g etwas geringer. Seit 1991 wird das Polystyrol-PEG-Pfropfpolymer unter dem Namen TentaGel[®] kommerziell vertrieben^[86-90].

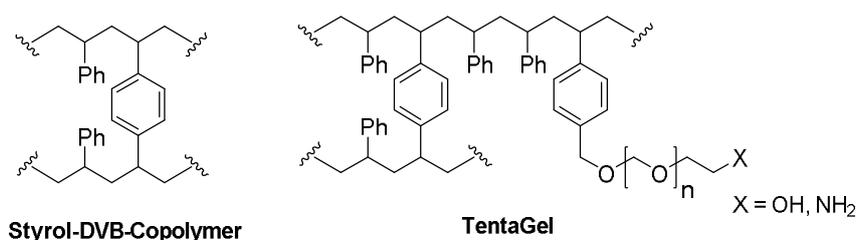


Abbildung 7: Styrol-DVB-Copolymer und TentaGel[®].

Cellulose

Bei Cellulosemembranen sind die einzelnen Glucosemoleküle $\beta(1-4)$ -glycosidisch miteinander verknüpft, wodurch ein poröses, quellbares, faseriges Netzwerk entsteht, welches hohe Derivatisierungsgrade ($500-1600 \text{ nmol/cm}^2$) ermöglicht^[17,91]. Desweiteren zeichnen sich Membrane aus Cellulose durch ihre hohe mechanische Stabilität, sowie einer gewissen Beständigkeit gegenüber organischen Solventien oder Reagenzien wie NaOMe oder NH_3 aus^[91] (**Abbildung 8**).

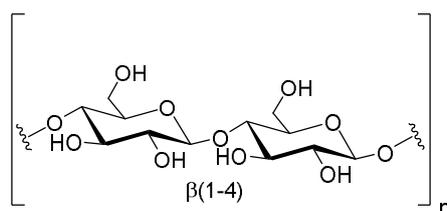


Abbildung 8: Cellobioseeinheit der Cellulose.

Glas

Träger aus Glas bestehen aus SiO_2 -Tetraedern (**Abbildung 9**) und beeindrucken durch ihre hohe mechanische, thermische sowie chemische Stabilität^[92]. Da Glas gegenüber allen organischen Solventien inert ist und nicht quillt, sind die Derivatisierungsgrade jedoch dementsprechend niedriger ($20-40 \text{ nmol/cm}^2$)^[24]. Neben planaren Glasträgern kommen auch Kügelchen (engl. – *beads*) aus Glas zur Anwendung. Dieses kommerziell erhältliche Glas unterscheidet sich in Partikel- und Porengröße, sowie der inneren Oberfläche. Träger mit großen Poren ($d = 25-300 \text{ nm}$) werden hierbei als „Controlled Pore Glass“ (CPG) bezeichnet und kommen insbesondere bei der Synthese von Oligonukleotiden zum Einsatz^[93].

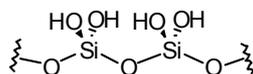


Abbildung 9: Glas aus SiO_2 -Tetraedern.

2.4.2.4 Linker

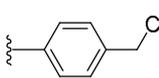
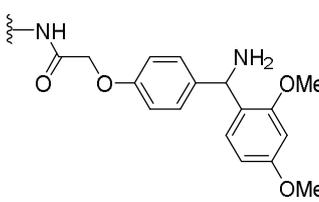
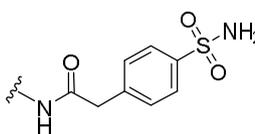
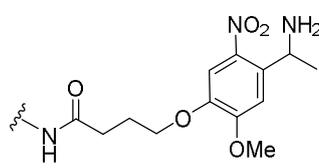
Bei einer Festphasensynthese fungiert der Linker als Bindeglied zwischen dem Trägermaterial und dem jeweiligen Substrat.

Damit ein Molekül diesbezüglich als Linker herangezogen werden kann, muss es spezifische Anforderungen erfüllen^[94]:

- Zu Beginn einer Festphasenpeptidsynthese sollte das potentielle Linkermolekül die Anbindung der ersten Aminosäure (engl. - *loading*) problemlos mit nahezu quantitativem Umsatz erlauben.
- Während der Synthesesequenz muss der Linker sämtliche Reaktionsbedingungen unbeschadet überstehen, ohne vorzeitig vom Träger abgespalten zu werden.
- Nach Beendigung der Festphasensynthese sollte die Abspaltung des jeweiligen Peptids schließlich annähernd quantitativ, sowie zersetzungsfrei vonstattengehen.

Da bei festphasenvermittelten Peptidsynthesen eine Vielzahl von Parametern (Träger, Linker, Aktivierungsmethoden) variiert werden können, entwickelten sich im Laufe der Zeit auch diverse Linkersysteme, bei denen die Abspaltung des Peptids unter elektrophilen^[85,95-100], nucleophilen^[101-103] Bedingungen oder mittels einer photochemischen Reaktion^[104-105] erfolgen kann (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Exemplarische Auswahl an Linkersystemen.

Eintrag	Linker	Abspaltung des Peptids vom Linker mit	Kompatible Schutzgruppenstrategie
1	Chlormethyl-Linker ^[85] 	HF, TMFSA	Boc
2	Rink-Amid-Linker ^[96] 	20-95% TFA/DCM	Fmoc
3	Kenner-Linker ^[103] 	CH ₂ N ₂ und Nucleophilen	Boc
4	Holmes-Linker ^[104] 	UV-Strahlung (λ = 365 nm)	Fmoc, Boc

2.4.2.5 Peptidkupplungsmethoden

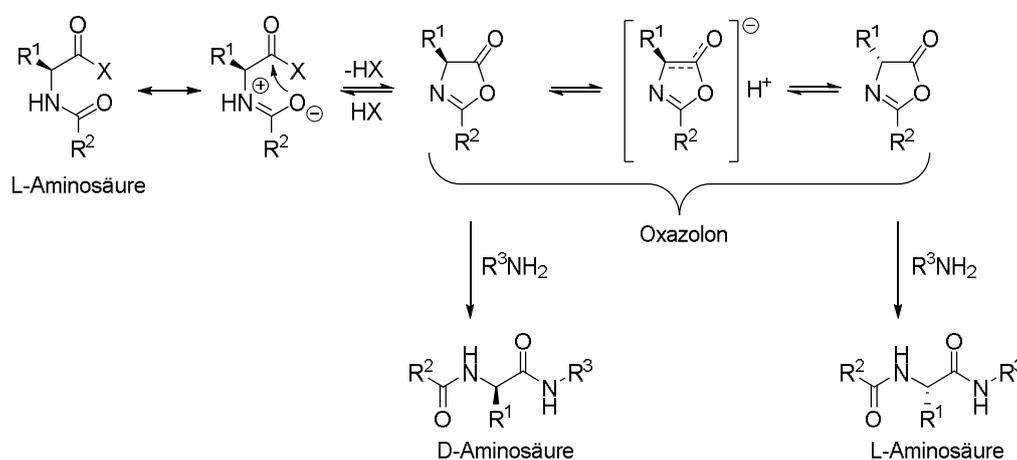
Die Ausbildung einer Peptidbindung zwischen einer Carbonsäure und einem Amin erfolgt aufgrund der geringen Carbonylaktivität der Carbonsäure nicht spontan, weshalb die Hydroxylgruppe der jeweiligen Säure zunächst mithilfe von geeigneten Kupplungsreagenzien in eine elektronenziehende Abgangsgruppe (X) umgewandelt werden muss (**Schema 12**).



X = Abgangsgruppe; R¹, R² = aliphatischer oder aromatischer Rest

Schema 12: Allgemeine Peptidkupplungsreaktion.

Damit eine Verbindung als Kupplungsreagenz fungieren kann, muss diese eine hohe Reaktivität sowie geringe Tendenz zur Racemisierung vorweisen können. Bei Verwendung eines ungeeigneten Kupplungsreagenzes kann beispielsweise eine L-Aminosäure unter Bildung eines Oxazolons in die korrespondierende D-Aminosäure umgewandelt werden^[106-108] (**Schema 13**).



R¹, R², R³ = aliphatischer oder aromatischer Rest

Schema 13: Racemisierung einer D/L-Aminosäure unter Bildung eines Oxazolons.

In der Literatur wurden in den vergangenen Dekaden zahlreiche Peptidkupplungsmethoden vorgestellt, wobei aufgrund der enormen Vielfalt nur die wichtigsten exemplarisch beschrieben werden^[109-110].

Carbodiimide und Aktivester

Bei Carbodiimiden handelt es sich um *in situ*-Aktivierungsreagenzien, welche häufig in der Peptid-Chemie verwendet werden. Die wichtigsten Vertreter sind hierbei das *N,N'*-Dicyclohexyl-^[111], das *N,N'*-Diisopropyl-^[112], sowie das 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid^[113] (**Abbildung 10**).

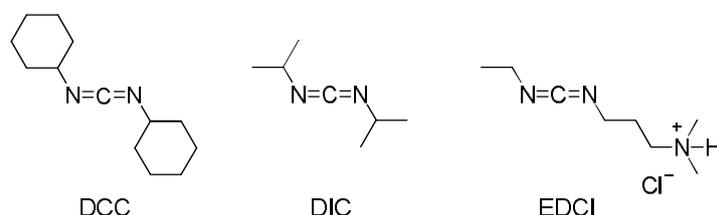
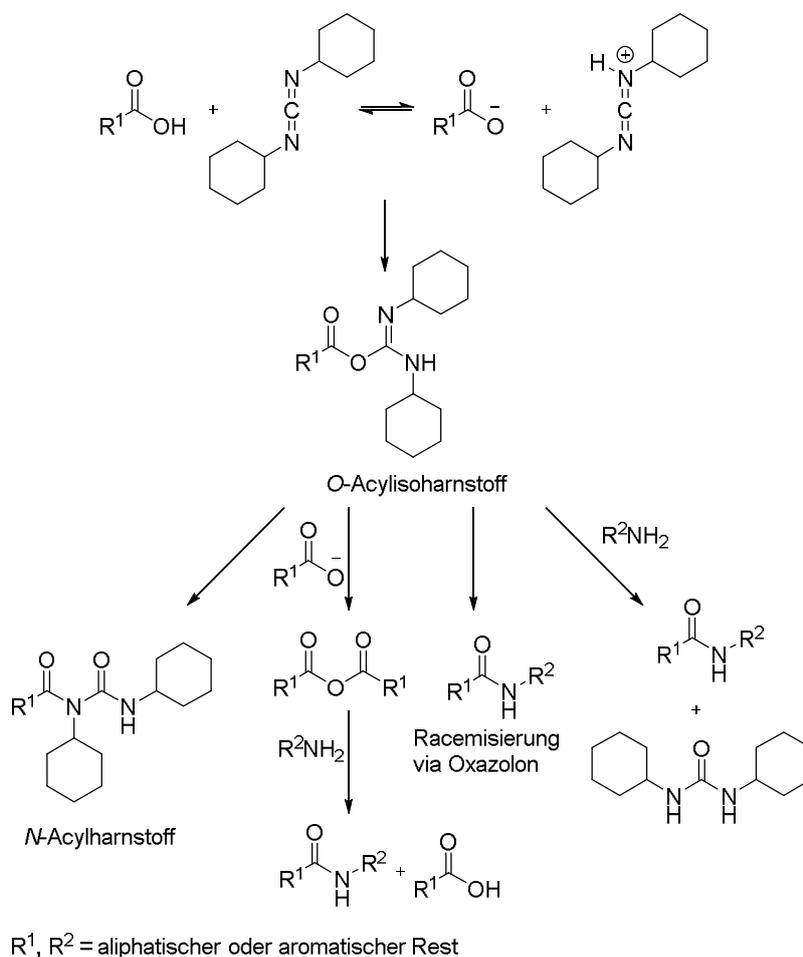


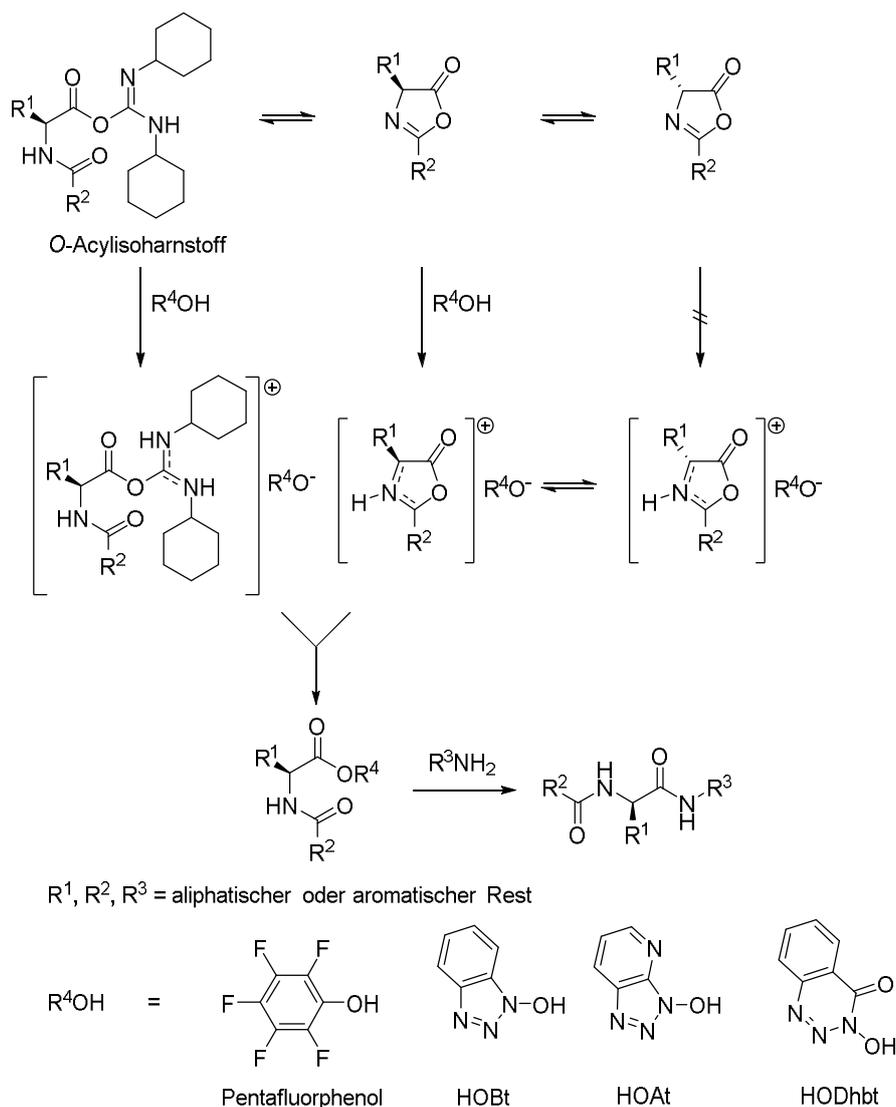
Abbildung 10: DCC, DIC und EDCI.

Bei der Aktivierung einer Carbonsäure mit einem Carbodiimid bildet sich als reaktive Spezies zunächst ein *O*-Acylisoharnstoffderivat, das nucleophil von einem Amin angegriffen werden kann, wodurch das jeweilige Peptid und das entsprechende Harnstoffderivat entstehen. Die Ausbildung des Harnstoffs stellt die Triebkraft der Reaktion dar (**Schema 14**).



Schema 14: Peptidkupplung mithilfe von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid.

Nachteilig bei der Aktivierung mit Carbodiimiden ist die hohe Tendenz zur Racemisierung und die Umlagerung des reaktiven *O*-Acylisoharnstoffs zu einem unreaktiven *N*-Acylharnstoffderivat (**Schema 14**). Um diese Nebenreaktion zu vermeiden werden die *O*-Acylisoharnstoffderivate häufig durch Zugabe von Nucleophilen wie Pentafluorphenol^[114], 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)^[115], 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt)^[116] oder 3-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-on (HODhbt)^[117-119] in die entsprechenden Aktivester überführt (**Schema 15**).



Schema 15: Peptidkupplung mittels DCC und Aktivester.

Bei Synthesen in Lösung wird oft das *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) eingesetzt, da der *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff während der Reaktion ausfällt und durch Filtration abgetrennt werden kann. Bei nasschemischen Synthesen findet desweiteren auch häufig das 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDCI) Verwendung, da dessen tertiärer Stickstoff leicht protoniert werden kann wodurch die Abtrennung des resultierenden Harnstoffderivats mittels wässriger

Extraktion möglich ist. Für Festphasensynthesen kommt hingegen das *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) zum Einsatz, weil der entsprechende *N,N'*-Diisopropylharnstoff einfach mit DCM abgewaschen werden kann.

Uronium-/Aminium-Salze

In der Peptidchemie kommen neben den Carbodiimiden häufig auch Uronium- bzw. Guanidinium-Salze zum Einsatz. Die Struktur ist nach wie vor umstritten und hängt vom verwendeten Lösungsmittel, der Isolierungsmethode, sowie dem Gegenion ab^[120-121]. Die wichtigsten Vertreter sind hierbei das HBTU^[122] und HATU^[122] (**Abbildung 11**).

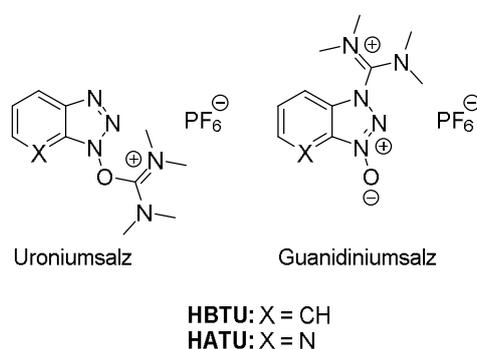
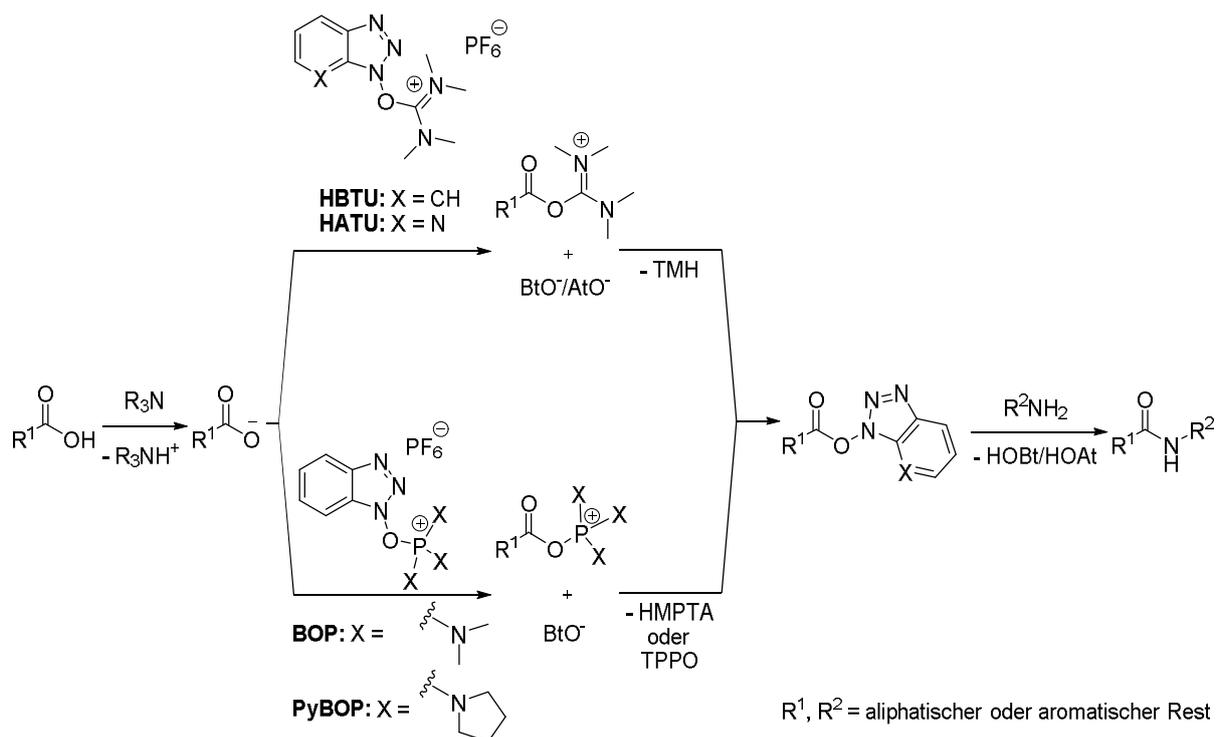


Abbildung 11: Uronium- und Guanidinium-Salze von HBTU und HATU.

Die Kupplung der Carbonsäure mit dem Amin in Gegenwart von HBTU oder HATU benötigt eine Hilfsbase (z.B. NEt_3 oder DIPEA). Dabei bildet die deprotonierte Säure mit dem jeweiligen Reagenz zunächst ein *O*-Acyluroniumkation, welches mit dem 1-Hydroxybenzotriazol-Anion (BtO^-) bzw. dem 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol-Anion (AtO^-) unter Freisetzung des Tetramethylharnstoffs (TMH) in den korrespondierenden Aktivester überführt wird, der im Anschluss mit dem Amin zum Peptid weiter reagiert (**Schema 16**).

Phosphoniumsalze

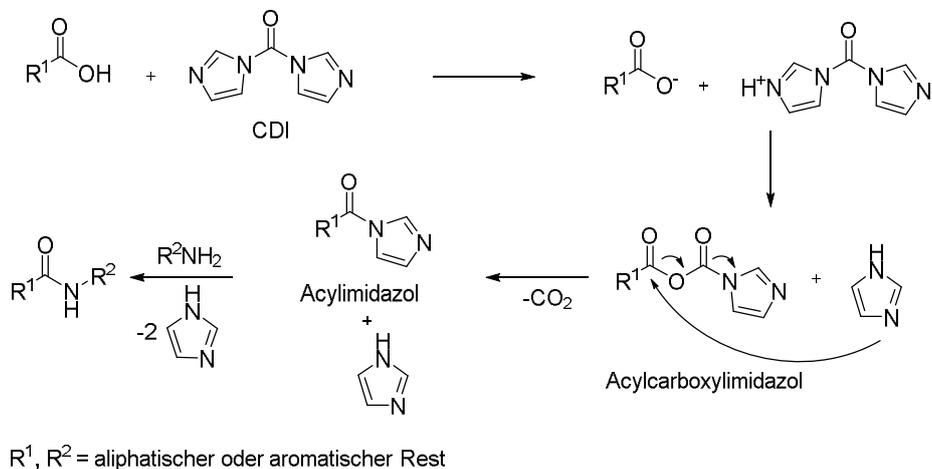
Eine weitere wichtige Klasse von Kupplungsreagenzien sind die Phosphoniumsalze. Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat (BOP)^[123], auch bekannt als *Castro's Reagenz*, ist das erste publizierte Beispiel dieser auf HOBt basierenden Oniumsalze (**Schema 16**). Da bei der BOP-vermittelten Peptidkupplung Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPTA) entsteht, welches karzinogene Eigenschaften besitzt, wird heutzutage bevorzugt das Benzotriazol-1-yloxy-trispyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP)^[124] als Kupplungsreagenz eingesetzt, da sich hierbei das unbedenklichere Tris(pyrrolidinophosphin)oxid (TPPO) bildet.



Schema 16: Peptidkupplung unter Verwendung von HBTU/HATU sowie BOP/PyBOP.

Carbonyldiimidazol (CDI)

Das Carbonyldiimidazol (CDI)^[125] ermöglicht eine alternative Aktivierung von Carbonsäuren. Hierbei fungiert das CDI zunächst als Base, welche die vorliegende Carbonsäure deprotoniert (**Schema 17**). Das so erhaltene Carboxylatanion kann nun nucleophil mit dem Carbonyl-Kohlenstoff des CDI reagieren, was je die Bildung eines gemischten Anhydrids und Imidazol-Moleküls zur Folge hat. Daraufhin entsteht die aktive Spezies, das Acylimidazol. Hierbei stellt die Abspaltung von CO_2 die Triebkraft der Reaktion dar. Durch das entstehende Imidazol ist es auch möglich die Hydrochloride der jeweiligen Amine einzusetzen, ohne dass eine zusätzliche Base notwendig ist.



Schema 17: Ausbildung einer Amidbindung mittels CDI.

2.4.2.6 Monitoring von Festphasenpeptidsynthesen

Zur Reaktionsverfolgung (engl. - *monitoring*) einer Festphasensynthese wird das Substrat idealerweise nach jedem einzelnen Kupplungsschritt vom Träger abgespalten und mittels analytischer Methoden (HPLC, NMR, MS) untersucht (*off-beat-monitoring*). Da eine solche Vorgehensweise in der Praxis jedoch nur unter großem Aufwand umsetzbar ist, finden bevorzugt Methoden Verwendung, mit denen trägergebundene Substrate direkt analysiert werden können (*on-beat-monitoring*):

Diese direkte Reaktionsverfolgung kann mittlerweile unter Verwendung diverser Analyseverfahren erfolgen, wobei die Wahl der entsprechenden Methode vom jeweiligen Träger abhängt. Kommen bei einer festphasenvermittelten Synthese Träger, wie funktionalisierte Kügelchen, aus Polystyrol oder planare Cellulosemembranen zum Einsatz, so kann eine Stichprobe entnommen werden und mithilfe der Gravimetrie, Elementaranalyse, Farbreaktionen oder spektrometrischen- bzw. spektroskopischen Methoden untersucht werden. Wird eine Festphasensynthese hingegen auf planaren Trägern aus Polystyrol oder Glas durchgeführt, so erfolgt das Monitoring hauptsächlich unter Verwendung von der UV/Vis-Spektroskopie.

Gravimetrie

Die Gravimetrie ist ein quantitatives Analyseverfahren, bei dem der Beladungsgrad eines Trägers durch simples Auswiegen bestimmt werden kann, sofern die relative Änderung im Vergleich zum unterivatisierten Träger signifikant ist.

Elementaranalyse

Mit einer Elementaranalyse kann die prozentuale Zusammensetzung eines derivatisierten Trägers ermittelt werden, wobei die Bestimmung der Beladung üblicherweise anhand des Halogen-, Stickstoff- oder Schwefelwertes erfolgt^[126-127].

Farbreaktionen

Um zu überprüfen, ob die Ausbildung einer Peptidbindung nahezu quantitativ erfolgt, werden häufig simple Farbreaktionen herangezogen, welche auf der Detektion von nicht abreagierten Aminogruppen beruhen. Die wichtigsten vier Tests diesbezüglich können der **Tabelle 3** entnommen werden.

Tabelle 3: Tests auf freie Aminogruppen.

Eintrag	Test	Nachweis von	Substrat	Farbstoff (Farbe)
1	Kaiser-Test ^[128]	prim./sek. Aminen	Ninhydrin	Ruhemanns Purpur (Violett)
2	TNBS-Test ^[129]	prim. Amine	TNBS	Pikrinamid (orange-rot)
3	Acetaldehyd/Chloranil-Test ^[129]	prim./sek. Aminen	Chloranil	Chloranil-Amin- Addukt (dunkelblau-grün)
4	Bromphenolblau-Test ^[130]	prim./sek. Aminen	Bromphenolblau	Bromphenolblau (dunkelblau)

Der Kaiser-, TNBS- oder Acetaldehyd/Chloranil-Test ist bei Synthesen auf planaren Trägern aus Polystyrol oder Glas nicht vorteilhaft, da bei diesen Tests keine Stichprobe entnommen werden kann, sodass die gesamte Trägermenge, für das Monitoring verbraucht wäre. Daher kommt hier vorwiegend der Bromphenolblau-Test zur Anwendung, da die zugrunde liegende Reaktion reversibel ist. Bromphenolblau fungiert hierbei als pH-Indikator, dessen Farbe in Gegenwart von Basen, wie Aminogruppen, im Bereich von pH 3.0 bis 4.6 von gelb nach blau umschlägt. Nach einem durchgeführten Test kann das Bromphenolblau durch Waschen mit einer Lösung von Piperidin oder DIPEA wieder vom Träger entfernt werden. Die Vollständigkeit einer Peptidkupplung wird demnach durch eine gelbe Färbung angezeigt.

Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse einer trägergebundenen Verbindung kann entweder direkt mit der Sekundärionenmassenspektrometrie (TOF-SIMS)^[131] bzw. MALDI-TOF-MS^[132] oder nach dessen Abspaltung vom Träger mittels ESI/MALDI-TOF-MS erfolgen.

NMR-Spektroskopie

NMR-spektroskopische Untersuchungen können bei festphasengebundenen Substraten mittels Festkörper-NMR oder Gel-Phasen-NMR durchgeführt werden^[133-136]. Die Anwendbarkeit dieser Methoden ist jedoch bei eindimensionalen Spektren auf Kerne wie ¹³C, ¹⁹F oder ³¹P begrenzt, da andere Kerne, wie ¹H, aufgrund von zahlreichen Signalen oder der Linienverbreiterung schlecht ausgewertet werden können. Unter Zuhilfenahme der MAS-NMR-Spektroskopie^[137], bei der die Probe

um den magischen Winkel von 54.74° relativ zum angelegten Magnetfeld gedreht wird, kann die Linienverbreiterung reduziert werden.

IR-Spektroskopie

Die FT-IR- sowie FT-ATR-IR-Spektroskopie kommt bei festphasenvermittelten Peptidsynthesen (SPPS) häufig zur Anwendung, da die Ausbildung einer Peptidbindung einfach anhand von drei charakteristischen Absorptionsbanden ($\tilde{\nu}_s(\text{N-H}) \sim 3300 \text{ cm}^{-1}$; $\tilde{\nu}_s(\text{C=O}) \sim 1650 \text{ cm}^{-1}$; $\tilde{\nu}_{\text{as}}(\text{N-H}) \sim 1520\text{-}1550 \text{ cm}^{-1}$) qualitativ als auch quantitativ verfolgt werden kann^[138].

UV/Vis-Spektroskopie

Erfolgt eine festphasenvermittelte Peptidsynthese unter Verwendung der Fmoc-Strategie (Kapitel 2.4.2.2), so kann die Anbindung der entsprechenden Aminosäure an den Träger im Zuge der anschließenden Fmoc-Entschützung mit einer 20% igen Lösung von Piperidin in DMF (v/v) untersucht werden. Zur Quantifizierung des Derivatisierungsgrades wird die Extinktion des entstehenden Piperidin-Dibenzofulven-Addukts UV-spektroskopisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 301 \text{ nm}$ gemessen^[139] (**Abbildung 12**).

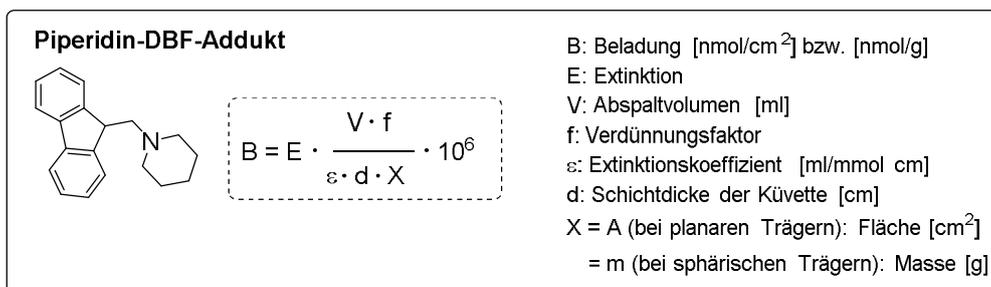
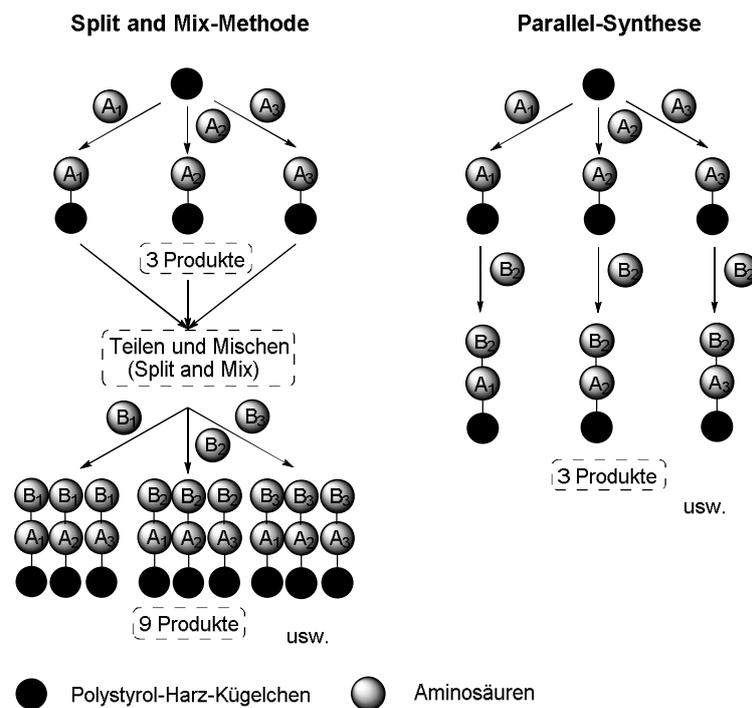


Abbildung 12: UV-spektroskopische Bestimmung des Derivatisierungsgrades.

2.4.3 KOMBINATORISCHE PEPTIDBIBLIOTHEKEN

Bei der kombinatorischen Darstellung von Substanzbibliotheken haben sich zwei Strategien etabliert: Die Split and Mix-Methode^[140] und die Parallel-Synthese^[141] (**Schema 18**).



Schema 18: Split and Mix-Methode und Parallel-Synthese.

2.4.3.1 Split and Mix-Methode

Bei der Split and Mix-Methode nach Furka^[140] werden die einzelnen Bausteine (A_{1-n}) an ein funktionalisiertes Trägermaterial, wie Polystyrol-Kügelchen, gebunden (**Schema 18**). Daraufhin werden die einzelnen Polymer-Kügelchen vereint und gewaschen, woraufhin die *N*-terminale Schutzgruppe abgespalten wird. Anschließend werden die Kügelchen durchmischt und geteilt, infolgedessen weitere Aminosäuren (B_{1-n}) angehängt werden. Durch eine Vielzahl an Wiederholungen können somit komplexe Peptidgemische dargestellt werden, bei denen jede kombinatorisch mögliche Aminosäuresequenz vertreten ist. Am Ende einer Synthese erhält man somit eine Substanzbibliothek, bei der sich auf jedem einzelnen *Bead* genau eine Aminosäuresequenz in vielfacher Kopie befindet (*one-bead-one-compound*^[142]). Um nun spezifische Interaktionen der polymer gebundenen Peptide zu untersuchen, können standardisierte immunologische Detektionsmethoden herangezogen werden^[143]. Sind die biologisch wirksamen Peptide identifiziert worden, so muss jedoch deren Aminosäuresequenz z.B. mithilfe des *Sanger*-^[144] oder *Edman*-

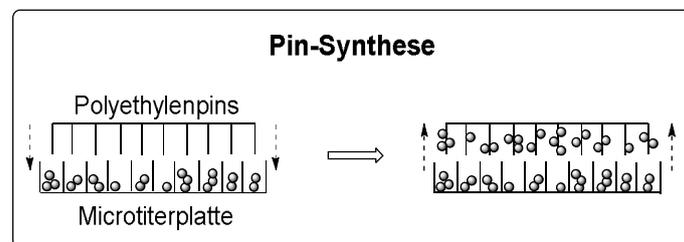
Abbaus^[145] bestimmt werden. Diese aufwendige Dechiffrierung stellt hierbei einen beachtlichen Nachteil der Split and Mix-Methode dar.

2.4.3.2 Parallel-Synthese

Bei kombinatorischen Festphasenpeptidsynthesen erfolgt die gezielte Darstellung von Bibliotheken deshalb bevorzugt mittels der multiplen Parallel-Synthese. Hierbei werden die jeweiligen Peptide gleichzeitig in separierten Reaktoren synthetisiert, sodass deren Sequenz durch die Reihenfolge der Kupplungen vorgegeben wird und somit immer bekannt ist.

Pin-Synthese

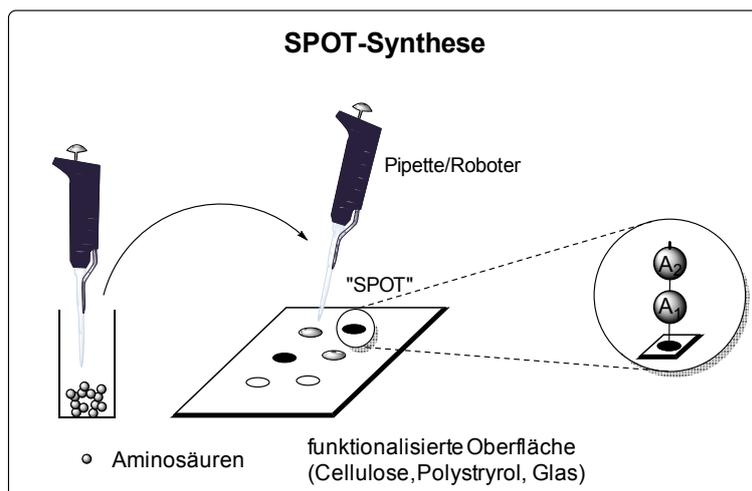
Bei der Parallel-Synthese nach H. M. Geysen^[141] werden die einzelnen Substanzen räumlich getrennt voneinander an aminofunktionalisierten Polyethylenstäbchen synthetisiert, welche in einem 96er Microtiterplattenraster angeordnet sind. Die Anbindung der jeweiligen Aminosäuren erfolgt hierbei durch Eintauchen der Stäbchen in 96er Wellplates, in denen die entsprechenden Lösungen vorgelegt werden (**Schema 19**).



Schema 19: Schematische Darstellung der Parallel-Synthese an Polyethylenstäbchen.

SPOT-Synthese

Im Jahre 1988 entwickelten R. Frank^[146] und J. Eichler^[147] nahezu gleichzeitig die sogenannte SPOT-Synthese, eine Parallel-Synthese, bei der die Darstellung von Peptiden auf planaren, aminofunktionalisierten Cellulosemembranen, erfolgt. Die jeweiligen Aminosäuren werden hierbei mithilfe einer Pipette oder eines Roboters als Tropfen ortsadressiert aufgetragen, wobei zahlreiche, räumlich voneinander getrennte Reaktoren (SPOTS) entstehen, in denen die Peptidkupplungen stattfinden (**Schema 20**).



Schema 20: Schematische Darstellung der SPOT-Synthese.

Die Größe der jeweiligen Spots limitiert hierbei die Zahl der parallel synthetisierbaren Substanzen und hängt vom pipettierten Volumen, der Viskosität des Lösungsmittels sowie den physikalischen Eigenschaften des entsprechenden Trägermaterials ab^[148]. Durch den Einsatz eines Pipettier-Roboters ist es möglich mit sehr geringen Volumina und Substanzmengen zu arbeiten, sodass beispielsweise auf einer Cellulosemembran des Formats 8 x 12 cm Arrays mit bis zu 2000 SPOTS dargestellt werden können^[149] (**Abbildung 13**).

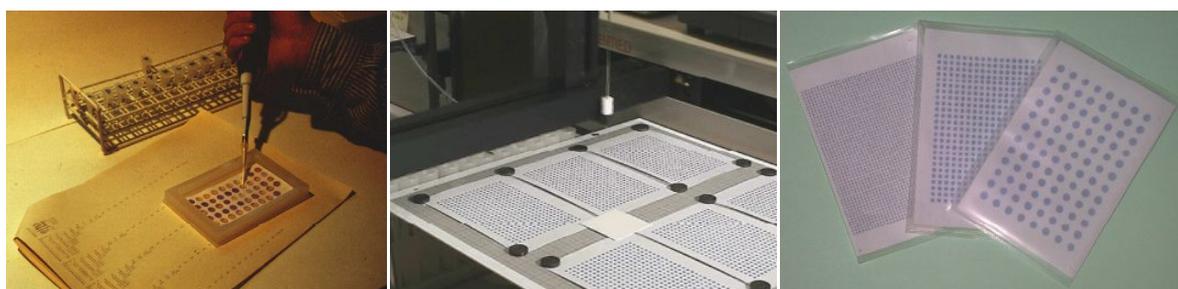


Abbildung 13: *Links:* Manuelle SPOT-Synthese mittels Pipette; *Mitte:* Automatisierte SPOT-Synthese mittels AutoSpot-Roboter; *Rechts:* Funktionalisierte Cellulosemembranen (8 x 12 cm) mit Arrays des Formats 8 x 12 (Volumen/Spot: 0.5 µl; Spot-Abstand: 9 mm; Spot-Durchmesser: 7 mm; Stoffmenge/Spot: 25 nmol), 17 x 25 (Volumen/Spot: 0.1 µl; Spot-Abstand 4 mm; Spot-Durchmesser: 3 mm; Stoffmenge/Spot: 6 nmol) und 40 x 50 (Volumen/Spot: 30 nl; Spot-Abstand 2 mm; Spot-Durchmesser: 1 mm; Stoffmenge/Spot: 1 nmol)^[149-151].

Höhere Spotdichten können unter Verwendung der von Frank *et al.* entwickelten SC²-Methode (*spotting compound-support conjugates*) erreicht werden. Hierbei werden die gewünschten Peptidsequenzen zunächst mittels SPOT-Synthese auf einer funktionalisierten Cellulosemembran synthetisiert, woraufhin die Verbindungen abgespalten und erneut auf modifizierte Träger aus Glas aufgespottet werden. So können beispielsweise auf einem Objektträger mit den Maßen 76 x 26 mm Microarrays mit bis zu 10.000 Spots aufgetragen werden^[152]. In den vergangenen Dekaden wurde die Microarray-Technologie immer bedeutender, sodass mittlerweile diverse Arten von Microarrays, die sog. Gen- oder Biochips, wie beispielsweise DNA-, Protein-, Peptid-, oder Kohlenhydrat-Chips kommerziell erhältlich sind. Aufgrund dieser kontinuierlichen Miniaturisierung können so komplexe Bibliotheken aus bis zu 200.000 verschiedenen Verbindungen auf einem einzelnen Mikrochip immobilisiert werden^[153-155].

2.5 UNTERSUCHUNG VON KOHLENHYDRAT-PROTEIN-WECHSELWIRKUNGEN

Kohlenhydrate-Protein-Wechselwirkungen können mittels zahlreicher Methoden wie der isothermen Titrationskalorimetrie (engl. *ITC – isothermal titration calorimetry*)^[156-157], Oberflächenplasmonenresonanz (engl. *SPR – surface plasmon resonance*)^[158-159], Fluoreszenzpolarimetrie (engl. *FP – fluorescence polarization*)^[160-161] oder der Kernspinresonanzspektroskopie (engl. *NMR – nuclear magnetic resonance*)^[162-164] untersucht werden.

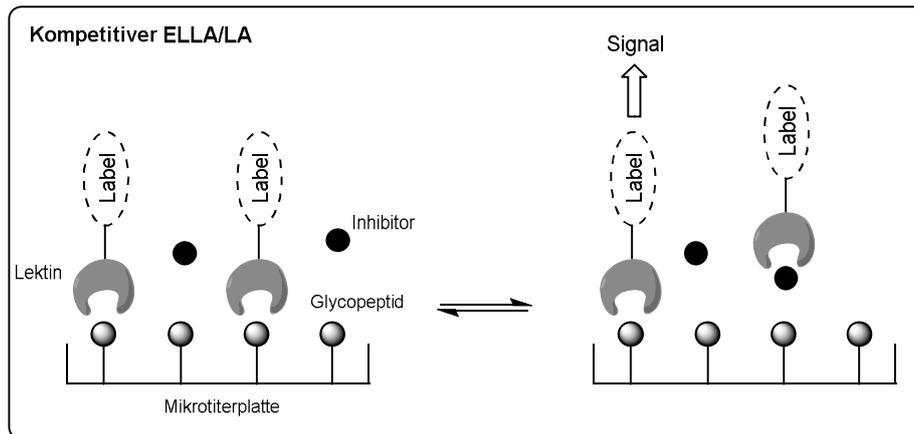
Bindungsstudien komplexer Substanzbibliotheken, bei welchen die jeweiligen Glykokonjugate nur in sehr geringen Stoffmengen im μmol - bzw. nmol -Bereich vorliegen, erfolgen insbesondere unter Verwendung des enzymgekoppelten Lektintests (engl. *ELLA – enzyme linked lectin assay*) bzw. Lektintests (engl. *LA – lectin assay*)^[165-166].

2.5.1 ENZYMGEKOPPELTER LEKTIN-TEST (ELLA) UND LEKTIN-TEST (LA)

Der enzymgekoppelte Lektintest (ELLA), eine Variante des enzymgekoppelten Immuntests (engl. *ELISA – enzyme linked immunosorbent assay*)^[167-168], wurde erstmals Anfang der 80er Jahre des vergangenen Jahrhunderts von McCoy *et al.* beschrieben. Im Unterschied zum ELISA, bei dem das jeweilige Antigen durch Interaktion mit einem Antikörper detektiert wird, bezeichnet der enzymgekoppelte Lektintest (ELLA) ein Nachweisverfahren, das auf der Wechselwirkung eines Substrats mit einem Lektin beruht. Die zu untersuchenden Substanzen werden hierbei adsorptiv oder kovalent auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert, woraufhin die Interaktionen mittels *kompetitiven* oder *nicht kompetitiven* ELLA analysiert werden können.

2.5.1.1 Kompetitiver ELLA/LA

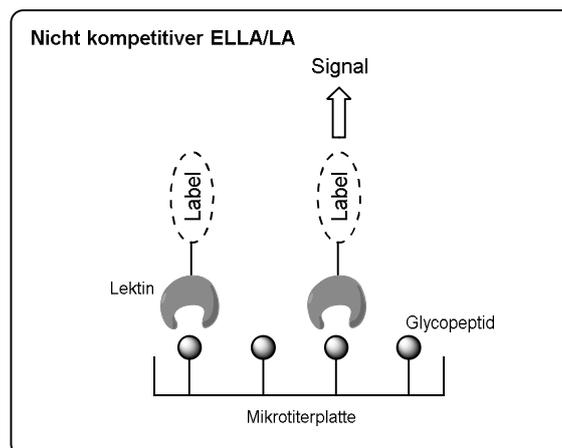
Bei einem *kompetitiven* ELLA/LA konkurriert das jeweilige Glycopeptid mit einem Inhibitor um das aktive Zentrum des jeweiligen Lektins (**Schema 21**). In Abhängigkeit der Konzentration des Inhibitors kommt es zu einer Signalabschwächung, wobei das gemessene Signal indirekt proportional zur Substratkonzentration ist. Wird die Signalintensität gegenüber der Inhibitorkonzentration aufgetragen, so lassen sich Bindungsparameter wie die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) bestimmen.



Schema 21: Kompetitiver ELLA/LA.

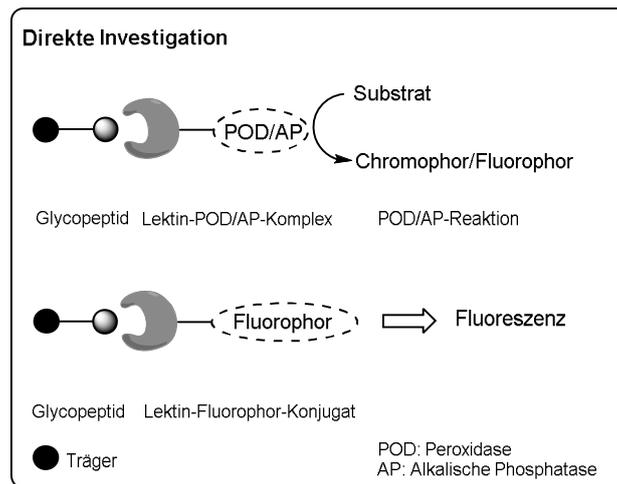
2.5.1.2 Nicht-kompetitiver ELLA/LA

Im Vergleich zum *kompetitiven*, erfolgt der *nicht-kompetitive* ELLA/LA ohne Zugabe eines Inhibitors, wobei hierbei die Signalintensität direkt proportional zur Substratkonzentration ist (**Schema 22**).



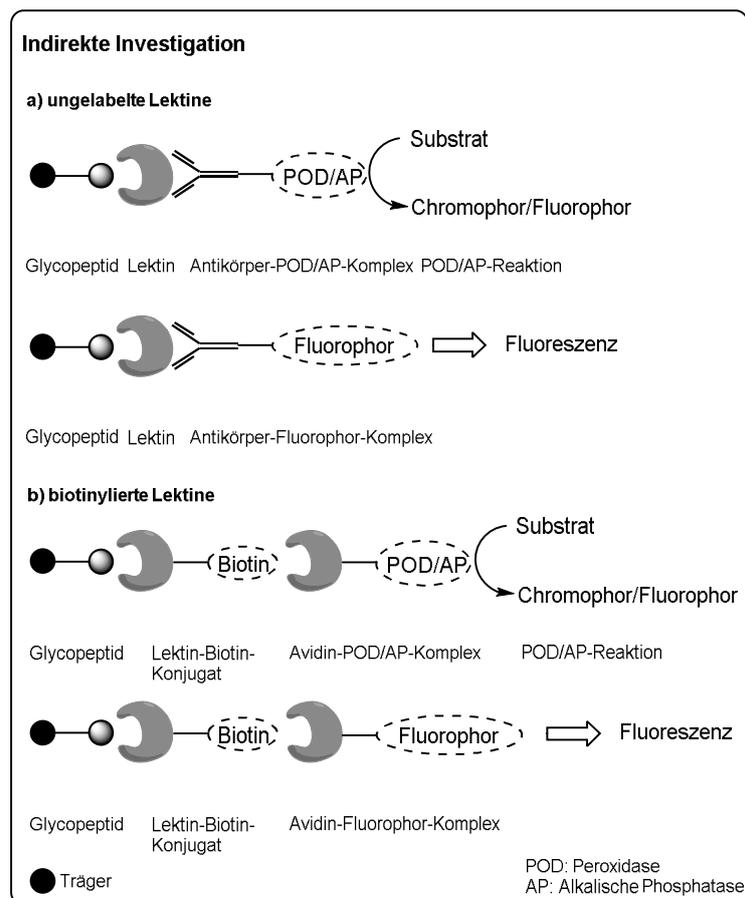
Schema 22: Nicht-kompetitiver ELLA/LA.

Darüber hinaus kann die Investigation der Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung, je nach Labelling der Lektine, unter Verwendung einer *direkten* oder *indirekten* Methode erfolgen. Bei der *direkten* Investigation erfolgt die Untersuchung der Glycopeptid-Lektin-Interaktion mittels POD/AP- bzw. Fluorophor-gelabelten Lektinen. Werden die Lektine direkt mit einem Fluorophor markiert, so wird dies im Folgenden als Lektintest (LA) bezeichnet (**Schema 23**).



Schema 23: Direkte Investigation der Glycopeptid-Lektin-Interaktion.

In Relation zu der *direkten* Investigation finden bei der *indirekten* Variante ungelabelte oder biotinylierte Lektine Verwendung, an die ein gelabelter Antikörper^[169-170] oder Avidin^[171-172], Streptavidin^[173] bzw. Neutravidin^[174] bindet (**Schema 24**).



Schema 24: Indirekte Investigation der Glycopeptid-Lektin-Interaktion.

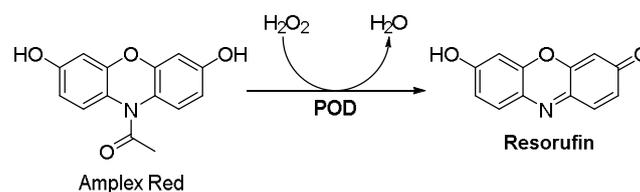
Enzymatische Markierung (POD/AP-Labeling)

Im Falle der enzymmarkierten Antikörper kommen häufig die Alkalische Phosphatase (AP), sowie die Peroxidase aus Meerrettich (POD) zur Anwendung. Diese sogenannte Meerrettichperoxidase (POD) ist eine Mischung aus Isoenzymen, welche vorwiegend aus der Peroxidase C besteht. Dieses monomere Enzym ist aus 308 Aminosäuren aufgebaut und katalysiert die Oxidation einer organischen Verbindung mittels Wasserstoffperoxid^[175-176]. Bei dieser Reaktion entstehen unlösliche Farbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoffe, welche wiederum detektiert werden (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Substrate für die katalytische Oxidation durch H₂O₂ mittels Meerrettichperoxidase (POD).

Eintrag	Substrat	Farbstoff (Farbe)
1	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) ^[177]	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindiimin (dunkelblau)
2	3,3'-Diaminobenzidin (DAB) ^[178]	3,3'-Diaminobenzidindiimin (braun)
3	3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) ^[179]	Wursters Rot (rot)
4	4-Chlor-1-naphthol (CN) ^[180]	4-Chlor-1-naphthon (grau-blau)
5	Luminol ^[181]	3-Aminophthalsäuredicarboxylat (Chemilumineszenz)
6	Amplex [®] Red ^[182-183]	Resorufin (Fluoreszenz)

Um die Empfindlichkeit von ELISA bzw. ELLA-Tests zu steigern, finden seit einigen Jahren auch zahlreiche Fluorophore Verwendung, welche zunächst in einer inaktiven, nicht fluoreszierenden Form vorliegen (z.B. Amplex[®] Red^[182-183]), infolgedessen diese in einer enzymatischen Reaktion mittels H₂O₂ sowie einer Peroxidase in eine aktive Spezies überführt werden (**Schema 25**).



Schema 25: Katalytische Oxidation des Amplex[®] Red zum fluoreszierenden Resorufin.

Die Alkalische Phosphatase (AP) ist ein homodimeres, zytoplasmatisches Enzym, welches die alkalische Hydrolyse von Phosphorsäureestern zu den korrespondierenden Phosphaten und deren Alkoholderivaten katalysiert^[184-185]. Bei dieser Dephosphorylierung können, wie auch bei der Meerrettichperoxidase (POD), unlösliche, farbige Verbindungen gebildet werden, mit deren Hilfe die Anbindung des Lektins an das jeweilige Glycokonjugat untersucht werden kann. Einige dieser Substrate und deren zugehörige Farbstoffe können der **Tabelle 5** entnommen werden.

Tabelle 5: Substrate für die Reaktion mit der Alkalischen Phosphatase (AP).

Eintrag	Substrat	Farbstoff (Farbe)
1	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/ Nitroblautetrazoliumchlorid (BCIP/NBT) ^[186]	5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo/ NBT-Diformazan (blau)
2	Naphtol AS-MX-Phosphat/Echtrot-Salz (fast red) ^[187]	Azoverbindung (rot)
3	Naphtol AS-MX-Phosphat/Echtblau-Salz (fast blue) ^[187]	Azoverbindung (blau)

Aufgrund von sterischen bzw. chemischen Einflüssen können Lektine oft nicht direkt mit der Alkalischen Phosphatase (AP) markiert werden, wohingegen ein Labelling mit Biotin meist problemlos realisiert werden kann^[188]. Diese biotinylierten Lektine bilden mit Avidin oder Neutravidin, die ihrerseits mit der POD bzw. AP gelabelt werden, thermodynamisch stabile Komplexe^[171-172], über die wiederum die Investigation indirekt erfolgen kann.

Fluoreszenzmarkierung

In den vergangenen Dekaden haben sich bei immunologischen Untersuchungen neben der enzymatischen Markierung auch fluorophorgelabelte Antikörper^[189-191] bzw. Lektine^[10,192-194] etabliert. Im Zuge der Analytik muss jedoch beachtet werden, dass auch Antikörper sowie Lektine elektromagnetische Strahlung mit Wellenlängen von bis zu 310 nm absorbieren, weshalb die jeweiligen Fluorochrome so gewählt werden sollten, dass deren Absorptionsmaxima zwischen 310 und 650 nm liegen. Da Fluoreszenzmarker in der Bioanalytik sowie der medizinischen Diagnostik mehr und mehr Verwendung finden, ist die Anzahl an Fluorophoren in den letzten Jahrzehnten rapide angestiegen. In der Literatur wurden bis dato zahlreiche fluoreszierende Chromophore beschrieben, wobei die wichtigsten Vertreter (Fluorescein, Rhodamin₁₁₀, Tetramethylrhodamin, Naphtholrhodamin, Resorufin oder Alexa Fluor 488) allesamt Xanthenderivate sind und **Abbildung 14** entnommen werden können^[195-197].

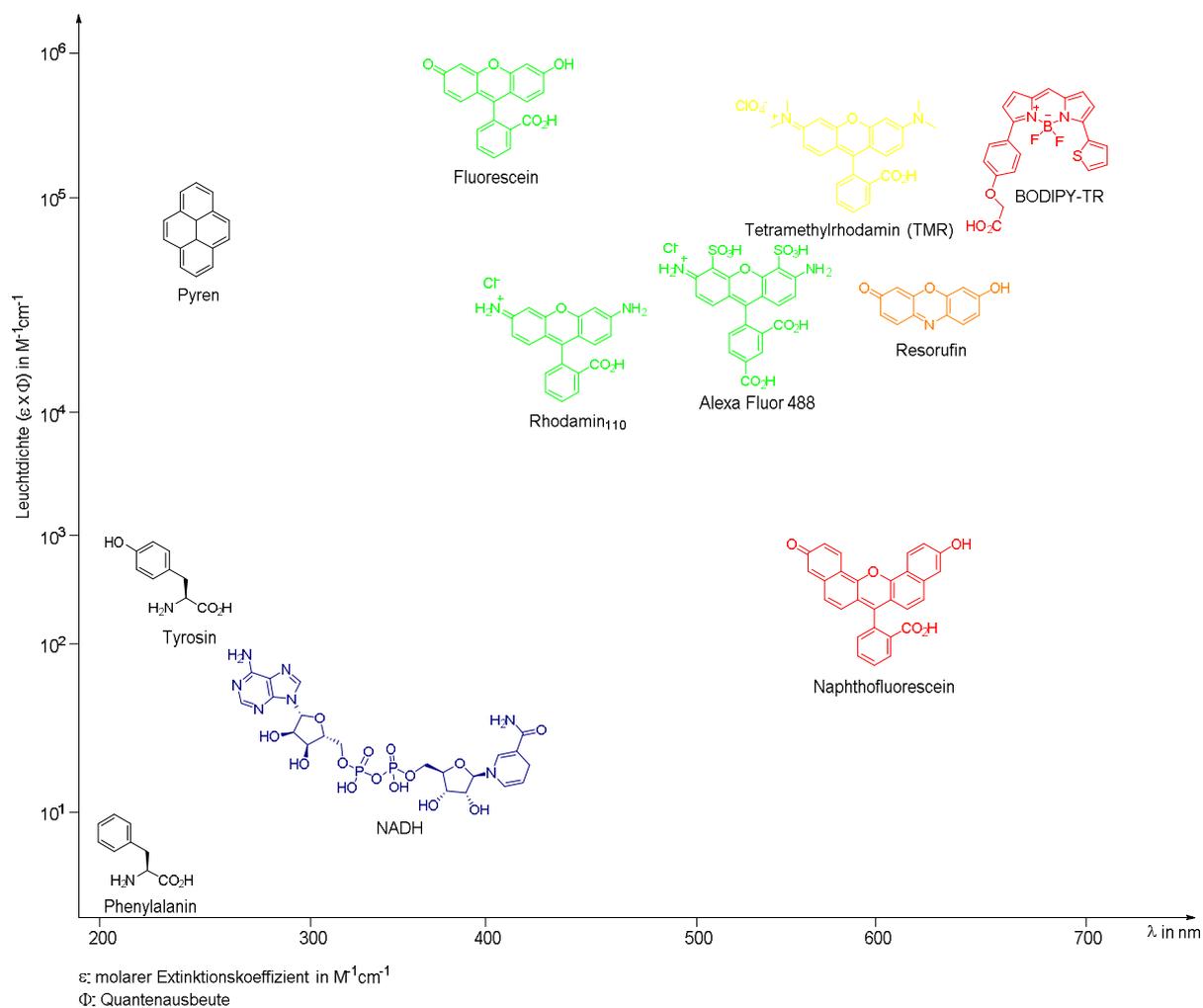


Abbildung 14: Einige Fluorophore (Leuchtdichte gegenüber der Emissionswellenlänge)^[197].

Im Rahmen des Lektinlabellings kommen oft Fluorescein-Derivate zum Einsatz, welche über reaktive funktionelle Gruppen (NHS-Ester, Maleinimide oder Phosphoramidite) kovalent an die jeweiligen Proteine gebunden werden. In Relation zu anderen Fluorophoren besitzt das Fluorescein durch eine extrem hohe Leuchtdichte (großer Extinktionskoeffizient ϵ sowie hohe Quantenausbeute Φ) (**Abbildung 14**), wobei es jedoch auch gleichermaßen eine geringe Photostabilität (Photobleaching) sowie eine stark pH-abhängige Emission in Kombination mit einem unscharfen Fluoreszenzmaximum und einem breiten Emissionsspektrum aufweist^[198]. Im Jahre 1999 beschrieben Haugland *et al.*^[199] die Alexa-Farbstoffe, welche das Anregungswellenlängenmaximum im Namen tragen und eine weitaus höhere Photostabilität sowie eine geringere pH-Abhängigkeit besitzen (**Abbildung 15**). Diese Fluorochrome, die durch einfache Sulfonierung von Cumarin-, Rhodamin-, oder Cyaninderivaten synthetisiert werden können, zeichnen sich durch eine stark verbesserte Wasserlöslichkeit sowie thermodynamische Stabilität aus, weshalb sie inzwischen bei einer Vielzahl von Anwendungen zum Einsatz kommen^[200-201].

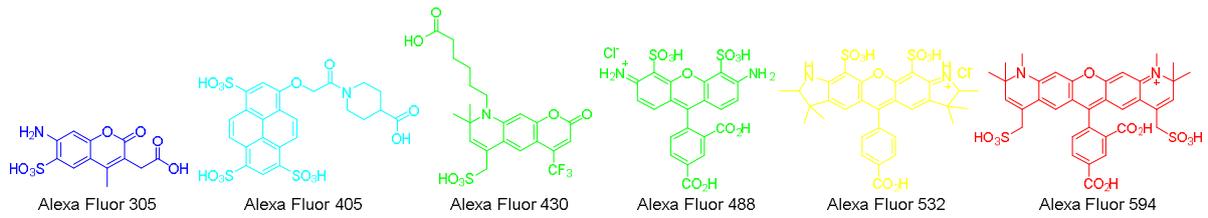


Abbildung 15: Strukturen einiger Alexa-Fluorophore.

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Alexa-Farbstoffen, welche mit ihren Absorptions- sowie Emissionsspektren den UV-, den gesamten sichtbaren, sowie den nahen Infrarotbereich abdecken^[202] (**Abbildung 16**).

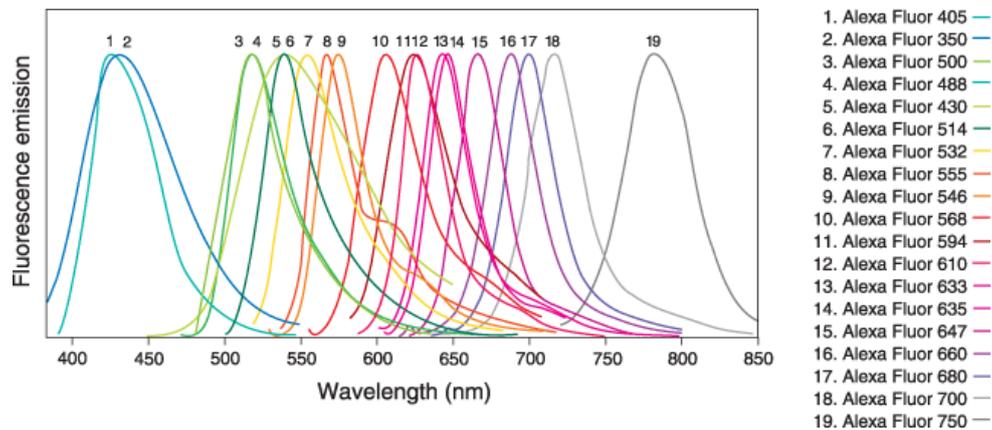


Abbildung 16: Emissionsspektren der Alexa-Farbstoffe^[202].

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

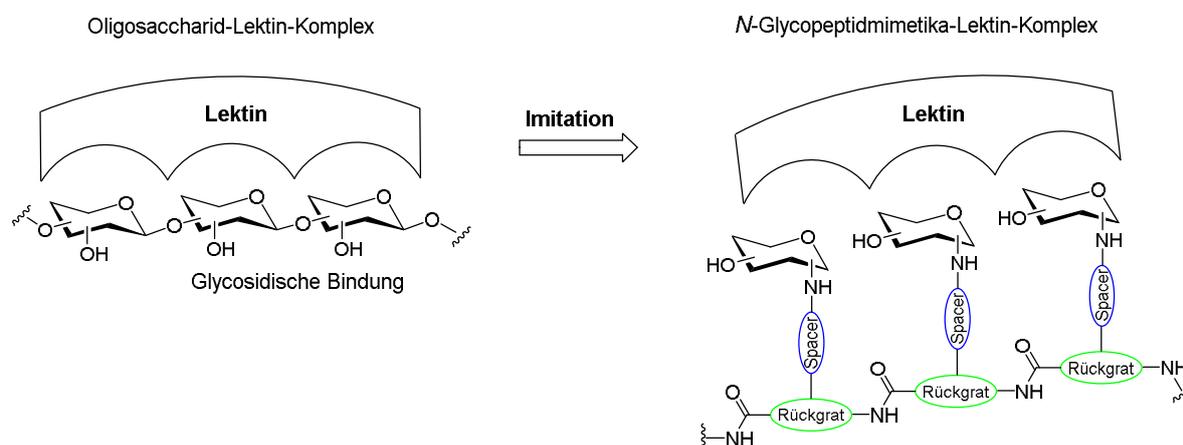
3.1 SYNTHESKONZEPT

Im nachfolgenden Kapitel soll zunächst auf das Synthesekonzept der Mimetika dieser Arbeit eingegangen werden (Kapitel 3.1.1), welche aus aromatischen- bzw. aliphatischen *N*-Glycokonjugaten mit vier unterschiedlichen Sacchariden (Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc) bestehen (Kapitel 3.1.2).

Zu Beginn soll die grundlegende Strategie vorgestellt werden, woraufhin die jeweiligen aromatischen- sowie aliphatischen Saccharidderivate explizit beschrieben werden.

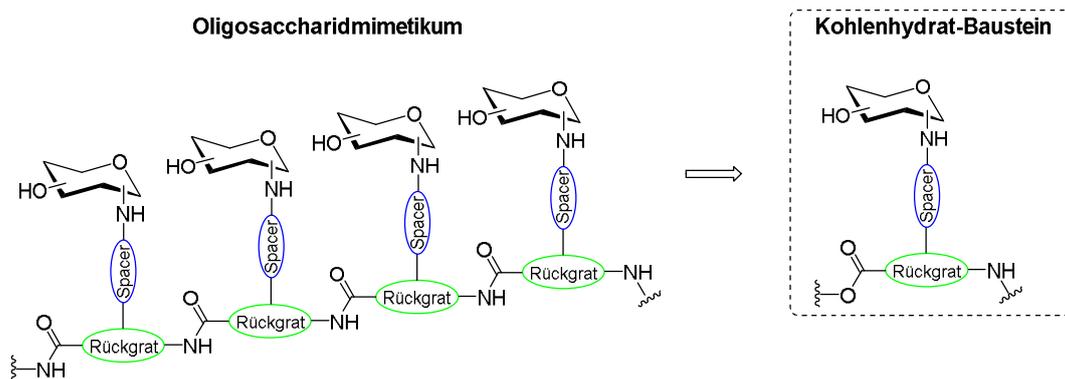
3.1.1 IMITATION VON OLIGOSACCHARIDEN DURCH *N*-GLYCOPEPTIDE

Oligosaccharide bestehen aus mehreren einzelnen Monosacchariden, welche α - oder β -glycosidisch miteinander verknüpft sind. Auf der Zelloberfläche fungieren Oligosaccharide, wie *N*-Glycoside, als Rezeptoren, welche unter anderem mit Lektinen interagieren können^[5]. In den vergangenen Dekaden wurde in unserer Arbeitsgruppe ein neuartiges Konzept entwickelt, das auf der Imitation der komplexen Saccharidstrukturen durch Oligosaccharidmimetika beruht, bei denen darauf verzichtet wird, die einzelnen Saccharide mittels glycosidischer Bindungen zu verknüpfen^[11-24] (**Schema 26**).



Schema 26: Imitation von Oligosacchariden durch Verknüpfung einzelner Kohlenhydrat-Bausteine.

Diese neuartigen Oligosaccharidmimetika können auf einzelne Kohlenhydrat-Bausteine, zurückgeführt werden, welche aus einem trifunktionalen Rückgrat, sowie einem Spacermolekül bestehen, an das die entsprechenden Monosaccharide kovalent gebunden werden. Die Verknüpfung zum betreffenden Mimetikum erfolgt schließlich über das jeweilige Rückgrat, wodurch komplexe Oligosaccharidsynthesen vermieden werden können^[11,13-16,19,23] (Schema 27).



Schema 27: Oligosaccharidmimetikum aus einzelnen Kohlenhydrat-Bausteinen.

Damit ein *N*-Glycopeptid als Mimetikum fungieren kann, müssen jedoch spezifische Anforderungen erfüllt werden^[203]:

- Die räumliche Anordnung der einzelnen Saccharide sollte der Anordnung im korrespondierenden Oligosaccharid entsprechen.
- Die *N*-Glycopeptide sollten von Wasser gut solvatisiert werden können.
- Die Kohlenhydrate der *N*-Glycopeptide müssen eine gewisse Flexibilität aufweisen, damit eine Wechselwirkung mit der bzw. den CRDs zu Stande kommen kann.
- Das Peptidrückgrat sollte, in Kombination mit dem Spacer, eine definierte, geometrische Struktur ausbilden, damit die einzelnen Saccharide gleichmäßig ausgerichtet werden können.
- Die synthetischen *N*-Glycopeptide müssen eine ausreichende proteolytische Stabilität vorweisen, um als Mimetikum wirken zu können.

3.1.2 AUFBAU DER AROMATISCHEN UND ALIPHATISCHEN *N*-GLYCOPEPTIDE

Anstelle der natürlich vorkommenden α -Aminosäuren sollte das Peptidrückgrat der neuartigen *N*-Glycopeptide mithilfe von Aromaten bzw. der Peptid-Nukleinsäure^[204] aufgebaut werden, wobei die Verknüpfung der Saccharide, analog zu den natürlichen Strukturen (Kapitel 2.1.1), über deren anomeren Kohlenstoff erfolgen sollte (**Abbildung 17**).

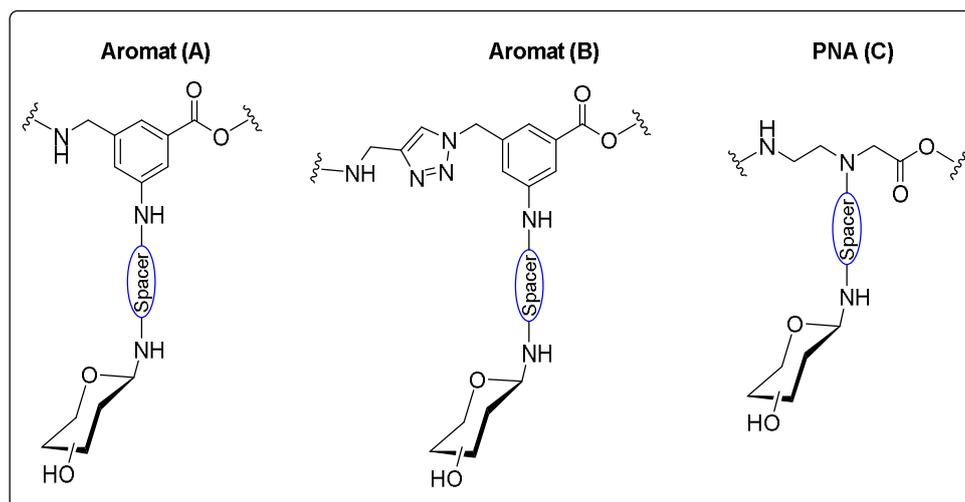


Abbildung 17: Kohlenhydrat-Bausteine mit aromatischen und aliphatischen Rückgrat-Strukturen.

3.1.2.1 Aromatische *N*-Glycopeptide

In dieser Arbeit wurden zwei aromatische Rückgrat-Strukturen (**A** und **B**) untersucht (**Abbildung 17**), welche einen zentralen Benzolring beinhalten (Rückgrat **A**), der beim Rückgrat **B** um einen Heteroaromaten (Triazol), erweitert wurde.

Die Verwendung von Aromaten hat mehrere Vorteile:

- Die aromatischen Aminosäuren können von Enzymen (Nukleasen, Peptidasen, Proteasen, etc.) nur schwer abgebaut werden^[205-206].
- Die aromatischen Rückgrate können über π - π -Wechselwirkungen stabile Strukturen (z. B. Helices) ausbilden, wodurch die einzelnen Saccharide gleichmäßig ausgerichtet werden können^[207].
- Die aromatischen Strukturen können über π - π - oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der jeweiligen Lektine bzw. Proteine wechselwirken und so für eine Vororientierung des Mimetikums sorgen^[56].
- Die aromatischen Aminosäuren neigen bei der Peptidaktivierung, im Gegensatz zu den α -Aminosäuren, nicht zur Racemisierung^[208].

3.1.2.2 Aliphatische *N*-Glycopeptide

Im Vergleich zu den aromatischen Strukturen **A** und **B**, wurde auch ein aliphatisches Rückgrat **C** (**Abbildung 17**), das PNA-Rückgrat, genauer analysiert^[204].

Die Peptid-Nukleinsäure (PNA) stellt ein Analogon zu den Nukleinsäuren DNA bzw. RNA dar, wobei der DNA- bzw. RNA-Einzelstrang aus zahlreichen Desoxyribose- bzw. Ribose-Einheiten besteht, welche über Phosphodiester miteinander verbunden sind. Darüber hinaus sind die jeweiligen Desoxyribose- bzw. Ribose-Einheiten mit einer Nucleobase (Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin) verknüpft, welche über Wasserstoffbrücken (Watson-Crick-Basenpaarung) mit einander interagieren, sodass zwei DNA-bzw. RNA-Einzelstränge eine Doppelhelix mit definierter Geometrie ausbilden^[209]. Im Falle des PNA-Rückgrats wird das Saccharid-Phosphodiester-Rückgrat durch ein Oligo- respektive Polypeptid substituiert, welches in einzelne *N*-(2-Amidoethyl)-glycin Einheiten zerlegt werden kann^[210-211] (**Abbildung 18**).

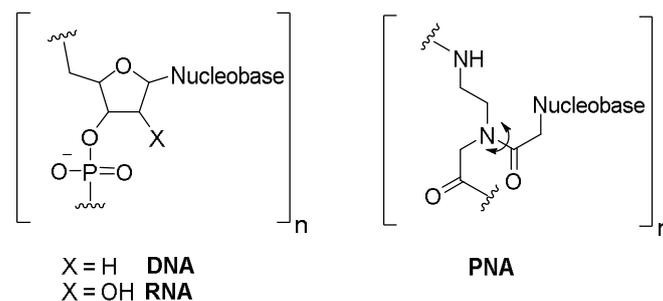


Abbildung 18: DNA/RNA- und PNA-Rückgrat.

Die Verwendung der **Peptid-Nukleinsäure** (PNA) hat hierbei folgende Vorteile:

- Die Peptid-Nukleinsäuren können von Enzymen (Nukleasen, Peptidasen, Proteasen, etc.) nur schwer abgebaut werden^[212].
- Die Peptid-Nukleinsäuren neigen bei der Peptidaktivierung, im Gegensatz zu den α -Aminosäuren, nicht zur Racemisierung^[208].
- Erfolgt die Anbindung der Nucleobase an das PNA-Rückgrat mittels einer Säurefunktion (**Abbildung 18**) wird eine zentrale Peptidbindung generiert, bei der die Rotation um die C-N-Bindung gehindert ist. Somit werden Rotamerstrukturen (Kapitel 3.6) ausgebildet, welche eine erhöhte Affinität zu Proteinen respektive Lektinen aufweisen können^[24].

Spacer

Der Spacer fungiert als Abstandhalter zwischen dem jeweiligen Aminosäurerückgrat und den entsprechenden Sacchariden, kann aber auch durch diverse Wechselwirkungen die Konformation des Proteins (Helix, Faltblatt, Random Coil) beeinflussen. Die Länge des Spacers ist für die Flexibilität des gebundenen Kohlenhydrats von enormer Bedeutung^[17,22]. Bei einem zu kurzem Spacer besteht die Gefahr, dass die betreffenden Saccharide, aufgrund von sterischen Hinderungen, nicht von den Lektinen erkannt werden können. Ist das Spacer-Molekül hingegen zu lang, so kann es zur Ausbildung eines Knäuels kommen, wodurch die einzelnen Saccharide nicht mehr gleichmäßig ausgerichtet werden können. Neben der Länge spielt auch die Art des Spacers eine wichtige Rolle. So können beispielsweise aromatische Spacer über π - π -Wechselwirkungen untereinander oder mit dem Rückgrat interagieren und so zu einer Stabilisierung der Konformation des Mimetikums beitragen^[17,22]. Desweiteren können die Spacer mit aromatischen Aminosäuren der jeweiligen CRD wechselwirken, wodurch eine Vororientierung der Saccharide erfolgen kann. Untersuchungen haben ergeben, dass die optimale Spacerlänge je nach Problematik (Rückgrat, Spacerart, Saccharid, Lektin) variieren kann^[14,16]. Da in dieser Arbeit aromatische Rückgrat-Strukturen untersucht werden, soll auf den Einsatz von aromatischen Spacern verzichtet werden. Überdies soll die Anbindung an das Peptidrückgrat, als auch an das jeweilige Saccharid über Aminofunktionen erfolgen, woraufhin als Spacer somit nur Dicarbonsäuren in Frage kommen. Hierbei spielt die einfachste Dicarbonsäure, die Oxalsäure, eine untergeordnete Rolle, da diese keine Methylengruppen besitzt, welche die Flexibilität der gebundenen Saccharide erhöhen würden. Stattdessen rücken diejenigen Dicarbonsäuren in den Fokus, welche eine oder mehrere Methylengruppen beinhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte diesbezüglich ein Malonsäure-Spacer auf dessen Anwendbarkeit untersucht werden (**Abbildung 19**).

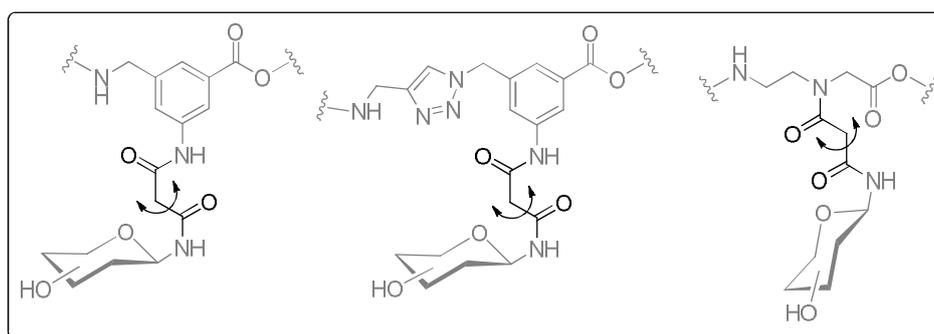
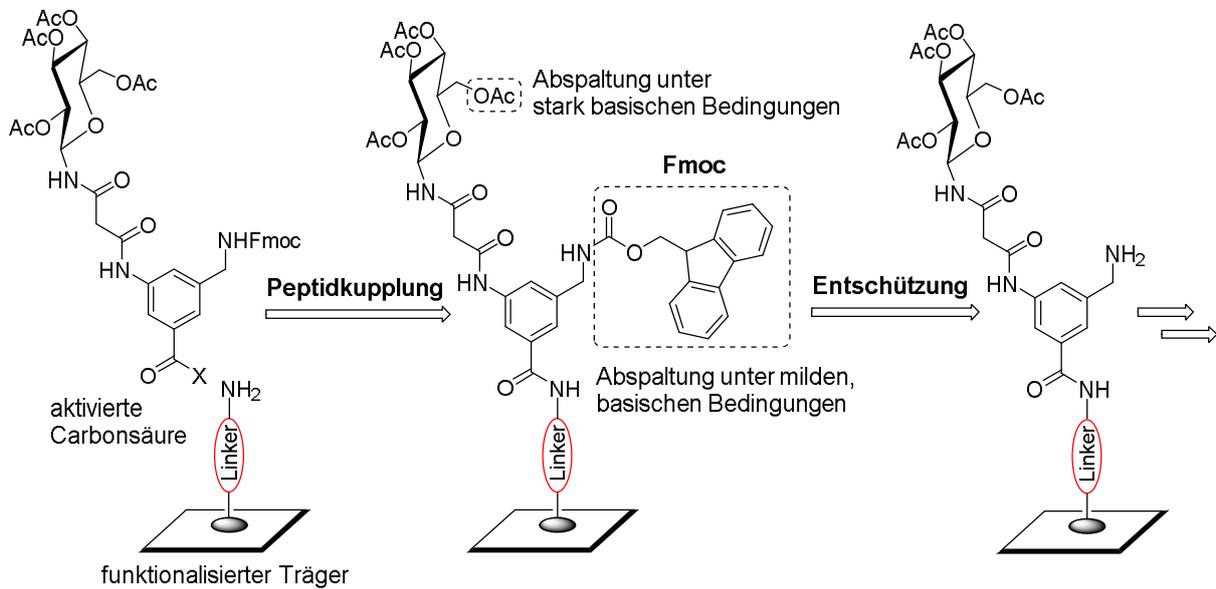


Abbildung 19: Aromatische und aliphatische Kohlenhydrat-Bausteine inklusive Malonsäure-Spacer.

3.1.3 DARSTELLUNG DER *N*-GLYCOPEPTIDMIMETIKA

Die Synthese der aromatischen und aliphatischen *N*-Glycopeptidmimetika erfolgte mittels Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung einer orthogonalen Fmoc-Strategie (**Schema 28**).



Schema 28: Darstellung der *N*-Glycopeptidmimetika mittels orthogonaler Fmoc-Strategie.

Die Synthese von *N*-Glycopeptidmimetika beginnt mit der Anbindung eines aktivierten „*Building-Blocks*“ an ein aminofunktionalisiertes Trägermaterial. Daraufhin wird die Fmoc-Schutzgruppe unter milden, basischen Bedingungen (Piperidin oder Morpholin) entfernt, wobei die Acetylschutzgruppen des Saccharides nicht abgespalten werden. Infolgedessen kann ein weiterer Baustein angebunden werden. Diese Prozedur wird so lange wiederholt, bis das gewünschte Glycopeptid aufgebaut wurde. Im finalen Schritt werden die Acetylschutzgruppen schließlich unter basischen Bedingungen (NaOMe oder NH_3) entfernt, woraufhin das Mimetikum einem Lektin-Assay unterzogen werden kann. Unter Verwendung der Fmoc-Strategie ergeben sich somit folgende aromatische und aliphatische Kohlenhydrat-Bausteine (**Abbildung 20**).

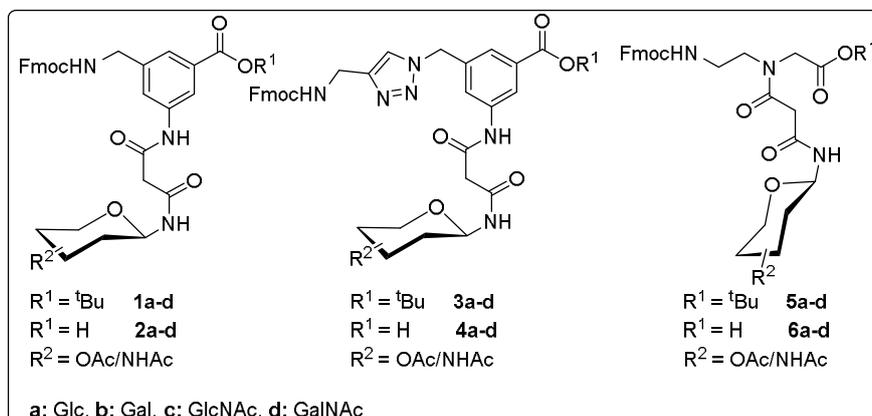


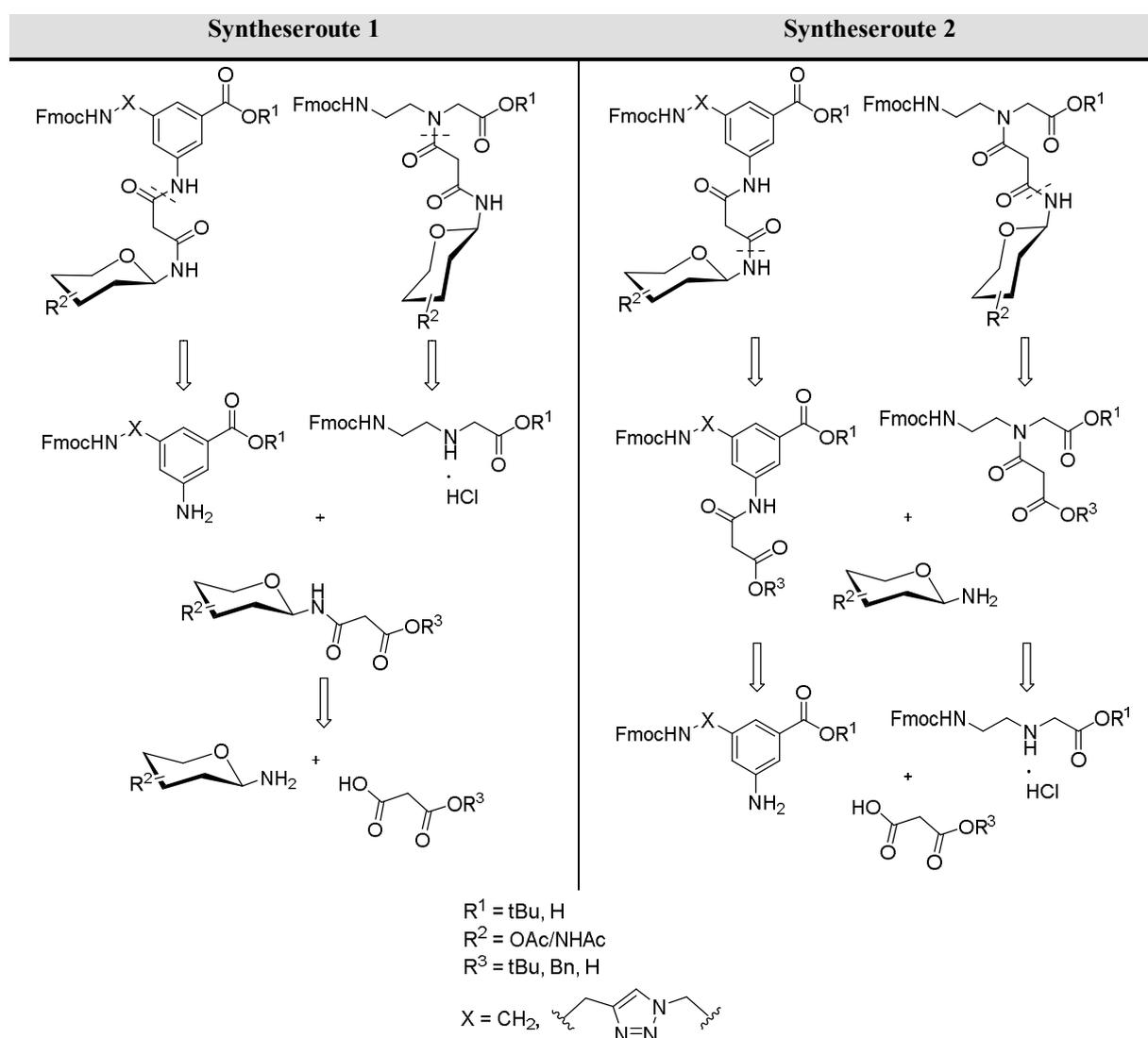
Abbildung 20: Aromatische und aliphatische Kohlenhydrat-Bausteine.

3.2 RETROSYNTHESE DER KOHLENHYDRAT-BAUSTEINE

Retrosynthetische Überlegungen verdeutlichen, dass die Darstellung der aromatischen sowie aliphatischen Kohlenhydrat-Bausteine (**Abbildung 22**) über zwei unterschiedliche Syntheserouten erfolgen kann (**Schema 29**).

Bei der Syntheseroute 1 wird das jeweilige Saccharid (Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc) zunächst *N*-glycosidisch mit dem korrespondierenden Malonsäurespacer verknüpft, woraufhin die Anbindung an das Fmoc/tBu-geschützte Rückgrat vorgenommen wird.

Bei der Syntheseroute 2 wird das Spacer-Molekül zu Beginn mit dem trifunktionalen Rückgrat verbunden, infolgedessen die Kupplung mit dem Aminoglycosid erfolgt.



Schema 29: Retrosynthese der aromatischen und aliphatischen Kohlenhydrat-Bausteine.

In dieser Arbeit wurden alle Kohlenhydrat-Bausteine über die Syntheseroute 1 dargestellt, da hierbei die Auftrennung von möglichen anomeren Mischungen zu Beginn der jeweiligen Synthese erfolgen kann.

3.3 SYNTHESE DER RÜCKGRATE

3.3.1 AROMATISCHE RÜCKGRATE

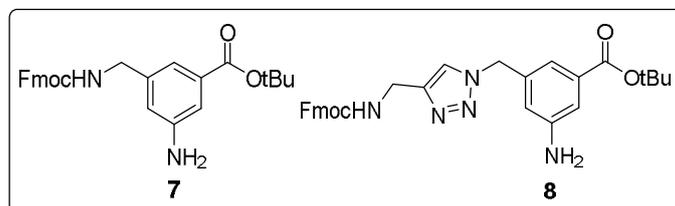
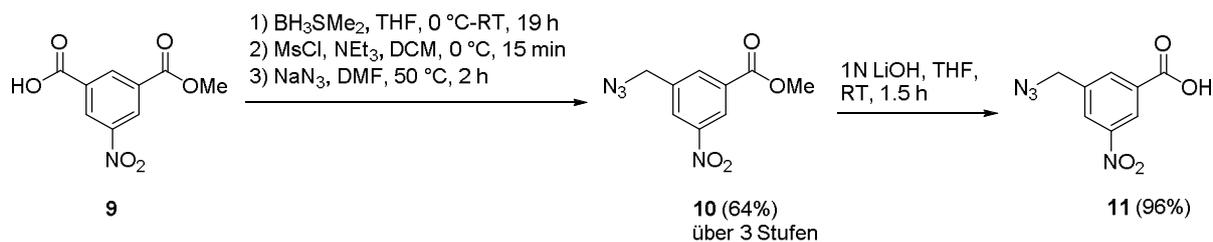


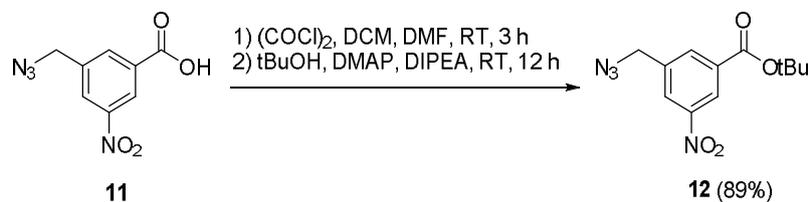
Abbildung 21: Aromatische Rückgrate **7** und **8**.

Zur Synthese der aromatischen Rückgrate **7** und **8** (**Abbildung 21**) wurde der kommerziell erhältliche 5-Nitro-isophthalsäure-monomethylester **9** in einer dreistufigen Reaktion zunächst zum 3-Azidomethyl-5-nitrobenzoesäuremethylester **10** umgesetzt, wobei eine Gesamtausbeute von 64% erzielt werden konnte^[213-214]. Daraufhin wurde der Methylester **10** mit einer 1N LiOH-Lsg. zur freien Carbonsäure **11** verseift, was mit einer Ausbeute von 96% realisiert werden konnte (**Schema 30**).



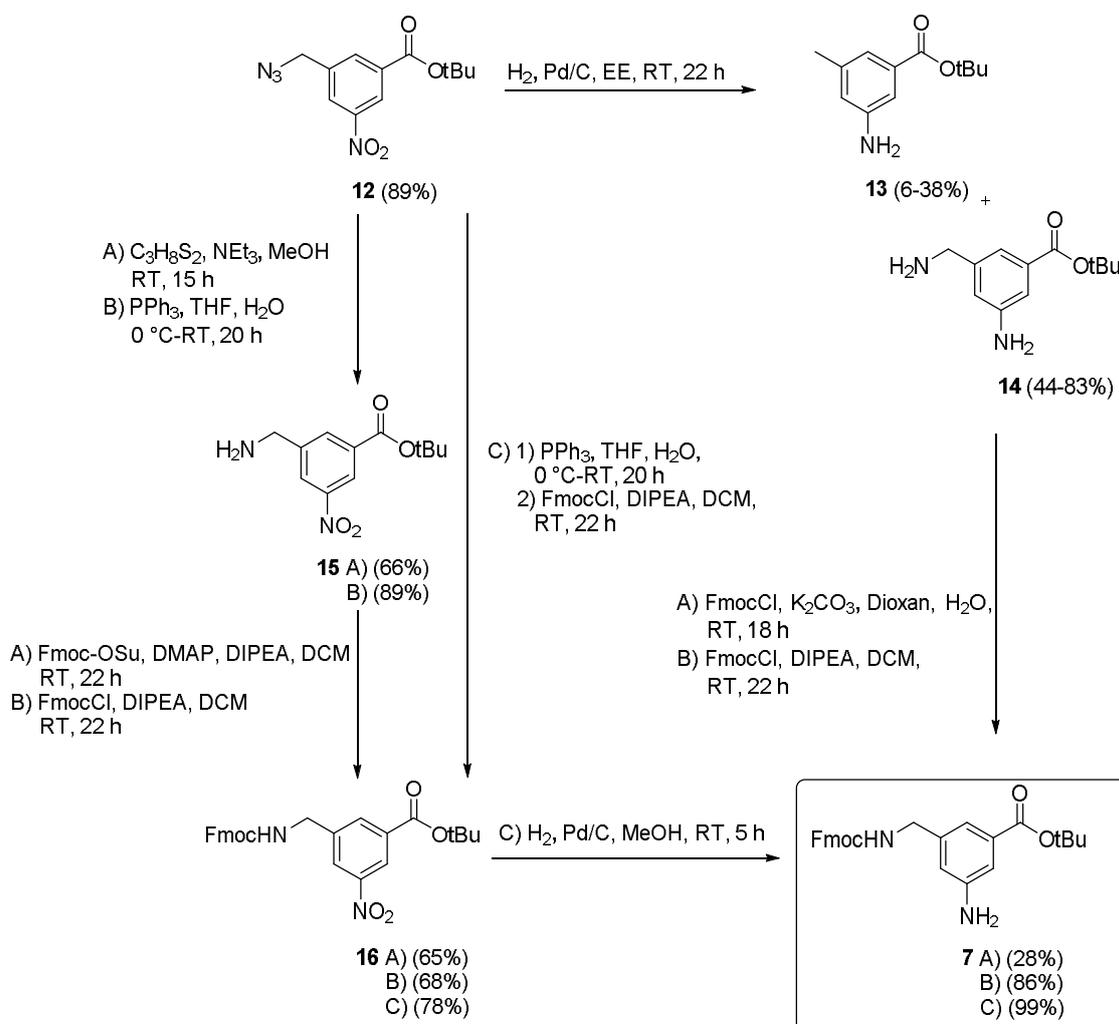
Schema 30: Darstellung der 3-Azidomethyl-5-nitrobenzoesäure **11**.

Anschließend wurde die 3-Azidomethyl-5-nitrobenzoesäure **11** mittels Oxalylchlorid und *t*BuOH in den korrespondierenden *tert*-Butyl-Ester **12** überführt, wobei eine Ausbeute von 89% erreicht werden konnte (**Schema 31**).



Schema 31: Darstellung des aromatischen *tert*-Butylesters **12**.

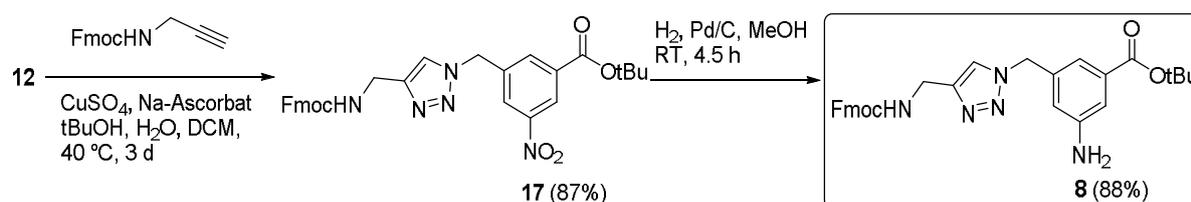
Zur Darstellung des aromatischen Rückgrates **7** war die Untersuchung von diversen Reaktionswegen erforderlich (**Schema 32**). Bei der katalytischen Hydrierung des *tert*-Butyl-Esters **12** kann festgehalten werden, dass die Menge des eingesetzten Katalysators einen signifikanten Einfluss auf die Reaktion hat. Kam hierbei zu viel Pd/C zum Einsatz (54 mg Pd/C pro mmol Edukt), so wurde die Azid-Funktion nicht zum entsprechenden Amin reduziert, sondern es entstand zu 38% die methylierte, aromatische Aminosäure **13**, wohingegen der 3-Amino-5-aminomethylbenzoesäure-*tert*-butylester **14** lediglich mit einer Ausbeute von 44% isoliert werden konnte (**Schema 32**). Wurde die Menge des Palladiums hingegen auf ca. die Hälfte verringert (26 mg Pd/C pro mmol Edukt), so gelang die Darstellung des *tert*-Butylesters **14** mit einer Ausbeute von 83%, wobei die Entstehung des Nebenprodukts **13** auf 6% reduziert werden konnte. Die Einführung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte anschließend auf unterschiedliche Weisen (Methode A, B). Bei der Umsetzung des Diamins **14** mit FmocCl und K₂CO₃ konnte das Rückgrat **7** lediglich mit einer Ausbeute von 28% synthetisiert werden, wohingegen die Reaktion mit FmocCl und DIPEA eine Ausbeute von 86% lieferte.



Schema 32: Darstellung des aromatischen Rückgrats **7**. Unterschiedliche Methoden werden mit Buchstaben (A, B, C) bezeichnet, wohingegen aufeinanderfolgende Reaktionsschritte mit Zahlen (1, 2) gekennzeichnet sind.

Alternativ wurde die Azidfunktion des *tert*-Butyl-Esters **12** mit 1,3-Propanedithiol, respektive Triphenylphosphin zum Amin **15** reduziert, welches mit einer Ausbeute von 66% bzw. 89% isoliert werden konnte. Daraufhin wurde die Aminofunktion mit Fmoc-OSu oder FmocCl geschützt, wobei die Ausbeuten des *tert*-Butylesters **16** 65% bzw. 69% betragen. Eine Steigerung der Ausbeute auf 78% konnte erreicht werden, indem die Verbindung **12** zunächst *in situ* mittels Triphenylphosphin zum Amin **15** reduziert wurde, was sofort mit FmocCl weiter zum 3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-nitrobenzoesäure-*tert*-butylester **16** umgesetzt wurde (**Schema 32**). Schließlich wurde der Fmoc-geschützte *tert*-Butyl-Ester **16** mittels katalytischer Hydrierung (Lindlar-Katalysator) in das aromatische Rückgrat **7** überführt, was mit einer Ausbeute von 99% isoliert werden konnte.

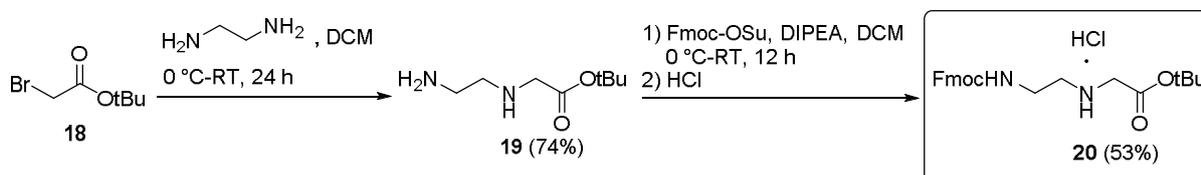
Zur Darstellung des aromatischen Rückgrates **8** wurde der *tert*-Butylester **12** in einer kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition (Click-Reaktion)^[215-219] mit Fmoc-geschütztem Propargylamin^[220] umgesetzt, woraufhin der nitrosubstituierte Aromat **17** mit einer Ausbeute von 87% erhalten wurde. Im Anschluss wurde die Nitroverbindung **17** in Gegenwart von Pd/C katalytisch hydriert, wobei das aromatische Rückgrat **8** mit einer Ausbeute von 88% synthetisiert werden konnte (**Schema 33**).



Schema 33: Darstellung des aromatischen Rückgrats **8**.

3.3.2 ALIPHATISCHES PNA-RÜCKGRAT

Die Synthese des Fmoc/*t*Bu-geschützten PNA-Hydrochlorids **20** erfolgte analog der Literatur^[221-222]. Hierbei wurde das *tert*-Butylbromacetat **18** zunächst in einer nucleophilen Substitutionsreaktion mit dem Ethylendiamin zum *tert*-Butyl-*N*-(2-Aminoethyl)glycinat **19** umgesetzt (Ausbeute 74%), welches anschließend mittels Fmoc-OSu in das aliphatische PNA-Rückgrat **20** überführt wurde. Dabei betrug die Ausbeute 53% (**Schema 34**).



Schema 34: Darstellung des aliphatischen PNA-Rückgrates **20**.

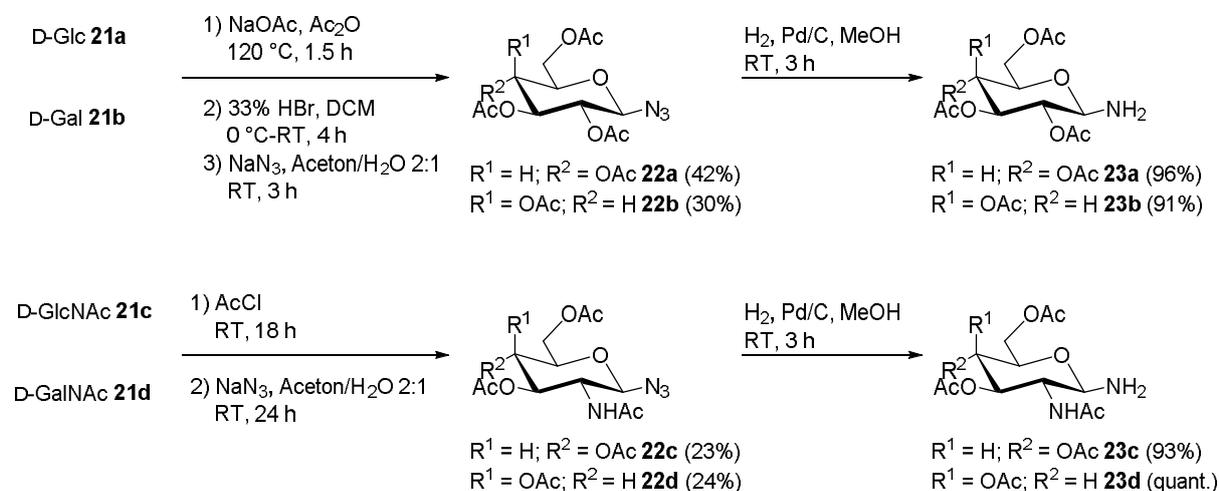
3.4 SYNTHESE DER KOHLENHYDRAT-BAUSTEINE

Nachdem im vorherigen Kapitel die Synthese der aromatischen und aliphatischen Rückgrate **7**, **8** und **20** vorgestellt wurde, soll nun die Darstellung der Kohlenhydrat-Bausteine über die Syntheseroute 1 (Kapitel 3.2), näher beschrieben werden. Hierbei wird das jeweilige Saccharid (Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc) zunächst *N*-glycosidisch über eine Aminogruppe mit einem einseitig geschützten Malonsäurespacer verknüpft (Kapitel 3.4.2), woraufhin nach Entfernung der Esterschutzgruppe (Kapitel 3.4.3) die Anbindung an das Fmoc/tBu-geschützte Rückgrat erfolgt (Kapitel 3.4.4).

3.4.1 DARSTELLUNG DER AZIDE UND AMINE VON GLUCOSE, GALACTOSE, GLUCOS- UND GALACTOSAMIN

Die anomeren Azide bzw. Amine der D-Glucose, D-Galactose, *N*-Acetyl-D-glucosamin bzw. *N*-Acetyl-D-galactosamin wurden nach literaturbekannten Vorschriften synthetisiert.

Im Falle der D-Glucose bzw. D-Galactose wurden die ungeschützten Saccharide zunächst in die peracetylierten Derivate überführt^[223-224], welche nach anschließender Bromierung^[223,225] (33%iger HBr in Eisessig) mit NaN_3 in die jeweiligen Azide **22a** (42%) bzw. **22b** (30%) umgewandelt wurden^[226]. Die *N*-acetylierten Saccharide des Glucos- sowie Galactosamin wurden mittels Acylchlorid in die peracetylierten, anomeren Chloride überführt^[227-228], aus welchen, durch Zugabe von NaN_3 , die korrespondierenden Azide **22c** (23%) sowie **22d** (24%) synthetisiert werden konnten^[226,229-230]. Die Azide **22a-d** wurden daraufhin in Gegenwart von Pd/C katalytisch hydriert, woraufhin die Halbaminale **23a-d** in nahezu quantitativen Ausbeuten erhalten wurden^[225,229,231-234] (**Schema 35**).

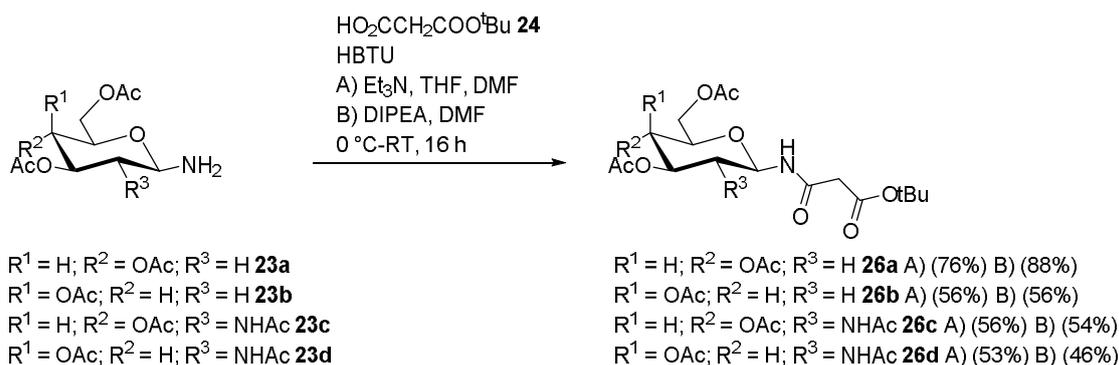


Schema 35: Synthese der anomeren Azide **22a-d** und Halbaminale **23a-d**.

3.4.2 PEPTIDKUPPLUNG DER AMINOPYRANOSEN MIT DEN MALONSÄUREDERIVATEN

3.4.2.1 Peptidkupplung mit dem mono-*tert*-Butylmalonat

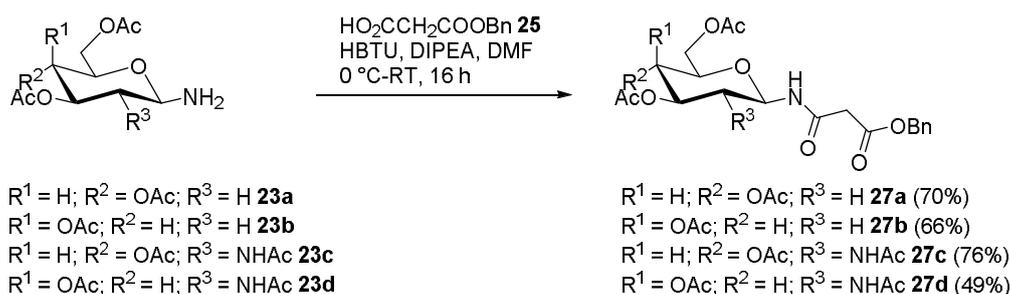
Die Peptidkupplung der anomeren Halbaminale **23a-d** mit dem mono-*tert*-Butylmalonat **24** erfolgte in Gegenwart von HBTU, sowie einer sterisch gehinderten Stickstoffbase (NEt₃ bzw. DIPEA). Die korrespondierenden *tert*-Butylester **26a-d** konnten hierbei mit Ausbeuten von 46-88% isoliert werden (**Schema 36**).



Schema 36: Peptidkupplung der Halbaminale **23a-d** mit dem mono-*tert*-Butylmalonat **24**. Unterschiedliche Methoden werden mit Buchstaben (A, B) bezeichnet.

Die Peptidkupplung der Halbaminale **23a-d** mit dem mono-*tert*-Butylmalonat **24** lieferte mit Ausnahme des Glucosederivates **26a**, lediglich Ausbeuten zwischen 46% und 56% (**Schema 36**), was entweder auf eine verringerte Nucleophilie der Halbaminale oder Säureempfindlichkeit der *tert*-Butylester zurückgeführt werden kann, welche bei der chromatographischen Aufreinigung am sauren Kieselgel partiell entschützt werden können. Um auszuschließen, dass die *tert*-Butylester auf dem Kieselgel protonenkatalysiert gespalten werden, wurden die aminofunktionalisierten Saccharide **23a-d** fernerhin mit dem mono-Benzylmalonat **25** umgesetzt (**Schema 37**).

3.4.2.2 Peptidkupplung mit dem mono-Benzylmalonat



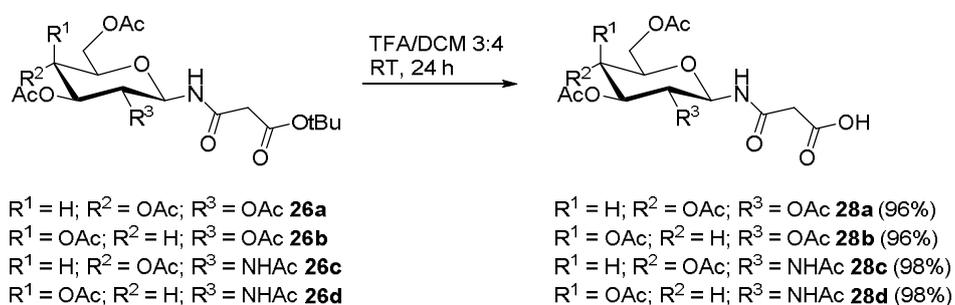
Schema 37: Darstellung der Benzylester **27a-d**.

Nach der Amidkupplung der Amine **23a-d** mit dem mono-Benzylester der Malonsäure **25** wurde jedoch deutlich, dass die Ausbeuten nur im Falle des Galactose- **27b** sowie Glucosaminderivats **27c** auf 66% bzw. 76% gesteigert werden konnten, weshalb die mäßigen Kupplungsausbeuten von 46-56% sehr wahrscheinlich durch die verringerte Nucleophilie der Halbaminale verursacht werden (**Schema 37**).

3.4.3 ENTSCHÜTZUNG DER *tert*-BUTYL- UND BENZYLESTER

3.4.3.1 Saure Hydrolyse der *tert*-Butylester

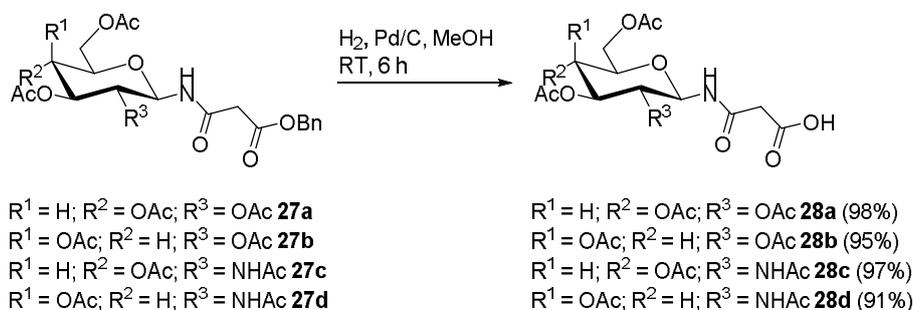
Daraufhin wurden die *tert*-Butylester **26a-d** unter sauren Bedingungen (TFA/DCM 3:4) hydrolysiert, sodass die freien Carbonsäurederivate **28a-d** (96-98%) erhalten werden konnten (**Schema 38**).



Schema 38: Darstellung der freien Carbonsäuren **28a-d** mittels saurer Hydrolyse.

3.4.3.2 Katalytische Hydrierung der Benzylester

Die benzylgeschützten Saccharidderivate **27a-d** wurden hingegen in Gegenwart von Pd/C katalytisch hydriert, woraufhin die freien Carbonsäuren **28a-d** mit Ausbeuten von 91-98% isoliert werden konnten (**Schema 39**).



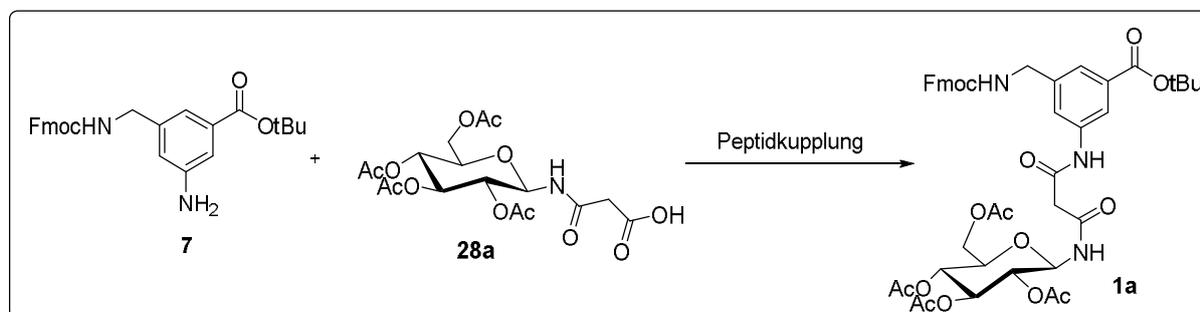
Schema 39: Darstellung der freien Carbonsäuren **28a-d** mittels katalytischer Hydrierung.

3.4.4 PEPTIDKUPPLUNG MIT DEM AROMATISCHEN- BZW. ALIPHATISCHEN RÜCKGRAT

Nach der *N*-glycosidischen Verknüpfung der Saccharide **23a-d** mit dem Malonsäurespacer und der sauren bzw. hydrogenolytischen Spaltung der Esterschutzgruppen, wurden die korrespondierenden Carbonsäuren **28a-d** mit den Fmoc/tBu-geschützten, aromatischen Rückgraten **7**, **8** sowie dem aliphatischen Rückgrat **20** umgesetzt.

3.4.4.1 Peptidkupplung mit den aromatischen Rückgraten

Bei der Synthese der aromatischen Glycokonjugate **1a-d** respektive **3a-d** wurde zunächst anhand des Bausteins **1a** untersucht, welche Peptidkupplungsmethoden die bestmöglichen Ausbeuten liefern (**Schema 40/Tabelle 6**).



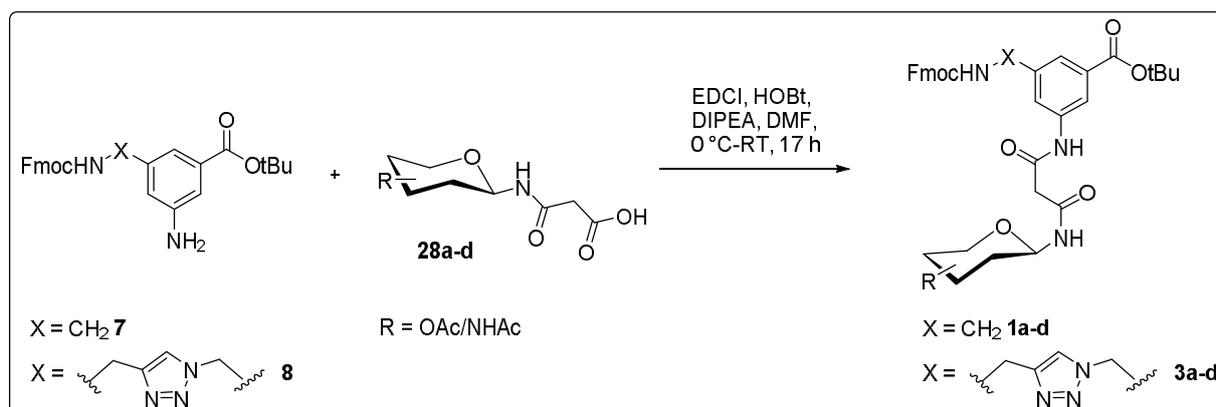
Schema 40: Darstellung des aromatischen Kohlenhydrat-Bausteins **1a** mittels Peptid-Kupplung.

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen bei der Peptid-Kupplung des Amins **7** mit der Carbonsäure **28a**.

Eintrag	Kupplungsreagenzien	Lösungsmittel	Temperatur	Zeit	Ausbeute
1	DCC, HOBt, DIPEA	DCM	0 °C-RT	14 h	23%
2	DIC, HOBt, DIPEA	DCM	0 °C-RT	14 h	65%
3	EDCI, HOBt, DIPEA	DMF	0 °C-RT	17 h	54%
4	HBTU, HOBt, DIPEA	DMF	0 °C-RT	13 h	70%
5	HATU, HOAt, DIPEA	DMF	0 °C-RT	13 h	24%
6	PyBOP, HOBt, DIPEA	DMF	0 °C-RT	13 h	Spuren
7	CDI	THF	RT	13 h	Spuren

Bei der Umsetzung des aromatischen Rückgrats **7** mit dem Saccharid **28a** unter Verwendung von PyBOP oder CDI konnte der aromatische Kohlenhydrat-Baustein **1a** nur in Spuren nachgewiesen werden. Erfolgte die Reaktion hingegen unter Beteiligung der Carbodiimide DCC, EDCI sowie DIC, so konnten die Ausbeuten auf 23%, 54% bzw. 65% gesteigert werden. Wurde die Peptidkupplung in Gegenwart der Uroniumsalze HATU und HBTU durchgeführt, so konnte das aromatische

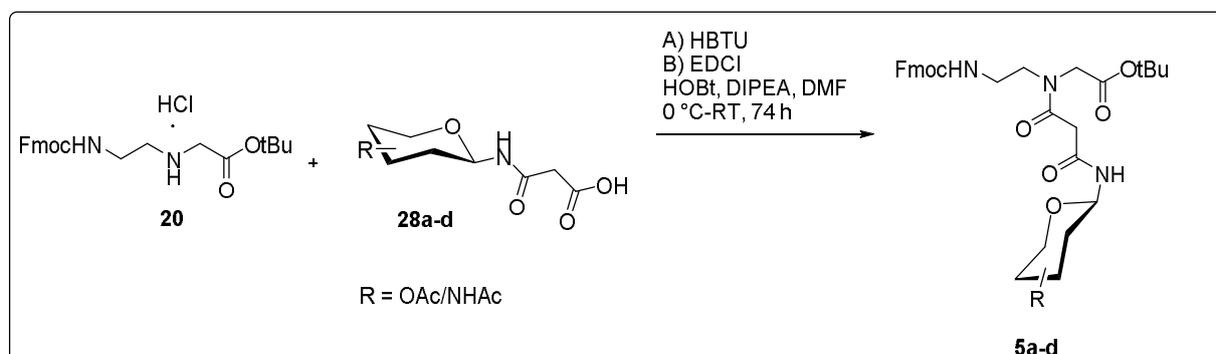
N-Glycokonjugat **1a** schließlich mit einer Ausbeute von 24% respektive 70% isoliert werden. Nach der Optimierung der Kupplungsreaktion kristallisierte sich heraus, dass eine HBTU-medierte Amidbildung die beste Ausbeute von 70% lieferte, wobei jedoch festgehalten werden muss, dass die säulenchromatographische Abtrennung des entstehenden Tetramethylharnstoffs äußerst diffizil war. Wurde die Kupplung hingegen in Gegenwart von EDCI durchgeführt, so konnte der korrespondierende Harnstoff bei der wässrigen Aufarbeitung leicht protoniert und somit abgetrennt werden. Aufgrund dieses eindeutigen Vorteils erfolgte die Darstellung der Glycokonjugate **1a-d** und **3a-d** unter Verwendung von EDCI als Kupplungsreagenz (**Schema 41**), wobei Ausbeuten von 48-61% bzw. 45-67% erreicht werden konnten (**Tabelle 7**).



Schema 41: Darstellung der aromatischen Glycokonjugate **1a-d** und **3a-d**.

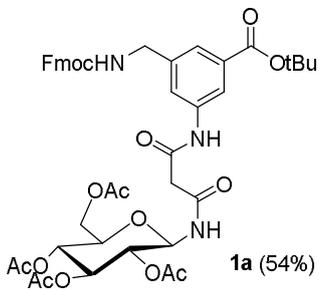
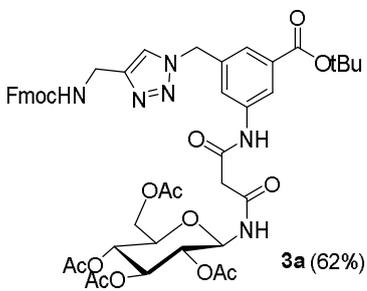
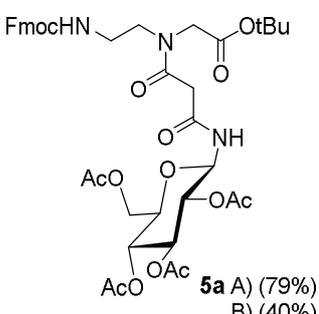
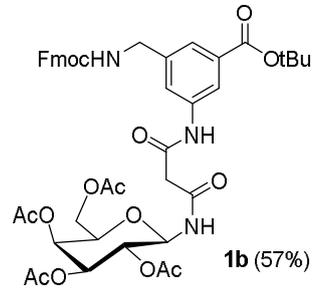
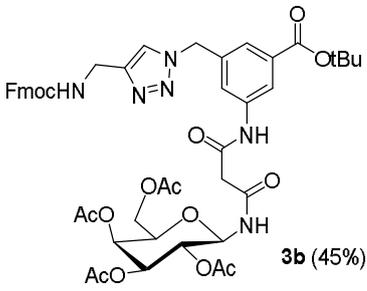
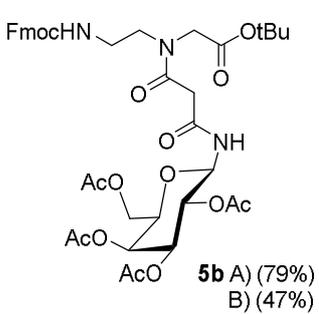
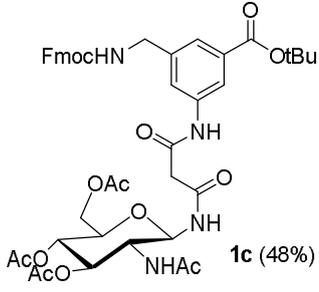
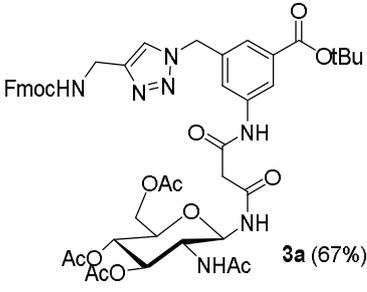
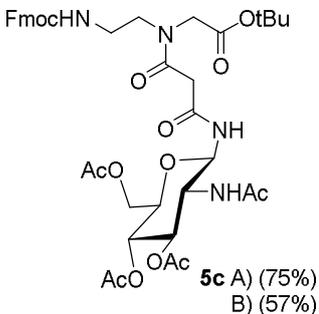
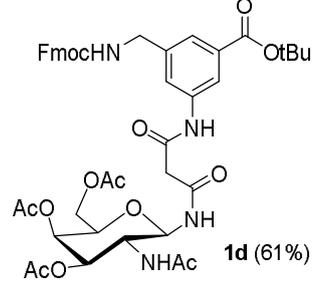
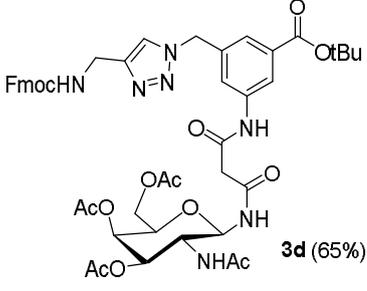
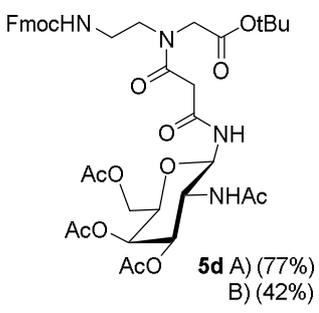
3.4.4.2 Peptidkupplung mit den aliphatischen Rückgrat

Bei der Synthese der aliphatischen, PNA-basierten Glycokonjugate **5a-d** kamen ebenfalls die Peptidkupplungsreagenzien HBTU sowie EDCI zum Einsatz (**Schema 42**). Dabei fielen die Ausbeuten bei der HBTU-vermittelten Kupplung mit 75-79% im Vergleich zur EDCI-Variante deutlich höher aus, bei der die Ausbeuten lediglich 40-57% betragen (**Tabelle 7**). Darüber hinaus kann in Relation zu den aromatischen Glycokonjugaten **1a-d** sowie **3a-d** konstatiert werden, dass hierbei die Abtrennung der entstehenden Harnstoffderivate beim Einsatz beider Reagenzien problemlos möglich war.



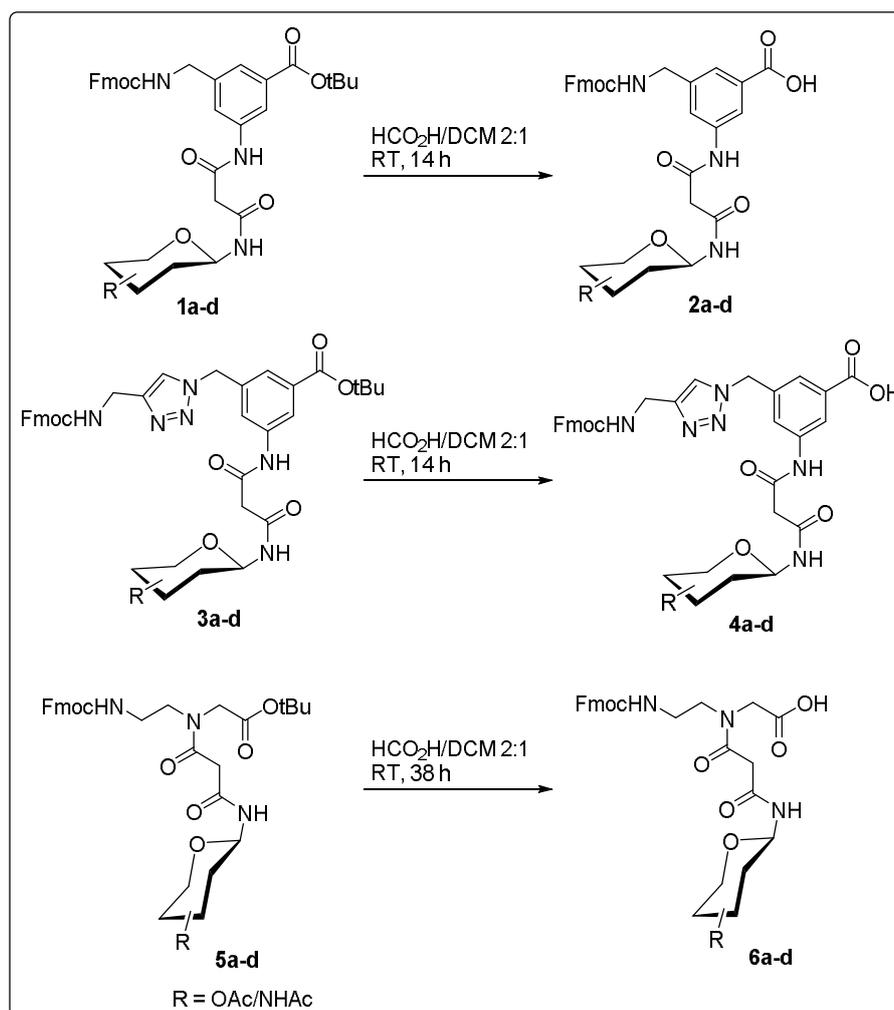
Schema 42: Darstellung der aliphatischen Glycokonjugate **5a-d**. Unterschiedliche Methoden werden mit Buchstaben (A, B) bezeichnet.

Tabelle 7: Aromatische und aliphatische Glycokongugate **1a-d**, **3a-d** und **5a-d**.

Eintrag	Produkt 1	Produkt 3	Produkt 5
1	 <p>1a (54%)</p>	 <p>3a (62%)</p>	 <p>5a A) (79%) B) (40%)</p>
2	 <p>1b (57%)</p>	 <p>3b (45%)</p>	 <p>5b A) (79%) B) (47%)</p>
3	 <p>1c (48%)</p>	 <p>3a (67%)</p>	 <p>5c A) (75%) B) (57%)</p>
4	 <p>1d (61%)</p>	 <p>3d (65%)</p>	 <p>5d A) (77%) B) (42%)</p>

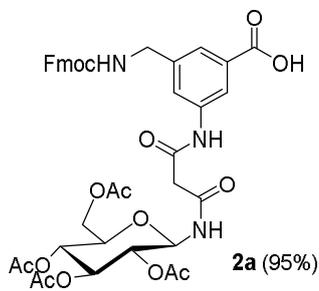
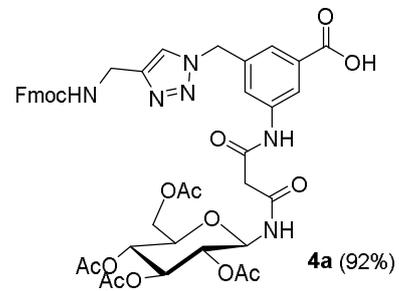
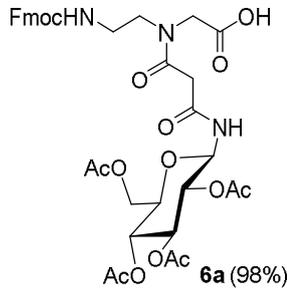
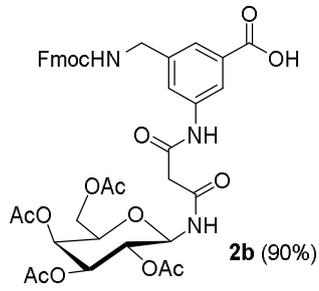
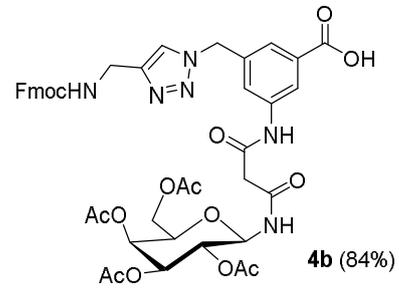
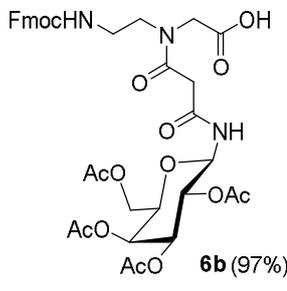
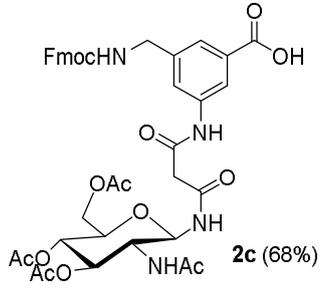
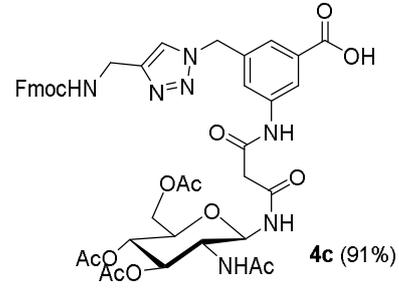
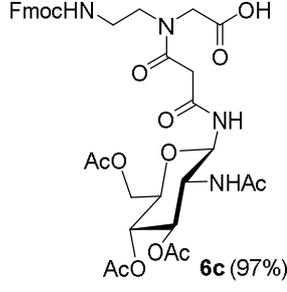
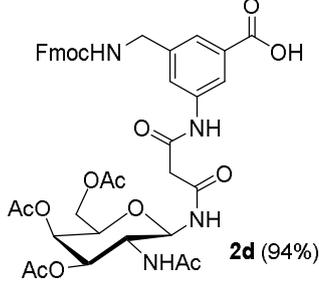
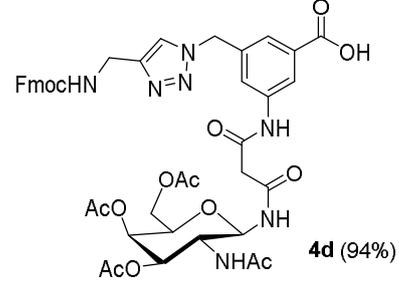
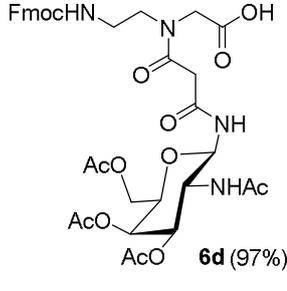
3.4.5 ENTSCHÜTZUNG DER *tert*-BUTYLESTER DER KOHLENHYDRAT-BAUSTEINE

Zur Darstellung der freien Carbonsäuren **2a-d**, **4a-d** sowie **6a-d** wurden die aromatischen und aliphatischen Glycokonjugate **1a-d**, **3a-d** sowie **5a-d** unter sauren Bedingungen (HCO₂H/DCM 2:1) hydrolysiert (**Schema 43**). Hierbei konnten, mit Ausnahme des Glucosaminderivats **2c** (68%), sehr gute Ausbeuten von 84-98% erzielt werden (**Tabelle 8**).



Schema 43: Darstellung der freien Carbonsäuren **2a-d**, **4a-d** sowie **6a-d**.

Tabelle 8: Aromatische und aliphatische Carbonsäuren **2a-d**, **4a-d** sowie **6a-d**.

Eintrag	Produkt 2	Produkt 4	Produkt 6
1	 2a (95%)	 4a (92%)	 6a (98%)
2	 2b (90%)	 4b (84%)	 6b (97%)
3	 2c (68%)	 4c (91%)	 6c (97%)
4	 2d (94%)	 4d (94%)	 6d (97%)

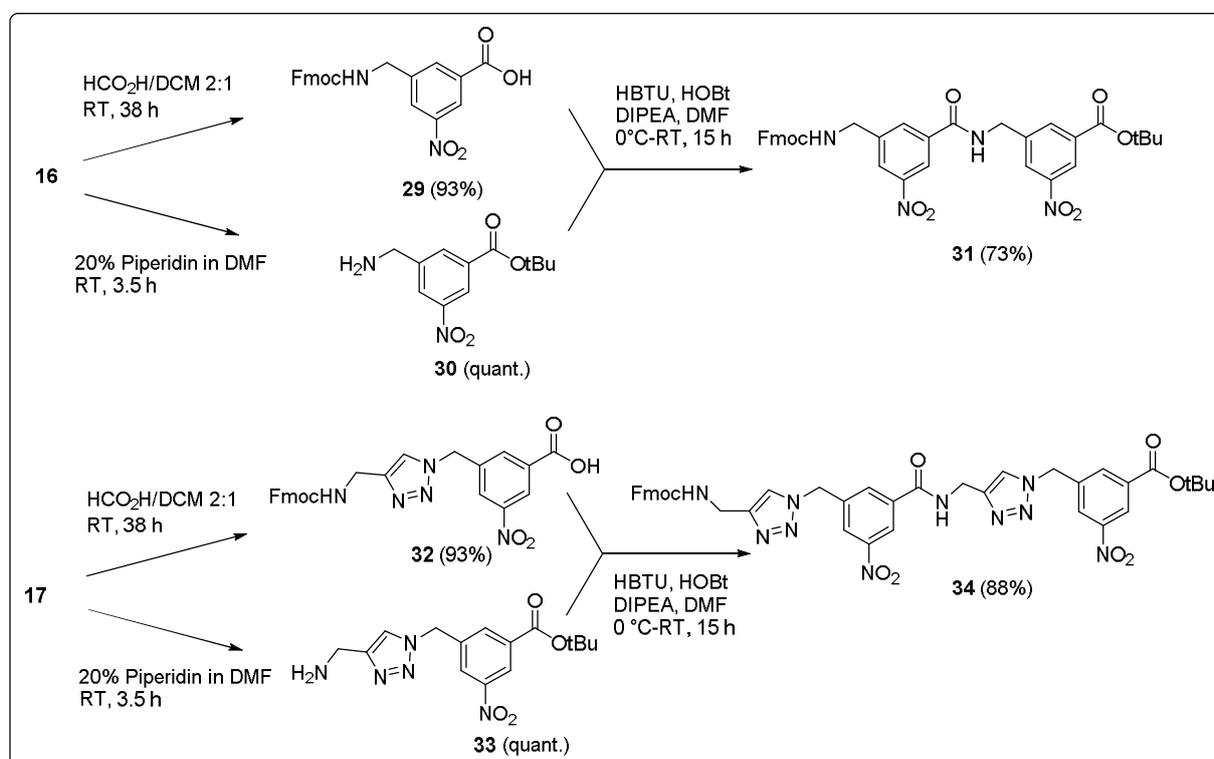
3.5 SYNTHESE VON AROMATISCHEN UND ALIPHATISCHEN DIMEREN

Um zu demonstrieren, dass die aromatischen und aliphatischen *N*-Glycokonjugate **2a-d**, **4a-d**, **6a-d**, sowie die Bausteine **29** und **32** für den Aufbau von kombinatorischen Bibliotheken an einer festen Phase geeignet sind, wurden exemplarisch die Dimere **31**, **34**, **36**, **38** sowie **40** synthetisiert (Schema 44/45).

Hierzu wurden zunächst die *tert*-Butylester **16** bzw. **17** unter sauren Bedingungen ($\text{HCO}_2\text{H}/\text{DCM}$ 2:1) hydrolysiert, woraufhin die freien Carbonsäuren **29** sowie **32** mit Ausbeuten von 93% isoliert werden konnten.

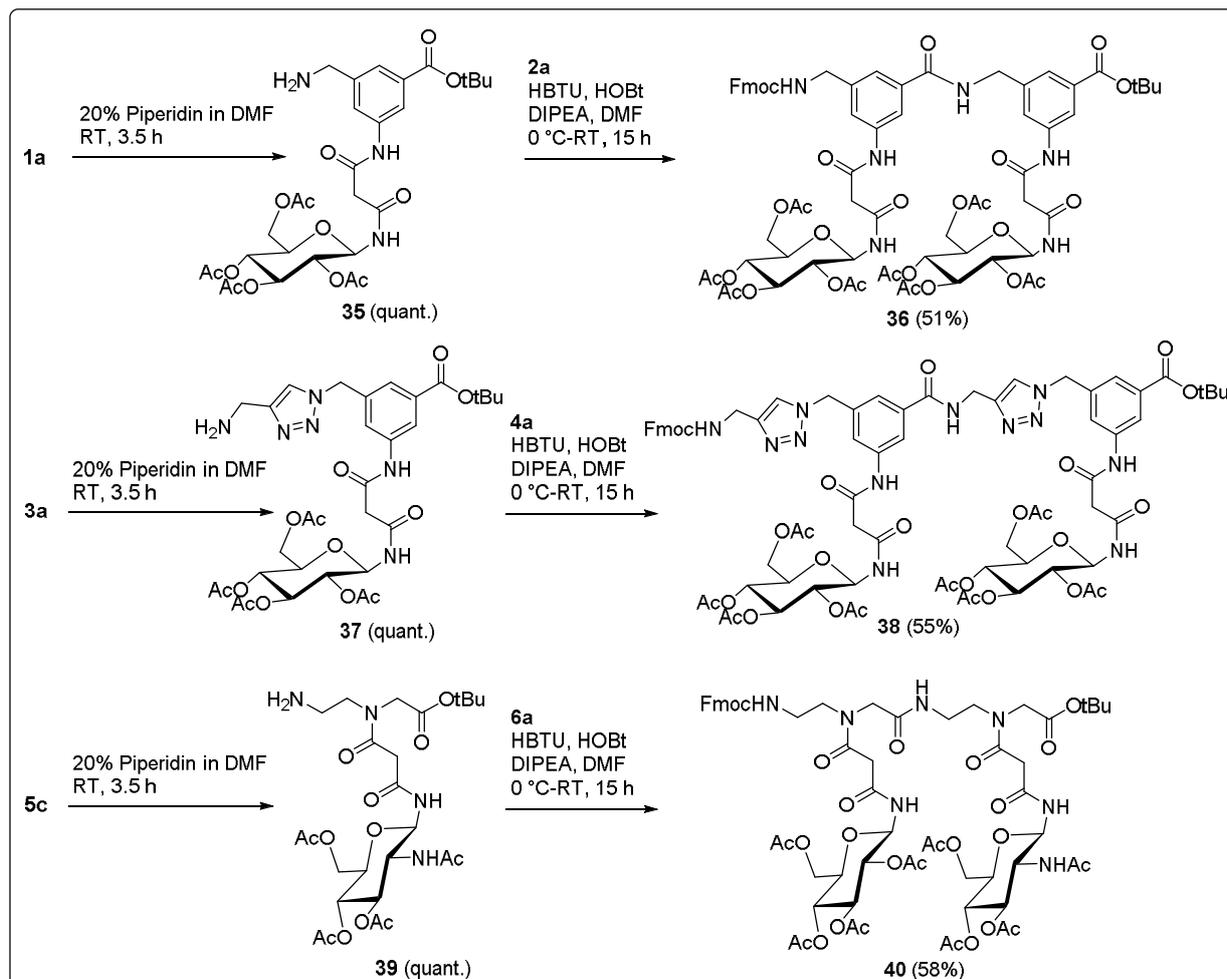
Anschließend wurden die Fmoc-geschützten Amine **16** und **17** unter milden, basischen Bedingungen mittels Piperidin in die entsprechenden Amin-Derivate **30** sowie **33** überführt, welche ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt wurden.

Die finale Peptidkupplung erfolgte in Gegenwart von HBTU, HOBT, sowie DIPEA in DMF, wonach die aromatischen Dimere **31** und **34** mit Ausbeuten von 73% bzw. 88% erhalten werden konnten (Schema 44).



Schema 44: Synthese der aromatischen Dimere **31** und **34**.

Zur Synthese der aromatischen bzw. aliphatischen *N*-Glucosyl-Dimere **36**, **38** und **40** wurden die Fmoc-geschützten Glycokonjugate **1a**, **3a** bzw. **5c** zunächst mittels Piperidin in die freien Amine **35**, **37** und **39** überführt. Im Anschluss erfolgte die Kupplung mit den freien Carbonsäure-Derivaten **2a**, **4a** und **6a** unter denselben Bedingungen (HBTU, HOBT, DIPEA, DMF) wie bei den nicht-glycosylierten Dimeren **31** und **34**. Die aromatischen *N*-Glucosyl-Dimere **36**, **38** respektive das aliphatische Dimer **40** konnten so mit Ausbeuten von 51%, 55% bzw. 58% dargestellt werden (**Schema 45**).



Schema 45: Synthese der aromatischen Dimere **36**, **38** und **40**.

Anhand der Synthesen der aromatischen bzw. aliphatischen Dimere **31**, **34**, **36**, **38** sowie **40** konnte gezeigt werden, dass die aromatischen und aliphatischen Kohlenhydrat-Bausteine **2a-d**, **4a-d**, **6a-d** sowie die aromatischen Carbonsäuren **29** und **32** für die kombinatorische SPOT-Synthese von Peptidbibliotheken an einer festen Phase herangezogen werden können. Vermeintlich geringe Ausbeuten wie bei den Glucosyl-Dimeren **36**, **38** und **40** (51-58%) werden bei der Festphasensynthese verhindert, indem die Carbonsäuren der jeweiligen Glycopeptide **2a-d**, **4a-d**, **6a-d** im großen Überschuss eingesetzt werden.

3.6 ROTAMERSTRUKTUR DER PNA-BASIERTEN GLYKOKONJUGATE

Bei der Darstellung der PNA-basierten Glykokonjugate **5a-d** wurde anhand der spektroskopischen Auswertung ($^1\text{H-NMR}$) deutlich, dass die Rotation um die zentrale Peptidbindung gehindert ist. Im Protonenspektrum in CDCl_3 (**Abbildung 22** bzw. **23**) generiert das anomere, amidische Proton zwei separate Dubletts, was ein Indiz für das Auftreten zweier verschiedener Rotamerstrukturen (cis und trans) ist (**Schema 46**).

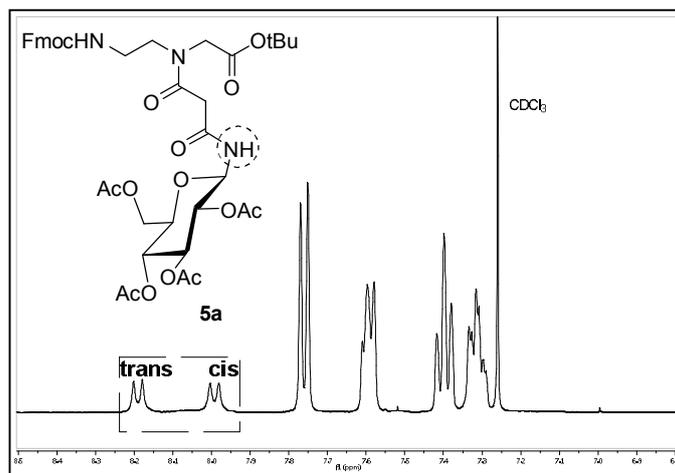


Abbildung 22: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) des PNA-Bausteins **5a** in CDCl_3 . Die amidischen Protonensignale wurden markiert.

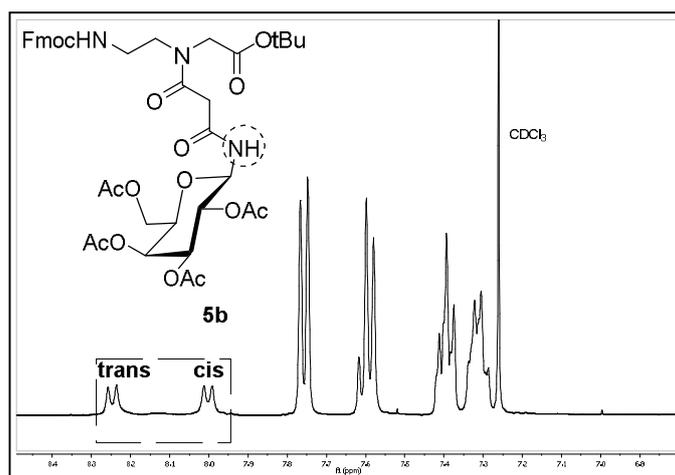
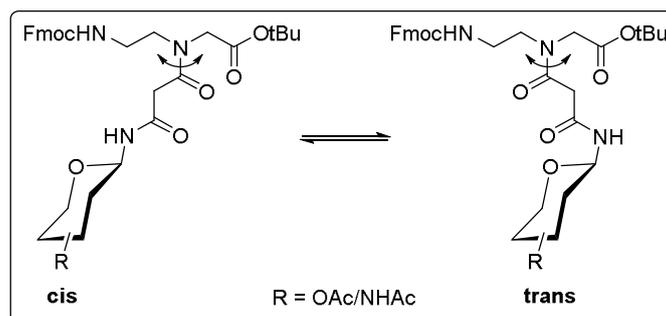


Abbildung 23: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) des PNA-Bausteins **5b** in CDCl_3 . Die amidischen Protonensignale wurden markiert.



Schema 46: Cis- und trans-Rotamer der PNA-basierten Glycokonjugate.

Im Vergleich zu den monomeren PNA-Konjugaten veranschaulicht das Protonenspektrum des dimeren Glycokonjugates **40** (**Abbildung 24**) das Auftreten von vier Rotamerstrukturen (**Schema 47**).

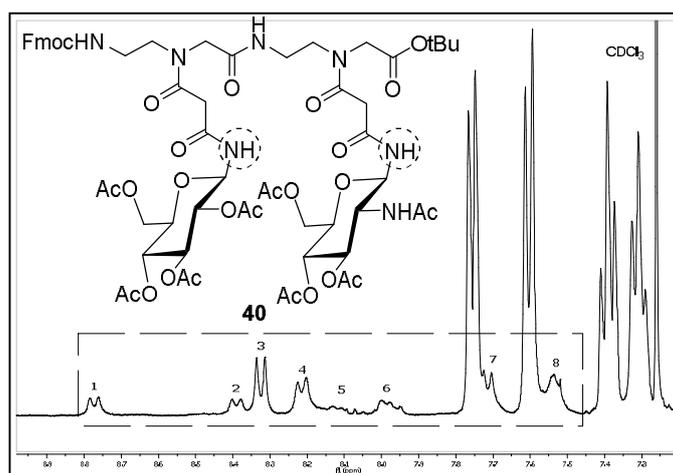
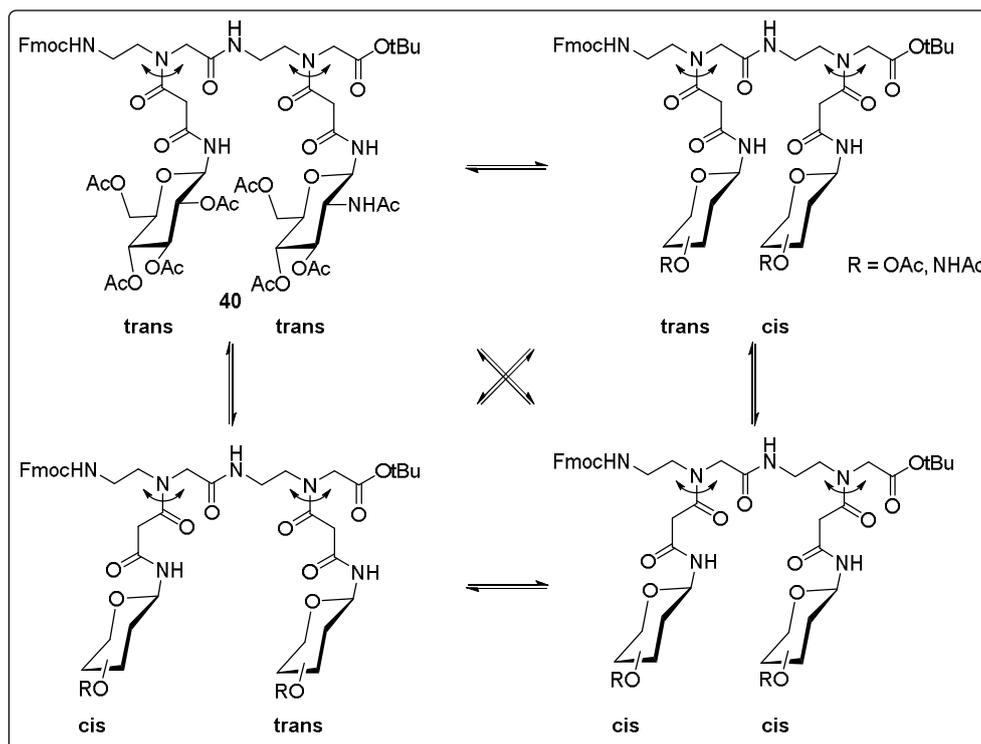
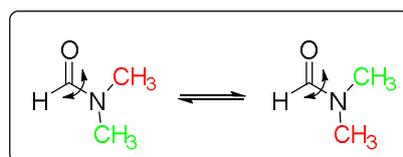


Abbildung 24: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) des dimeren PNA-Glycokonjugates **40** in CDCl_3 . Die amidischen Protonensignale der Rotamere (2 für jedes Rotamer) sind markiert 1/2, 3/4, 5/6, 7/8.



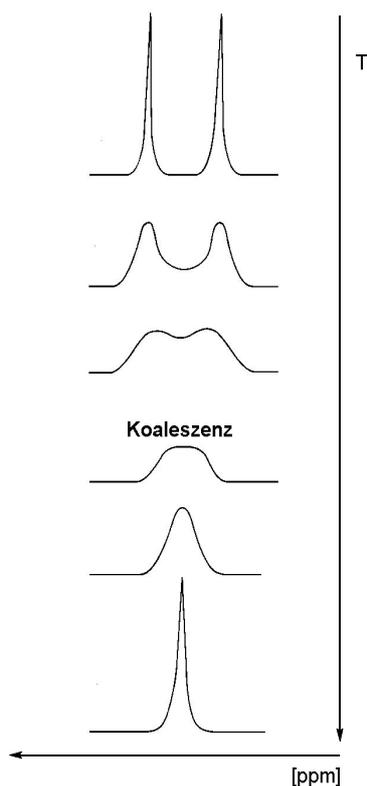
Schema 47: Rotamerstrukturen des Glykokonjugates 40.

Zur Verifizierung der cis- respektive trans-Struktur können temperaturabhängige NMR-Studien durchgeführt werden, welche anhand des *N,N'*-Dimethylformamids (DMF) exemplarisch erläutert werden sollen (**Schema 48**).



Schema 48: Rotation um die C-N-Bindung des *N,N'*-Dimethylformamids (DMF).

Wenn beim DMF die Rotation um die C-N-Bindung bei tiefen Temperaturen „eingefroren“ wird, so werden die Protonen-Signale der zwei Methylgruppen getrennt voneinander wahrgenommen. Wird die Temperatur hingegen kontinuierlich erhöht, so wird die Rotationsbarriere durchbrochen, woraufhin der Koaleszenzpunkt (breites Signal) durchlaufen wird, bis schließlich ein scharfes Signal erhalten wird (**Schema 49**).



Schema 49: Temperaturabhängige ¹H-NMR-Spektroskopie am Beispiel von DMF^[235].

Bei der Durchführung temperaturabhängiger ¹H-NMR Studien spielt die Wahl des Lösungsmittels eine entscheidende Rolle. Für die Untersuchung des Glycokonjugates **5a** ist CDCl₃ ungeeignet, da im Protonenspektrum der spektrale Abstand der beiden amidischen Dubletts sehr groß ist, weswegen sehr hohe Temperaturen notwendig wären, damit der Koaleszenzpunkt erreicht werden kann. Aufgrund des niedrigen Siedepunktes von CDCl₃ bei 61 °C sind Untersuchungen bei höheren Temperaturen nicht möglich. Aus diesem Grund wurde das PNA-basierte Glycokonjugat **5a** NMR-spektroskopisch in weiteren deuterierten Lösungsmitteln vermessen: DMSO-*d*₆, DMF-*d*₇ und Chlorbenzol-*d*₅ (**Abbildung 25**).

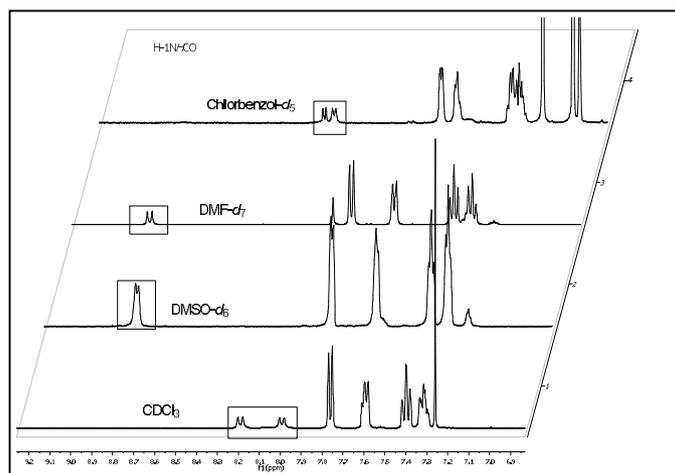


Abbildung 25: PNA-Baustein **5a** in CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$, $\text{DMF-}d_7$ und $\text{Chlorbenzol-}d_5$.

Die Protonenspektren des Glykokonjugates **5a** in $\text{DMSO-}d_6$ sowie $\text{DMF-}d_7$ zeigen, dass die Dubletts der anomeren, amidischen Protonen nicht ausreichend voneinander getrennt sind, wodurch die Bestimmung des Koaleszenzpunktes erschwert wird. Wird das Glykokonjugat **5a** in $\text{DMSO-}d_6$ auf $60\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt, so erscheint bei einer chemischen Verschiebung von 6.21 ppm das Signal des Dibenzofulvens, welches die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe verifiziert (Abbildung 26).

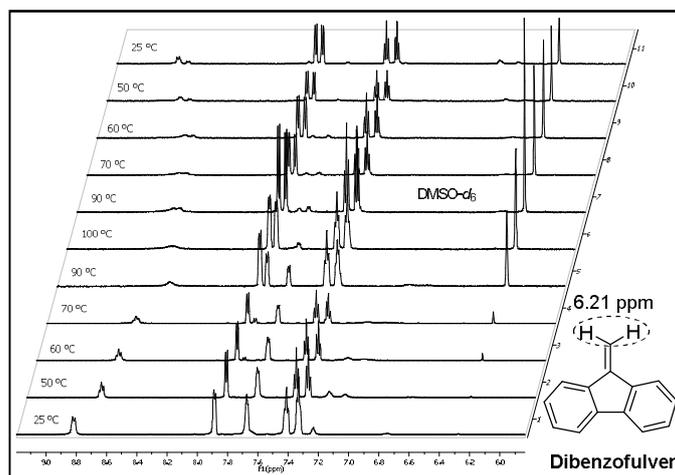


Abbildung 26: Temperaturabhängige $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) Spektren in $\text{DMSO-}d_6$.

Höck *et al.* konnten diesbezüglich zeigen, dass die Fmoc-Schutzgruppe in Gegenwart von Chlorbenzol- d_5 auch bei höheren Temperaturen beständig ist^[236]. Desweiteren hat Chlorbenzol- d_5 einen hohen Siedepunkt von 131 °C, weshalb es für temperaturabhängige NMR-Studien äußerst prädestiniert ist. Weiterhin veranschaulicht das ^1H -NMR Spektrum des PNA-Bausteins **5a** (**Abbildung 25**), dass die Dubletts der amidischen Protonen eine kleinere Differenz bezüglich deren chemischen Verschiebung aufweisen, weshalb keine allzu großen Temperaturen nötig sein sollten, um den entsprechenden Koaleszenzpunkt zu erreichen.

Aufgrund dieser eindeutigen Vorteile wurden die weiteren temperaturabhängigen Protonenspektren der Glykokonjugate **5a**, **5b** sowie **40** in Chlorbenzol- d_5 aufgenommen (**Abbildung 27**, **28** und **29**).

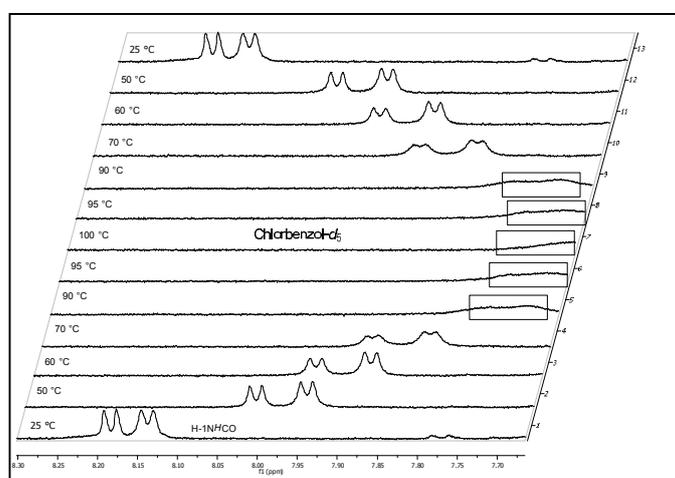


Abbildung 27: Temperaturabhängige ^1H -NMR (600 MHz) Spektren des Konjugats **5a** in Chlorbenzol- d_5 . Die Signalverbreiterung um den Koaleszenzpunkt wurde markiert.

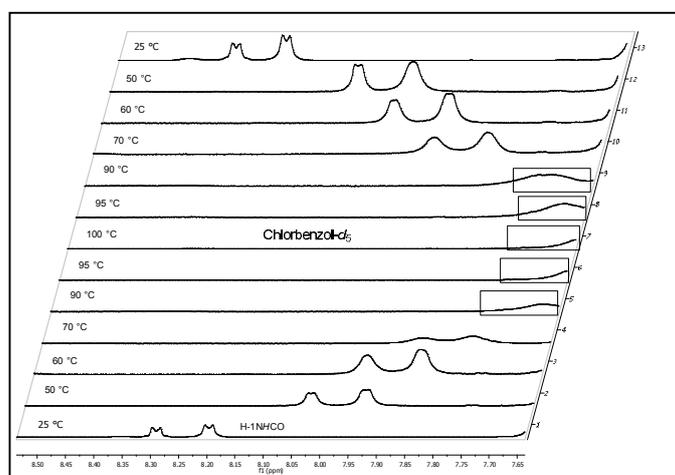


Abbildung 28: Temperaturabhängige ^1H -NMR Spektren (600 MHz) des Konjugats **5b** in Chlorbenzol- d_5 . Die Signalverbreiterung um den Koaleszenzpunkt wurde markiert.

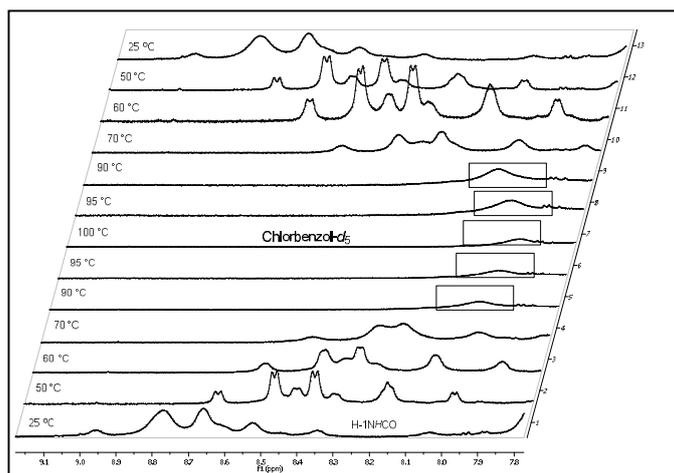


Abbildung 29: Temperaturabhängige ^1H -NMR Spektren (600 MHz) des Konjugats **40** in Chlorbenzol- d_5 . Die Signalverbreiterung um den Koaleszenzpunkt wurde markiert.

Anhand der temperaturabhängigen Protonenspektren des Glykokonjugates **5a**, **5b** und **40** (25-100 °C) in Chlorbenzol- d_5 (**Abbildung 27-29**) wird ersichtlich, dass eine Erhöhung der Temperatur einen *Tieffeldshift* der anomeren, amidischen Protonensignale zur Folge hat. Unglücklicherweise überlappen die amidischen Signale bei steigender Temperatur mit den aromatischen Fmoc-Signalen (**Abbildung 30**), weswegen keine exakte Koaleszenztemperatur, sondern lediglich ein Koaleszenzbereich von 90-95 °C angegeben werden kann.

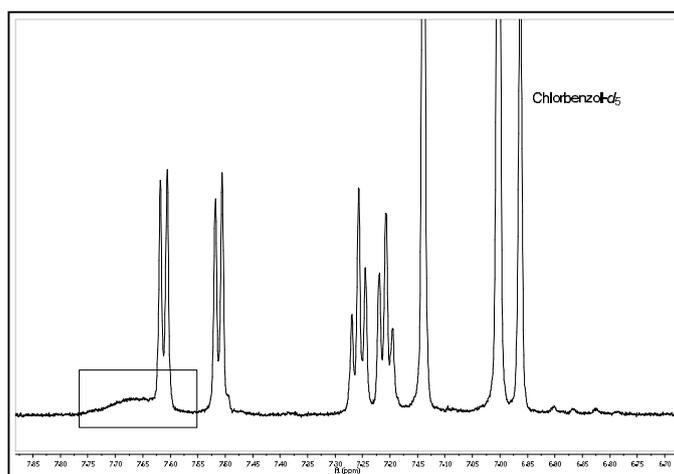


Abbildung 30: ^1H -NMR (600 MHz) Spektrum des Konjugats **5a** in Chlorbenzol- d_5 bei 95 °C. Die Signalüberlappung mit den Fmoc-Signalen wurde markiert.

Cis- und trans-Zuordnung

Die Zuordnung der zwei amidischen Dubletts zum entsprechenden cis-, bzw. trans-Rotamer erfolgte mithilfe eines 2D-NOESY-Spektrums in CDCl_3 (**Abbildung 31**).

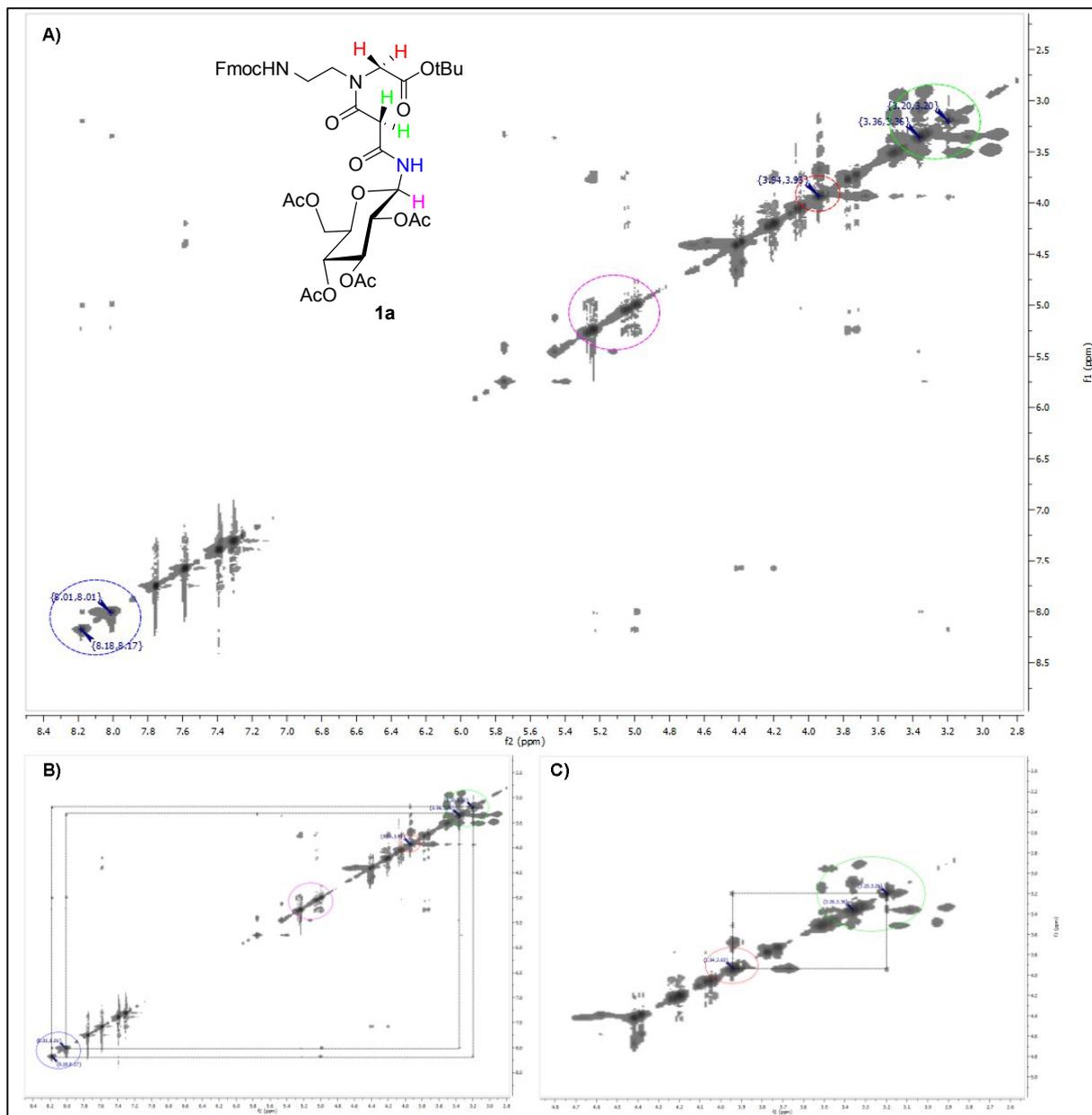
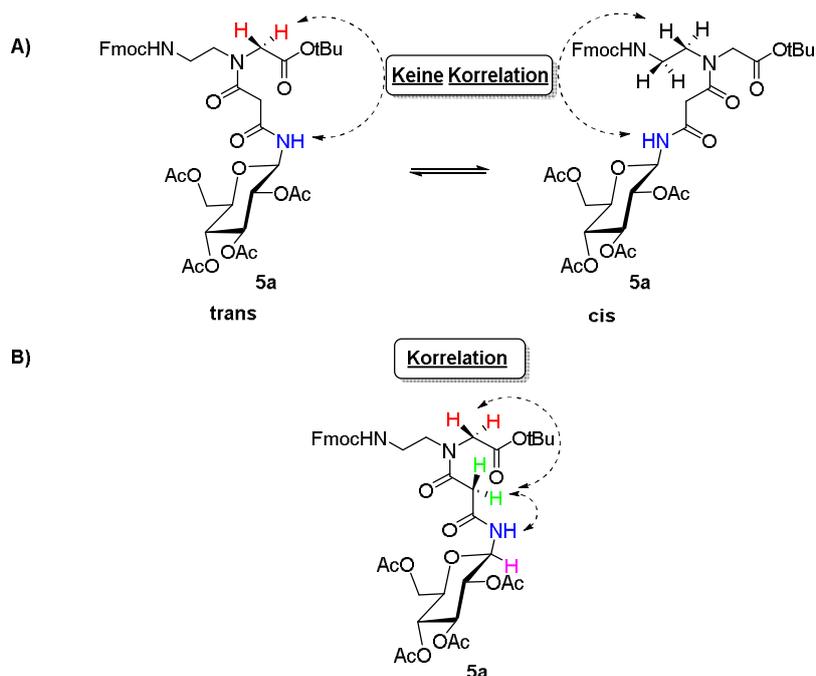


Abbildung 31: A) 2D-NOESY-Spektrum (600 MHz; $\tau_m = 450$ ms) des Glykokonjugates **5a** in CDCl_3 , B) NOE-Kreuzpeaks der amidischen (blau) Protonen mit den Malonyl-Protonen (grün), C) NOE-Kreuzpeaks zwischen den amidischen- und den Malonyl-Protonen.

Aus dem 2D-NOESY-Spektrum wurde ersichtlich, dass eine direkte Zuweisung der amidischen Dubletts aufgrund der fehlenden Korrelationen zwischen den amidischen- und den Methylen- bzw. 2-Aminoethyl-Protonen nicht durchführbar ist (**Schema 50**).



Schema 50: NOE-Korrelationen des Glycokonjugates **5a**. **A)** Fehlende Korrelation zwischen dem amidischen Proton und den Methylen- oder 2-Aminoethylprotonen des PNA-Rückgrates. **B)** Beobachtete NOE-Korrelationen des PNA-Bausteins **5a**.

Dennoch konnten NOE-Kreuzpeaks zwischen den amidischen Protonen und den Methyl-Protonen des Malonsäure-Spacers identifiziert werden, über die eine indirekte Zuordnung realisierbar war (**Abbildung 31**). Intensive NOE-Kreuz-Korrelationen zwischen den Malonyl-Protonen der Seitenkette (3.20 ppm) und den Methyl-Protonen des PNA-Rückgrates (3.93 ppm) verdeutlichen, dass der Abstand zwischen diesen Protonen weitaus geringer sein sollte, als der der Protonen mit einer chemischen Verschiebung von 3.36 bzw. 3.93 ppm (**Abbildung 31**). Folglich kann das Dublett bei 8.18 ppm dem trans- und das Dublett bei 8.01 ppm dem cis-Rotamer zugewiesen werden.

Berechnung der Rotationsbarriere (ΔG_r^\ddagger -Werte)

Die Rotationsbarrieren der Glycopeptide **5a-b** um die C-N-Bindung können mit der mit der Eyring-Theorie^[237-238] sowie den experimentell ermittelten Koaleszenztemperaturen berechnet werden (**Tabelle 9**). Die ΔG_r^\ddagger -Werte des dimeren Glycokonjugates **40** konnten hierbei jedoch nicht bestimmt werden, da die Zuordnung der einzelnen Rotamerstrukturen zu den korrespondierenden Protonensignalen nicht realisiert werden konnte. Dennoch sollten die Rotationsbarrieren aufgrund der ähnlichen Koaleszenztemperatur (T_c) nahezu identisch sein.

$$k_r = \frac{kT_c}{h} e^{-\frac{\Delta G_r^\ddagger}{RT_c}}$$

$$\Delta G_r^\ddagger = 4.56 \cdot T_c \left\{ 10.32 + \lg \left(\frac{T_c}{k_r} \right) \right\} \cdot 10^{-3} \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$$

$$k_r = 2.22 \cdot \Delta U \text{ (in ppm)} \cdot 600 \text{ MHz}$$

Die benötigten ΔU -Werte wurden den $^1\text{H-NMR}$ Spektren der Glycokonjugate **5a-b** in Chlorbenzol- d_5 bei 25 °C entnommen.

Tabelle 9: ΔG_r^\ddagger -Werte der Glycopeptide **5a-b** in Chlorbenzol- d_5 .

Eintrag	Glycopeptid	T_c in °C (K)	ΔU (NH _{trans} -NH _{cis}) in ppm	k_r in Hz	ΔG_r^\ddagger in kcal/mol
1	5a	90-95 (363-368)	0.07	93.2	18.1-18.3
2	5b	90-95 (363-368)	0.09	119.9	17.9-18.1

Anhand **Tabelle 9** wird ersichtlich, dass die Rotationsbarrieren von 17.9-18.3 kcal/mol lediglich maximal 0.4 kcal/mol voneinander abweichen. Dieser geringe Unterschied lässt den Rückschluss zu, dass die verschiedenen Saccharidderivate (Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc) der *N*-Glycopeptide **5a-d** bzw. **6a-d** keinen signifikanten Einfluss auf die Rotation um die C-N-Bindung ausüben. Fernerhin kann festgehalten werden, dass die ermittelten Rotationsbarrieren in der gleichen Größenordnung wie die Barrieren anderer, literaturbekanntere PNA-Derivate (17.9-19.0 kcal/mol)^[239-240] sind.

3.7 SPOT-SYNTHESE UND SCREENING DER *N*-GLYCOPEPTIDE

3.7.1 AUSWAHL EINES GEEIGNETEN TRÄGERS

Die Darstellung der aromatischen und aliphatischen *N*-Glycopeptidmimetika mittels Festphasenpeptidsynthese erfolgte in dieser Arbeit auf einer 384er Glas-Wellplate der Firma Mikrogas Chemtech GmbH (**Abbildung 32**).



Abbildung 32: Glas-Wellplates (384-Wells)^[241].

Die Verwendung einer Glas-Wellplate hat dabei folgende Vorteile:

- Glas besticht durch seine hohe chemische und thermische Stabilität^[92].
- Oberflächen aus Glas sind inert gegenüber allen organischen Solventien^[92].
- Glasträger besitzen eine regelmäßige Oberfläche, wodurch die Derivatisierungen reproduzierbar durchführbar sind^[242].
- Im Vergleich zu anderen Trägern wie Cellulose besticht Glas durch eine niedrige Hintergrundfluoreszenz^[243-244].
- Vorgefertigte Wells verhindern bei vollständiger Bedeckung des Bodens ein „Auseinanderlaufen“ der SPOTS, sodass die Reaktionslösungen homogen verteilt werden können^[155].
- Glasträger können nach Reinigung mittels Caroscher Säure ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) wiederverwendet werden^[242].

3.7.2 FUNKTIONALISIERUNG DER FESTEN PHASE

3.7.2.1 Silanisierung von SiO_2 -Oberflächen

Vor Beginn der SPOT-Synthese müssen die Glas-Wellplates zunächst gereinigt, aktiviert sowie modifiziert werden. Um Verunreinigungen von der Glasoberfläche zu entfernen und diese für die Silanisierung zu aktivieren, d.h. möglichst viele freie, reaktive Si-OH-Gruppen zu generieren, wurden die Wellplates vorbehandelt. Die Glas-Wellplates wurden mit einer 3N NaOH-Lösung gereinigt, mit Wasser gewaschen, sowie mit einer Lösung aus $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (3:2) aktiviert. Nach erneutem Waschen mit 1,4-Dioxan sowie Methanol, erfolgte die Silanisierung, bei der prinzipiell eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Silanen Verwendung finden kann (**Abbildung 33**).

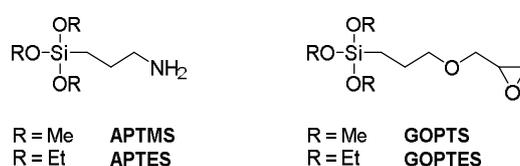
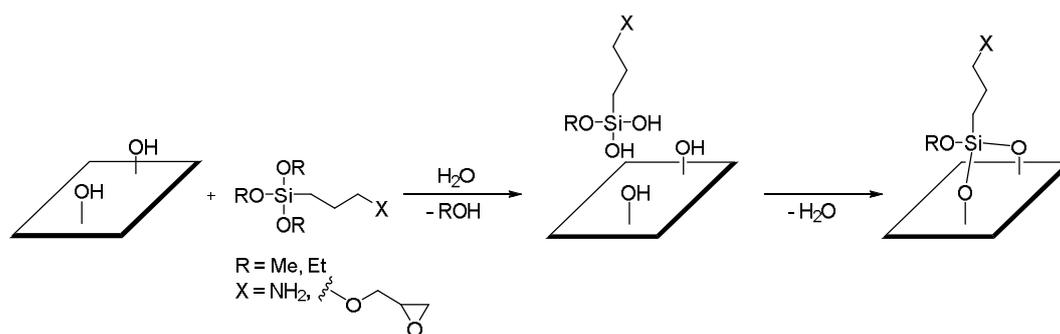


Abbildung 33: Organosilane.

Eine Modifikation der Oberfläche mit simplen Monoalkoxysilanen liefert monomere Anordnungen, wohingegen Di- oder Trialkoxysilane (**Abbildung 33**) komplexe, quervernetzte Strukturen ausbilden^[245].

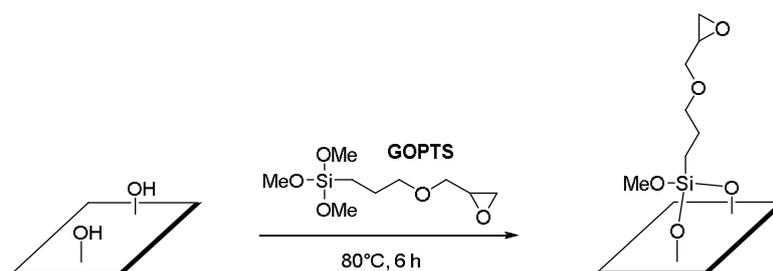
Bei der Anbindung der Silane an die Oberfläche wird angenommen, dass der Alkoxyrest zunächst hydrolysiert, woraufhin die kovalente Bindung zur Glasoberfläche gebildet wird (**Schema 51**). Daher werden unpolare Lösungsmittel häufig mit Wasser angereichert, wohingegen polare Lösungsmittel, aufgrund eines zu hohen Wassergehalts, vorher getrocknet werden müssen. Oft wird auch auf zusätzliche Lösungsmittel verzichtet, da Glasoberflächen einen physisorbierten Wasserfilm tragen können, durch welchen die Hydrolyse der Alkoxygruppen erfolgen kann^[246]. Um eine möglichst vollständige Ausbildung der Siloxanbindungen zur Oberfläche sicherzustellen, erfolgt die Funktionalisierung bei einer Vielzahl von Applikationen über einen längeren Zeitraum (1-18 h) bzw. bei erhöhten Temperaturen (75-80 °C)^[242,247-251]. Im Zuge dessen kristallisierte sich heraus, dass der Grad der Silanisierung ab einer Reaktionsdauer von ca. 5 h nicht mehr wesentlich zunimmt^[250].



Schema 51: Oberflächenfunktionalisierung mit Alkoxysilanen.

Im Rahmen dieser Arbeit fand das reaktive, methoxyderivatisierte GOPTS Verwendung, da der Einsatz dieses Silans, in Relation zu anderen, aminofunktionalisierten Silanen, hohe, reproduzierbare Oberflächenbeladungen (5.7 pmol/mm^2) ermöglicht^[242]. Desweiteren wird in der Literatur beschrieben, dass der Gebrauch von reinem, wasserfreiem GOPTS die Entstehung von „Multi-Layern“ unwahrscheinlich macht, wohingegen die Bildung von Monolagen begünstigt wird^[242,252]. Im Vergleich zu den Amino-Silanen zeichnen sich die GOPTS Lagen zusätzlich durch ihre hohe Dichte, sowie hohen Homogenität aus, was deren Verwendung favorisiert^[242].

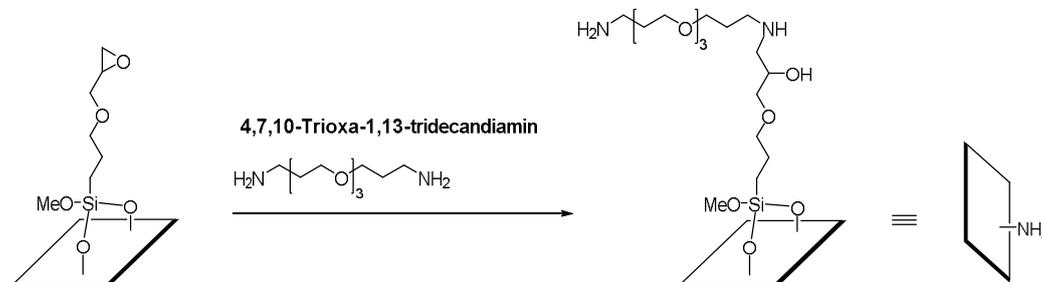
Aufgrund dieser Vorteile erfolgte die Derivatisierung der Glas-Wellplates in dieser Arbeit mit reinem, wasserfreiem GOPTS über einen Zeitraum von 6 h und einer Temperatur von $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (**Schema 52**).



Schema 52: Derivatisierung der Glas-Oberfläche mit GOPTS.

3.7.2.2 Aminofunktionalisierung der GOPTS-derivatisierten Glas-Oberflächen

Neben den bereits beschriebenen Vorteilen kann das epoxidierte Silan mit zahlreichen Spacermolekülen, wie bifunktionalen Aminen (DAPEG ...) umgesetzt werden, wodurch die Variationsmöglichkeiten vielfältig sind. Laut Literatur^[242] liefert beispielsweise die nucleophile Reaktion mit konzentrierten, sowie lösungsmittelfreien Diaminen hohe, reproduzierbare Oberflächenbeladungen, weshalb PEG-Diamine, wie das 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin, in der vorliegenden Arbeit auch in ihrer reinen Form zur Anwendung kamen (**Schema 53**).



Schema 53: Nucleophile Reaktion des PEG-Diamins mit der epoxidierten Glas-Oberfläche.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Festphasensynthese ist die Verwendung eines geeigneten Linkers zwischen der aminofunktionalisierten Glasoberfläche (**Schema 53**) und des entsprechenden Glycokonjugates (Kapitel 3.1.2). Ein passender Linker muss sämtliche Reaktionsbedingungen unbeschadet überstehen bzw. orthogonal zu allen anderen Schutzgruppen sein, die bei der Synthese des jeweiligen Glycopeptids zum Einsatz kommen. Zum anderen muss die Einführung sowie Abspaltung nahezu quantitativ von Statten gehen, woraufhin das Produkt in einer sehr hohen Reinheit vorliegen sollte^[94]. Um eine Auswahl treffen zu können, müssen die jeweiligen Synthesebedingungen exakt unter die Lupe genommen werden: Bei der SPOT-Synthese der aromatischen und aliphatischen *N*-Glycopeptidmimetika sollte, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, eine orthogonale Fmoc-Strategie^[80] Verwendung finden (**Abbildung 34**).

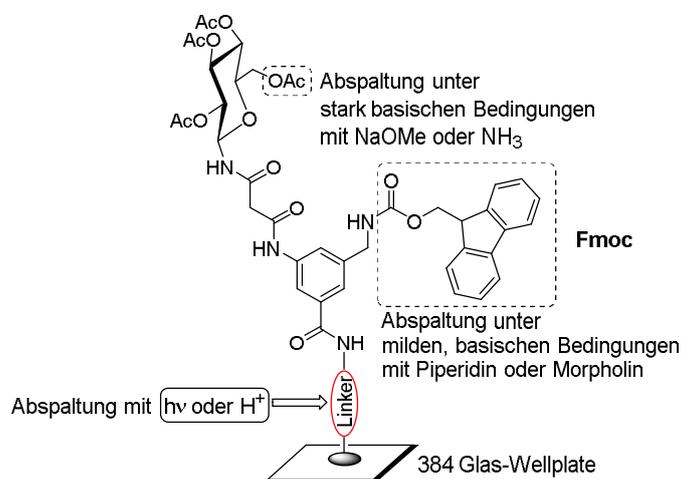
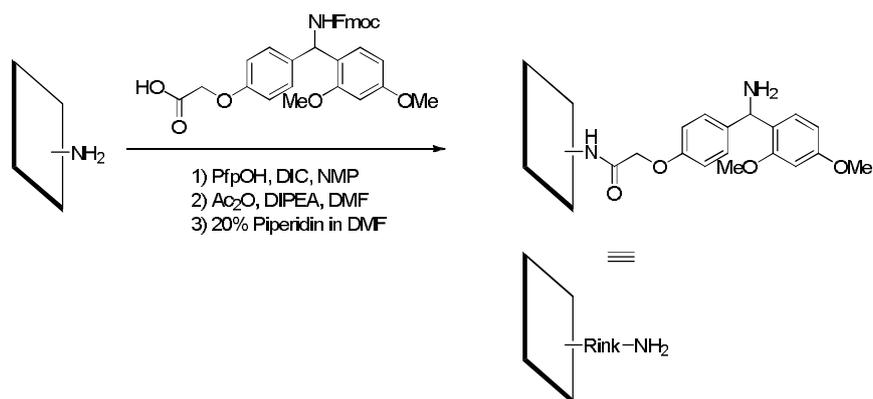


Abbildung 34: Orthogonale Fmoc-Strategie.

Bei dieser Strategie erfolgt die Entschützung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe unter milden, basischen Bedingungen mittels Piperidin, wobei die Acetyl-Schutzgruppen am Saccharid beständig sind und so nicht abgespalten werden. Da die Verseifung der Acetyl-Reste unter stark basischen Bedingungen erfolgt, kann zwischen der aminofunktionalisierten Glasoberfläche und dem Glycopeptid nur ein photolytisch- oder sauer-spaltbarer Linker in Betracht gezogen werden. Untersuchungen von C. Schips^[17] haben diesbezüglich gezeigt, dass ein photolabiler Linker, wie der Holmes Linker^[253], für das Synthesekonzept nicht in Frage kommt, da dieser ebenfalls unter basischen Bedingungen, beispielsweise mit NH₃, abgespalten werden kann. Stattdessen kristallisierte sich heraus, dass der Rink-Amid-Linker^[96], ein sauer abspaltbarer Linker, ausgezeichnet für die synthesebedingten Anforderungen geeignet ist. Der Rink-Amid-Linker ist unter stark basischen Bedingungen stabil und lieferte bei der Abspaltung des entsprechenden Glycokonjugates mit TFA (20-95%) gute Ausbeuten (> 80%)^[254]. Desweiteren konnte dieser Linker mit bis zu 80% an die aminofunktionalisierte

Oberfläche gekoppelt werden^[17]. Aufgrund dieser Resultate kam der Rink-Amid-Linker auch in dieser Arbeit zur Anwendung.

Zur Kupplung des Rink-Amid-Linkers an die aminofunktionalisierte Glasoberfläche wurde der Linker in NMP gelöst (0.25 M) und mit DIC sowie Pentafluorphenol *in situ* aktiviert. Nach 30 min wurde der korrespondierende Pfp-Ester mittels eines Pipettierroboters (Kapitel 3.7.4) auf die derivatisierte Oberfläche aufgetragen (**Schema 54**).



Schema 54: Derivatisierung mit dem Rink-Amid-Linker.

Um den Derivatisierungsgrad der Glasoberfläche (**Tabelle 15**) zu ermitteln, wurde die Fmoc-Schutzgruppe über einen Zeitraum von 30 min mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF (v/v) abgespalten. Zur Quantifizierung wurde das entstehende Piperidin-Dibenzofulven-Addukt UV-spektroskopisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 301$ nm gemessen (**Abbildung 35**).

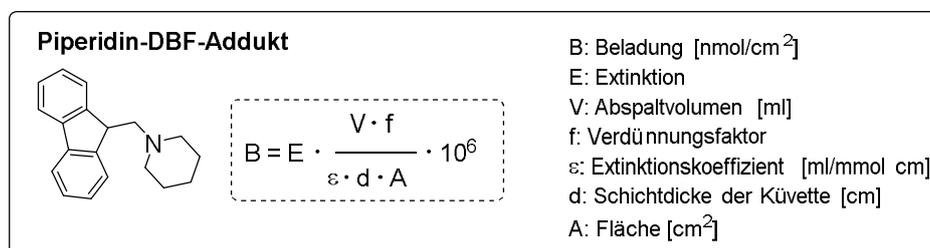


Abbildung 35: UV-spektroskopische Bestimmung des Derivatisierungsgrades.

Vor Bestimmung des Derivatisierungsgrades der jeweiligen Glasoberfläche musste zunächst der Extinktionskoeffizient ϵ des Piperidin-Dibenzofulven-Addukts experimentell ermittelt werden, da die Angaben der Literatur stark voneinander abweichen ($\epsilon = 7800 \text{ ml/mmol cm}^{[255]}$ bzw. $\epsilon = 5253 \text{ ml/mmol cm}^{[256]}$). Hierzu wurden verschieden konzentrierte Lösungen von Fmoc-*L*-Alanin, welche Beladungsgrade simulieren ($2\text{-}20 \text{ nmol/cm}^2$), die etwas unterhalb des Maximalwerts von K. Günther^[24] ($4.2 \text{ nmol/well} \approx 41.3 \text{ nmol/cm}^2$) liegen, mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF versetzt und nach 30 min spektroskopisch vermessen. Nach Auftragung der Extinktion bei 301 nm gegen die jeweilige Konzentration ergab sich nach linearer Regression aus der Steigung ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 5980 \text{ ml/mmol cm}$ (**Abbildung 36**).

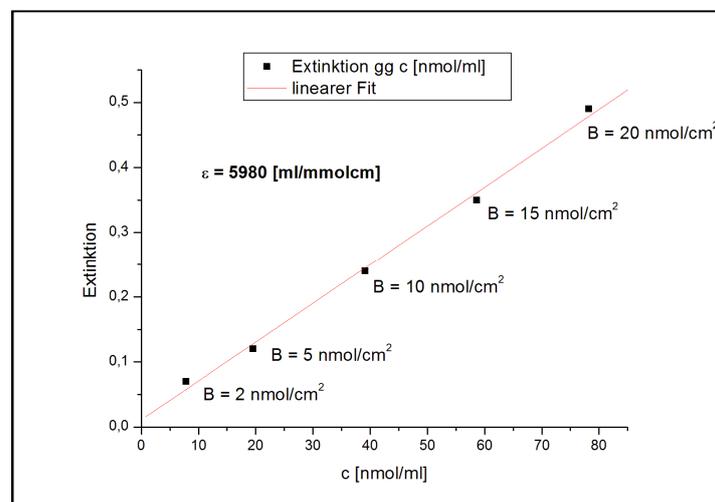


Abbildung 36: Bestimmung des Extinktionskoeffizienten ϵ des Piperidin-DBF-Addukts.

Zur Optimierung des Derivatisierungsgrades wurde die Reaktionsdauer mit dem 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin, ausgehend von literaturbekannten Bedingungen ($15\text{-}16 \text{ h}$, $70\text{-}80 \text{ °C}$)^[249-250], sukzessive verlängert (**Tabelle 10**), wobei jedoch ab einer Reaktionsdauer von 7 Tagen lediglich Zersetzung des Diamins beobachtet werden konnte.

Tabelle 10: Derivatisierung der Glas-Wellplate.

Eintrag	GOPTS 10 µl/Well	PEG-Diamin 10 µl/Well	Fmoc Rink-Amid-Linker			
			2 x 1.25 µl/Well		2 x 2.0 µl/Well	
1	6 h, 80 °C	18 h, 80 °C	2 x 30 min, RT	0.3-0.7 nmol/Well	2 x 30 min, RT	0.5-0.9 nmol/Well
				2.9-6.9 nmol/cm ²		4.9-8.8 nmol/cm ²
2	6 h, 80 °C	4 d, 80 °C	2 x 30 min, RT	0.7-1.4 nmol/Well	2 x 30 min, RT	0.8-1.5 nmol/Well
				6.9-13.8 nmol/cm ²		7.9-14.7 nmol/cm ²

Anhand der **Tabelle 10** wird deutlich, dass eine Verlängerung der Reaktionsdauer mit dem 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin von 18 h auf 4 d sowie eine Erhöhung des Volumens der Linker-Lösung von 2 x 1.25 auf 2 x 2.0 µl/Well keinen signifikanten Anstieg der Aminofunktionalisierung zur Folge hat, weshalb weitere Glas-Wellplates 18 h bei 80 °C mit dem 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin inkubiert wurden und der Rink-Amid-Linker mit einem Volumen von 2 x 1.25 µl/Well aufgespottet wurde. Um einen durchschnittlichen Derivatisierungsgrad zu ermitteln, wurde die Anbindung des Rink-Amid-Linkers an eine PEG-derivatisierte Glasoberfläche zweimal wiederholt, wobei sich folgende Werte ergaben (**Tabelle 11**).

Tabelle 11: Derivatisierung der Glas-Wellplate mit dem Rink-Amid-Linker.

Eintrag	Beladung ₁ = B ₁	B ₂	B ₃	Ø B ₁₋₃
1	0.7 nmol/Well	0.7 nmol/Well	0.3 nmol/Well	0.6 nmol/Well
	6.9 nmol/cm ²	6.9 nmol/cm ²	2.9 nmol/cm ²	5.9 nmol/cm²

Um die Vollständigkeit der Fmoc-Abspaltung nach einer Reaktionszeit von 30 min zu überprüfen, wurde eine Glas-Wellplate nach der Entschützung mit DMF (abs.) und EtOH (HPLC grade) gewaschen und erneut 30 min mit einer 20%igen Piperidin-Lösung benetzt. Nach der UV-spektroskopischen Analyse der beiden Abspaltungslösungen konnte manifestiert werden, dass die Fmoc-Entschützung bereits nach 30 min nahezu quantitativ erfolgt, da in der Lösung der Kontrollreaktion kein Piperidin-Dibenzofulven-Addukt mehr nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 37**).

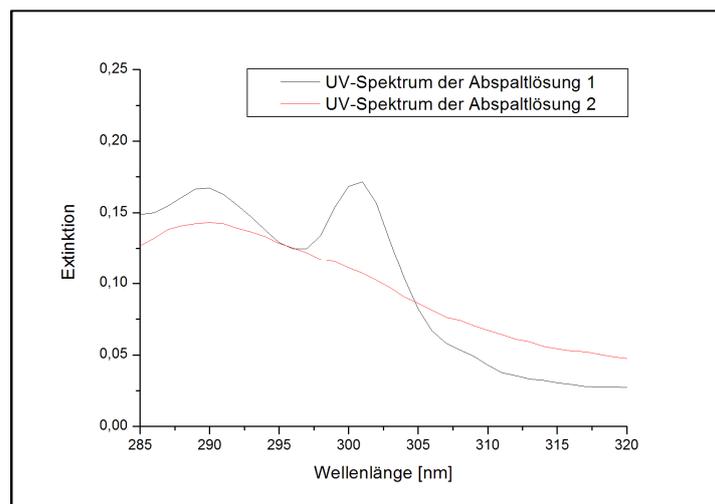
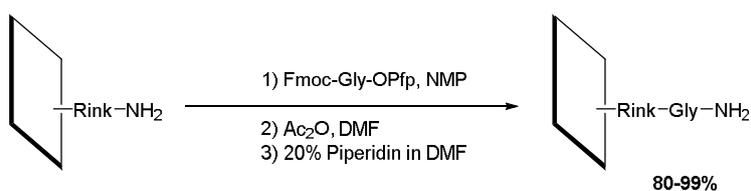


Abbildung 37: UV-Spektren des Entschützungsrests.

Um bei der Kupplung des ersten Glycoconjugates gleichbleibende Umsätze zu bekommen, ist es aus sterischen Gründen sinnvoll, dass zwischen dem Rink-Amid-Linker und dem ersten Glycokonjugat eine weitere Aminosäure, wie Glycin oder β -Alanin, eingefügt wird.

Hierzu wurde der Fmoc-geschützte Pfp-Ester des Glycins in NMP gelöst (0,25 M) und mit dem Pipettierroboter auf die aminofunktionalisierte Glasoberfläche aufgetüpfelt (2 x 1,25 μ l/Well). Nach anschließender Acetylierung und Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe konnte gezeigt werden, dass die Anbindung des Glycins mit 80-99% an den Rink-Amid-Linker durchgeführt werden kann (**Schema 55**).



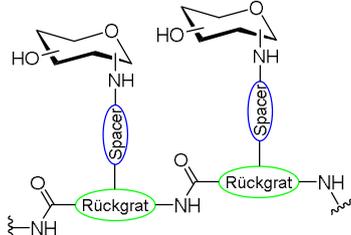
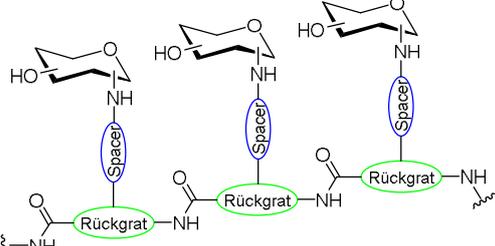
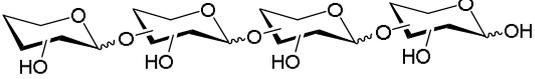
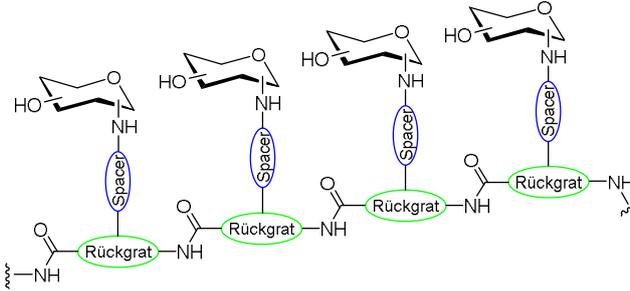
Schema 55: Derivatisierung mit Glycin.

3.7.3 AUSWAHL DER *N*-GLYCOPEPTIDMIMETIKA UND LEKTINE

Bei der Untersuchung von Kohlenhydrat-Lektin-Interaktionen mittels kombinatorischer SPOT-Synthese müssen zu Beginn folgende Fragestellungen geklärt werden:

- 1) Welche *N*-Glycopeptidmimetika sollen bzw. können getestet werden? (**Tabelle 12**)
(Imitation von Di-,Tri- oder Tetrasacchariden usw.)
- 2) Welche Lektine können möglicherweise mit diesen Mimetika wechselwirken?

Tabelle 12: Saccharide und ihre *N*-Glycopeptidmimetika.

Saccharid	<i>N</i> -Glycopeptidmimetikum
 <p data-bbox="391 918 502 952">Disaccharid</p>	
 <p data-bbox="391 1265 502 1299">Trisaccharid</p>	
 <p data-bbox="391 1579 502 1612">Tetrasaccharid</p>	

1) Auswahl der *N*-Glycopeptidmimetika

Die Kohlenhydrat-Bausteine dieser Arbeit bestehen aus einem trifunktionalen, aromatischen oder aliphatischen Rückgrat, sowie einem Malonsäurespacer, an den vier verschiedenen Monosaccharide (Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc) kovalent gebunden sind (**Abbildung 38**).

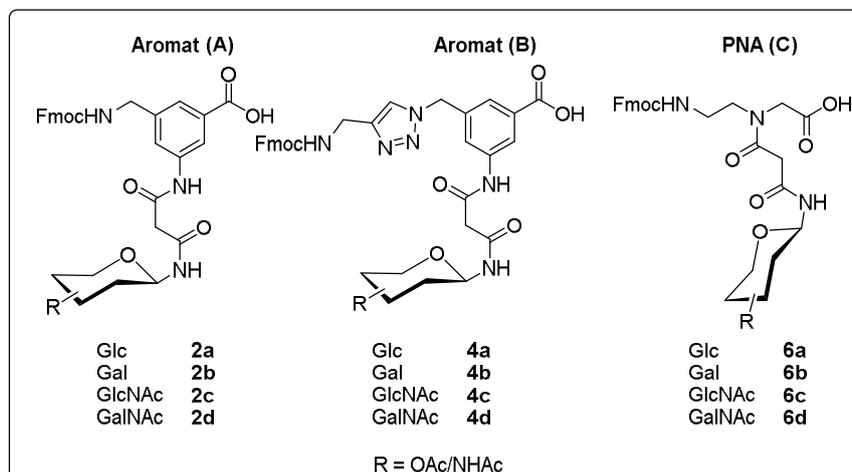


Abbildung 38: Aromatische und aliphatische Kohlenhydratbausteine.

Mit diesen Glycokonjugaten (**Abbildung 38**) wären für jeden einzelnen Typus (A, B, C) prinzipiell die folgenden Kombinationsmöglichkeiten realisierbar (**Tabelle 13**).

Tabelle 13: Kombinationsmöglichkeiten der aromatischen und aliphatischen *N*-Glycopeptide.

Eintrag	<i>N</i> -Glycopeptidmimetika	Kombinationsmöglichkeiten
1	Disaccharid-	$4^2 = 16$
2	Trisaccharid-	$4^3 = 64$
3	Tetrasaccharidmimetika	$4^4 = 256$

Anhand der **Tabelle 13** wird ersichtlich, dass mit den drei unterschiedlichen Bausteintypen 16 Disaccharid-, 64 Trisaccharid- oder 256 Tetrasaccharidmimetika synthetisiert werden könnten. Da bei der kombinatorischen SPOT-Synthese, wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben, eine 384er Glas-Wellplate Verwendung finden soll, können auf einer Plate maximal 384 unterschiedliche Glycopeptidmimetika (Di-, Tri- oder Tetrasaccharidmimetika) dargestellt werden. Zur Vermeidung von zufälligen Fehlern, müssen die jeweiligen Mimetika in ausreichender Zahl auf der Glas-Wellplate vorhanden sein, weshalb das Anlegen einer Bibliothek mit 256 Verbindungen nicht sinnvoll wäre. Damit eine statistische Auswertung des designierten Screenings durchführbar ist, kommen somit nur Bibliotheken mit 16 oder 64 *N*-Glycopeptiden in Frage.

Um nach dem Screening auf einen möglichst großen Datensatz zurückgreifen zu können, wurde in dieser Arbeit, pro *N*-Glycopeptid- bzw. Rückgrat-Typ, eine Bibliothek aus **16 verschiedenen Disaccharidmimetika** synthetisiert (**Tabelle 14**), bei der jedes einzelne Mimetikum mit insgesamt 22 Replika auf der 384er Glas-Wellplate vertreten ist (**Abbildung 39**).

Tabelle 14: Disaccharidmimetika mit den Rückgrat-Typen **A**, **B** und **C**.

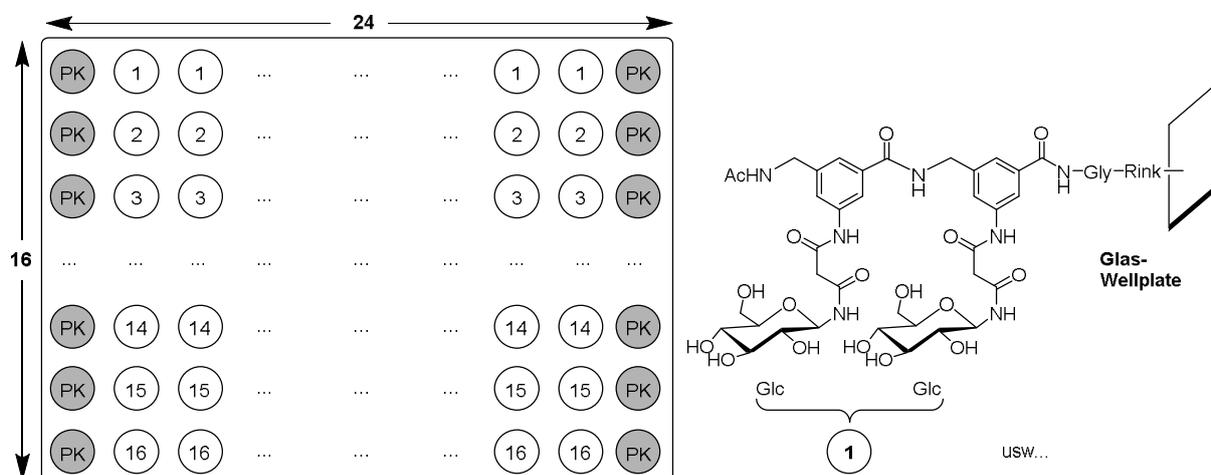
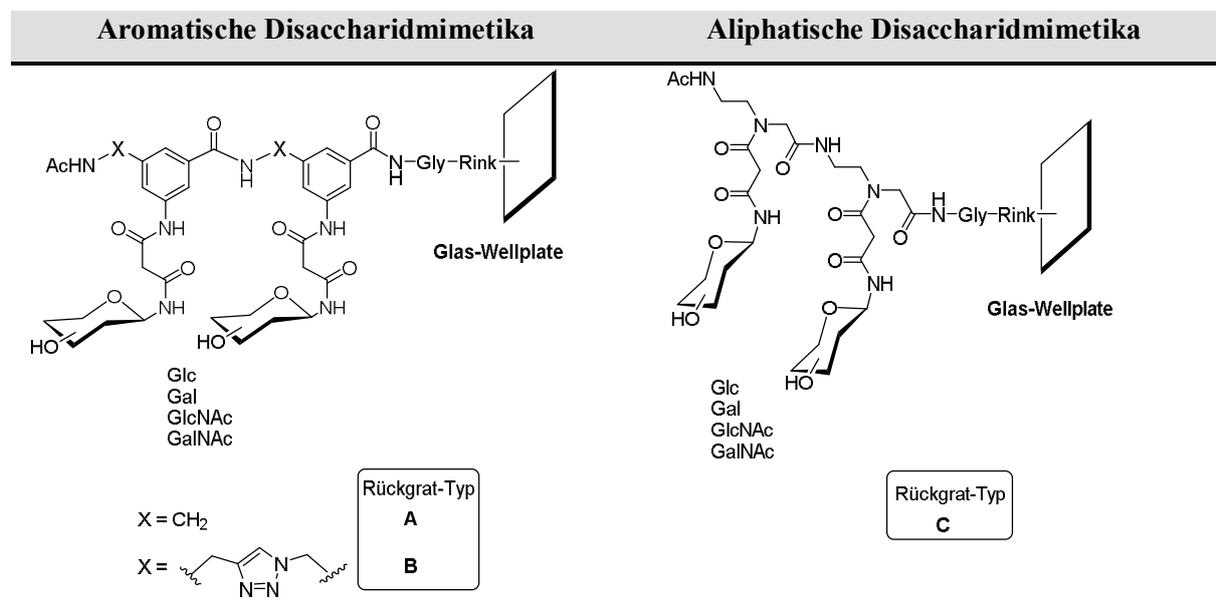


Abbildung 39: Glas-Wellplate mit 16er Bibliothek; **1-16:** Disaccharidmimetika, **PK:** „Positiv-Kontrolle“.

2) Auswahl geeigneter Lektine

Lektine besitzen eine oder mehrere kohlenhydraterkennende Bereiche (engl. *CRD - carbohydrate recognition domain*), welche spezifische Wechselwirkungen mit den jeweiligen Sacchariden eingehen. Untersuchungen haben gezeigt, dass einige Lektine nicht nur mit komplexen Oligosacchariden, sondern auch mit einfachen Glycokonjugaten, wie Disacchariden wechselwirken (**Tabelle 15**).

Tabelle 15: Lektine, die mit Disacchariden interagieren.

Eintrag	Lektin	Herkunft	Spezifität
1	<i>Peanut agglutinin</i> ^[50] (PNA)	<i>Archais Hypogaea</i> (Erdnuss)	Galβ(1-3)GalNAc
2	<i>Erythrina corallodendron agglutinin</i> ^[257] (ECoA)	<i>Erythrina corallodendron</i> (Korallenbaum)	Galβ(1-4)GlcNAc
3	<i>Erythrina cristagalli agglutinin</i> ^[258-260] (ECA)	<i>Erythrina cristagalli</i> (Korallenstrauch)	Galβ(1-4)GlcNAc
4	<i>Ricinuns communis agglutinin</i> ^[260] (RCA ₁₂₀)	<i>Ricinuns communis</i> (Ricinusbohne)	Galβ(1-4)GlcNAc

Im Rahmen der Krebsforschung wurde bekannt, dass das homotetramere *Peanut Agglutinin* (PNA) unter physiologischen Bedingungen mono-, di- oder Polysaccharide mit terminalen β-Galactosiden, wie das Thomsen-Friedenreich-Antigen (TF-Antigen) erkennt, welches auf der Oberfläche von Tumorzellen vorkommt^[261-262] (**Abbildung 40**).

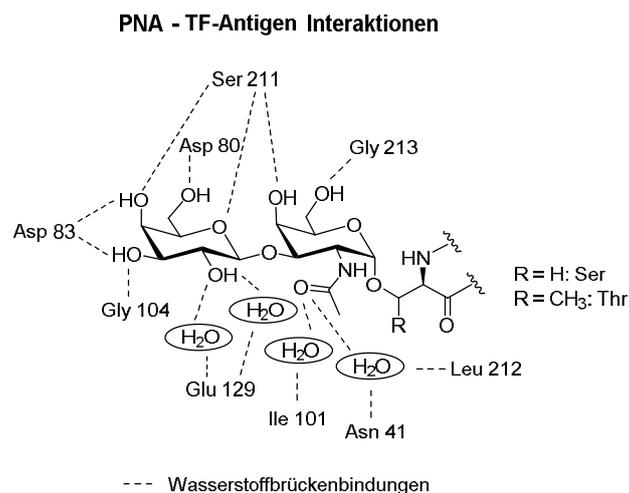


Abbildung 40: PNA – TF-Antigen Interaktionen^[263].

Aufgrund der enormen medizinischen Bedeutung sollte überprüft werden, inwiefern die aromatischen und aliphatischen *N*-Glycopeptidmimetika dieser Arbeit mit dem Lektin der Erdnuss (PNA) interagieren.

3.7.4 SPOT-ROBOTER

Die Darstellung der *N*-Glycopeptidmimetika dieser Arbeit erfolgte unter Verwendung eines teilautomatisierten Pipettier-Roboters (Intavis ASP 222)^[264] (**Abbildung 41**).

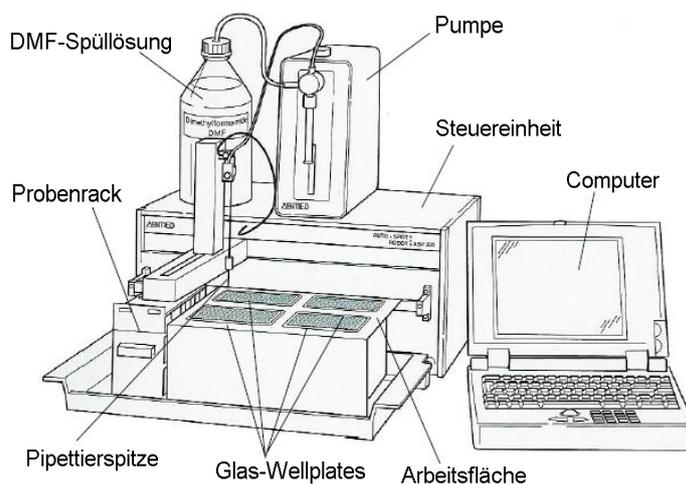


Abbildung 41: Pipettier-Roboter Intavis ASP 222.

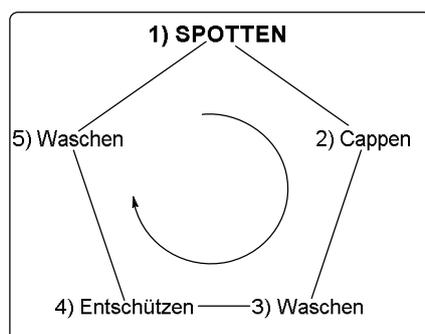
Bei der kombinatorischen SPOT-Synthese mittels Pipettier-Roboter wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Festlegen eines Arrays in der .xyz-Datei
- Definieren der jeweiligen Peptid-Sequenz in der .seq-Datei
- Laden der .seq-Datei in die Steuersoftware (.xyz-Datei wird automatisch geladen)
- Einstellen der SPOT-Parameter (**Tabelle 16**)
- Beladen des Probenracks mit den entsprechenden Lösungen
- Aufbringen der Glas-Wellplates auf die Arbeitsfläche
- Starten der Synthese

Tabelle 16: SPOT-Parameter.

Eintrag	Parameter	Einstellung
1	Pipettiervolumen	1.25 -2.0 μ l
2	Konzentration	0.1 mmol/ml
3	Reaktionszeit	30 min
4	Stoffmenge (RCO ₂ H)	0.10 mmol
5	Luftvolumen	0 μ l
6	Anzahl an Wiederholungen	2

Zu Beginn der SPOT-Synthese musste der Pipettier-Roboter zunächst programmiert werden: Anhand einer *.xyz*-Datei wurde dem Roboter mitgeteilt, wo sich die Glas-Wellplates auf der Arbeitsfläche befinden. In dieser Datei wurde festgehalten, welchen Abstand (xy) die einzelnen Wells von einander haben und welche z-Koordinate die Pipettierspitze in Relation zur Glas-Wellplate einnehmen darf. Desweiteren wurde festgelegt, welche Positionen (xyz) die Reaktionslösungen im Probenrack einnehmen (**Abbildung 41**). Weiterhin wurde in der *.seq*-Datei vorgegeben, welche Peptidsequenz aufgebaut werden soll, wobei jedem einzelnen Baustein ein Buchstabe (z. B. A, R, N, D) zugeordnet wurde. Nach der erfolgreichen Parametrisierung wurde das Probenrack mit den entsprechenden Lösungen beladen und die Glas-Wellplate(s) wurde(n) auf der Arbeitsfläche angebracht (Bis zu vier Glas-Wellplates können gleichzeitig derivatisiert werden). Über die Spritzennadel entnahm der SPOT-Roboter nun definierte Volumina (1.25-2.0 μ l) der jeweiligen Reaktionslösung, woraufhin der Arm alle Positionen ansteuerte, die im voreingestellten Synthesecyclus vorgesehen waren. Damit die jeweilige Peptidkupplung mit möglichst hohen Ausbeuten ablaufen konnte, war es sinnvoll eine Reaktionszeit von 30 min abzuwarten, woraufhin der Zyklus einmal wiederholt wurde. Nach einer Reaktionsdauer von insgesamt 60 min (2 x 30 min) mussten die Glas-Wellplates von der Arbeitsfläche abgenommen werden, um nicht abreagierte Aminofunktionen mittels Acetanhydrid zu Acetylieren. Dieses sogenannte „Cappen“ ist zwingend erforderlich, da so Sequenzierfehler vermieden werden können. Im Anschluss wurden die Glas-Wellplates mit DMF (abs.) bzw. EtOH (HPLC grade) gewaschen und getrocknet. Nun wurden die N-terminalen Fmoc-Schutzgruppen unter milden, basischen Bedingungen entschützt (10 μ l/Well einer 20%igen Piperidin in DMF-Lsg. (v/v)), woraufhin abermals mit DMF (abs.) als auch EtOH (HPLC grade) gewaschen wurde. Nach erneutem Trocknen wurden die Wellplates wieder auf der Arbeitsfläche angebracht, infolgedessen der SPOT-Roboter zum nächsten Synthesesyklus überging und einen weiteren Baustein auftöpfelte. Daraufhin wurden die Glas-Wellplates analog, wie oben bereits beschrieben, für weitere Synthesesyklen vorbereitet. Diese Prozedur wurde nun so lange wiederholt, bis die in der *.seq*-Datei vorgegebene Peptidsequenz abgearbeitet wurde. Der schematische Ablauf der SPOT-Synthese ist **Schema 56** zu entnehmen.



Schema 56: Ablauf der SPOT-Synthese.

3.7.5 AUSWAHL EINER GEEIGNETEN UNTERSUCHUNGSMETHODE

Die Investigation der Kohlenhydrat-Lektin-Interaktionen erfolgt in dieser Arbeit zunächst unter Verwendung des nicht kompetitiven, enzymgekoppelten Lektintests (ELLA) bzw. eines Lektintests (LA). Zur Vereinfachung des Messprotokolls kommt hierbei die direkte Variante (Kapitel 2.5.1) mittels POD/AP- bzw. Chromophor/Fluorophor-gelabelten Lektinen zur Anwendung. Finden dabei Wellplates aus Glas Verwendung (Kapitel 3.7.1), so ist der Derivatisierungsgrad (in nmol/cm²) in Relation zu einer Cellulosemembran (siehe Kapitel 2.4.3.2) niedriger, infolgedessen die visuelle Auswertung der entsprechenden Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung, im Falle von enzymatisch gelabelten Antikörpern bzw. Lektinen (POD/AP-Labeling), nicht anhand simpler Farbreaktionen (Kapitel 2.5.1) möglich ist (**Abbildung 42**)^[16-17].

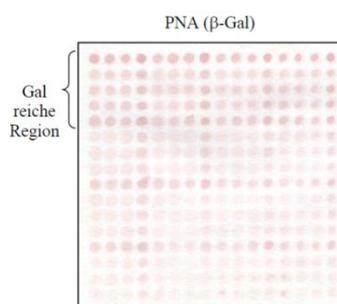
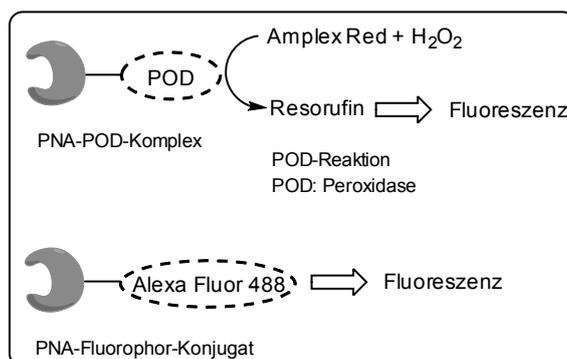


Abbildung 42: Screening der Saccharidderivate auf einer Cellulosemembran mit einem POD-gelabelten *Peanut Agglutinin* (PNA) mittels AEC/H₂O₂-Farbreaktion von C. Schips^[17].

Anstelle der gängigen Chromophore können diesbezüglich Fluorophore, wie das Resorufin Fluorescein oder Alexa Fluor herangezogen werden, wobei die resultierende Fluoreszenz mittels eines Plate-Readers ausgelesen werden kann. In Vorabuntersuchungen sollte daher zunächst ein Peroxidase-gelabeltes *Peanut Agglutinin* in Kombination mit einem Substrat/Fluorophor-Paar, wie dem Amplex[®] Red/Resorufin, sowie ein Alexa Fluor 488 markiertes PNA auf deren Anwendbarkeit überprüft werden (**Schema 57**).



Schema 57: Fluoreszenz via Enzym-Substrat-Reaktion bzw. Alexa Fluor 488 gelabeltem PNA.

3.7.5.1 Verwendung eines Substrat/Fluorophor Paares (Amplex[®] Red/Resorufin)

Zu Beginn sollte getestet werden, inwiefern die Untersuchung der Kohlenhydrat-Lektin-Interaktion mittels Peroxidase-gelabelten Lektinen und einem Substrat/Fluorophor auf einer 384er Glas-Wellplate (max. Vol./Well 25 μ l) realisierbar ist.

Um den Erwerb eines teuren, peroxidase-gelabelten Lektins zu vermeiden, wurde diese Untersuchung mit einem „Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit“^[265] der Firma Invitrogen durchgeführt. Zur Evaluierung des Assays wurden sechs „hohe“ ($0.16\text{-}5\cdot 10^{-3}$ U/ml) sowie sechs „niedrige“ ($0.13\text{-}4\cdot 10^{-5}$ U/ml) POD-Konzentrationen herangezogen. Die einzelnen Konzentrationen wurden mit jeweils acht Replika auf die Glas-Wellplate aufgetragen (7.5 μ l/Well), woraufhin je 7.5 μ l einer 100 μ M „Amplex[®] Red/H₂O₂-Arbeitslösung“ hinzugefügt wurden. Die Detektion der resultierenden Fluoreszenzintensität des sich bildenden Resorufins erfolgte mit einem Fluoreszenzreader (BMG-Labtech - CLARIO Star) über 3500 s in Abständen von jeweils 60 s (**Abbildung 43 und 44**).

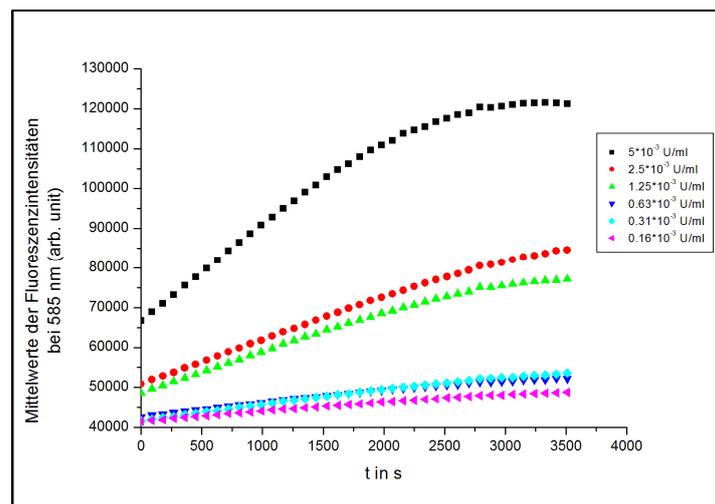


Abbildung 43: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten über acht Replika bei „hohen“ POD-Konzentrationen ($0.16\text{-}5\cdot 10^{-3}$ U/ml) gegenüber der Zeit t in s.

Im Falle der „hohen“ Konzentrationen ($1.25\text{-}5\cdot 10^{-3}$ U/ml) kann konstatiert werden, dass einer höheren POD-Konzentration auch eine größere Fluoreszenzintensität zugeordnet werden kann (**Abbildung 43**). Fernerhin ist festzuhalten, dass diese durch sigmoidale Funktionen (der Zeit t) beschrieben werden können, wobei sich die drei Graphen (**schwarz**, **rot**, **grün**) mit fortschreitender Messdauer nicht schneiden – d.h. eine hohe POD-Konzentration, respektive große Fluoreszenzintensität entspräche zu jedem Zeitpunkt einer hohen Lektin-Konzentration und somit einer guten Anbindung an das jeweilige Substrat. Folglich wäre unter den gewählten Rahmenbedingungen ein entsprechendes Peroxidase-Assay durchführbar.

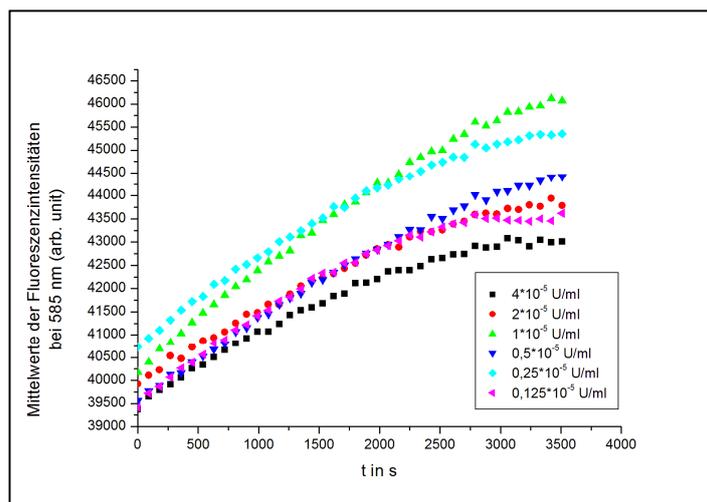


Abbildung 44: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten über acht Replika bei „niedrigen“ POD-Konzentrationen ($0.13\text{-}4 \cdot 10^{-5}$ U/ml) gegenüber der Zeit t in s.

Aus **Abbildung 43** und **44** ist zu entnehmen, dass sich die Graphen der anderen Konzentrationen ($0.16\text{-}0.63 \cdot 10^{-3}$ U/ml sowie $0.13\text{-}4 \cdot 10^{-5}$ U/ml) schneiden. Die höchste Peroxidase-Konzentration führt hierbei nicht zur größten Fluoreszenzintensität (**Abbildung 44**), weswegen diese auch nicht mit der entsprechenden Lektin-Konzentration korreliert, wodurch das angestrebte Assay in diesen Bereichen nicht durchführbar, bzw. auswertbar wäre.

Fernerhin muss berücksichtigt werden, dass das Amplex[®] Red bereits in Gegenwart von Licht und Wasserstoffperoxid zum Resorufin oxidiert wird, weshalb die Grundfluoreszenz mit fortschreitender Zeit stetig zunimmt^[266] (**Abbildung 45**).

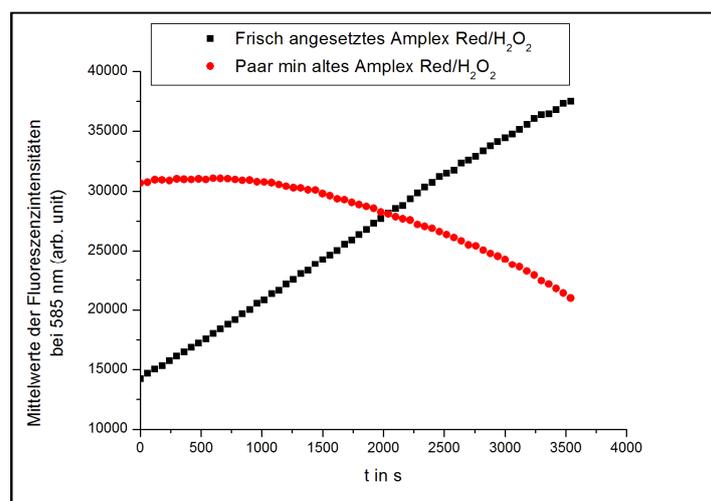
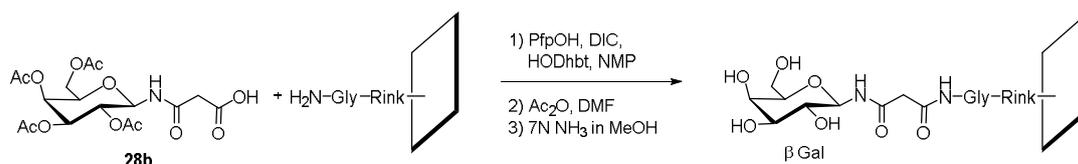


Abbildung 45: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten zweier „Amplex[®] Red/H₂O₂-Arbeitslösungen“.

Diese Problematik spielt bei einem designierten Assay auf einer 384er Glas-Wellplate eine wesentliche Rolle, da es, in Relation zu einer Cellulosemembran, präperativ schwierig ist alle Wells zeitgleich mit der „Amplex[®] Red/H₂O₂-Arbeitslösung“ zu versetzen. Infolgedessen ist die Ermittlung der resultierenden Fluoreszenzintensität (gemessene Fluoreszenzintensität – Grundfluoreszenzintensität) mit einem hohen experimentellen Aufwand verbunden, da die Grundfluoreszenz der „Amplex[®] Red/H₂O₂-Arbeitslösung“ zu jedem Zeitpunkt vor der Zugabe zu den entsprechenden Wells bekannt sein müsste. Aufgrund dieser Komplexizität wurde darüber hinaus ein Alexa-Fluor 488-markiertes *Peanut Agglutinin* auf dessen Eignung überprüft.

3.7.5.2 Verwendung eines Alexa Fluor 488-gelabelten Peanut Agglutinins

Um herauszufinden, ob das Alexa-Fluor 488 gelabelte *Peanut Agglutinin* für das geplante Lektin-Assay herangezogen werden kann, wurde das β -*N*-glycosidisch verknüpfte Galactosid **28b** via SPOT-Synthese über den Malonsäure-Spacer an die aminofunktionalisierte Glas-Wellplate gebunden (**Schema 58**).



Schema 58: Anbindung des β -*N*-Galactosids **28b** über dessen Malonsäure-Spacer.

Desweiteren wurden 144 Wells (6 x 24) nicht derivatisiert, damit positive von negativen Resultaten unterschieden werden können. Das Layout der Wellplate ist **Abbildung 46** zu entnehmen.

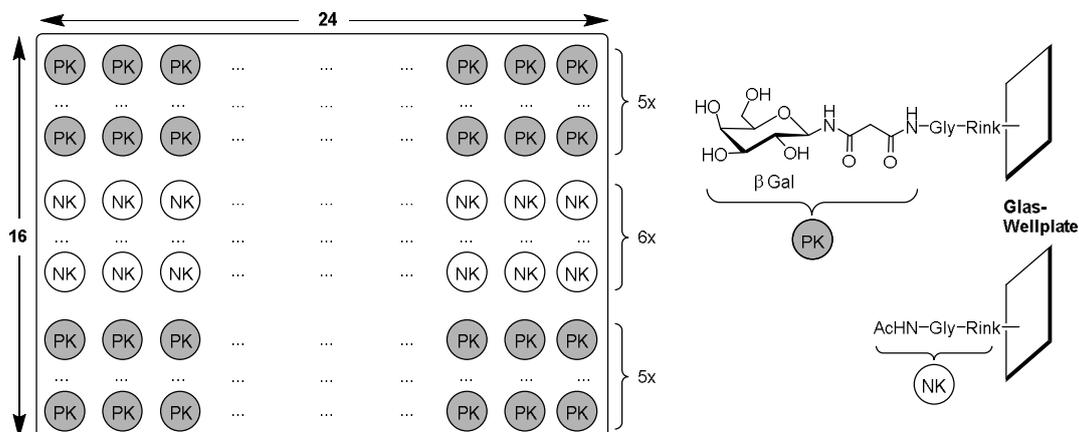
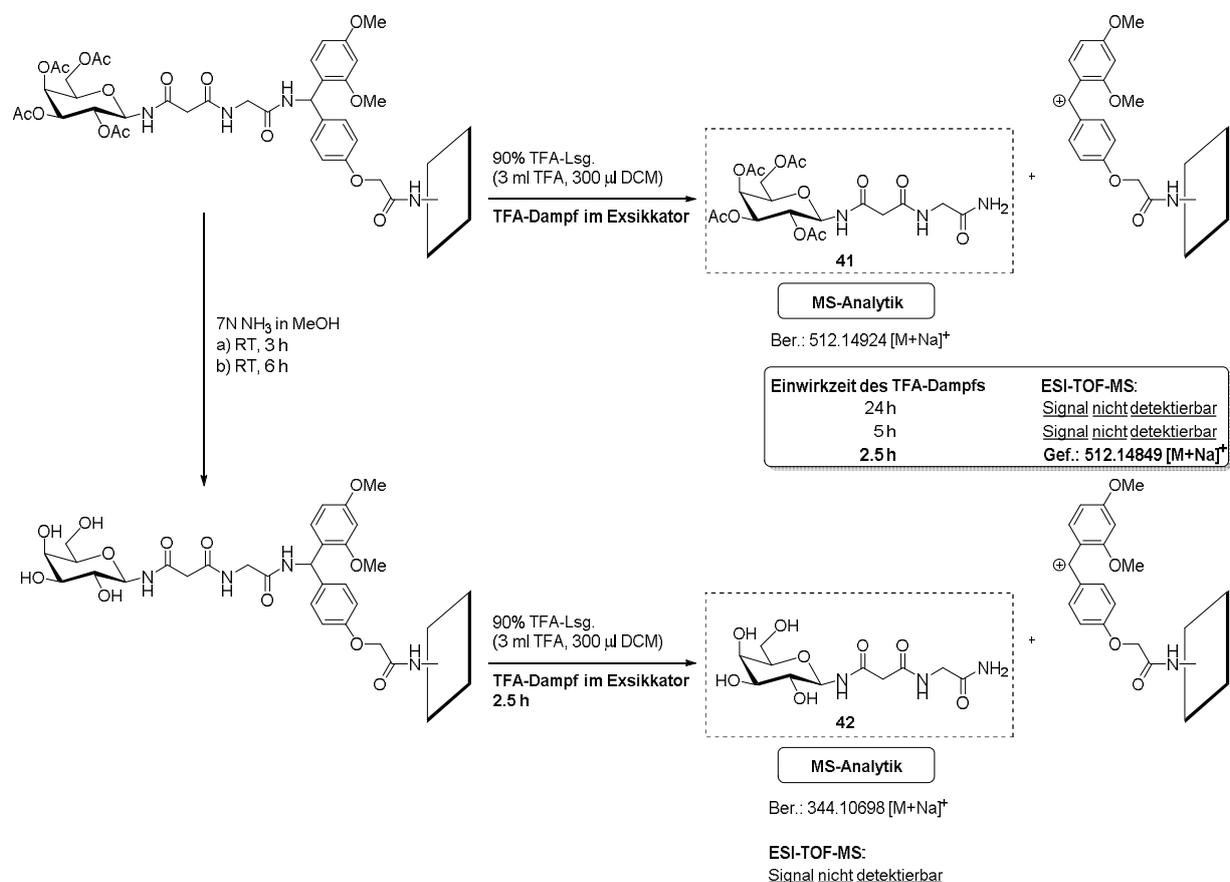


Abbildung 46: Glas-Wellplate mit **PK** (Positiv-Kontrolle): β -*N*-Galactosid und **NK** (Negativ-Kontrolle): Linkersystem.

Analytik mittels Massenspektrometrie

Zur Verifizierung des Derivatisierungsprotokolls wurde das β -*N*-Galactosid **28b** kovalent an eine separate Glas-Wellplate gebunden, von den 384 Wells mittels 90%igem TFA-Dampf abgespalten^[17,24] mit Ethanol (3 x 20 μ l) abgewaschen sowie massenspektrometrisch (ESI-TOF-MS) nachgewiesen (**Schema 59**).

Auf einer weiteren Glas-Wellplate sollten daraufhin die Acetylschutzgruppen des festphasengebundenen *N*-Galactosederivats **28b** 6 h bei RT mittels einer 7N NH_3 in MeOH-Lösung entfernt werden^[17,24], woraufhin das ungeschützte Saccharid **42** im TFA-Dampf abgespalten werden sollte. Nach anschließender Waschprozedur und MS-Untersuchung musste jedoch konstatiert werden, dass das korrespondierende Signal nicht nachgewiesen werden konnte, was möglicherweise auf eine zu geringe Stoffmenge, oder die Bildung von Nebenprodukten zurückgeführt werden kann. Um vermeidliche Nebenreaktionen zu minimieren wurde die Einwirkzeit der 7N NH_3 -Lösung daraufhin auf 3 h verkürzt, wobei jedoch keine signifikante Verbesserung erzielt werden konnte, da das Signal des ungeschützten *N*-Galactosids **42** im Massenspektrum dennoch nicht nachgewiesen werden konnte (**Schema 59**).



Schema 59: Abspaltung des geschützten sowie deacetylierten Glycin-Addukts **41** und **42** des Galactosids **26b**.

Screening mit dem Alexa Fluor 488 gelabelten *Peanut Agglutinin*

Nach der analytischen Untersuchung unter Verwendung der Massenspektrometrie wurde das β -*N*-Galactosids **28b** erneut mittels SPOT-Synthese an eine aminofunktionalisierte Glas-Wellplate gebunden, 3 bzw. 6 h bei RT mittels einer 7N NH_3 in MeOH-Lösung entschützt und einem Bindungstest mit dem Alexa Fluor 488 gelabelten *Peanut Agglutinin* unterzogen.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, wurden die einzelnen Wells zunächst mit je 15 μl einer 3% BSA-Lösung (3% BSA in PBS mit 0.05% Tween 20) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Untersuchungen von Thompson *et al.*^[173] haben diesbezüglich ergeben, dass das Bovine serum albumin (BSA) in Kombination mit dem *Peanut Agglutinin* bei Assays Verwendung finden kann, wohingegen andere Lektine, wie das WGA, ConA oder LCA selbst mit dem BSA interagieren, wodurch „falsch positive“ Wechselwirkungen detektiert werden können.

Nach der Inkubation wurde die Blockierpuffer-Lösung entfernt, infolgedessen die Glaswellplate dreimal mit je 15 μl /Well einer Waschpuffer-Lösung (0.5% Tween 20 in PBS) gewaschen wurde. Im Anschluss wurde die Wellplate 1 h bei 37 °C mit dem Alexa Fluor 488 gelabelten *Peanut Agglutinin* (15 μl /Well; 1 mg Lektin in 100 ml PBS-Lösung und einer 100 μl CaCl_2 -Lösung (0.1 M)) inkubiert, demzufolge die Lektin-Lösung ebenfalls abpipettiert wurde. Nach erneutem Waschen mit 0.5% Tween 20 in PBS wurden die einzelnen Wells mit je 15 μl /Well einer PBS-Lösung (pH 7.4) versetzt, woraufhin die Fluoreszenzintensität mit einem Mikroplatten-Reader (CLARIO Star® - BMG Labtech) ausgelesen wurde. Um zu überprüfen wie viele Waschvorgänge für das Assay geeignet sind, wurden noch zwei weitere Male mit der Waschpuffer-Lösung gewaschen, PBS-Puffer aufgetragen und die resultierende Fluoreszenzintensität ermittelt (**Abbildung 47/48**).

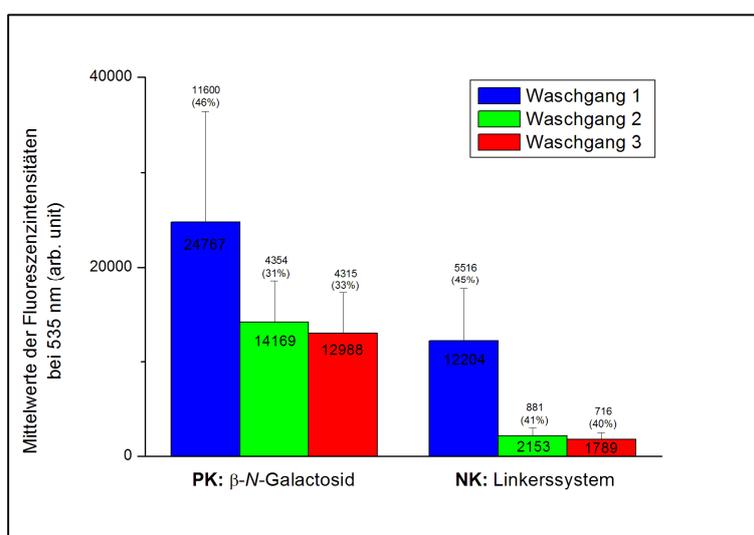


Abbildung 47: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für das β -*N*-Galactosid (PK) und das Linkersystem (NK) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen nach Waschgang 1 (blau), Waschgang 2 (grün) sowie Waschgang 3 (rot) – (*Deacetylierung über 3 h*).

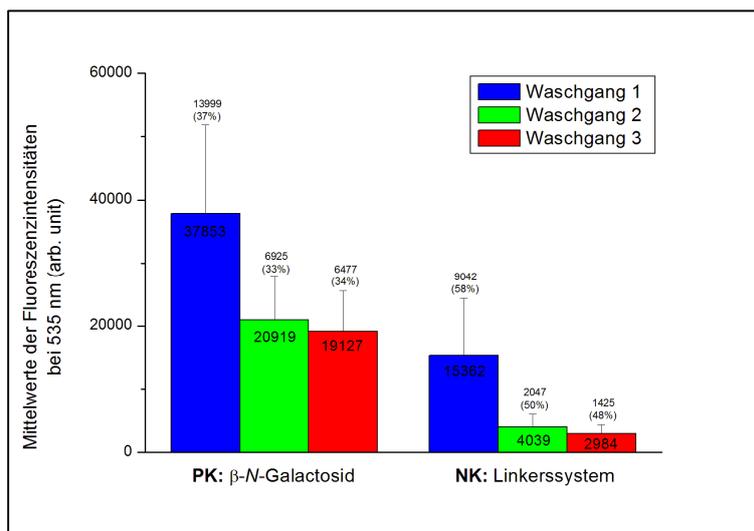


Abbildung 48: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für das β -N-Galactosid (PK) und das Linkersystem (NK) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen nach Waschgang 1 (blau), Waschgang 2 (grün) sowie Waschgang 3 (rot) – (Deacetylierung über 6 h).

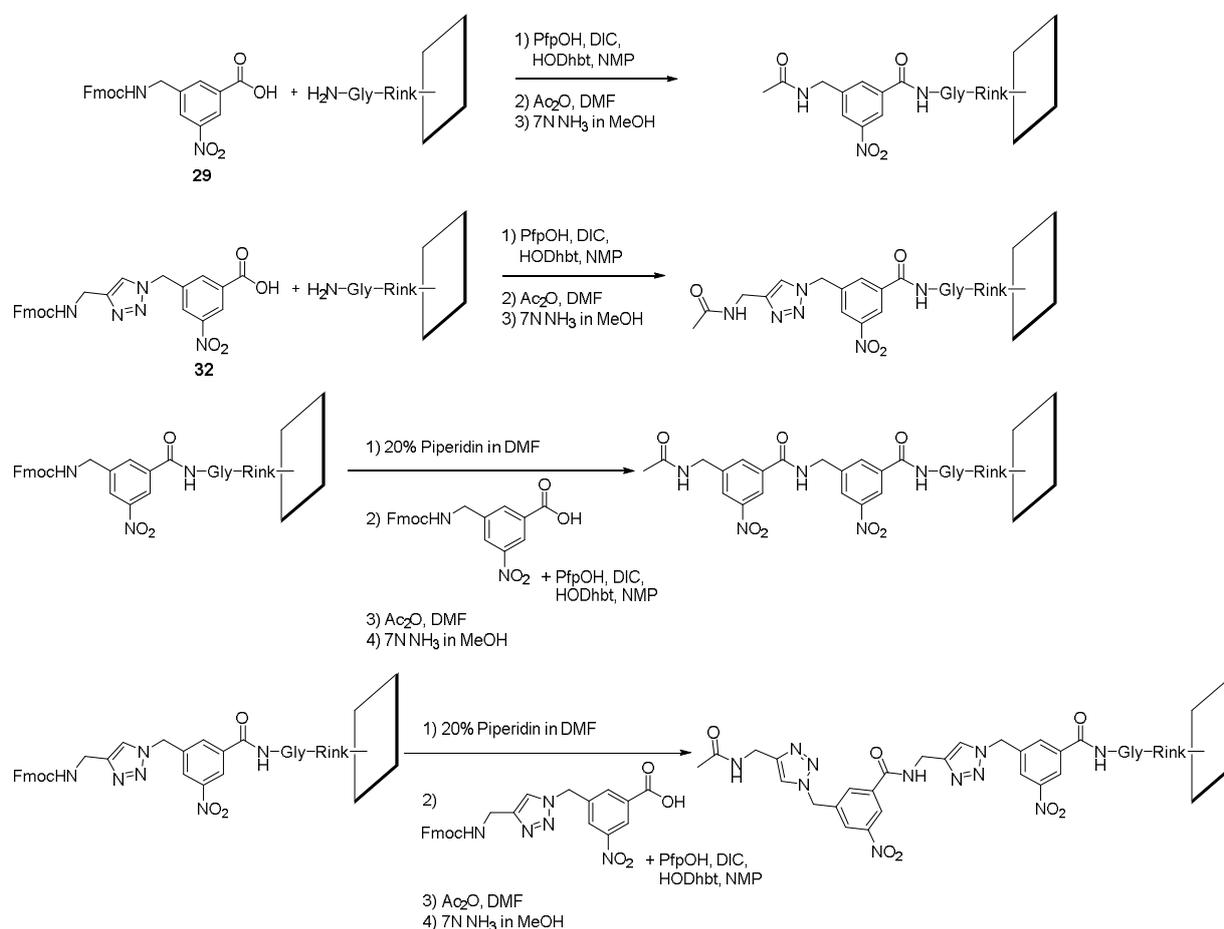
Aus **Abbildung 47** als auch **48** wird ersichtlich, dass das Alexa Fluor 488 markierte *Peanut Agglutinin* das deacetylierte β -N-Galactosid (PK) erkennt, da sich die zugehörigen Fluoreszenzintensitäten wesentlich von derjenigen der nicht derivatisierten Wells (NK) unterscheiden. Anhand der beiden Messreihen wird offenkundig, dass sich die Fluoreszenzintensitäten nach Waschgang 2 in einer ähnlichen Größenordnung bewegen (PK: 14169 und 20919 bzw. NK: 2153 sowie 4039 (arb. unit)), weshalb die Deacetylierung der jeweiligen Saccharidderivate bei weiteren Assays über einen Zeitraum von 3 h erfolgte. Fernerhin wird deutlich, dass die Intensitäten zwischen Waschgang 2 und 3 nicht mehr signifikant voneinander abweichen, weshalb die Fluoreszenzintensitäten bei weiteren Assays nach zwei Waschgängen ermittelt wurden.

Anhand dieser Tests konnte somit gezeigt werden, dass das Alexa Fluor 488 gelabelte *Peanut Agglutinin*, sowie das ungeschützte, malonyl-verbrückte β -N-Galactosid (Positiv-Kontrolle) für das designierte Screening der N-Glycopeptide (Kapitel 3.7.6) herangezogen werden kann.

3.7.6 AUFSPOTTEN UND SCREENING DER *N*-GLYCOPEPTIDE

3.7.6.1 Aromatische Rückgrate

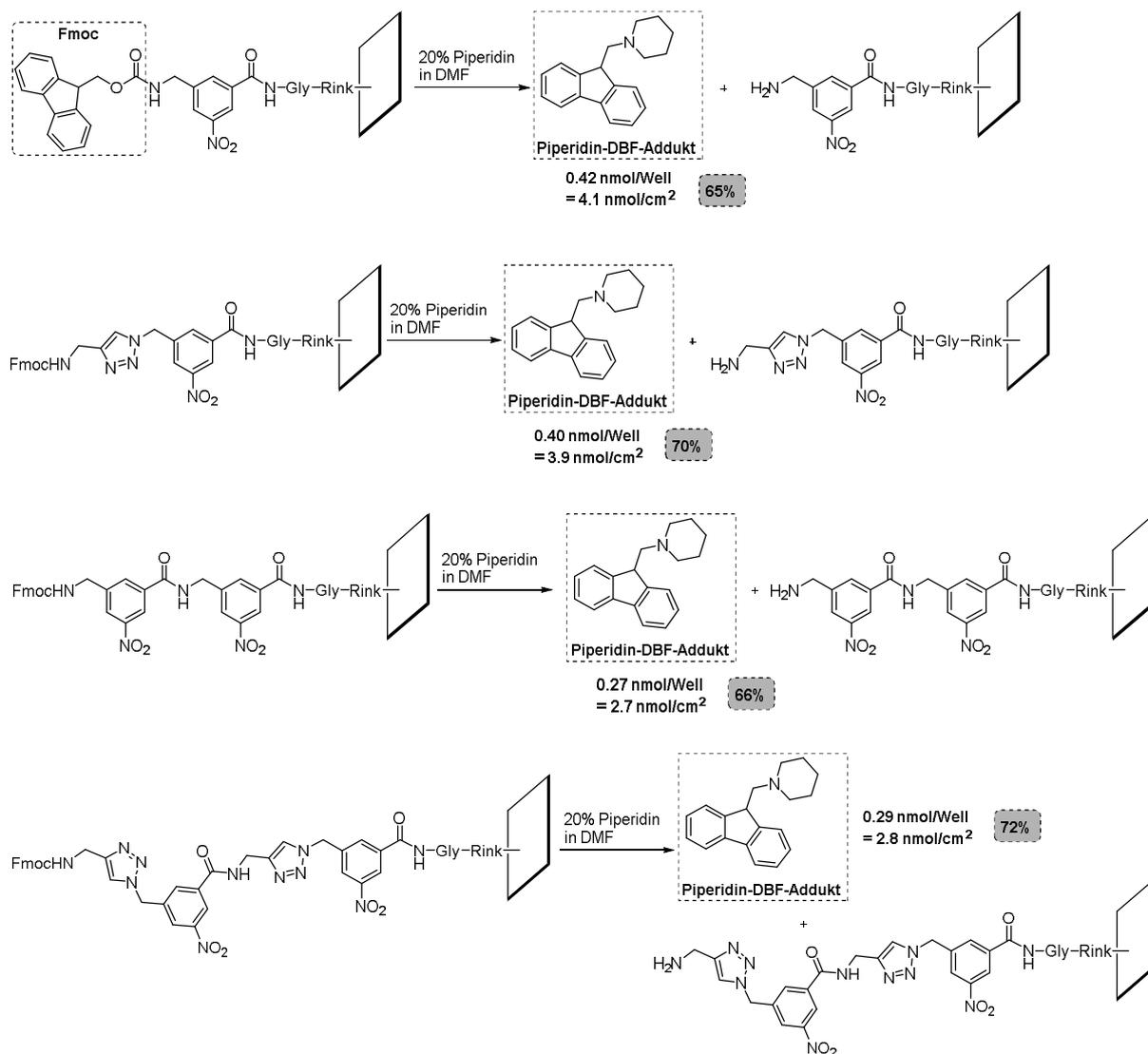
Nachdem in Kapitel 3.7.5 verdeutlicht werden konnte, dass das Alexa Fluor 488 gelabelte *Peanut Agglutinin* in der Lage ist das malonyl-verbrückte β -*N*-Galactosid zu erkennen, sollte zum Vergleich überprüft werden, inwiefern das Pflanzenlektin mit den nicht glycosylierten, aromatischen Rückgraten wechselwirken kann. Hierfür wurden monomere, als auch dimere Strukturen getestet, welche unter Verwendung der SPOT-Synthese an die Glas-Wellplate gebunden wurden (**Schema 60**). Fernerhin wurden einige Wells mit dem malonyl-verbrückten β -*N*-Galactosid **28b** derivatisiert und mit einer 7N NH_3 -Lösung entschützt, damit diese als Positiv-Kontrolle Verwendung finden konnten (**Schema 59**).



Schema 60: Anbindung der aromatischen Rückgrate an die Wellplate aus Glas.

Analytik mittels UV-Spektroskopie

Um zu überprüfen wie gut die aromatischen Carbonsäuren **29** und **32** an die aminofunktionalisierte Glas-Wellplatte gebunden werden können, wurde die Fmoc-Schutzgruppe nach den jeweiligen Kupplungsschritten mittels einer 20%igen Piperidin-Lösung abgespalten und die UV-Absorption des Piperidin-DBF-Addukts (Kapitel 2.4.2.6) gemessen (**Schema 61**).

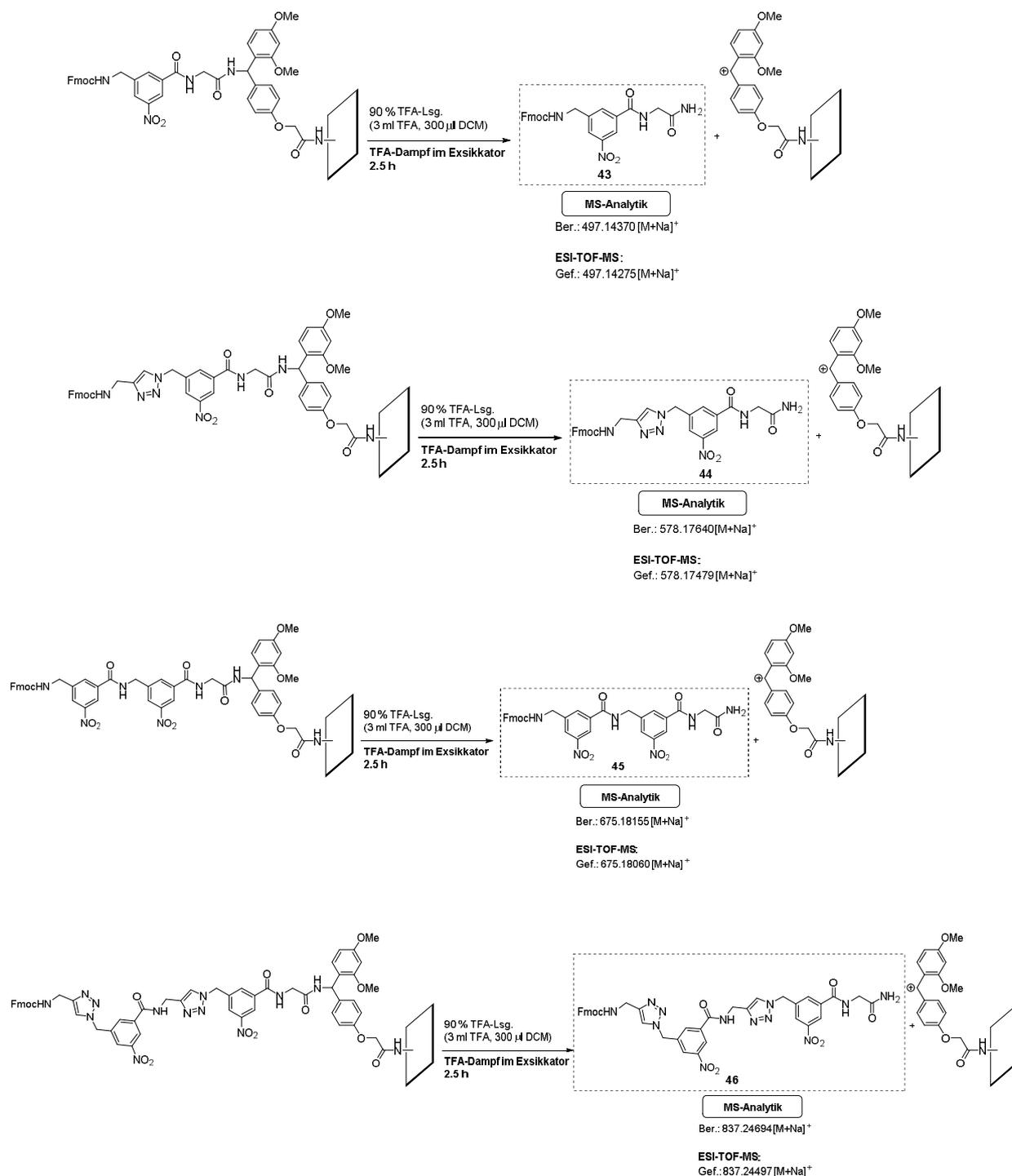


Schema 61: Fmoc-Abspaltung der gebundenen aromatischen Rückgrate. Die angegebenen Derivatisierungsgrade [nmol/cm²] sind Mittelwerte über 384 Wells der Glas-Wellplatte.

Anhand der Abspaltungsversuche (**Schema 61**) wird deutlich, dass die Anbindung der aromatischen Rückgrate **29** und **32** prozentual mit recht hohen Ausbeuten (65-72%) durchführbar ist.

Analytik mittels Massenspektrometrie

Analog zum *N*-glycosidischen gebundenen β -Galactosids **28b** erfolgte die Abspaltung der Glycin-Addukte der aromatischen Rückgrate **43**, **44**, **45** und **46**, wie bereits beschrieben, exemplarisch jeweils über 384 Wells einer separaten Glas-Wellplate mittels 90%igem TFA-Dampf (Schema 62).



Schema 62: Abspaltung der aromatischen Glycin-Addukte **43**, **44**, **45** und **46**.

Das Screening der gebundenen, aromatischen Rückgrate mit dem Alexa Fluor 488 markierten *Peanut Agglutinin* erfolgte nach demselben Protokoll wie der Bindungstest des malonyl-verbrückten β -*N*-Galactosids (PK) (Kapitel 3.7.5.2). Das Layout der dazugehörigen Glas-Wellplates kann **Abbildung 49** entnommen werden.

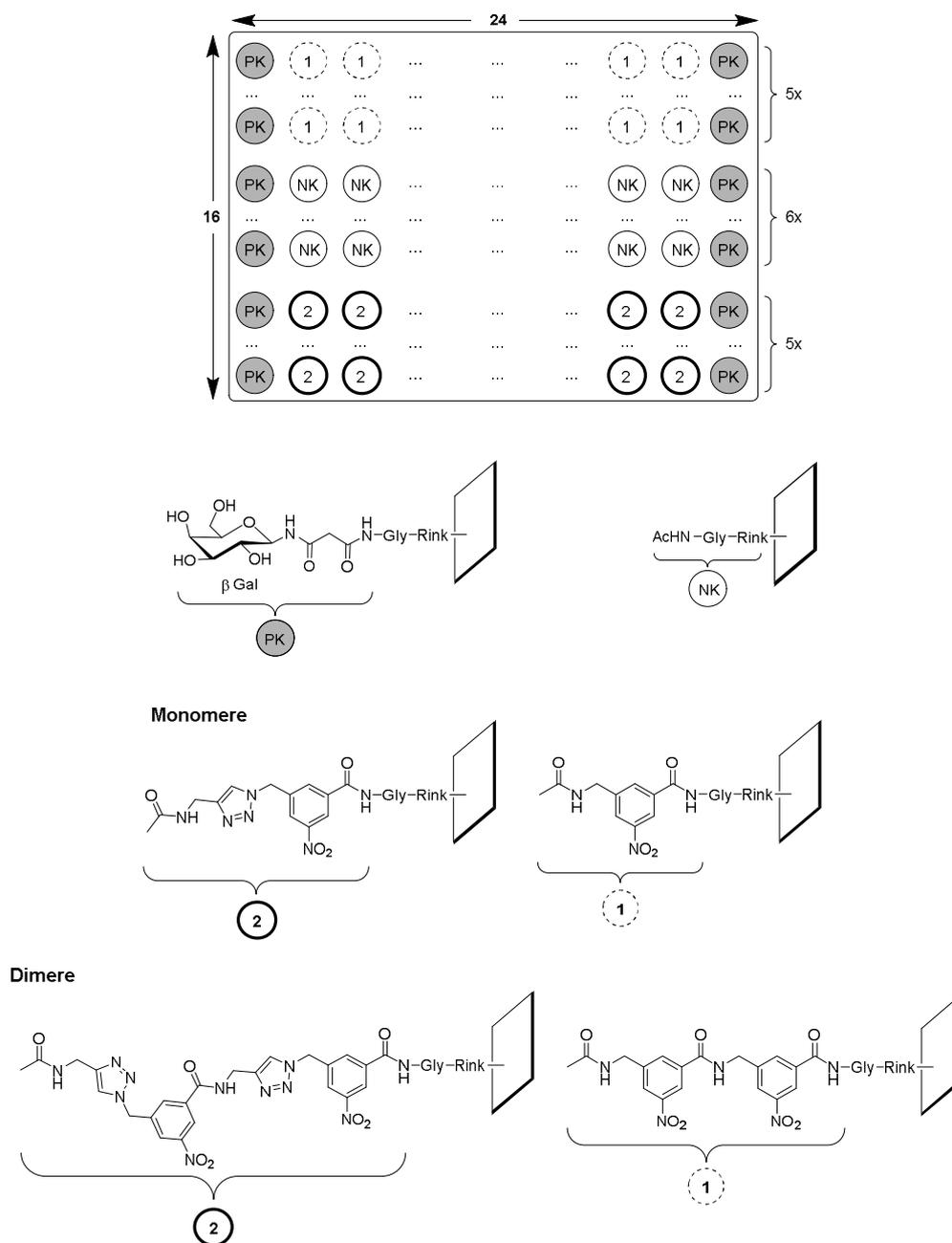


Abbildung 49: Layout der Glas-Wellplate für das Screening der aromatischen Rückgrate.

Zur Erkennung und Eliminierung von Messartefakten wurden die einzelnen Messreihen wiederholt, wobei die Anordnung der Verbindungen auf der Glas-Wellplate unter Beibehaltung der gleichen Anzahl variiert wurde. Der besseren Übersicht halber wird bei den folgenden Messungen jeweils nur ein Layout abgebildet.

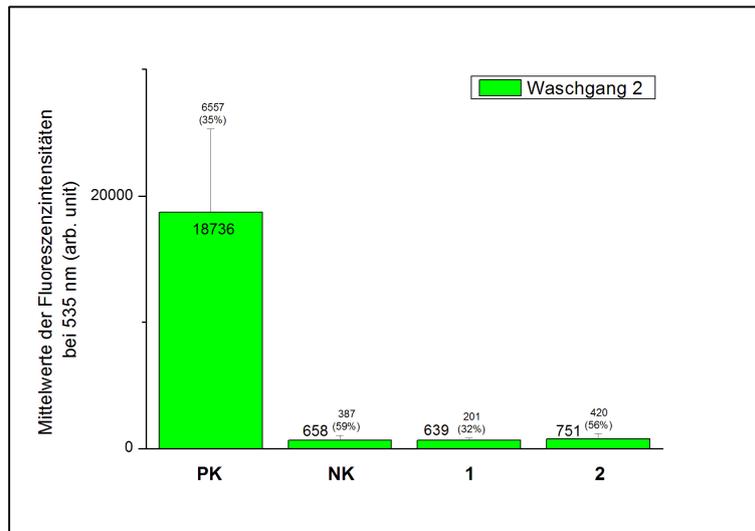


Abbildung 50: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für das β -*N*-Galactosid (PK), das Linkersystem (NK) und die aromatischen Rückgrate (1) sowie (2) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen nach Waschgang 2 (grün) – (Messreihe 1).

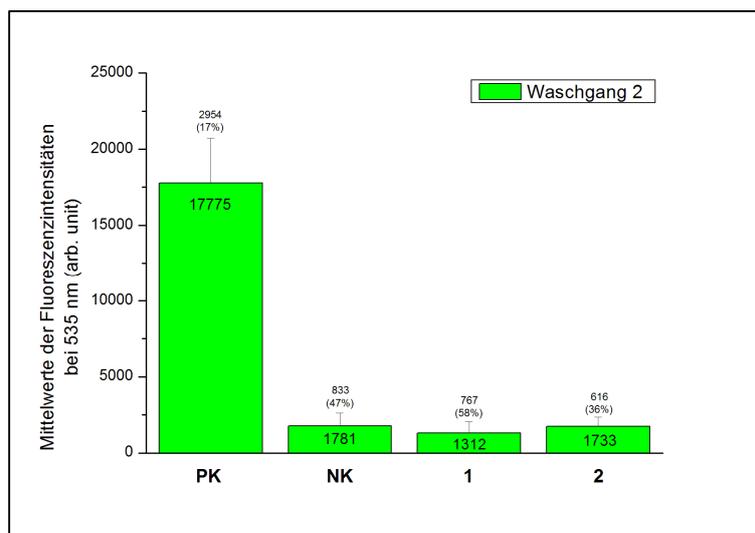


Abbildung 51: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für das β -*N*-Galactosid (PK), Linkersystem (NK) und die aromatischen Rückgrate (1) sowie (2) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen nach Waschgang 2 (grün) – (Messreihe 2).

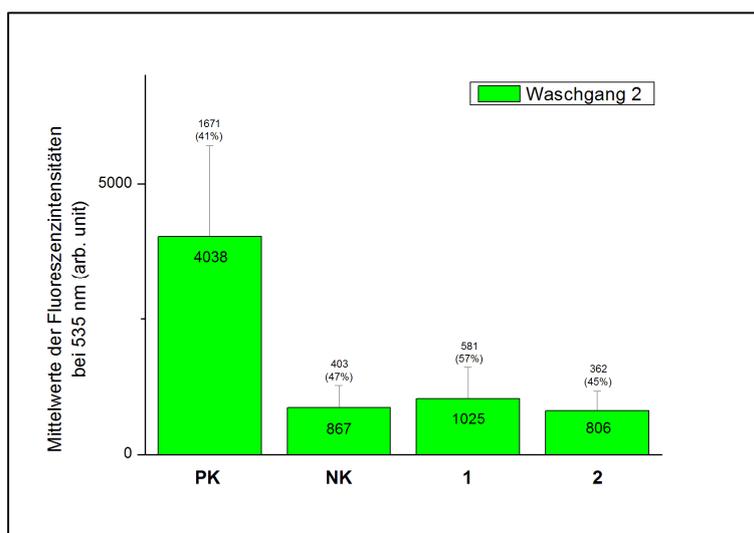


Abbildung 52: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für das β -*N*-Galactosid (PK), Linkersystem (NK) und die Dimere der aromatischen Rückgrate (1 bzw. 2) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen nach Waschgang 2 (grün) – (Messreihe 1).

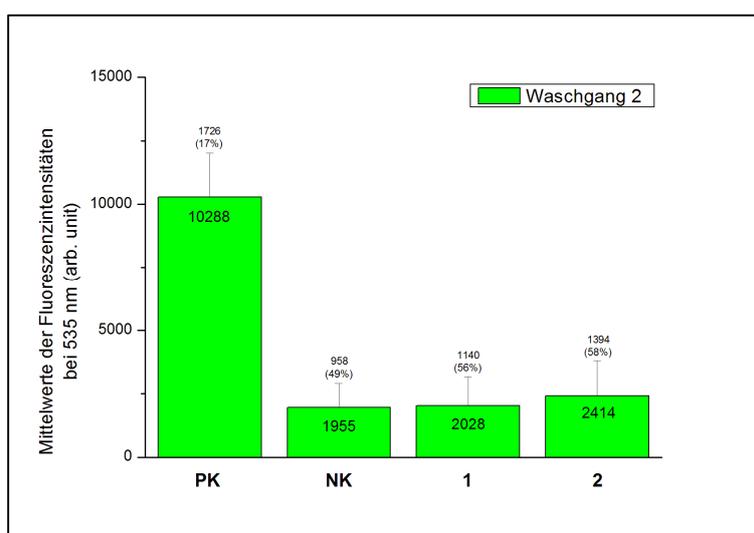
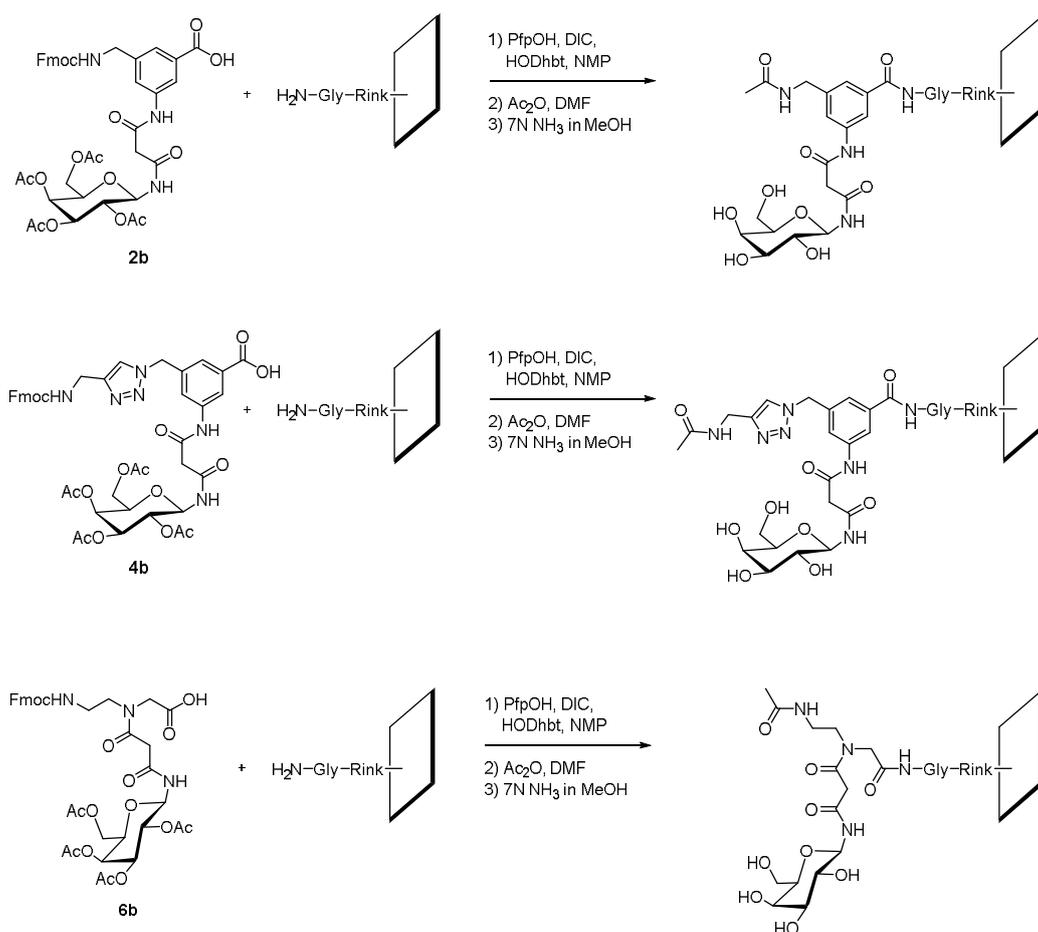


Abbildung 53: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für das β -*N*-Galactosid (PK), Linkersystem (NK) und die Dimere der aromatischen Rückgrate (1 bzw. 2) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen nach Waschgang 2 (grün) – (Messreihe 2).

Anhand der Fluoreszenzintensitäten aus den **Abbildungen 50-53** kann konstatiert werden, dass das Alexa Fluor 488 gelabelte *Peanut Agglutinin* stärker mit dem kovalent gebundenen, deacetylierten β -*N*-Galactosid (PK) wechselwirkt, wohingegen Interaktionen mit dem Linkersystem (NK), sowie den monomeren- oder dimeren Rückgraten (1) bzw. (2) nur schwach ausfallen. In Anbetracht dieser Untersuchungsergebnisse kann somit davon ausgegangen werden, dass die aromatischen Rückgratstrukturen auch bei den monomeren oder dimeren aromatischen *N*-Glycokonjugaten (**2a-d**, **4a-d**, etc.) sehr wahrscheinlich nur einen vernachlässigbaren Beitrag zu den Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen beisteuern.

3.7.6.2 *N*-Glycopeptid-Monomere

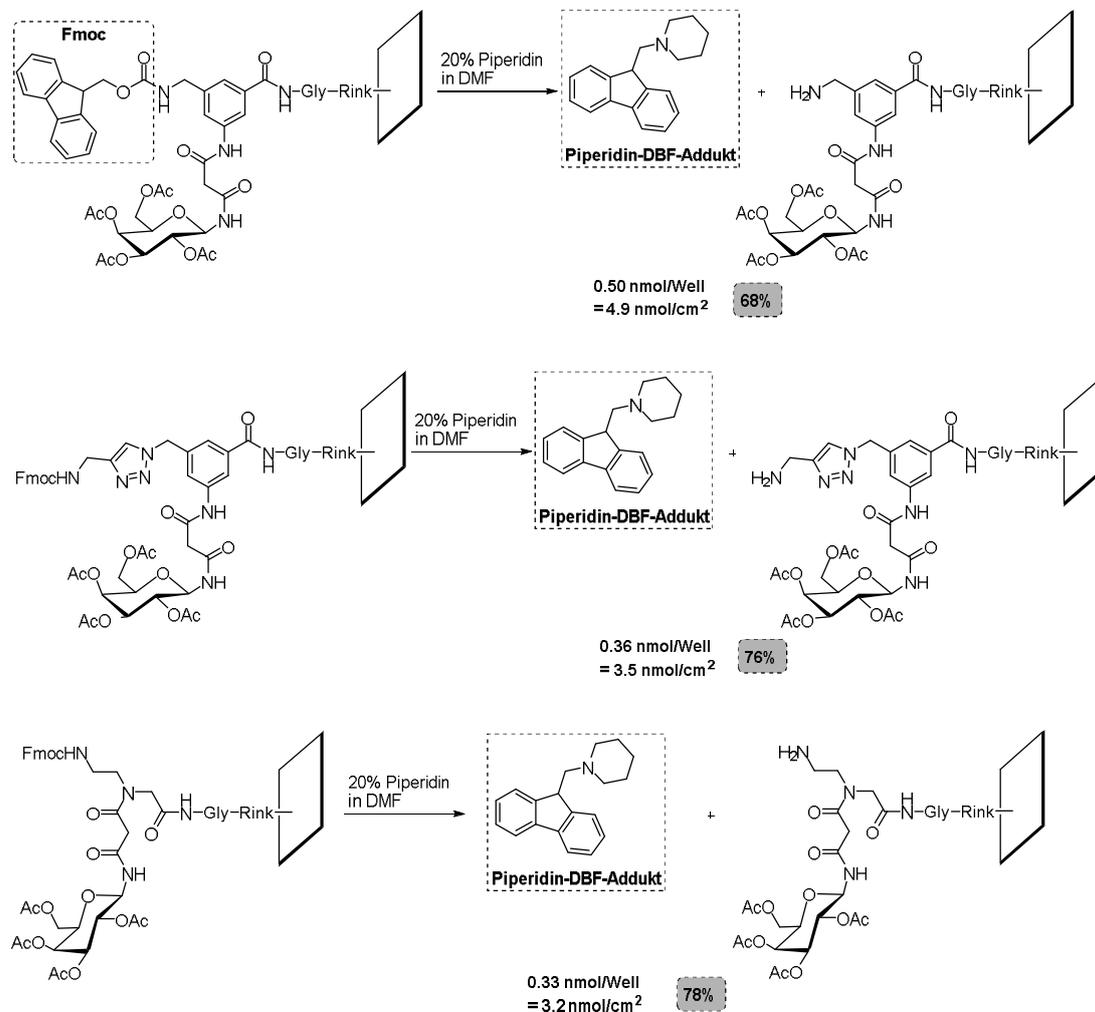
Nachdem Screening der aromatischen Rückgrate sollte verifiziert werden, dass das Alexa Fluor 488 gelabelte *Peanut Agglutinin* in der Lage ist auch mit den festphasengebundenen *N*-Galactosiden **2b**, **4b** und **6b** zu wechselwirken. Diesbezüglich wurden die Galactoside mittels SPOT-Synthese auf die aminofunktionalisierte Glas-Wellplate aufgetragen, wobei auch hier einige Wells mit dem malonyl-verbrückten β -*N*-Galactosid **26b** (Positiv-Kontrolle) derivatisiert wurden (**Schema 63**).



Schema 63: Anbindung der Galactoside **2a**, **4a**, **6a**.

Analytik mittels UV-Spektroskopie

Um zu überprüfen, wie gut die einzelnen Kohlenhydrat-Bausteine (**2b**, **4b** und **6b**) an die aminofunktionalisierte Glas-Wellplatte gebunden werden können, wurde die Fmoc-Schutzgruppe nach dem Kupplungsschritt mittels einer 20%igen Piperidin in DMF-Lösung abgespalten und die UV-Absorption des Piperidin-DBF-Addukts gemessen (**Schema 64**).

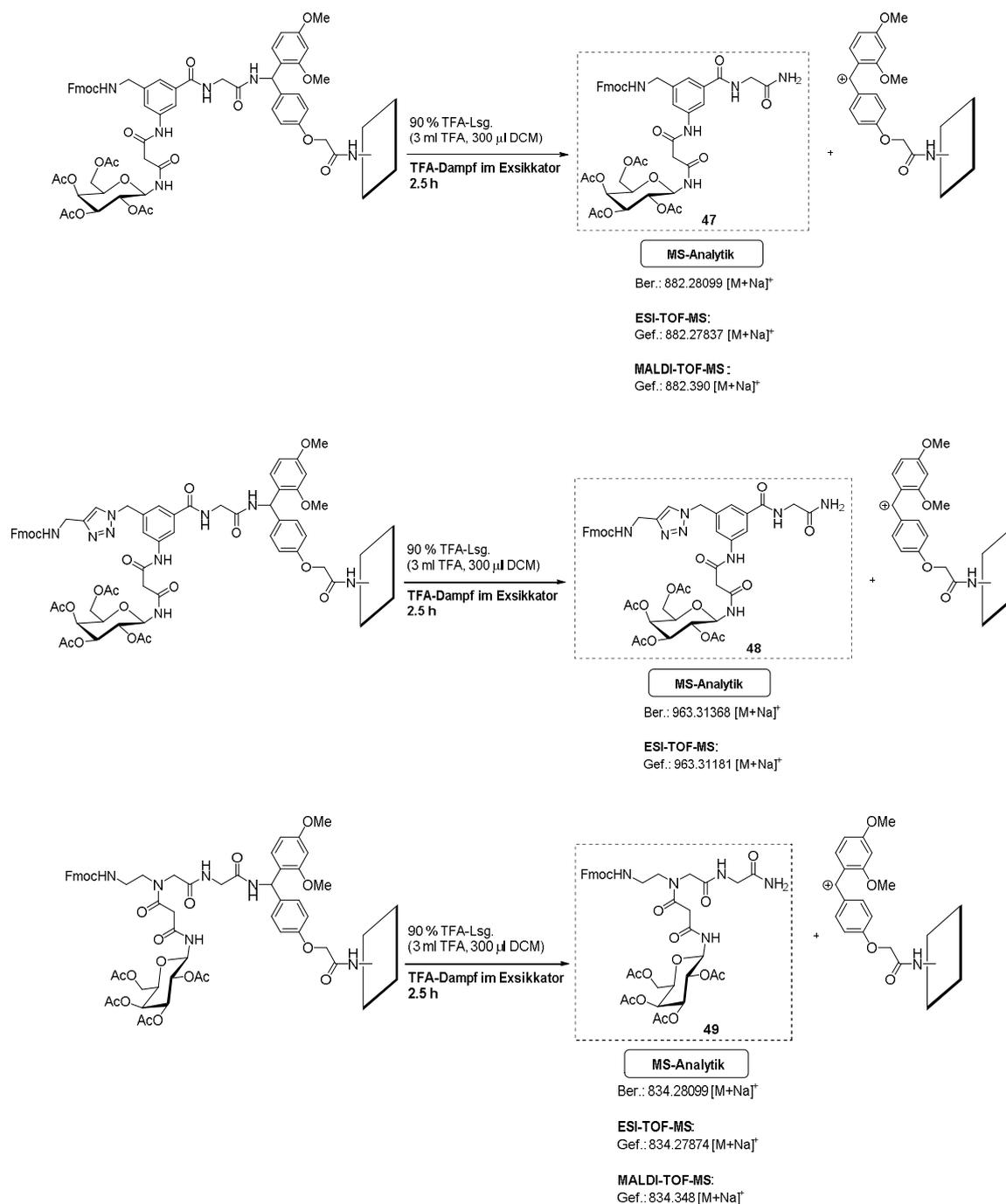


Schema 64: Fmoc-Abspaltung der gebundenen aromatischen sowie aliphatischen Galactoside. Die angegebenen Derivatisierungsgrade [nmol/cm²] sind Mittelwerte über 384 Wells der Glas-Wellplatte.

Anhand der Abspaltungsversuche (**Schema 64**) wird auch hierbei deutlich, dass die Anbindung der aromatischen bzw. aliphatischen Kohlenhydrat-Bausteine **2b**, **4b** sowie **6b** prozentual mit recht hohen Ausbeuten (68-78%) durchführbar ist.

Analytik mittels Massenspektrometrie

Zur Verifizierung der kovalent gebundenen Kohlenhydrat-Bausteine wurden die Galactoside **2b**, **4b** sowie **6b** mit der aminofunktionalisierten Oberfläche verknüpft, woraufhin die korrespondierenden Glycin-Addukte **47**, **48** und **49** zuerst mittels TFA-Dampf abgespalten, dann mit Ethanol (3 x 20 μ l) abgewaschen und schließlich massenspektrometrisch (ESI- bzw. MALDI-TOF-MS) untersucht wurden (**Schema 65**). Die Abspaltungstests erfolgten für jeden einzelnen Baustein ebenfalls über je 384 Wells einer separaten Glas-Wellplatte.



Schema 65: Abspaltung der Glycin-Addukte **47**, **48** und **49** der Galactoside **2b**, **4b** und **6b**.

Das Screening der gebundenen, deacetylierten Glycokonjugate der Galactoside **2a**, **4a**, **6a** mit dem Alexa Fluor 488 markierten *Peanut Agglutinin* erfolgte nach dem bereits etablierten Protokoll wie der Bindungstest des malonyl-verbrückten β -*N*-Galactosids (PK) (Kapitel 3.7.5.2). Das Layout der dazugehörigen Glas-Wellplate kann **Abbildung 54** entnommen werden.

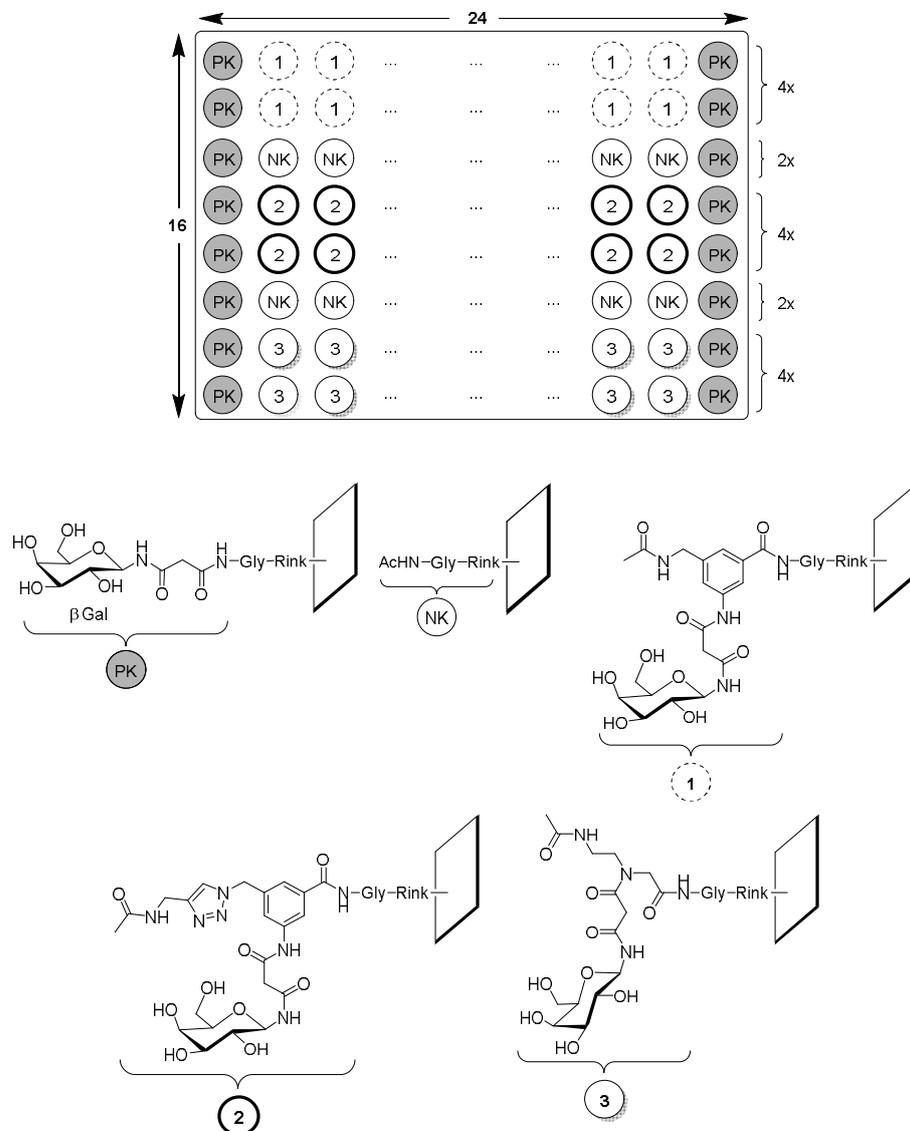


Abbildung 54: 384er Glas-Wellplate mit dem Linkersystem (NK), den deacetylierten *N*-Galactosiden (1), (2) und (3) sowie dem malonyl-verbrückten β -*N*-Galactosid (PK).

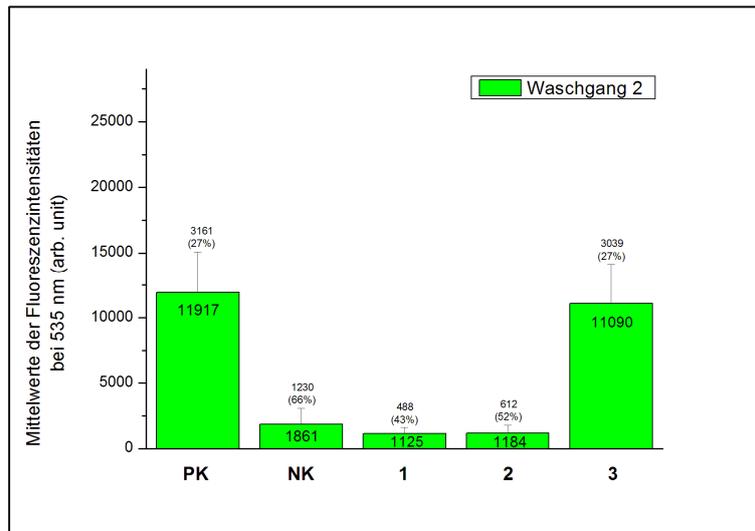


Abbildung 55: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für das β -*N*-Galactosid (PK), Linkersystem (NK) und die ungeschützten *N*-Galactoside (1), (2) und (3) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen nach Waschgang 2 (grün) – (Messreihe 1).

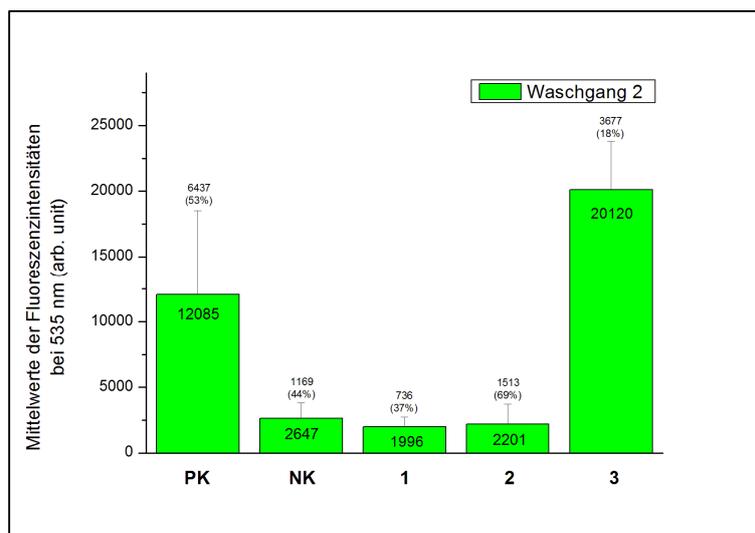
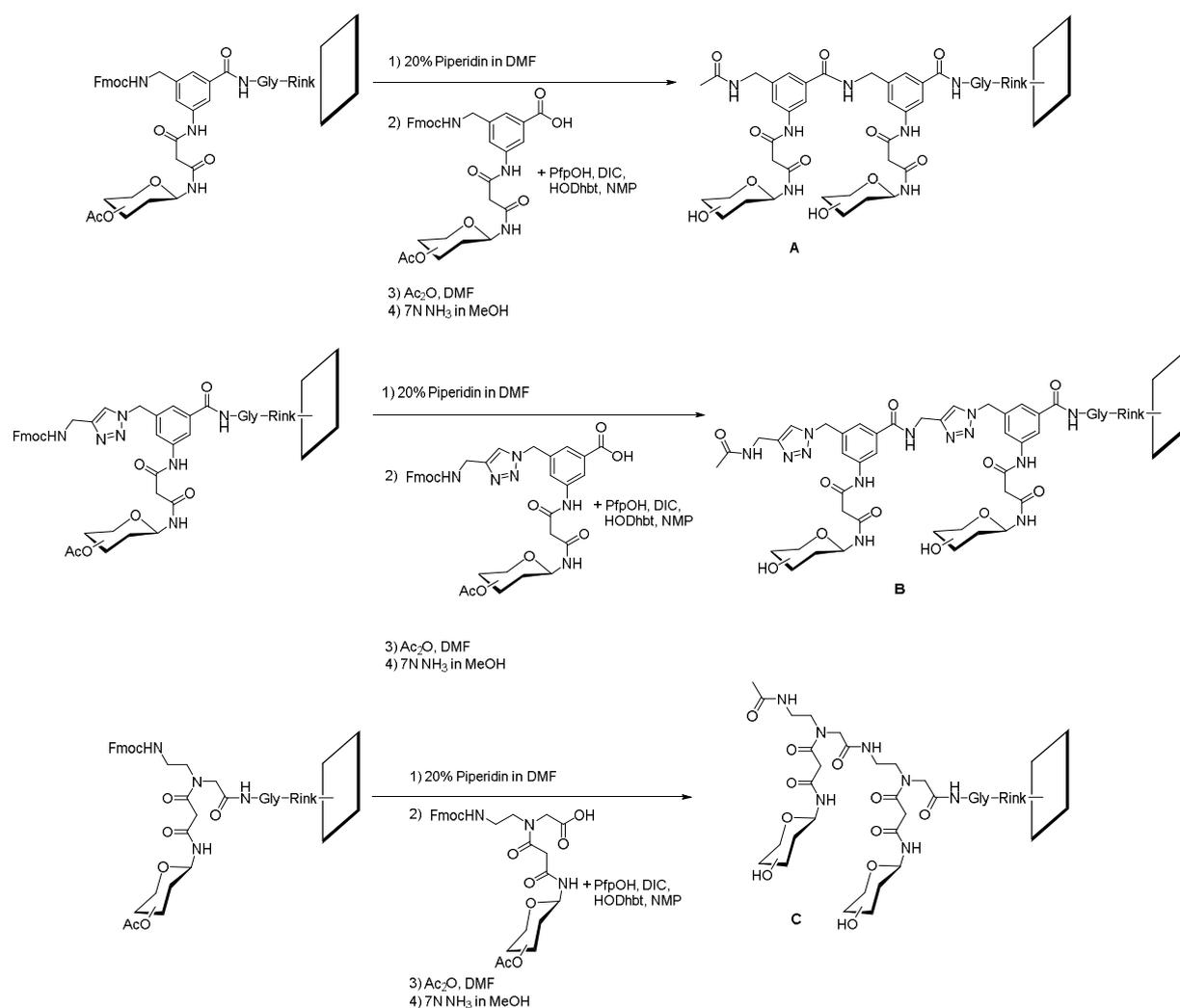


Abbildung 56: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für das β -*N*-Galactosid (PK), Linkersystem (NK) und die ungeschützten *N*-Galactoside (1), (2) und (3) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen nach Waschgang 2 (grün) – (Messreihe 2).

Aus den **Abbildungen 55** und **56** wird anhand der gemessenen Fluoreszenzintensitäten ersichtlich, dass die Wechselwirkung des *Peanut Agglutinins* mit dem deacetylierten β -*N*-Galactosid (PK), bzw. dem *N*-Galactosid (3) vergleichbar stark ist, wohingegen die Interaktionen mit den ungeschützten, aromatischen Saccharidderivaten (1) als auch (2) schwach sind.

3.7.6.3 *N*-Glycopeptid-Dimere

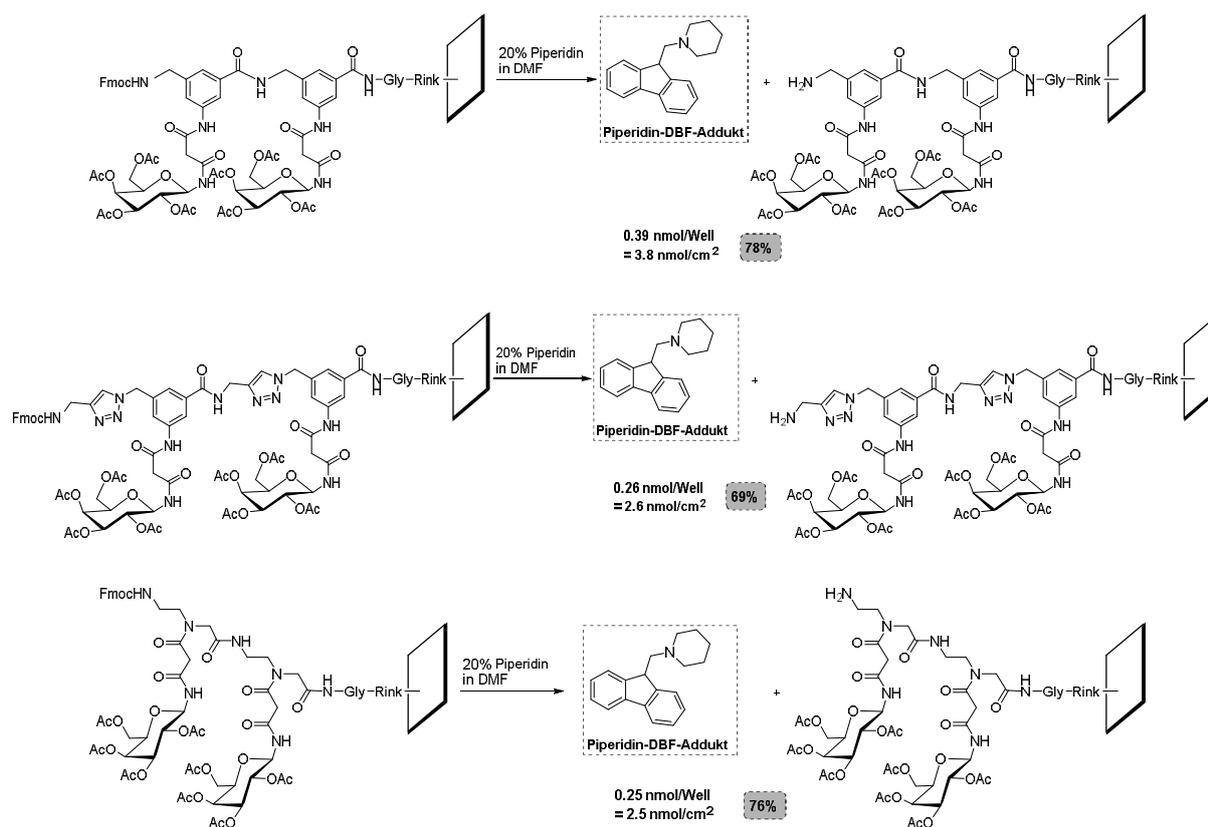
Nach dem Screening der *N*-Glycopeptid-Monomere **2b**, **4b** sowie **6b** sollte untersucht werden, wie gut das *Peanut Agglutinin* mit den aromatischen und aliphatischen dimeren Glycopeptiden (Glc-Glc, Glc-Gal, etc.) mit den Rückgrat-Strukturen **A**, **B** und **C** wechselwirkt. Diesbezüglich wurden die Kohlenhydrat-Bausteine **2a-d**, **4a-d** und **6a-d** sowie das malonyl-verbrückten β -*N*-Galactosid **26b** (Positiv-Kontrolle) mithilfe der SPOT-Synthese an die aminofunktionalisierte Glas-Wellplatte gebunden und mittels einer 7N NH_3 -Lösung entschützt (**Schema 66**).



Schema 66: Synthese der *N*-Glycopeptid-Dimere mit den Rückgrat-Typen **A**, **B** und **C**.

Analytik mittels UV-Spektroskopie

Um zu überprüfen, wie gut die jeweiligen *N*-Glycopeptid-Dimere an die aminofunktionalisierten Glas-Wellplate gebunden werden können, wurden die drei Galactose-Dimere der Rückgrat-Typen **A**, **B** und **C** jeweils auf einer separaten Glas-Wellplate synthetisiert. Daraufhin wurde die Fmoc-Schutzgruppe mittels einer 20%igen Piperidin in DMF-Lösung abgespalten und die UV-Absorption des Piperidin-DBF-Addukts gemessen (**Schema 67**).



Schema 67: Fmoc-Abspaltung der aromatischen sowie aliphatischen Galactopeptid-Dimere. Die angegebenen Derivatisierungsgrade [nmol/cm²] sind Mittelwerte über 384 Wells der Glas-Wellplate.

Auch hier wird anhand der Abspaltungsversuche (**Schema 67**) deutlich, dass die Anbindung der aromatischen bzw. aliphatischen Glycopeptid-Dimere mit bis zu 78% möglich ist.

Das Screening der gebundenen, deacetylierten aromatischen Glycopeptid-Dimere (Rückgrat **A** und **B**) respektive der aliphatischen Glycopeptide (Rückgrat **C**) (**Tabelle 17**) mit dem Alexa Fluor 488 markierten *Peanut Agglutinin* erfolgte ebenfalls nach dem bereits etablierten Protokoll (Kapitel 3.7.5.2). Das Layout der dazugehörigen Glas-Wellplate kann **Abbildung 57** entnommen werden.

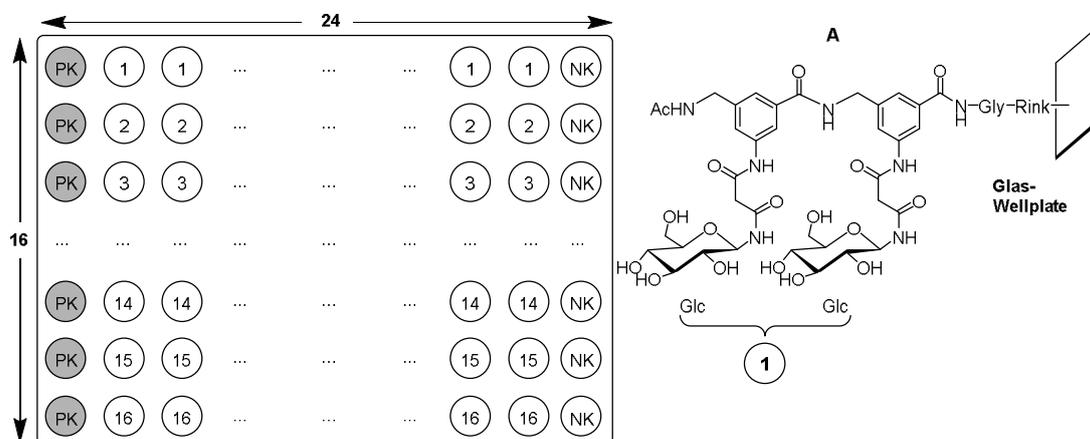


Abbildung 57: 384er Glas-Wellplate mit den deacetylierten *N*-Glycopeptid-Dimeren (exemplarisch für das Rückgrat **A**), dem malonyl-verbrückten β -*N*-Galactosid **26b** (Positiv-Kontrolle (PK)) sowie dem Linkersystem (Negativ-Kontrolle (NK)).

Die Zuordnung der einzelnen Dimere zu den jeweiligen Nummern geht aus **Tabelle 17** hervor.

Tabelle 17: Zuordnung der *N*-Glycopeptid-Dimere zu den entsprechenden Nummern.

Eintrag	<i>N</i> -Glycopeptid-Dimer	Nummer
1	Glc-Glc	1
2	Gal-Glc	2
3	GalNAc-Glc	3
4	GlcNAc-Glc	4
5	Glc-Gal	5
6	Gal-Gal	6
7	GlcNAc-Gal	7
8	GalNAc-Gal	8
9	Glc-GlcNAc	9
10	Gal-GlcNAc	10
11	GlcNAc-GlcNAc	11
12	GalNAc-GlcNAc	12
13	Glc-GalNAc	13
14	Gal-GalNAc	14
15	GlcNAc-GalNAc	15
16	GalNAc-GalNAc	16

a) Rückgrat A

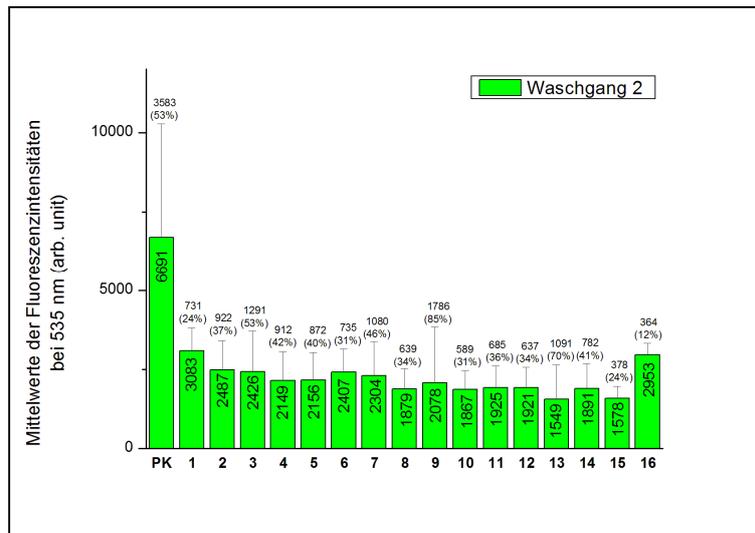


Abbildung 58: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für das β -*N*-Galactosid (PK) und die 16 Dimere des Rückgrats A (1-16) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen nach Waschgang 2 (grün) – (Messreihe 1).

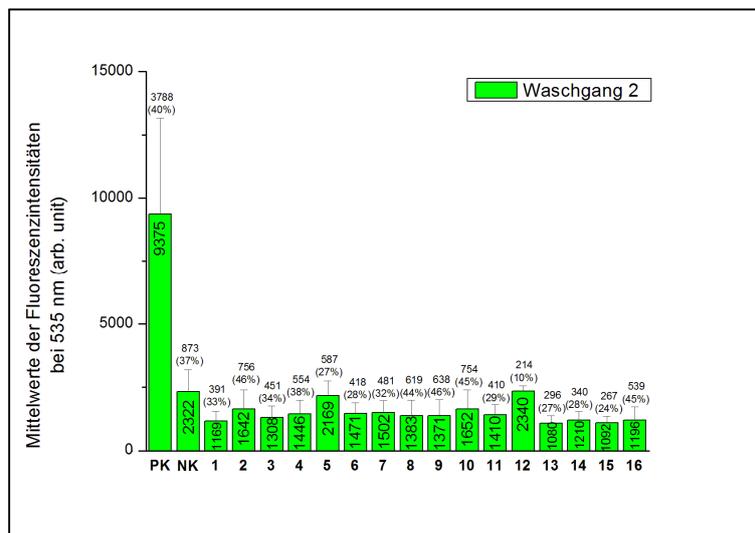


Abbildung 59: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für das β -*N*-Galactosid (PK), Linkersystem (NK) und die 16 Dimere des Rückgrats A (1-16) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen nach Waschgang 2 (grün) – (Messreihe 2).

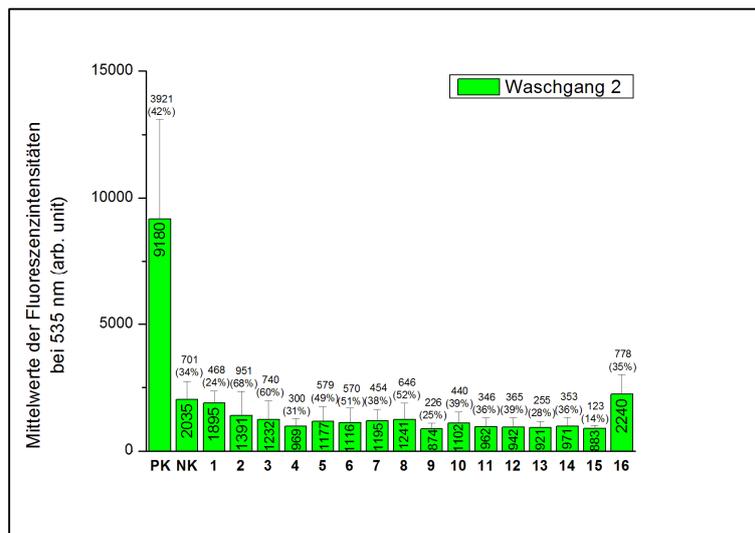
b) Rückgrat **B**

Abbildung 60: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für das β -*N*-Galactosid (PK), Linkersystem (NK) und die 16 Dimere des Rückgrats **B** (1-16) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen nach Waschgang 2 (grün) – (Messreihe 1).

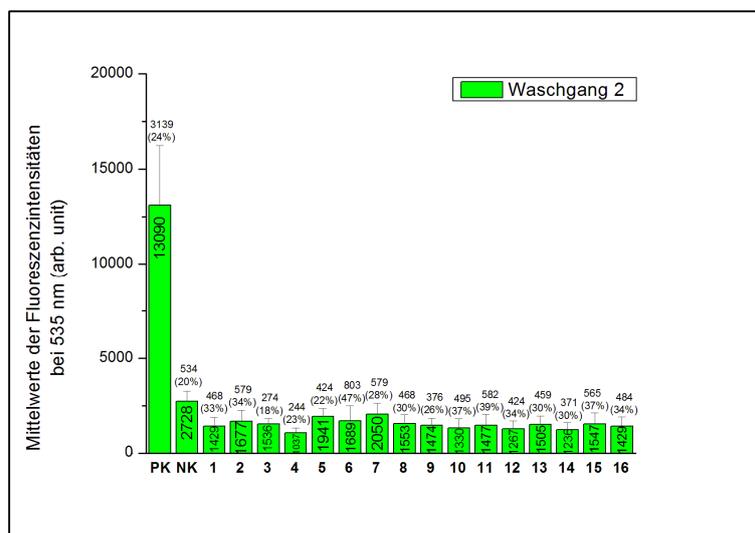


Abbildung 61: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für das β -*N*-Galactosids (PK), Linkersystem (NK) und die 16 Dimere des Rückgrats **B** (1-16) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen nach Waschgang 2 (grün) – (Messreihe 2).

Bei der Untersuchung der aromatischen Dimere (Glc-Glc, Gal-Gal, etc.) des Rückgrats **A** wurde nach Messreihe 1 deutlich, dass die Unterschiede zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität des gebundenen β -D-Galactosid (PK) und den Fluoreszenzintensitäten der immobilisierten aromatischen Dimeren aufgrund den zugehörigen Standardabweichungen nicht signifikant sind (**Abbildung 58**). Unter Berücksichtigung, dass bereits die Interaktion des aromatischen β -D-Galactosids des Rückgrats **A** ((**1**) in **Abbildung 54, 55** und **56**) mit dem Alexa Fluor 488 gelabelten *Peanut Agglutinin* vernachlässigbar ist, kann eine positive bzw. negative Einstufung der aromatischen Dimere 1-16 nicht eindeutig erfolgen, weshalb bei der Messreihe 2 zusätzlich zu einer Positiv- auch eine Negativ-Kontrolle herangezogen werden musste, die auch bei weiteren Messreihen beibehalten wurde.

Nach der Messreihe 2 kann konstatiert werden, dass sich die Fluoreszenzintensitäten der Positiv-Kontrolle (PK) und der Negativ-Kontrolle (NK) deutlich voneinander unterscheiden. Desweiteren konnte nach der Wiederholungsmessung eindeutig belegt werden, dass die Wechselwirkungen der aromatischen Dimere 1-16 mit dem *Peanut Agglutinin* vernachlässigbar schwach sind, da sich die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in derselben Größenordnung wie die Negativ-Kontrolle (NK) bewegen (**Abbildung 59**).

Beim Screening der aromatischen Dimere des Rückgrats **B** (**Abbildung 60** und **61**), kann, wie auch bei den Dimeren des Rückgrats **A**, anhand der niedrigen Fluoreszenzintensitäten beobachtet werden, dass die Lektin-Saccharid-Wechselwirkungen unter Beteiligung des *Peanut Agglutinins*, in Relation zum kovalent gebundenen β -D-Galactosid (PK), verschwindend gering sind. Da die jeweiligen Kohlenhydrate (Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc), als auch das Spacermolekül bei allen Rückgraten (**A**, **B**, **C**) identisch sind, muss die schwache Interaktion durch die aromatischen Rückgrate verursacht werden, die in diesem Fall womöglich nicht für eine Vororientierung der Saccharide sorgen (Kapitel 3.1.2.1), sondern die Annäherung an die Bindungstasche erschweren.

c) Rückgrat C

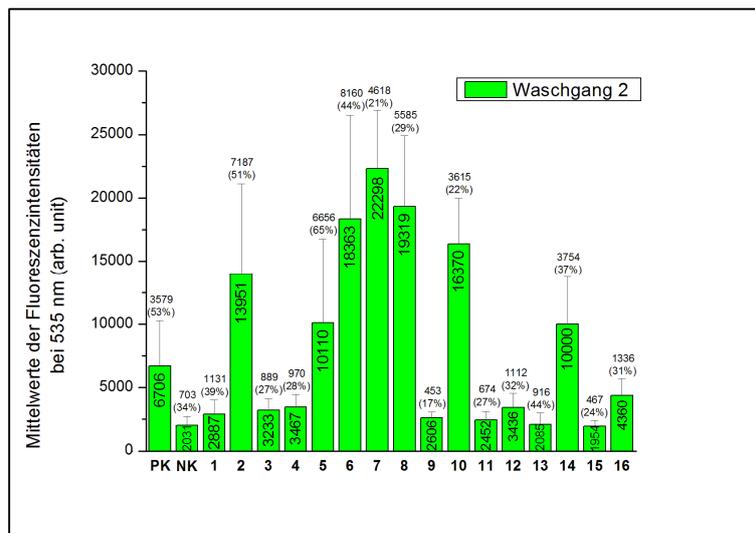


Abbildung 62: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für das β -*N*-Galactosid (PK), Linkersystem (NK) und die 16 Dimere des Rückgrats C (1-16) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen nach Waschgang 2 (grün) – (Messreihe 1).

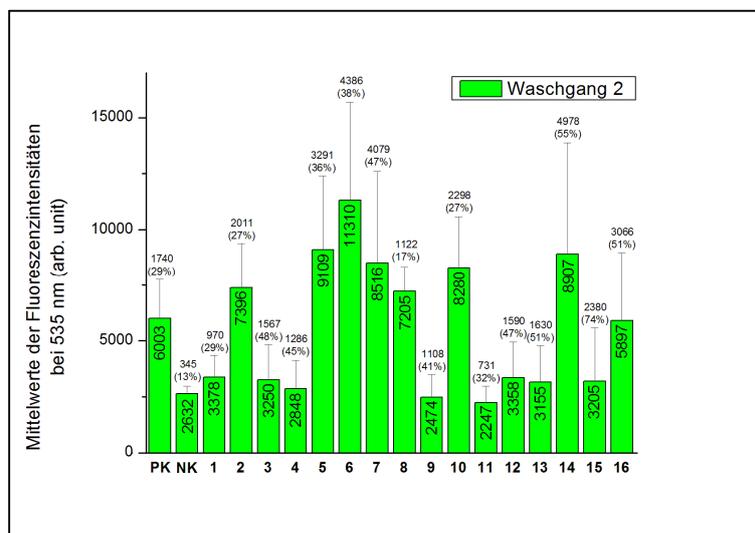


Abbildung 63: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für das β -*N*-Galactosid (PK), Linkersystem (NK) und die 16 Dimere des Rückgrats C (1-16) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen nach Waschgang 2 (grün) – (Messreihe 2).

Nach der Auswertung des Screenings der dimeren, aliphatischen *N*-Glycokonjugate mit dem Fluorophor markierten *Peanut Agglutinin* (Messreihe 1 und 2) kann zunächst festgehalten werden, dass nur diejenigen Saccharid-Kombinationen (**2**, **5**, **6**, **7**, **8**, **10** und **14**) vom Lektin der Erdnuss erkannt werden, welche einen Galactose-Baustein beinhalten (**Abbildung 62** und **63**). Desweiteren kann aus den Graphen entnommen werden, dass das aliphatische Dimer **16**, bestehend aus zwei *N*-Acetyl-D-galactosamin-Bausteinen, ebenfalls mit dem *Peanut Agglutinin* zu interagieren scheint. Darüber hinaus kann anhand der Messreihen 1 und 2 manifestiert werden, dass die dimeren Glycokonjugate **6** und **7** am stärksten mit dem *Peanut Agglutinin* wechselwirken, wobei die Interaktionen mit den weiteren *N*-Glycokonjugaten **2**, **5**, **8**, **10** und **14** jedoch nur minimal geringer ausfallen (**Abbildung 64**).

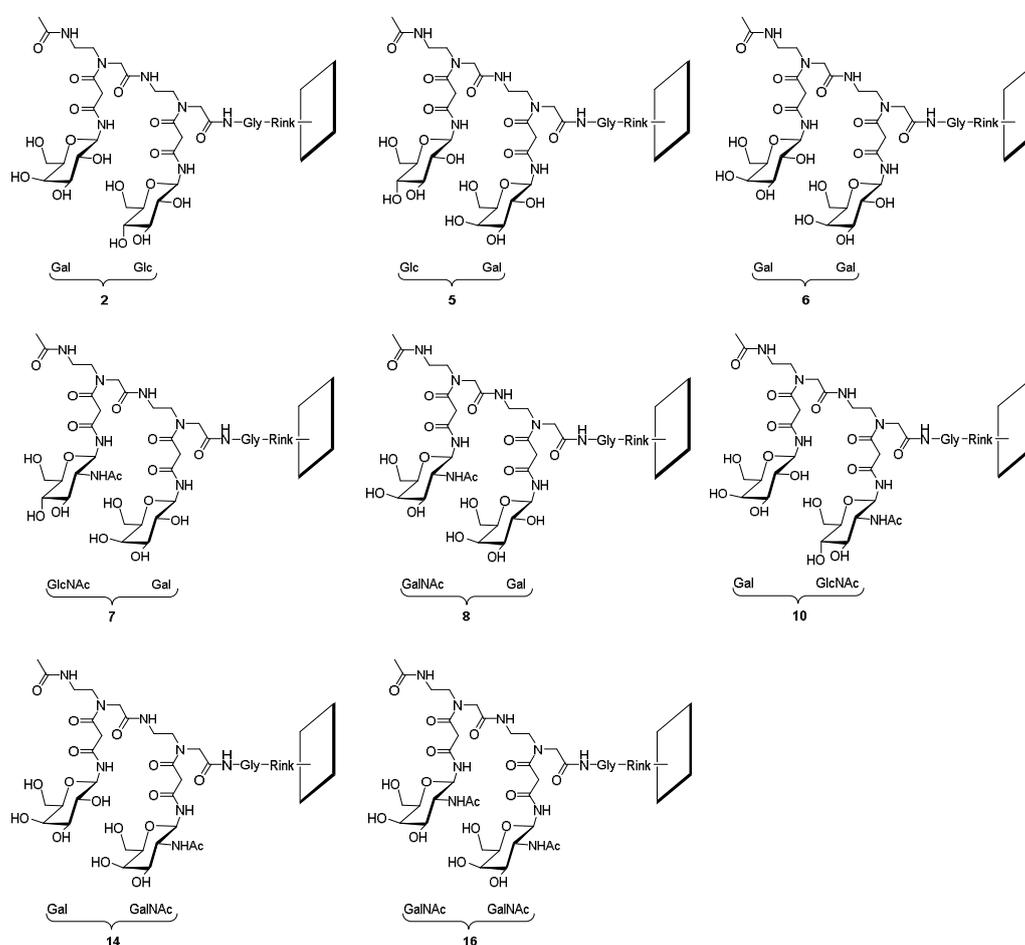


Abbildung 64: Aliphatische, dimere *N*-Glycokonjugate, die mit dem *Peanut Agglutinin* interagieren.

Anhand der durchgeführten Messreihen konnte somit demonstriert werden, dass mittels kombinatorischer SPOT-Synthese auf einer 384er Glas-Wellplatte unter Verwendung der aromatischen sowie aliphatischen Kohlenhydrat-Bausteinen **2a-d**, **4a-d** sowie **6a-d** monomere als auch dimere *N*-Glycopeptide immobilisiert werden können (Kapitel 3.7.6), welche spezifisch mit dem Erdnusslektin, dem *Peanut Agglutinin*, interagieren. Desweiteren konnte belegt werden, dass sich eine Lektin-basierte Differenzierung der gebundenen *N*-Glycokonjugate prinzipiell realisieren lässt.

3.7.7 FEHLERDIAGNOSE DES SCREENINGS

Nach der Untersuchung des immobilisierten β -*N*-Galactosids **28b** (PK), der aromatischen und aliphatischen Monomere **2b**, **4b** sowie **6b** als auch der 48 Dimeren (16 pro Rückgrat-Struktur **A**, **B** oder **C**) wird deutlich, dass die absoluten, sowie relativen (%) Standardabweichungen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten, trotz diverser Optimierungsversuche relativ groß sind, weshalb die jeweiligen Resultate fehlerbehaftet sein können. Fernerhin kann nach den Messungen festgehalten werden, dass sich die Fluoreszenzintensitäten zwischen zwei Glas-Wellplates, auch bei gleicher Positiv-Kontrolle, voneinander unterscheiden, was verdeutlicht, dass die Fluoreszenzintensitäten einzelner Glas-Wellplates nicht direkt mit einander verglichen werden können, wonach Studien unterschiedlicher Saccharidderivate lediglich auf ein und derselben Wellplate durchführbar sind (**Abbildung 65**).

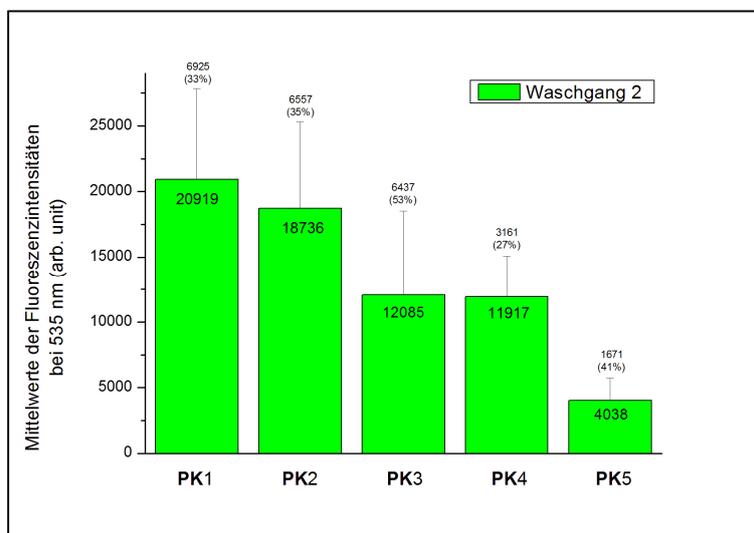


Abbildung 65: Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten für die Positiv-Kontrolle (PK1-5) mit den zugehörigen absoluten sowie relativen (%) Standardabweichungen auf unterschiedlichen Glas-Wellplates nach Waschgang 2 (grün).

Unter Berücksichtigung der Vielzahl an Arbeitsschritten, die vor dem jeweiligen Lektin-Assay durchgeführt werden müssen (Kapitel 3.7) – Reinigung, Silanisierung, Aminofunktionalisierung, Anbindung der *N*-Glycokonjugate, sowie Entschützung der Acetylgruppen – wird verständlich, dass die Schwankungen der Fluoreszenzintensitäten zwischen den einzelnen Messreihen durch diverse Fehlerquellen hervorgerufen werden können (**Tabelle 18**).

Insbesondere muss hierbei darauf geachtet werden, dass die Reinigung der 384er Glas-Wellplate bei einer Wiederverwendung intensiv erfolgt, da Verunreinigungen oder gebundene organische Reste ansonsten nicht vollständig entfernt werden, wodurch verschiedenartige Derivatisierungen die Folge wären. Dieser Fehler kann dahingegen minimiert werden, indem die Glasoberfläche der Wellplates nach jedem Screening 4 x 4 h mittels Caroscher Säure ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 3:2) sowie 2 x 2 h mit einer 3N NaOH-Lösung im Ultraschallbad gereinigt wird.

Desweiteren sollte nach der Silanierung das überschüssige GOPTS mit wasserfreiem Aceton abgewaschen werden, da andernfalls die reaktiven, terminalen Epoxide abreagieren können. Darüber hinaus muss bei der Aminofunktionalisierung als auch bei der Anbindung der N-Glycokonjugate sichergestellt werden, dass die verwendeten Lösungsmittel NMP bzw. DMF frei von Aminen sind, damit Fehlsequenzen, bedingt durch terminale Fmoc-Abspaltungen, vermieden werden. Diese Fehlerquelle kann beseitigt werden, indem die Lösungsmittel vor den jeweiligen Derivatisierungsschritten frisch destilliert werden.

Außerdem können auch nach der Entschützung der Acetylgruppen mit der 7N NH_3 -Lösung partiell unvollständig deacetylierte Saccharide vorliegen, sodass die jeweiligen N-Glycopeptidmimetika unterschiedlich gut mit dem Lektin interagieren. Damit die Acetylschutzgruppen vollständig verseift werden, sollte die Deacetylierung über einen Zeitraum von 3-6 h erfolgen (siehe auch Kapitel 3.7.5.2).

Neben den Fehlern, welche bei der Derivatisierung der Glas-Wellplate gemacht werden können, können auch beim Screening der N-Glycopeptide Probleme auftreten, die schwankende Fluoreszenzintensitäten zur Folge haben (**Tabelle 19**).

Hierbei muss besonders bei der Inkubation mit dem BSA bzw. Peanut Agglutinin sowie bei den jeweiligen Waschschritten darauf Wert gelegt werden, dass nicht gebundene Proteinrückstände aus jedem einzelnen Well komplett entfernt werden. Um dies zu erreichen sollte die sowohl die BSA- als auch die Lektin-Lösung gründlich aus den Wells abpipettiert und dreimal mit einer Waschpuffer-Lösung gewaschen werden. Schließlich muss auch vor der Messung der Fluoreszenzintensitäten gewährleistet werden, dass jedes Well der 384er Plate mit 15 μl /Well einer PBS-Lösung versetzt wird, da unterschiedliche Volumina diesbezüglich auch schwankende Fluoreszenzintensitäten zur Folge haben können. Damit die Pipettiervorgänge mit einer möglichst geringen Standardabweichung durchgeführt werden können, sollte eine Multi-Kanal-Pipette, z.B. der Viaflo 96 mit einem 96er Pipettenkopf, verwendet werden.

Eine Zusammenfassung der einzelnen Arbeitsschritte, Fehlerquellen, Auswirkungen sowie deren Lösungen bzw. Optimierungen kann der **Tabelle 18** sowie **19** entnommen werden.

Tabelle 18: Fehlerquellen bei der Derivatisierung der festen Phase sowie Lösungen/Optimierungen.

Eintrag	Arbeitsschritt	Fehlerquelle(n)	Auswirkung(en)	Lösung(en)/ Optimierung(en)
1	<u>Reinigung</u> mit H ₂ SO ₄ /H ₂ O ₂ 3:2 und 3N NaOH-Lsg.	Verunreinigungen oder gebundene, organische Reste werden nicht vollständig entfernt	Verschieden- artige Derivatisie- rungen	Intensive Reinigung: <i>A) Aktivierung vor der Derivatisierung</i> 1 x 2 h mit H ₂ SO ₄ /H ₂ O ₂ 3:2 <i>B) Reinigung nach dem Screening</i> 4 x 4 h mit H ₂ SO ₄ /H ₂ O ₂ 3:2 2 x 2 h mit 3N NaOH-Lsg.
2	<u>Silanisierung</u> mit GOPTS	Abwaschen des überschüssigen GOPTS erfolgt nicht mit wasserfreiem Aceton	Reaktive Epoxide reagieren ab, wodurch der Beladungsgrad drastisch sinkt	Flasche Aceton HPLC grade sollte frisch geöffnet werden
3	<u>Aminofunktio- nalisation</u> mit PEG-Diamin Rink-Amid-Linker und Glycin	Abwaschen des überschüssigen PEG-Diamins ist nicht vollständig NMP sowie DMF müssen frei von Aminen sein	Fehlsequenzen, bedingt durch terminale Fmoc- Abspaltungen	Mit ausreichend MeOH HPLC grade waschen; pH-Wert überprüfen (ca. 7-8) NMP und DMF frisch absolutieren
4	<u>Anbindung der N-Glycokonjugate</u>	NMP sowie DMF müssen frei von Aminen sein	Fehlsequenzen, bedingt durch terminale Fmoc- Abspaltungen	NMP und DMF frisch absolutieren
5	<u>Entschützung der Acetylgruppen</u> mit 7N NH ₃ -Lsg.	Partiell unvollständig deacetylierte Saccharide	Schlechte Saccharid/Lektin - Wechselwirkung	Deacetylierung mit 7N NH ₃ -Lsg. über einen Zeitraum von 3-6 h

Tabelle 19: Fehlerquellen beim Screening der *N*-Glycopeptide sowie Lösungen/Optimierungen.

Eintrag	Arbeitsschritt	Fehlerquelle(n)	Auswirkung(en)	Lösung(en)/ Optimierung(en)
1	<u>Inkubation mit der 3%igen BSA-Lsg.</u>	Volumina der aufgetragenen Lsg. unterscheiden sich Inkubationszeit	Unspezifische Bindungsstellen können noch vorliegen und zu falsch-positiven Resultaten führen	Pipettieren mit dem Viaflo 96 in Kombination mit einem 96er Pipettenkopf 1h bei 37 °C inkubieren
2	<u>Reinigen der Glas-Oberfläche</u>	3%ige BSA-Lsg. wird nicht vollständig abgetragen	Anbindung des Lektins kann erschwert werden	BSA-Lsg. gründlich abpipettieren sowie dreifach mit Waschpuffer waschen
3	<u>Inkubation mit dem Alexa Fluor 488 gelabelten <i>Peanut Agglutinin</i></u>	Volumina der aufgetragenen Lektin-Lsg. unterscheiden sich Inkubationszeit	Bindungsstellen werden nicht ausreichend abgesättigt	Pipettieren mit dem Viaflo 96 in Kombination mit einem 96er Pipettenkopf 1h bei 37 °C inkubieren
4	<u>Reinigen der Glas-Oberfläche</u>	Lektin-Lsg. wird nicht vollständig abgetragen	Lektinrückstände führen zu erhöhten Fluoreszenzintensitäten	Lektin-Lsg. gründlich abpipettieren sowie dreifach mit Waschpuffer waschen
5	<u>Messung der Fluoreszenzintensitäten</u>	Volumina der aufgetragenen PBS-Puffer-Lsg. unterscheiden sich	Gemessene Fluoreszenzintensitäten unterscheiden sich, da die Geräteparameter auf die Wellvolumina vorjustiert sind	Pipettieren mit dem Viaflo 96 in Kombination mit einem 96er Pipettenkopf

4 EXPERIMENTELLER TEIL

4.1 ALLGEMEINE BEMERKUNGEN

Arbeitstechniken

Alle Reaktionen bei denen luft- oder feuchtigkeitsempfindliche Substanzen, Edukte sowie Produkte, auftraten, wurden unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Die dabei verwendeten Glasgeräte wurden vor der Reaktion bei 80 °C im Trockenschrank ausgeheizt und am Hochvakuum einer Membranpumpe evakuiert. Flüssigkeiten wurden mittels Einwegspritzen mit aufgesetzten Stahlkanülen in den Reaktionskolben eingeführt. Feststoffe wurden dagegen im Stickstoffgegenstrom zugegeben.

Chemikalien und Lösungsmittel

Die zur Synthese und Analytik verwendeten Chemikalien wurden, bei der Chemikalienversorgung der Universität (CVU), von den Firmen MERCK, SIGMA ALDRICH, FLUKA, ABCR, GLYCON oder ACROS bezogen. Alle benötigten Chemikalien wurden, sofern nicht explizit erwähnt, ohne vorherige Aufreinigung eingesetzt. Die Lösungsmittel für die verschiedenen Reaktionen wurden vor Gebrauch destilliert oder absolutiert.

Präparative Chromatographie

Zur säulenchromatographischen Trennung wurden Glassäulen verschiedener Größe, gepackt mit Kieselgel (0.032–0.063 mm) der Firma MACHEREY-NAGEL verwendet. Sämtliche Lösungsmittel wurden vor der Verwendung getrocknet und destilliert.

Für die Dünnschichtchromatographie fanden die DC-Fertigfolien POLYGRAM[®] SILG/UV₂₅₄ der Firma MACHEREY-NAGEL Verwendung. Die Detektion erfolgte entweder mithilfe einer UV-Lampe durch Fluoreszenzlöschung ($\lambda = 254$ nm), durch Entwicklung mit einer Permanganat-, Molybdat-, sowie Anisaldehyd-Lösung, oder durch Verkohlung nach Besprühen der Plättchen mit einer 5%igen ethanolischen Schwefelsäure-Lösung.

Schwefelsäure-Lösung: 5 ml konz. Schwefelsäure in 95 ml Ethanol.

Permanganat-Lösung: 3.0 g Kaliumpermanganat, 20.0 g Kaliumcarbonat und 5 ml 5%ige Natronlauge in 300 ml Wasser.

Molybdat-Lösung:	20.0 g Ammoniummolybdat, 0.4 g Cer(IV)sulfat, 42 ml 96%ige Schwefelsäure und 358 ml Wasser.
Anisaldehyd-Lösung:	0.5 ml Anisaldehyd, 50 ml Eisessig und 1 ml 96%ige Schwefelsäure

¹H-Kernresonanzspektroskopie

Die ¹H-NMR Spektren wurden an einem BRUKER AVANCE 400 ausgestattet mit einem 5 mm ATM Probenkopf bei 400 MHz aufgenommen. Das verwendete Lösungsmittel wird in Klammern nach der Messfrequenz angegeben. Die Auswertung der Protonenspektren erfolgte nach erster Ordnung. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm bezüglich TMS ($\delta = 0$ ppm) angegeben. Als interner Standard zur Kalibrierung der Spektren diente das Signal der nicht deuterierten Lösungsmittelanteile. (CDCl₃ $\delta = 7.26$ ppm; DMSO-*d*₆ $\delta = 2.50$ ppm; DMF-*d*₇: 8.03 ppm, 2.92 ppm, 2.75 ppm; Chlorbenzol-*d*₅: 7.14 ppm, 6.99 ppm, 6.96 ppm). Die Kopplungskonstanten *J* wurden in Hz angegeben. Bei geminalen Wasserstoffatomen, welche magnetisch nicht äquivalent sind, wurde das mit der größeren Resonanzfrequenz mit dem Index a gekennzeichnet. Das Wasserstoffatom mit der kleineren Resonanzfrequenz erhielt dagegen den Index b. Die Multiplizitäten wurden mithilfe folgender Abkürzungen charakterisiert.

s:	Singulett
d:	Dublett
t:	Triplett
q:	Quartett
quint:	Quintett
m:	Multiplett
b:	breites Signal
dd:	Dublett vom Dublett
ddd:	Dublett vom Dublett vom Dublett
dt:	Dublett vom Triplett

¹³C-Kernresonanzspektroskopie

Die ¹³C-NMR-Spektren wurden am BRUKER AVANCE 400 bei 100 MHz aufgenommen. Die Kalibrierung der Spektren sowie die Auswertung erfolgten analog den ¹H-NMR-Spektren (CDCl₃ δ = 77.16 ppm; DMSO-*d*₆ δ = 39.52 ppm; DMF-*d*₇: 163.2 ppm, 34.9 ppm, 29.8 ppm; Chlorbenzol-*d*₅: 134.19 ppm, 129.26 ppm, 128.25 ppm, 125.96 ppm). Die ¹³C-NMR-Spektren sind ¹H-breitbandentkoppelt. Zur exakten Zuordnung der Signale wurden zusätzlich DEPT-Messungen, sowie Korrelationsexperimente (H, H-COSY; HSQC; HMBC) herangezogen.

Massenspektrometrie

Die Fast Atom Bombardement-(FAB)-Massenspektren wurden am Finnigan MAT TSQ 70 aufgenommen. Zur Ionisierung wurden Xenon-Atome verwendet, als Matrix diente 3-Nitrobenzylalkohol. Hochauflösende Massenspektren wurden mit einem Bruker Daltonic Apex II (FT-ICR-MS) bzw. Bruker Daltonic maXis (ESI-TOF-MS) gemessen.

IR-Spektroskopie

Die Infrarot-(IR)-Spektren wurden am JACSO FT-IR-430-Spektrometer aufgenommen. Die Feststoffmessungen erfolgten als KBr/Substanz-Mischung unter Reflexion, bei vorheriger Hintergrund-Referenz-Messung. Die Lage der Absorptionsbanden ist in Wellenzahlen [cm⁻¹] angegeben.

Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden mit einem Euro EA 3000 der HEKAtech GmbH durchgeführt.

Polarimetrie

Die Drehwerte wurden mit dem Perkin Elmer Polarimeter Model 341 in einer Quarzglasküvette (Länge 10 cm) bei 20 °C und einer Wellenlänge von 589 nm (Na-Lampe) ermittelt.

Schmelzpunkt-Bestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Büchi M-560 bestimmt.

4.2 ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN

AAV1: Darstellung der *N*-Glycopeptide via Peptidkupplung

Variante A:

Eine Lösung von 1-1.3 äq. der freien Carbonsäure in DMF (abs.) oder DCM (abs.) wird unter einer Stickstoffatmosphäre auf 0 °C gekühlt. Daraufhin werden 1.3-1.5 äq. des Kupplungsreagenzes, 1.3-1.5 äq. HOBt, sowie 3-3.9 äq. DIPEA hinzugefügt, woraufhin die Reaktionsmischung 10 min bei 0 °C gerührt wird. Anschließend werden 1 äq. des freien Amins zugegeben und 2 h bei 0 °C und 13-72 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle).

Variante B:

1 äq. des Amins wird unter einer Stickstoffatmosphäre in DMF (abs.) oder THF (abs.) vorgelegt. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und bei Verwendung von THF (abs.) mit aktiviertem Molsieb (3 Å) versetzt. Nun werden 1.1 äq. des Kupplungsreagenzes sowie 1.1 äq. der freien Carbonsäure gelöst in THF (abs.) oder DMF (abs.) zugegeben. Daraufhin wird der pH-Wert auf ca. 8 eingestellt, indem 1.3 äq. NEt₃ oder DIPEA zugetropft werden. Anschließend wird die Reaktionsmischung 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle).

Aufarbeitung

Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in EE (140 ml pro mmol) aufgenommen und mit einer 10 %igen Zitronensäure-Lösung (2 x 40 ml pro mmol) angesäuert. Die EE-Phase wird mit ges. NaHCO₃-Lösung (3 x 40 ml pro mmol) neutralisiert und mit ges. NaCl-Lösung (1 x 40 ml pro mmol) gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird abdestilliert. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt und/oder umkristallisiert.

AAV2: Entschützung der *tert*-Butylester

In einem Rundkolben werden 1 äq. des *tert*-Butylesterderivats in TFA/DCM 3:4 oder HCO₂H/DCM 2:1 gelöst, woraufhin die Reaktionsmischung bis zum vollständigen Umsatz bei RT gerührt wird (DC-Kontrolle). Daraufhin wird die Lösung im Stickstoffstrom eingengt und mit Toluol koevaporiert (5 x 20 ml). Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt um die freien Carbonsäurederivate als weiße Feststoffe zu erhalten.

AAV3: Entschützung der Benzylester

Zu einer Lösung von 1 äq. des Benzylesters in MeOH wird eine katalytische Menge Pd/C gegeben, woraufhin die Suspension bis zum vollständigen Umsatz unter einer Wasserstoffatmosphäre bei RT gerührt wird (DC-Kontrolle). Der Katalysator wird über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel wird im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt um die freien Carbonsäurederivate als weiße Feststoffe zu erhalten.

AAV4: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin

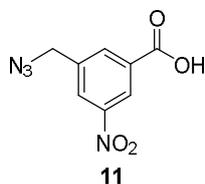
1 äq. des Fmoc-geschützten Amins wird bis zum vollständigen Umsatz in einer 20% igen Lösung von Piperidin in DMF (v/v) bei RT gerührt (DC-Kontrolle). Daraufhin wird das Lösungsmittel im Vakuum eingengt und der Rückstand mit Toluol koevaporiert (5 x 20 ml). Die freien Amine werden ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt.

AAV5: Einführung der Pentafluorphenolester mit PfpOH und DIC

1 äq. Pentafluorphenol (0.25 mmol) sowie 1 äq. der entsprechenden Carbonsäuren (0.1-0.25 mmol) werden in 1 ml NMP (abs.) gelöst, woraufhin 40 µl DIC (0.25 mmol) und 52 µl einer 25%igen Lösung von HODhbt in DMF (0.08 mmol) hinzugefügt werden. Die Reaktionsmischung wird kurz geschüttelt und anschließend 30 min bei RT stehen gelassen. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wird die *in situ* aktivierte Carbonsäure mittels SPOT-Synthese an den funktionalisieren Träger gebunden.

4.3 SYNTHESE DER AROMATISCHEN RÜCKGRATE

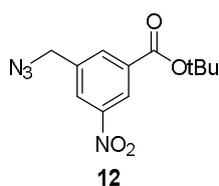
3-Azidomethyl-5-nitrobenzoesäure (**11**)



Zu einer Lösung von 1.53 g **10** (6.48 mmol; 1 äq.) in 20 ml THF (abs.) werden 13 ml einer 1N LiOH-Lösung (12.96 mmol; 2 äq.) gegeben, woraufhin 1.5 h bei RT gerührt wird (DC-Kontrolle: PE/EE 1:1). Daraufhin wird das THF abdestilliert, der Rückstand wird in 100 ml DCM aufgenommen und mit 75 ml einer 1M HCl-Lösung auf pH 2 angesäuert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt um 1.38 g **11** (6.21 mmol; 96%) als weißen, amorphen Feststoff zu erhalten.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 13.79 (s, 1H, CO₂H), 8.56 (s, 1H, arom. H), 8.47 (s, 1H, arom. H), 8.33 (s, 1H, arom. H), 4.76 (s, 2H, N₃CH₂); ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ 165.3 (1C, C=O), 148.1, 139.1, 134.8, 132.9, 126.7, 123.2 (6C, arom. C), 52.01 (N₃CH₂); FAB-MS *m/z* 220.8 [M-H]⁻; IR (KBr): 3442, 3091, 2114, 1696, 1619, 1590, 1536 cm⁻¹; Anal. ber. für C₈H₆N₄O₄ (222.16): C 43.25; H 2.72; N 25.22; gef.: C 43.37; H 2.75; N 25.15.

3-Azidomethyl-5-nitrobenzoesäure-*tert*-butylester (**12**)

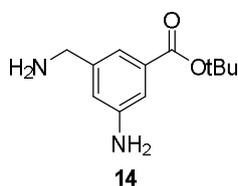


Zu einer Suspension von 4.43 g **11** (19.94 mmol; 1 äq.) in 100 ml DCM (abs.) werden unter einer Stickstoffatmosphäre 5.13 ml (COCl)₂ (59.82 mmol; 3 äq.) sowie 0.4 ml DMF (abs.) getropft. Die Lösung wird 3 h bei RT gerührt, woraufhin das Lösungsmittel abdestilliert wird. Der Rückstand wird in 38 ml *t*BuOH (399.00 mmol; 20 äq.) gelöst und es werden 2.44 g DMAP (19.94 mmol; 1 äq.) sowie 34 ml DIPEA (199.40 mmol; 10 äq.) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wird nun 12 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle: PE/EE 8:1) und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 400 ml DCM aufgenommen und dreimal mit je 100 ml einer 1N NaOH-Lösung sowie dreimal mit je 100 ml einer 1M HCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 8:1) aufgereinigt um 4.96 g **12** (17.83

mmol; 89%) als blass gelben Feststoff zu erhalten. Eine analytische Probe wurde aus Ethanol umkristallisiert.

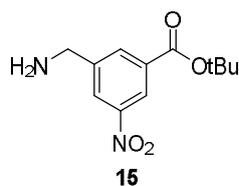
R_f: 0.31 (PE/EE 8:1); Smp.: 35 °C (EtOH); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.73 (s, 1H, arom. H), 8.35 (s, 1H, arom. H), 8.25 (s, 1H, arom. H), 4.56 (s, 2H, N₃CH₂), 1.63 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 163.2 (1C, C=O), 148.7, 138.2, 134.5, 134.4, 126.2, 124.1 (6C, arom. C), 83.1 (1C, CO₂C(CH₃)), 53.6 (1C, N₃CH₂), 28.2 (3C, CO₂C(CH₃)₃); FAB-MS: *m/z* 279.1 [M+H]⁺; IR (KBr): 3091, 2984, 2109, 1717, 1623, 1590, 1540 cm⁻¹; Anal. ber. für C₁₂H₁₄N₄O₄ (278.26): C 51.80; H 5.07; N 20.13; gef.: C 52.13; H 5.09; N 20.19.

3-Amino-5-aminomethylbenzoesäure-*tert*-butylester (14)



516 mg **12** (1.78 mmol; 1 äq.) und 50 mg Pd/C werden in 50 ml EE suspendiert und 22 h bei RT in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt (DC-Kontrolle: CHCl₃/7N NH₃ in MeOH 10:1). Der Katalysator wird über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (CHCl₃/7N NH₃ in MeOH 40:1) um 331 mg **14** (1.45 mmol; 83%) als weißen, amorphen Feststoffe zu erhalten.

R_f: 0.36 (CHCl₃/7N NH₃ in MeOH 40:1); ¹H-NMR (CDCl₃): δ 7.28 (s, 1H, arom. H), 7.16 (s, 1H, arom. H), 6.79 (s, 1H, arom. H), 3.78 (s, 4H, NH₂CH₂, NH₂CH₂), 1.56 (s, 12H, CO₂C(CH₃)₃, CH₂NH₂). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 166.0 (1C, C=O), 146.8, 144.7, 133.3, 118.3, 117.7, 114.4 (6C, arom. C), 81.0 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 46.3 (1C, NH₂CH₂), 28.3 (3C, CO₂C(CH₃)₃). FT-ICR-MS C₁₂H₁₈N₂O₂Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 223.144104; gef.: *m/z* 223.143920.

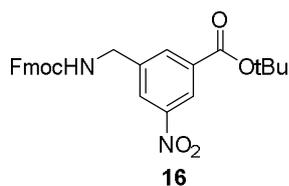
3-Aminomethyl-5-nitrobenzoesäure-*tert*-butylester (15)**Reduktion des Azids mittels 1,3-Propanedithiol (Methode A):**

Zu einer Lösung von 200 mg **12** (0.72 mmol; 1 äq.) in MeOH (abs.) werden unter einer Stickstoffatmosphäre bei 0 °C 0.4 ml NEt₃ (2.88 mmol; 4 äq.) sowie 0.43 ml 1,3-Propanedithiol (4.31 mmol; 6 äq.) getropft. Die Reaktionsmischung wird 15 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle: CHCl₃/7N NH₃ in MeOH 10:1), woraufhin das Lösungsmittel im Vakuum eingengt wird. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (CHCl₃/7N NH₃ in MeOH 10:1) aufgereinigt um 119 mg **15** (0.47 mmol; 66%) als farbloses Öl zu erhalten.

Reduktion des Azids mittels Triphenylphosphin (Methode B):

Eine Lösung von 220 mg **12** (0.79 mmol; 1 äq.) in 5 ml THF (abs.) wird unter einer Stickstoffatmosphäre bei 0 °C mit 207 mg PPh₃ (0.79 mmol; 1 äq.) versetzt. Die Lösung wird 15 h bei 0 °C gerührt, woraufhin 2 ml demin. H₂O hinzugefügt, sowie weitere 5 h bei RT gerührt werden (DC-Kontrolle: CHCl₃/7N NH₃ in MeOH 100:1). Das Lösungsmittel wird abdestilliert und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (CHCl₃/7N NH₃ in MeOH 200:1) aufgereinigt um 178 mg **15** (0.71 mmol; 89%) als farbloses Öl zu erhalten.

R_f: 0.30 (CHCl₃/7N NH₃ in MeOH 100:1); ¹H-NMR (CDCl₃): δ 8.63 (s, 1H, arom. H), 8.37 (s, 1H, arom. H), 8.25 (s, 1H, arom. H), 4.04 (s, 2H, NH₂CH₂), 1.61 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃), 1.54 (s, 2H, NH₂). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 163.8 (1C, C=O), 148.6, 145.7, 133.9, 125.5, 122.9 (6C, arom. C), 82.7 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 45.5 (1C, NH₂CH₂), 28.2 (3C, CO₂C(CH₃)₃). FT-ICR-MS C₁₂H₁₆N₂O₄ [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 253.118283; gef.: *m/z* 253.118133.

3-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-nitrobenzoesäure-*tert*-butylester (16)**Darstellung von 16 aus 15 unter Verwendung von FmocOSu (Methode A):**

Eine Lösung von 189 mg **15** (0.75 mmol; 1 äq.) in 6 ml DCM (abs.) wird unter einer Stickstoffatmosphäre bei 0 °C mit 253 mg FmocOSu (0.75 mmol; 1 äq.), 0.13 ml DIPEA (0.75 mmol; 1 äq.) sowie 9 mg DMAP (0.07 mmol; 0.1 äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 22 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle: PE/EE 3:1), woraufhin die Lösung mit 70 ml DCM verdünnt, mit 20 ml 1M HCl-Lösung angesäuert, mit 30 ml ges. NaHCO₃-Lsg. neutralisiert und schließlich mit 20 ml demin. H₂O sowie 20 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen wird. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird abdestilliert. Der Rückstand wird danach säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 5:1→1:1) aufgereinigt um 231 mg **16** (0.49 mmol; 65%) als weißen Feststoff zu erhalten.

Darstellung von 16 aus 15 unter Verwendung von FmocCl (Methode B):

Zu einer Lösung von 440 mg **15** (1.74 mmol; 1 äq.) in 8 ml DCM (abs.) werden unter einer Stickstoffatmosphäre 541 mg FmocCl (2.09 mmol; 1.2 äq.) sowie 1.39 ml DIPEA (8.20 mmol; 4.7 äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird 22 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle: PE/EE 3:1), woraufhin die Lösung mit 70 ml DCM verdünnt wird, mit 20 ml 1M HCl-Lösung angesäuert, mit 30 ml ges. NaHCO₃-Lösung neutralisiert und schließlich mit 20 ml demin. H₂O, sowie 20 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen wird. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird abdestilliert. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 5:1→1:1) aufgereinigt um 560 mg **16** (1.18 mmol; 68%) als weißen Feststoff zu erhalten.

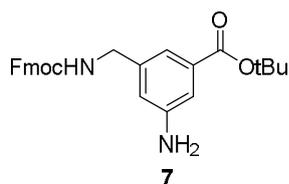
Darstellung von 16 aus 12 unter Verwendung von PPh₃ und FmocCl (Methode C):

Zu einer Lösung von 2.00 g **12** (7.19 mmol; 1 äq.) in 30 ml THF (abs.) werden unter einer Stickstoffatmosphäre bei 0 °C 2.07 g PPh₃ (7.91 mmol; 1.1 äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird 15 h bei RT gerührt, es werden 5 ml H₂O hinzugefügt und die Lösung wird weitere 5 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle: CHCl₃/7N NH₃ in MeOH 100:1). Daraufhin wird das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand wird in 40 ml DCM (abs.) aufgenommen und es werden 4.37 ml DIPEA (33.78 mmol; 4.7 äq.) sowie 2.79 g FmocCl (10.78 mmol; 1.5 äq.) hinzugefügt. Die Lösung wird 22 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle: PE/EE 3:1), mit 300 ml DCM verdünnt, mit 100 ml einer 1M HCl-Lösung angesäuert, mit 100 ml ges. NaHCO₃-Lösung neutralisiert und mit 50 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wird zunächst säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1→1:1) aufgereinigt

und anschließend aus *n*-Hexan/Chloroform umkristallisiert um 2.66 g **16** (5.61 mmol; 78%) als weißen, kristallinen Feststoff zu erhalten.

R_f: 0.70 (PE/EE 1:1); Smp.: 143 °C (*n*-Hexan/CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.66 (s, 1H, arom. H), 8.29 (s, 1H, arom. H), 8.22 (s, 1H, arom. H), 7.76 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.59 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz, arom. H), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, arom. H), 7.31 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, arom. H), 5.39 (s, 1H, NH), 4.50–4.47 (m, 4H, Fmoc-CH₂, Benzol-CH₂), 4.22 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz, Fmoc-CH), 1.62 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 163.5, 156.6 (2C, C=O), 148.6, 143.8, 141.4, 141.3, 134.1, 134.0, 127.2, 125.6, 125.0, 123.5, 120.1 (11C, arom. C), 82.9 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 67.1 (1C, Fmoc-CH₂), 47.3 (1C, Fmoc-CH), 44.2 (1C, Benzol-CH₂), 28.2 (3C, CO₂C(CH₃)₃); FT-ICR-MS C₂₇H₂₆N₂O₆Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 497.168308; gef.: *m/z* 497.168682; Anal. ber. für C₂₇H₂₆N₂O₆(474.51): C 68.34; H 5.52; N 5.90; gef.: C 68.27; H 5.51 N 5.76.

3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-aminobenzoessäure-*tert*-butylester (**7**)



Darstellung von **7** aus **14** unter Verwendung von FmocCl und K₂CO₃ (Methode A):

Zu einer Lösung von 519 mg K₂CO₃ (3.76 mmol; 5 äq.) in 7 ml H₂O werden 167 mg **14** (0.75 mmol; 1 äq.) gelöst in 7 ml 1,4-Dioxan getropft. Daraufhin werden 214 mg FmocCl (0.83 mmol; 1.1 äq.) hinzugegeben und die Reaktionsmischung wird 22 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle: CHCl₃/MeOH 40:1). Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeeengt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 3:1→1:1) aufgereinigt um 94 mg **7** (0.21 mmol; 28%) als weißen, amorphen Feststoff zu erhalten.

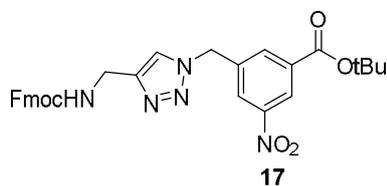
Darstellung von **7** aus **14** unter Verwendung von FmocCl und DIPEA (Methode B):

Eine Lösung von 331 mg **14** (1.49 mmol; 1 äq.) in 20 ml DCM (abs.) wird unter einer Stickstoffatmosphäre mit 424 mg FmocCl (1.64 mmol; 1.1 äq.) sowie 1.19 ml DIPEA (7.00 mmol; 4.7 äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle: PE/EE 1:1), woraufhin das Lösungsmittel abdestilliert wird. Daraufhin wird das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 2:1) aufgereinigt. Nach erneutem Entfernen des Lösungsmittels wird der erhaltene Rückstand ein weiteres Mal chromatographiert (CHCl₃/MeOH 200:1) um 569 mg **7** (1.28 mmol; 86%) als weißen, amorphen Feststoff zu erhalten.

Darstellung von 7 aus 16 mittels katalytischer Hydrierung (Methode C):

210 mg **16** (0.442 mmol; 1 äq.) sowie 50 mg Lindlar-Katalysator werden in 50 ml MeOH suspendiert und 5 h bei RT in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt (DC-Kontrolle: PE/EE 1:1). Der Katalysator wird über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (CHCl₃/Aceton 200:1) aufgereinigt um 194 mg **7** (0.44 mmol; 99%) als weißen, amorphen Feststoff zu erhalten.

R_f: 0.36 (PE/EE 1:1); ¹H-NMR (CDCl₃) δ .76 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, arom. H), 7.60 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.33–7.26 (m, 4H, arom. H), 7.21 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 6.76 (s, 1H, *NH*), 5.10 (s, 1H, *NH*), 4.45 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz, Fmoc-CH₂), 4.33 (d, 2H, *J* = 5.9 Hz, Benzol-CH₂), 4.23 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz, Fmoc-CH), 3.76 (s, 2H, *NH*₂), 1.57 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 165.8, 156.6 (2C, C=O), 146.9, 144.0, 141.4, 139.8, 133.6, 127.8, 127.2, 125.2, 120.1, 118.6, 118.0, 115.1 (12C, arom. C), 81.2 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 66.9 (1C, Fmoc-CH₂), 47.4 (1C, Fmoc-CH), 45.0 (1C, Benzol-CH₂), 28.3 (3C, CO₂C(CH₃)₃); ESI-TOF-MS C₂₇H₂₈N₂O₄Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 467.19413; gef.: *m/z* 467.19442.

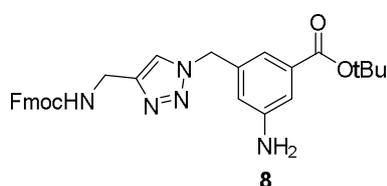
3-[[4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]methyl]-5-nitrobenzoesäure-*tert*-butylester (17**)**

Zu einer Lösung von 1.00 g **12** (3.59 mmol; 1 äq.) und 1.00 g Fmoc-propargylamin (3.59 mmol; 1 äq.) in 20 ml DCM und 20 ml *t*BuOH werden 0.18 g Cu(II)SO₄ · 5 H₂O (0.72 mmol; 0.2 äq.) und 0.29 g Natriumascorbat (1.44 mmol; 0.4 äq.), gelöst in 20 ml H₂O, gegeben. Die Reaktionsmischung wird 3 d bei 40 °C gerührt (DC-Kontrolle: PE/EE 1:2), woraufhin die Lösung mit 20 ml H₂O verdünnt und mit 200 ml DCM extrahiert wird. Die organische Phase wird mit 20 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:2) aufgereinigt. Nach erneutem Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand aus *n*-Hexan/Chloroform umkristallisiert um 1.74 g **17** (3.13 mmol; 87%) als weißen, kristallinen Feststoff zu erhalten.

R_f: 0.30 (PE/EE 1:2); Smp.: 112 °C (*n*-Hexan/ CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.73–8.72 (m, 1H, arom. H), 8.24 (d, 2H, *J* = 15.3 Hz, arom. H), 7.74 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, arom. H), 7.56–7.53 (m, 3H, arom. H), 7.39–7.35 (m, 2H, arom. H), 7.26 (t, 2H, *J* = 7.38 Hz, arom. H), 5.62–5.58 (m, 3H, Benzol-CH₂, *NH*), 4.46 (d, 2H, *J* = 5.9 Hz, Triazol-CH₂), 4.37 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, Fmoc-CH₂), 4.17 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz,

Fmoc-CH), 1.60 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 162.9, 156.6 (2C, C=O), 148.7, 146.1, 143.9, 141.4, 137.0, 134.8, 134.5, 127.8, 127.1, 126.4, 125.1, 124.7, 122.5, 120.1 (14C, arom. C), 83.3 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 67.0 (1C, Fmoc-CH₂), 52.9 (1C, Benzol-CH₂), 47.2 (1C, Fmoc-CH), 36.5 (1C, Triazol-CH₂), 28.2 (3C, CO₂C(CH₃)₃); FT-ICR-MS C₃₀H₂₉N₅O₆Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 578.201005; gef.: *m/z* 578.201133; Anal. ber. für C₃₀H₂₉N₅O₆(555.58): C 64.85; H 5.26; N 12.61; gef.: C 64.70; H 5.26; N 12.59.

3-{[4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-aminobenzoensäure-*tert*-butylester (**8**)



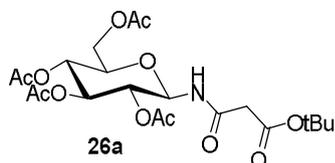
Eine Lösung von 170 mg **17** (0.31 mmol; 1 äq.) in 15 ml MeOH wird mit 50 mg Pd/C versetzt und 4.5 h bei RT in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt (DC-Kontrolle: CHCl₃/MeOH 40:1). Der Katalysator wird über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel wird im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 60:1) aufgereinigt um 141 mg **8** (0.27 mmol; 88%) als weißen, amorphen Feststoff zu erhalten.

R_f: 0.42 (CHCl₃/MeOH 60:1); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.73 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, arom. H), 7.55 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz, arom. H), 7.42 (s, 1H, arom. H), 7.37 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.27 (dd, 4H, *J* = 4.0 Hz, *J* = 12.6 Hz, arom. H), 6.62 (s, 1H, arom. H), 5.65 (s, 1H, NH), 5.39 (s, 2H, Benzol-CH₂), 4.43 (d, 2H, *J* = 5.7 Hz, Triazol-CH₂), 4.37 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz, Fmoc-CH₂), 4.17 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, Fmoc-CH), 3.68 (s, 2H, NH₂), 1.57 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 165.3, 156.5 (2C, C=O), 147.3, 145.6, 143.9, 141.4, 135.8, 133.9, 127.8, 127.1, 125.2, 122.1, 120.1, 119.0, 117.9, 116.2 (14C, arom. C), 81.5 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 66.9 (1C, Fmoc-CH₂), 54.0 (1C, Benzol-CH₂), 47.3 (1C, Fmoc-CH), 36.6 (1C, Triazol-CH₂), 28.2 (3C, CO₂C(CH₃)₃); FT-ICR-MS C₃₀H₃₁N₅O₄Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 548.226826; gef.: *m/z* 548.226661.

4.4 SYNTHESE DER KOHLENHYDRAT-BAUSTEINE

4.4.1 PEPTIDKUPPLUNG DER AMINOPYRANOSEN MIT DEN MALONSÄUREDERIVATEN

N-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-malonamidsäure-*tert*-butylester (**26a**)



Darstellung nach AAV1 (Variante B).

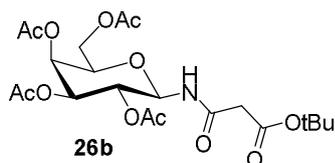
Amidkupplung unter Verwendung von NEt_3 :

1.77 g **23a** (5.10 mmol; 1 äq.), 0.86 ml Malonsäure-mono-*tert*-butylester (5.61 mmol; 1.1 äq.), 2.31 g HBTU (5.61 mmol; 1.1 äq.), 10 ml NEt_3 in 40 ml THF (abs.) und 20 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:1→1:2) 1.89 g **26a** (3.86 mmol; 76%) als weißen Feststoff.

Amidkupplung unter Verwendung von DIPEA:

2.11 g **23a** (6.08 mmol; 1 äq.), 1.03 ml Malonsäure-mono-*tert*-butylester (6.68 mmol; 1.1 äq.), 2.53 g HBTU (6.68 mmol; 1.1 äq.), 1.34 ml DIPEA (7.90 mmol; 1.3 äq.) in 40 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:1→1:2) 2.61 g **26a** (5.33 mmol; 88%) als weißen Feststoff. Eine analytische Probe wurde aus *n*-Hexan/ CHCl_3 umkristallisiert.

R_f : 0.35 (PE/EE 1:1); Smp.: 138 °C (*n*-Hexan/ CHCl_3); $[\alpha]_D^{20}$: +7.0 (*c* 1.0, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7.57 (d, 1H, $J_{1,\text{NH}} = 9.1$ Hz, NH), 5.27 (m, 2H, H-3, H-1), 5.06 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.9$ Hz, H-4), 4.99 (t, 1H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 9.6$ Hz, H-2), 4.26 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.3$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, H-6a), 4.07 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 1.9$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, H-6b), 3.80 (ddd, 1H, $J_{5,6b} = 1.9$ Hz, $J_{5,6a} = 4.2$ Hz, H-5), 3.20 (s, 2H, COCH_2CO), 2.06, 2.02, 2.01, 1.99 (4s, 12H, CH_3), 1.44 (s, 9H, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 170.7, 170.5, 170.1, 169.6, 167.5, 166.4 (6C, C=O), 83.0 (1C, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 78.1 (C-1), 73.7 (C-5), 73.0 (C-3), 70.3 (C-2), 68.2 (C-4), 61.8 (C-6), 42.7 (1C, COCH_2CO), 28.0 (1C, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 20.8, 20.7 (4C, CH_3); FT-ICR-MS $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{NO}_{12}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber.: m/z 512.173847; gef.: m/z 512.174240; Anal. ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{NO}_{12}$ (489.47): C 51.53; H 6.38; N 2.86; gef.: C 52.01; H 6.40; N 2.78.

***N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-malonamidsäure-*tert*-butylester (26b)**

Darstellung nach AAV1 (Variante B).

Amidkupplung unter Verwendung von NEt_3 :

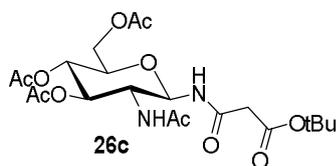
2.13 g **23b** (6.13 mmol; 1 äq.), 1.04 ml Malonsäure-mono-*tert*-butylester (6.74 mmol; 1.1 äq.), 2.56 g HBTU (6.74 mmol; 1.1 äq.), 10 ml NEt_3 in 40 ml THF (abs.) und 20 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:1→1:2) 1.68 g **26b** (3.43 mmol; 56%) als weißen Feststoff.

Amidkupplung unter Verwendung von DIPEA:

2.25 g **23b** (6.48 mmol; 1 äq.), 1.14 ml Malonsäure-mono-*tert*-butylester (7.13 mmol; 1.1 äq.), 2.70 g HBTU (7.13 mmol; 1.1 äq.), 1.43 ml DIPEA (8.42 mmol; 1.3 äq.) in 40 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:1→1:2) 1.78 g **26b** (3.64 mmol; 56%) als weißen Feststoff.

R_f : 0.23 (PE/EE 1:1); $[\alpha]_D^{20}$: +23.7 (c 1.0, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7.63 (d, 1H, $J_{1,\text{NH}} = 8.9$ Hz, NH), 5.42–5.41 (m, 1H, H-4), 5.25 (t, 1H, $J_{1,\text{NH}} = 9.1$ Hz, H-1), 5.20–5.15 (m, 1H, H-2), 5.10 (dd, 1H, $J_{3,4} = 3.3$ Hz, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-3), 4.14–4.00 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 3.21 (s, 2H, COCH_2CO), 2.14, 2.03, 2.02, 1.97 (4s, 12H, CH_3), 1.46 (s, 9H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 170.7, 170.5, 170.2, 170.0, 167.6, 166.3 (6C, C=O), 83.0 (1C, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 78.4 (C-1), 72.5 (C-5), 71.1 (C-3), 68.1 (C-2), 67.3 (C-4), 61.3 (C-6), 42.7 (1C, COCH_2CO), 28.1 (1C, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 20.8, 20.7, 20.6 (4C, CH_3); ESI-TOF-MS $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{NO}_{12}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber.: m/z 512.17385; gef.: m/z 512.17357; Anal. ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{NO}_{12}$ (489.47): C 51.53; H 6.38; N 2.86; gef.: C 51.67; H 6.35; N 2.45.

***N*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-malonamidsäure-*tert*-butylester (26c)**



Darstellung nach AAV1 (Variante B).

Amidkupplung unter Verwendung von NEt_3 :

1.41 g **23c** (4.07 mmol; 1 äq.), 0.69 ml Malonsäure-mono-*tert*-butylester (4.48 mmol; 1.1 äq.), 1.70 g HBTU (4.48 mmol; 1.1 äq.), 5 ml NEt_3 in 40 ml THF (abs.) und 20 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) 1.11 g **26c** (2.27 mmol; 56%) als weißen Feststoff.

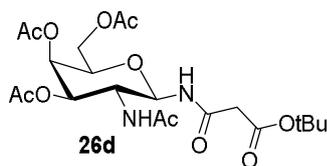
Amidkupplung unter Verwendung von DIPEA:

2.70 **23c** (7.80 mmol; 1 äq.), 1.32 ml Malonsäure-mono-*tert*-butylester (8.58 mmol; 1.1 äq.), 3.25 g HBTU (8.58 mmol; 1.1 äq.), 1.75 ml DIPEA (10.14 mmol; 1.3 äq.) in 40 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) 2.07 g **26c** (2.43 mmol; 54%) als weißen Feststoff.

Eine analytische Probe wurde aus *n*-Hexan/EE umkristallisiert.

R_f : 0.36 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1); Smp.: 143 °C (*n*-Hexan/EE); $[\alpha]_D^{20}$: + 3.0 (*c* 1.0, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7.55 (d, 1H, $J_{1,\text{NH}}$ = 8.6 Hz, NH), 6.47 (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ = 8.9 Hz, NH), 5.25–5.20 (m, 2H, H-1, H-3), 5.08 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.7$ Hz, H-4), 4.27 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.3$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, H-6a), 4.18 (dd, 1H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 9.9$ Hz, $J_{2,\text{NH}} = 10.0$ Hz, H-2), 4.07 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 2.2$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, H-6b), 3.84 (ddd, 1H, $J_{5,6b} = 2.2$ Hz, $J_{5,6a} = 4.2$ Hz, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-5), 3.27–3.16 (m, 2H, COCH_2CO), 2.06, 2.01, 2.00, 1.93 (4s, 12H, CH_3), 1.43 (s, 9H, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 172.0, 171.4, 170.8, 169.5, 167.3, 166.9 (6C, C=O), 82.6 (1C, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 79.9 (C-1), 73.5 (C-5), 72.9 (C-3), 68.2 (C-4), 62.0 (C-6), 53.0 (C-2), 43.7 (1C, COCH_2CO), 28.1 (1C, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 23.1, 20.8, 20.7, 20.6 (4C, CH_3); ESI-TOF-MS $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber.: m/z 511.18983; gef.: m/z 511.19053; Anal. ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{11}$ (488.49): C 51.63; H 6.60; N 5.73; gef.: C 51.49; H 6.51; N 5.60.

***N*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosyl)-malonamidsäure-*tert*-butylester (26d)**



Darstellung nach AAV1 (Variante B).

Amidkupplung unter Verwendung von NEt_3 :

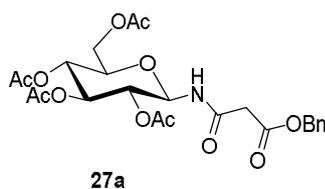
213 mg **23d** (0.63 mmol; 1 äq.), 0.11 ml Malonsäure-mono-*tert*-butylester (0.69 mmol; 1.1 äq.), 261 mg HBTU (0.69 mmol; 1.1 äq.), 2 ml NEt_3 in 10 ml THF (abs.) und 5 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) 162 mg **26d** (0.33 mmol; 53%) als weißen Feststoff.

Amidkupplung unter Verwendung von DIPEA:

650 mg **23d** (1.87 mmol; 1 äq.), 0.32 ml Malonsäure-mono-*tert*-butylester (2.06 mmol; 1.1 äq.), 780 mg HBTU (2.06 mmol; 1.1 äq.), 0.41 ml DIPEA (0.44 mmol; 1.3 äq.) in 20 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) 425 mg **26d** (0.87 mmol; 46%) als weißen Feststoff.

Eine analytische Probe wurde aus *n*-Hexan/EE umkristallisiert.

R_f : 0.24 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1); Smp.: 116 °C (*n*-Hexan/EE); $[\alpha]_D^{20}$: +11.4 (*c* 1.0, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7.51 (d, 1H, $J_{1,\text{NH}}$ = 8.5 Hz, NH), 6.44 (d, 1H, $J_{2,\text{NH}}$ = 8.9 Hz, NH), 5.36 (d, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 3.3$ Hz, H-4), 5.25–5.19 (m, 2H, H-1, H-3), 4.34 (dd, 1H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 9.5$ Hz, $J_{2,\text{NH}} = 9.1$ Hz, H-2), 4.17–4.04 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 3.28–3.15 (m, 2H, COCH_2CO), 2.13, 2.01, 1.97, 1.93 (4s, 12H, CH_3), 1.44 (s, 9H, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 172.3, 170.8, 170.5, 170.3, 167.6, 166.7 (6C, C=O), 82.6 (1C, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 80.4 (C-1), 72.3 (C-5), 70.5 (C-3), 66.8 (C-4), 61.5 (C-6), 49.3 (C-2), 43.6 (1C, COCH_2CO), 28.1 (1C, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 23.1, 20.8 (4C, CH_3); FT-ICR-MS $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber.: m/z 511.189831; gef.: m/z 511.189365; Anal. ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{11}$ (488.49): C 51.63; H 6.60; N 5.73; gef.: C 51.35; H 6.68 ; N 5.53.

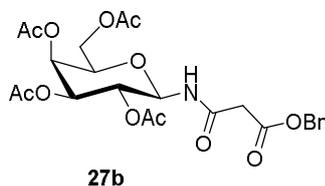
***N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-malonamidsäurebenzylester (27a)**

Darstellung nach AAV1 (Variante B).

Amidkupplung unter Verwendung von DIPEA:

1.71 g **23a** (4.92 mmol; 1 äq.), 1.05 g Malonsäuremonobenzylester (5.42 mmol; 1.1 äq.), 2.05 g HBTU (5.42 mmol; 1.1 äq.), 1.09 ml DIPEA (6.40 mmol; 1.3 äq.) in 40 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:1) 1.80 g **27a** (3.44 mmol; 70%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.21 (PE/EE 1:1); [α]_D²⁰: +2.6 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.57 (d, 1H, $J_{1,NH}$ = 9.1 Hz, NH), 7.38-7.31 (m, 5H, arom. H), 5.32-5.24 (m, 2H, H-1, H-3), 5.17 (s, 2H, CH₂Ph), 5.07 (t, 1H, $J_{3,4}$ = 9.7 Hz, H-4), 4.99 (t, 1H, $J_{2,3}$ = 9.6 Hz, H-2), 4.28 (dd, 1H, $J_{5,6a}$ = 4.4 Hz, $J_{6a,6b}$ = 12.5 Hz, H-6a), 4.07 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ = 2.0 Hz, $J_{6a,6b}$ = 12.5 Hz, H-6b), 3.81 (ddd, 1H, $J_{5,6b}$ = 2.1 Hz, $J_{5,6a}$ = 4.3 Hz, $J_{4,5}$ = 10.1 Hz, H-5), 3.35 (s, 2H, COCH₂CO), 2.07, 2.02, 2.01, 2.00 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 170.7, 170.0, 169.6, 168.1, 165.7 (6C, C=O), 135.0, 128.8, 128.8, 128.6 (4C, arom. C), 78.2 (C-1), 73.8 (C-5), 72.9 (C-3), 70.4 (C-2), 68.2 (C-4), 67.6 (1C, CH₂Ph), 61.7 (C-6), 41.7 (1C, NHCOCH₂CO), 20.8, 20.7, 20.6 (4C, CH₃); ESI-TOF-MS C₂₄H₂₉NO₁₂Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 546.15820; gef.: *m/z* 546.15859.

***N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-malonamidsäurebenzylester (27b)**

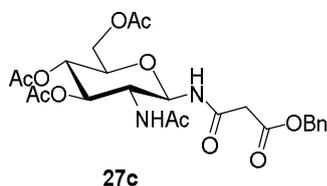
Darstellung nach AAV1 (Variante B).

Amidkupplung unter Verwendung von DIPEA:

2.27 g **23b** (6.54 mmol; 1 äq.), 1.40 g Malonsäuremonobenzylester (7.19 mmol; 1.1 äq.), 2.73 g HBTU (7.19 mmol; 1.1 äq.), 1.44 ml DIPEA (8.50 mmol; 1.3 äq.) in 40 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:1→1:2) 2.24 g **27b** (4.28 mmol; 66%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.29 (PE/EE 1:1); [α]_D²⁰: +14.3 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.61 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 8.9 Hz, *NH*), 7.38-7.31 (m, 5H, arom. H), 5.44 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 0.9 Hz, *J*_{4,5} = 3.3 Hz, H-4), 5.26 (t, 1H, *J*_{2,3} = 8.9 Hz, H-3), 5.20-5.10 (m, 4H, H-2, PhCH₂, H-3), 4.14-4.00 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 3.35 (s, 2H, COCH₂CO), 2.14, 2.02, 2.01, 1.98 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 171.0, 170.5, 170.2, 169.9, 168.2, 165.6 (6C, C=O), 135.0, 128.8, 128.7, 128.6 (4C, arom. C), 78.5 (C-1), 72.5 (C-5), 71.0 (C-3), 68.1 (C-2), 67.6 (1C, PhCH₂), 67.3 (C-4), 61.3 (C-6), 41.6 (1C, COCH₂CO), 20.8, 20.7, 20.7, 20.6 (4C, CH₃); ESI-TOF-MS C₂₄H₂₉NO₁₂Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 546.15820; gef.: *m/z* 546.15886.

***N*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-β-*D*-glucopyranosyl)-malonamidsäurebenzylester (27c)**



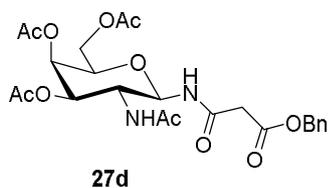
Darstellung nach AAV1 (Variante B).

Amidkupplung unter Verwendung von DIPEA:

820 mg **23c** (2.38 mmol; 1 äq.), 510 mg Malonsäuremonobenzylester (2.61 mmol; 1.1 äq.), 990 mg HBTU (2.61 mmol; 1.1 äq.), 0.53 ml DIPEA (3.09 mmol; 1.3 eq) in 30 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1) 940 mg **27c** (1.80 mmol; 76%) als weißen Feststoff. Eine analytische Probe wurde aus *n*-Hexan/EE umkristallisiert.

R_f: 0.27 (CHCl₃/MeOH 100:1); Smp.: 180 °C (*n*-Hexan/EE); [α]_D²⁰: -5.2 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.63 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 8.5 Hz, *NH*), 7.36-7.32 (m, 5H, arom. H), 6.36 (d, 1H, *J*_{2,NH} = 8.7 Hz, *NH*), 5.22-5.07 (m, 5H, H-1, H-3, CH₂Ph, H-4), 4.28 (dd, 1H, *J*_{5,6a} = 4.3 Hz, *J*_{6a,6b} = 12.5 Hz, H-6a), 4.18 (dd, 1H, *J*_{2,NH} = 10.0 Hz, *J*_{2,3} = 19.0 Hz, H-2), 4.08 (dd, 1H, *J*_{5,6b} = 2.0 Hz, *J*_{6a,6b} = 12.5 Hz, H-6b), 3.83 (ddd, 1H, *J*_{5,6b} = 2.1 Hz, *J*_{5,6a} = 4.2 Hz, *J*_{4,5} = 9.8 Hz, H-5), 3.39-3.30 (m, 2H, COCH₂CO), 2.07, 2.04, 2.03, 1.91 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 172.2, 171.6, 170.8, 169.5, 167.8, 166.2 (6C, C=O), 135.2, 128.8, 128.7, 128.5 (4C, arom. C), 80.1 (C-1), 73.6 (C-5), 72.9 (C-3), 68.1 (C-4), 67.6 (1C, CH₂Ph), 61.9 (C-6), 53.1 (C-2), 42.5 (1C, COCH₂CO), 23.1, 20.9, 20.8, 20.7 (4C, CH₃); ESI-TOF-MS C₂₄H₃₀N₂O₁₁Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 545.17418; gef.: *m/z* 545.17496; Anal. ber. für C₂₄H₃₀N₂O₁₁ (522.50): C 55.17; H 5.79; N 5.36; gef.: C 55.43; H 5.85; N 5.43.

***N*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosyl)-malonamid-säurebenzylester
(27d)**

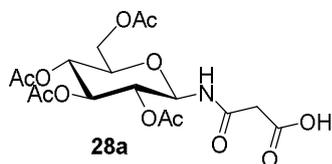


Darstellung nach AAV1 (Variante B).

Amidkupplung unter Verwendung von DIPEA:

620 mg **23d** (1.78 mmol; 1 äq.), 380 mg Malonsäuremonobenzylester (1.95 mmol; 1.1 äq.), 740 mg HBTU (1.95 mmol; 1.1 äq.), 0.39 ml DIPEA (2.31 mmol; 1.3 äq.) in 30 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 50:1) 450 mg **27d** (0.87 mmol; 49%) als weißen Feststoff. Eine analytische Probe wurde aus Et₂O/EE umkristallisiert.

R_f: 0.30 (CHCl₃/MeOH 50:1); Smp.: 150 °C (Et₂O/EE); [α]_D²⁰: +2.2 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.67 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 7.1 Hz, NH), 7.38-7.33 (m, 5H, arom. H), 5.92 (d, 1H, *J*_{2,NH} = 8.7 Hz, NH), 5.38 (d, 1H, *J*_{3,4} = 2.6 Hz, H-4), 5.14 (s, 2H, CH₂Ph), 5.14-5.07 (m, 2H, H-1, H-3), 4.41-4.34 (m, 1H, H-2), 4.14 (dd, 1H, *J*_{5,6a} = 6.8 Hz, *J*_{6a,6b} = 11.0 Hz, H-6a), 4.08-4.01 (m, 2H, H-6b, H-5), 3.35 (d, 2H, *J*_{CH,CH} = 3.1 Hz, CH₂Ph), 2.16, 2.03, 2.03, 1.93 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 172.5, 171.1, 170.6, 170.3, 168.0, 166.2 (6C, C=O), 135.1, 128.8, 128.7, 128.5 (4C, arom. C), 80.5 (C-1), 72.4 (C-5), 70.5 (C-3), 67.6 (1C, CH₂Ph), 66.7 (C-4), 61.5 (C-6), 49.5 (C-2), 42.5 (1C, COCH₂CO), 23.1, 20.8, 20.8 (4C, CH₃); ESI-TOF-MS C₂₄H₃₀N₂O₁₁Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 545.17418; gef.: *m/z* 545.17473; Anal. ber. für C₂₄H₃₀N₂O₁₁ (522.50): C 55.17; H 5.79; N 5.36; gef.: C 54.73; H 5.79; N 5.14.

4.4.2 ENTSCHÜTZUNG DER *TERT*-BUTYL- UND BENZYLESTER***N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-malonamidsäure (28a)**

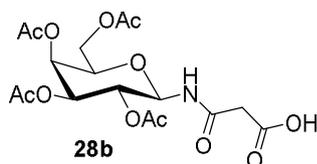
Darstellung nach **AAV2**.

2.49 g **26a** (5.09 mmol; 1 äq.) in 12 ml DCM (abs.) und 16 ml TFA liefern nach 24 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:1→PE/EE 1:3 + 1% HCO₂H) 2.11 g **28a** (4.87 mmol; 96%) als weißen, amorphen Feststoff.

Darstellung nach **AAV3**.

1.62 g **27a** (3.09 mmol; 1 äq.) und 50 mg Pd/C in 50 ml MeOH ergeben nach 6 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:3→PE/EE 1:3 + 1% HCO₂H) 1.32 g **28a** (3.05 mmol; 98%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.52 (PE/EE 1:3 + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: +6.5 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.59 (s, 1H, CO₂H), 7.68 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 8.9 Hz, NH), 5.30 (t, 2H, *J*_{1,2} = 9.4 Hz, H-1, H-3), 5.07 (t, 1H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9.8 Hz, H-4), 5.01 (t, 1H, *J*_{1,2} = *J*_{2,3} = 9.5 Hz, H-2), 4.28 (dd, 1H, *J*_{5,6a} = 4.5 Hz, *J*_{6a,6b} = 12.4 Hz, H-6a), 4.09 (d, 1H, *J*_{6a,6b} = 12.4 Hz, H-6b), 3.85 (dd, 1H, *J*_{5,6b} = 2.0 Hz, *J*_{4,5} = 8.0 Hz, H-5), 3.39 (s, 2H, COCH₂CO), 2.07, 2.04, 2.03, 2.01 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 171.3, 171.0, 170.2, 170.1, 169.8, 167.4 (6C, C=O), 78.0 (C-1), 73.9 (C-5), 72.9 (C-3), 70.6 (C-2), 68.2 (C-4), 61.9 (C-6), 40.8 (1C, COCH₂CO), 20.8, 20.7, 20.6 (4C, CH₃); ESI-TOF-MS C₁₇H₂₃NO₁₂Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 456.11125; gef.: *m/z* 456.11071.

***N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-malonamidsäure (28b)**

Darstellung nach **AAV2**.

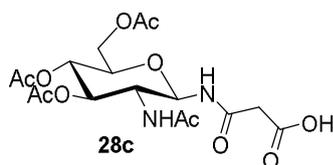
1.78 g **26b** (3.64 mmol; 1 äq.) in 17 ml DCM (abs.) und 13 ml TFA liefern nach 24 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:1→PE/EE 1:3 + 1% HCO₂H) 1.52 g **28b** (3.51 mmol; 96%) als weißen, amorphen Feststoff.

Darstellung nach **AAV3**.

2.34 g **27b** (4.47 mmol; 1 äq.) und 50 mg Pd/C in 50 ml MeOH ergeben nach 6 bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:1→PE/EE 1:3 + 1% HCO₂H) 1.84 g **28b** (4.25 mmol; 95%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.53 (PE/EE 1:3 + 1 % HCO₂H); [α]_D²⁰: + 19.8 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.56 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 9.0 Hz, NH), 7.37 (s, 1H, CO₂H), 5.45–5.44 (m, 1H, H-4), 5.30–5.25 (m, 1H, H-1), 5.16–5.14 (m, 2H, H-2, H-3), 4.12–4.05 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 3.39 (s, 2H, COCH₂CO), 2.15, 2.07, 2.04, 1.99 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 171.6, 170.8, 170.2, 170.0, 169.9, 167.3 (6C, C=O), 78.5 (C-1), 72.6 (C-5), 70.9 (C-3), 68.3 (C-2), 67.3 (C-4), 61.3 (C-6), 40.7 (1C, COCH₂CO), 20.8, 20.7, 20.6 (4C, CH₃); ESI-TOF-MS C₁₇H₂₃NO₁₂Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 456.11125; gef.: *m/z* 456.11071.

N-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-β-*D*-glucopyranosyl)-malonamidsäure (**28c**)



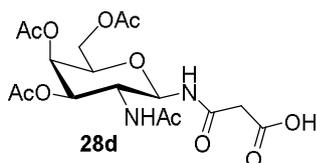
Darstellung nach **AAV2**.

250 mg **26c** (0.51 mmol; 1 äq.) in 4 ml DCM (abs.) und 3 ml TFA liefern nach 24 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:3→EE + 1% HCO₂H) 220 mg **28c** (0.50 mmol; 98%) als weißen, amorphen Feststoff.

Darstellung nach **AAV3**.

278 mg **27c** (0.53 mmol; 1 äq.) und 40 mg Pd/C in 30 ml MeOH ergeben nach 6 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:3→EE + 1% HCO₂H) 224 mg **28c** (0.52 mmol; 97%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.38 (EE + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: + 13.4 (*c* 1.0, DMSO); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 12.51 (s, 1H, CO₂H), 8.68 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 9.2 Hz, NH), 7.92 (d, 1H, *J*_{2,NH} = 9.3 Hz, NH), 5.15 (t, 1H, *J*_{1,2} = *J*_{1,NH} = 9.5 Hz, H-1), 5.11–5.07 (m, 1H, H-3), 4.82 (t, 1H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9.8 Hz, H-4), 4.17 (dd, 1H, *J*_{5,6a} = 4.3 Hz, *J*_{6a,6b} = 12.5 Hz, H-6a), 3.96 (dd, 1H, *J*_{5,6b} = 2.0 Hz, *J*_{6a,6b} = 12.4 Hz, H-6b), 3.92–3.81 (m, 2H, H-2, H-5), 3.16 (m, 2H, COCH₂CO), 2.00, 1.96, 1.90, 1.74 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 170.1, 169.5, 169.4, 169.3, 168.9, 166.3 (6C, C=O), 78.1, (C-1), 73.3 (C-3), 72.3 (C-5), 68.4 (C-4), 61.8 (C-6), 52.0 (C-2), 42.6 (1C, COCH₂CO), 22.6, 20.6, 20.4, 20.3 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₁₇H₂₄N₂O₁₁Na [M+Na]⁺: Ber.: *m/z* 455.127231; Gef.: *m/z* 455.127337.

***N*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosyl)-malonamidsäure (**28d**)**

Darstellung nach **AAV2**.

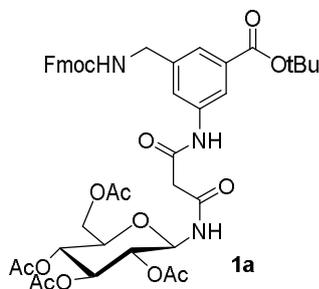
55 mg **26d** (0.11 mmol; 1 äq.) in 2 ml DCM (abs.) und 1.5 ml TFA liefert nach 24 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:5→EE + 1% HCO₂H) 47 mg **28d** (0.11 mmol; 98%) als weißen, amorphen Feststoff.

Darstellung nach **AAV3**.

193 mg **27d** (0.37 mmol; 1 äq.) und 50 mg Pd/C in 50 ml MeOH ergeben nach 6 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (EE + 1% HCO₂H) 144 mg **28d** (0.33 mmol; 91%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.21 (EE + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: +20.6 (*c* 1.0, DMSO); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 12.48 (s, 1H, CO₂H) 8.63 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 9.3 Hz, NH), 7.89 (d, 1H, *J*_{2,NH} = 9.2 Hz, NH), 5.26 (d, 1H, *J*_{3,4} = 3.0 Hz, H-4), 5.08 (t, 1H, *J*_{1,2} = *J*_{1,NH} = 9.5 Hz, H-1), 4.98 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 3.3 Hz, *J*_{2,3} = 10.2 Hz, H-3), 4.11–3.94 (H-2, H-6a, H-6b, H-5), 3.20–3.09 (m, 2H, COCH₂CO), 2.09, 1.99, 1.89, 1.76 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 170.0, 169.6, 169.2, 166.6 (6C, C=O), 78.8 (C-1), 71.4 (C-5), 70.9 (C-3), 66.7 (C-4), 61.6 (C-6), 48.2 (C-2), 42.8 (1C, COCH₂CO), 22.7, 20.6, 20.5, 20.4 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₁₇H₂₄N₂O₁₁Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 433.145286; gef.: 433.145250.

4.4.3 PEPTIDKUPPLUNG MIT DEN AROMATISCHEN RÜCKGRATEN

3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester (1a)

Darstellung nach AAV1 (Variante A).

Amidkupplung unter Verwendung von DCC, HOBt und DIPEA:

158 mg **28a** (0.36 mmol; 1.3 äq.), 95 mg DCC (0.46 mmol; 1.3 äq.), 62 mg HOBt (0.46 mmol; 1.3 äq.), 0.24 ml DIPEA (1.38 mmol; 3.9 äq.) und 158 mg **7** (0.36 mmol; 1 äq.) in 30 ml DCM (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT (DC-Kontrolle: PE/Aceton 1:1), Filtration des ausgefallenen Dicyclohexyllharnstoffs, sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/Aceton 2:1→1:1) 69 mg **1a** (0.08 mmol; 23%) als weißen, amorphen Feststoff.

Amidkupplung unter Verwendung von DIC, HOBt und DIPEA:

170 mg **28a** (0.39 mmol; 1.3 äq.), 0.06 ml DIC (0.39 mmol; 1.3 äq.), 53 mg HOBt (0.39 mmol; 1.3 äq.), 0.20 ml DIPEA (1.17 mmol; 3.9 äq.) und 134 mg **7** (0.30 mmol; 1 äq.) in 20 ml DCM (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT (DC-Kontrolle: PE/Aceton 1:1), Filtration des ausgefallenen Diisopropylharnstoffs sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/Aceton 4:1→1:1) 169 mg **1a** (0.19 mmol; 65%) als weißen, amorphen Feststoff.

Amidkupplung unter Verwendung von EDCI-HCl, HOBt und DIPEA:

204 mg **28a** (0.47 mmol; 1.3 äq.), 90 mg EDCI-HCl (0.47 mmol; 1.3 äq.), 64 mg HOBt (0.47 mmol; 1.3 äq.), 0.24 ml DIPEA (1.40 mmol; 3.9 äq.) und 161 mg **7** (0.36 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1) 167 mg **1a** (0.19 mmol; 54%) als weißen, amorphen Feststoff.

Amidkupplung unter Verwendung von HBTU, HOBt und DIPEA:

185 mg **28a** (0.43 mmol; 1 äq.), 243 mg HBTU (0.64 mmol; 1.5 äq.), 87 mg HOBt (0.64 mmol; 1.5 äq.), 0.11 ml DIPEA (0.64 mmol; 1.5 äq.) und 190 mg **7** (0.43 mmol; 1 äq.) in 7 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT (DC-Kontrolle: PE/Aceton 1:1) sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/Aceton 2:1→1:1) 257 mg **1a** (0.30 mmol; 70%) als weißen, amorphen Feststoff.

Amidkupplung unter Verwendung von HATU, HOAt und DIPEA:

190 mg **28a** (0.44 mmol; 1.3 äq.), 167 mg HATU (0.44 mmol; 1.3 äq.), 0.73 ml einer 0.6 M HOAt-Lösung in DMF (0.44 mmol; 1.3 äq.), 0.22 ml DIPEA (1.32 mmol; 1.3 äq.) und 150 mg **7** (0.34 mmol; 1 äq.) in 7 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT (DC-Kontrolle: PE/Aceton 1:1) sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/Aceton 2:1→1:1) 70 mg **1a** (0.08 mmol; 24%) als weißen, amorphen Feststoff.

Amidkupplung unter Verwendung von PyBOP, HOBt und DIPEA:

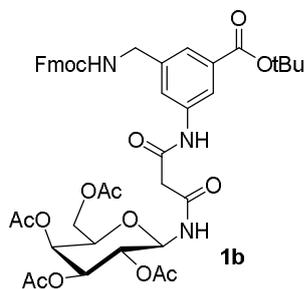
151 mg **28a** (0.35 mmol; 1.3 äq.), 181 mg PyBOP (0.35 mmol; 1.3 äq.), 47 mg HOBt (0.35 mmol; 1.3 äq.), 0.18 ml DIPEA (0.35 mmol; 1.3 äq.) und 121 mg **7** (0.27 mmol; 1 äq.) werden 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle: CHCl₃/MeOH 100:1), woraufhin das Produkt **1a** jedoch nur in Spuren detektiert werden konnte.

Amidkupplung unter Verwendung von CDI:

184 mg **28a** (0.42 mmol; 1.3 äq.) und 69 mg CDI (0.42 mmol; 1.3 äq.) in 20 ml THF (abs.) werden nach 30 min bei RT mit 145 mg **7** (0.33 mmol; 1 äq.) versetzt. Die Lösung wird 13 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle: CHCl₃/MeOH 200:1), woraufhin das Produkt **1a** jedoch nur in Spuren detektiert werden konnte.

R_f: 0.33 (CHCl₃/MeOH 100:1); [α]_D²⁰: -0.7 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.31 (s, 1H, Benzol-NH), 7.87 (d, 2H, *J* = 15.3 Hz, arom. H), 7.75 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, arom. H), 7.66 (s, 1H, H-1NHCOCH₂), 7.59 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.38 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, arom. H), 7.29 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, arom. H), 5.47 (s, 1H, CONHCH₂), 5.34–5.24 (m, 2H, H-1, H-3), 5.08 (t, 1H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9.8 Hz, H-4), 4.99 (t, 1H, *J*_{1,2} = *J*_{2,3} = 9.5 Hz, H-2), 4.41–4.39 (m, 4H, Fmoc-CH₂, Benzol-CH₂), 4.27 (dd, 1H, *J*_{5,6a} = 4.3 Hz, *J*_{6a,6b} = 12.6 Hz, H-6a), 4.22 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, Fmoc-CH), 4.08 (dd, 1H, *J*_{5,6b} = 1.9 Hz, *J*_{6a,6b} = 12.5 Hz, H-6b), 3.86 (ddd, 1H, *J*_{5,6b} = 2.1 Hz, *J*_{5,6a} = 4.2 Hz, *J*_{4,5} = 10.1 Hz, H-5), 3.37 (dd, 2H, *J* = 6.7 Hz, NHCOCH₂CO), 2.05, 2.03, 2.00 (3s, 12H, CH₃), 1.57 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 170.7, 170.6, 170.1, 169.6, 168.6, 165.2, 164.8, 156.7 (8C, C=O), 144.0, 141.3, 140.4, 138.0, 133.1, 127.8, 127.1, 125.2, 124.5, 123.0, 120.0 (11C, arom. C), 81.7 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 78.1 (C-1), 73.8 (C-3), 73.0 (C-5), 70.5 (C-2), 68.1 (C-4), 67.0 (1C, Fmoc-CH₂), 61.8 (C-6), 47.2 (1C, Fmoc-CH), 44.8 (1C, Benzol-CH₂), 43.6 (1C, NHCOCH₂CO), 28.2 (3C, CO₂C(CH₃)₃), 20.8, 20.7 (4C, CH₃); ESI-TOF-MS C₄₄H₄₉N₃O₁₅Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 882.30559; gef.: *m/z* 882.30656; Anal. ber. für C₄₄H₄₉N₃O₁₅(859.87): C 61.46; H 5.74; N 4.89; gef.: C 61.47; H 5.72; N 4.84.

3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester (1b**)**

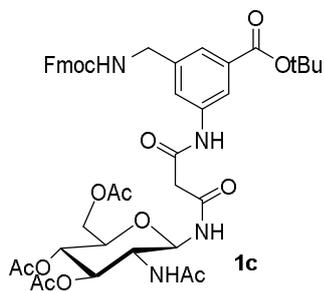


Darstellung nach **AAV1 (Variante A)**.

232 mg **28b** (0.54 mmol; 1.3 äq.), 103 mg EDCI·HCl (0.54 mmol; 1.3 äq.), 72 mg HOBt (0.54 mmol; 1.3 äq.), 0.27 ml DIPEA (1.61 mmol; 3.9 äq.) und 183 mg **7** (0.41 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 15 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 200:1) 203 mg **1b** (0.24 mmol; 57%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.22 (CHCl₃/MeOH 100:1); [α]_D²⁰: +1.5 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.41 (s, 1H, Benzol-NH), 7.93 (s, 1H, arom. H), 7.84 (s, 1H, arom. H), 7.78 (s, 1H, H-1NHCOCH₂), 7.76–7.73 (m, 2H, arom. H), 7.65 (s, 1H, arom. H), 7.57 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.37 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.27 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, arom. H), 5.57 (t, 1H, *J* = 5.9 Hz, CONHCH₂), 5.44–5.43 (m, 1H, H-4), 5.34–5.29 (m, 1H, H-1), 5.22–5.15 (m, 2H, H-2, H-3), 4.39 (m, 4H, Fmoc-CH₂, Benzol-CH₂), 4.20 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, Fmoc-CH), 4.12–4.02 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 3.44–3.35 (m, 2H, NHCOCH₂CO), 2.12, 2.00, 1.99, 1.98 (4s, 12H, CH₃), 1.57 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 171.0, 170.5, 170.2, 169.9, 168.4, 165.2, 164.7, 156.7 (8C, C=O), 144.0, 141.4, 140.0, 138.1, 133.2, 127.8, 125.2, 124.6, 123.1, 120.1 (10C, arom. C), 81.7 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 78.5 (C-1), 72.5 (C-5), 71.0 (C-3), 68.2 (C-2), 67.3 (C-4), 67.1 (1C, Fmoc-CH₂), 61.3 (C-6), 47.3 (1C, Fmoc-CH), 44.8 (1C, Benzol-CH₂), 43.6 (1C, NHCOCH₂CO), 28.3 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 20.8, 20.7, 20.6, 20.5 (4C, CH₃); FT-ICR-MS: C₄₄H₄₉N₃O₁₅Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 882.305589; gef.: *m/z* 882.305686.

3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester (1c**)**

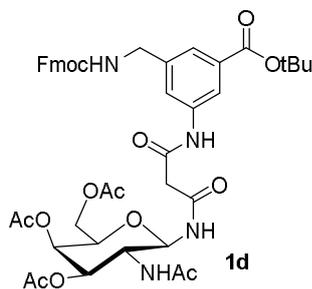


Darstellung nach **AAV1 (Variante A)**.

225 mg **28c** (0.52 mmol; 1.3 äq.), 100 mg EDCI·HCl (0.52 mmol; 1.3 äq.), 70 mg HOBt (0.52 mmol; 1.3 äq.), 0.27 ml DIPEA (1.56 mmol; 3.9 äq.) und 178 mg **7** (0.40 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 15 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 200:1→50:1) 166 mg **1c** (0.19 mmol; 48%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.30 (CHCl₃/MeOH 50:1); [α]_D²⁰: -9.0 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.55 (s, 1H, Benzol-NH), 8.07 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 8.2 Hz, H-1NHCOCH₂), 7.82 (s, 1H, arom. H), 7.74–7.71 (m, 3H, arom. H), 7.58–7.55 (m, 3H, arom. H) 7.36 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.28–7.24 (m, 2H, arom. H), 6.86 (d, 1H, *J*_{2,NH} = 8.6 Hz, NH), 5.77 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, CONHCH₂), 5.25–5.18 (m, 2 H, H-1, H-3), 5.09 (t, 1H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9.6 Hz, H-4), 4.39 (d, 2H, *J* = 7.1 Hz, Fmoc-CH₂), 4.32–4.18 (m, 5 H, Benzol-CH₂, H-2, H-6a, Fmoc-CH), 4.05 (dd, 1H, *J*_{5,6b} = 1.8 Hz, *J*_{6a,6b} = 12.4 Hz, H-6b), 3.78–3.75 (m, 1H, H-5), 3.43–3.32 (m, 2H, NHCOCH₂CO), 2.03, 2.02, 2.00, 1.91 (4s, 12H, CH₃), 1.55 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 172.5, 171.4, 170.8, 169.5, 169.3, 165.4, 164.5, 156.8 (8C, C=O), 144.0, 141.4, 139.8, 132.9, 127.8, 127.2, 125.3, 124.2, 122.8, 120.1, 119.6 (11C, arom. C), 81.7 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 80.0 (C-1), 73.7 (C-5), 72.9 (C-3), 68.2 (C-4), 67.1 (1C, Fmoc-CH₂), 61.9 (C-6), 52.9 (C-2), 47.3 (1C, Fmoc-CH), 44.8 (1C, Benzol-CH₂), 44.4 (1C, NHCOCH₂CO), 28.2 (3C, CO₂C(CH₃)₃), 28.2, 23.1, 20.8, 20.7 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₄₄H₅₀N₄O₁₄Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 881.321573; gef.: *m/z* 881.320928; Anal. ber. für C₄₄H₅₀N₄O₁₄(858.89): C 61.53; H 5.87; N 6.52; gef.: C 61.22; H 5.86; N 6.36.

3-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[N-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester (1d**)**

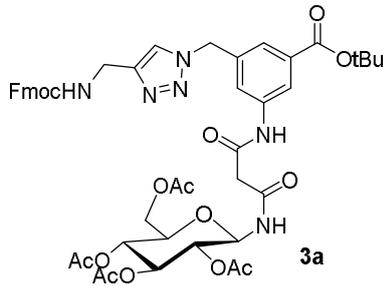


Darstellung nach **AAV1 (Variante A)**.

255 mg **28d** (0.57 mmol; 1.3 äq.), 109 mg EDCI·HCl (0.57 mmol; 1.3 äq.), 77 mg HOBt (0.57 mmol; 1.3 äq.), 0.29 ml DIPEA (1.70 mmol; 3.9 äq.) und 194 mg **7** (0.44 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 15 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 200:1→50:1) 228 mg **1d** (0.27 mmol; 61%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.21 (CHCl₃/MeOH 100:1); [α]_D²⁰: -15.0 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.58 (s, 1H, Benzol-NH), 7.97 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 8.1 Hz, H-1NHCOCH₂), 7.82 (s, 1H, arom. H), 7.74–7.69 (m, 3H, arom. H), 7.59–7.54 (m, 2H, arom. H), 7.37 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.28–7.25 (m, 3H, arom. H), 6.86 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, NH), 5.67 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, CONHCH₂), 5.38 (d, 1H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 3.0 Hz, H-4), 5.20–5.14 (m, 2H, H-1, H-3), 4.45–4.27 (m, 5H, H-2, Fmoc-CH₂, Benzol-CH₂), 4.20 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, Fmoc-CH), 4.14–3.98 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 3.48–3.32 (m, 2H, NHCOCH₂CO), 2.13, 2.00, 2.98, 2.93 (4s, 12H, CH₃), 1.54 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 171.0, 170.5, 170.3, 169.2, 165.5, 164.4, 156.7 (8C, C=O), 144.0, 141.4, 139.7, 138.5, 132.8, 132.7, 127.8, 127.2, 125.2, 124.2, 122.9, 120.1, 119.6 (13C, arom. C), 81.8 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 80.7 (C-1), 72.4 (C-5), 70.6 (C-3), 67.1 (1C, Fmoc-CH₂), 66.6 (C-4), 61.4 (C-6), 49.3 (C-2), 47.3 (1C, Fmoc-CH), 44.9 (1C, Benzol-CH₂), 44.8 (1C, NHCOCH₂CO), 28.2 (3C, CO₂C(CH₃)₃), 23.2, 20.8, 20.7 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₄₄H₅₀N₄O₁₄Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 881.321573; gef.: *m/z* 881.322324; Anal. ber. für C₄₄H₅₀N₄O₁₄(858.89): C 61.53; H 5.87; N 6.52; gef.: C 61.15; H 5.82; N 6.14.

3-{{4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester (3a)

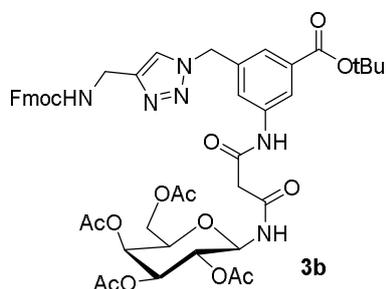


Darstellung nach **AAV1 (Variante A)**.

126 mg **28a** (0.29 mmol; 1.3 äq.), 55 mg EDCI·HCl (0.29 mmol; 1.3 äq.), 40 mg HOBt (0.29 mmol; 1.3 äq.), 0.15 ml DIPEA (0.88 mmol; 3.9 äq.) und 118 mg **8** (0.22 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 15 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1→50:1) 130 mg **3a** (0.14 mmol; 62%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.28 (CHCl₃/MeOH 50:1); [α]_D²⁰: -0.3 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.8 (s, 1H, Benzol-NH), 8.12–8.06 (m, 2H, arom. H), 7.81–7.70 (m, 3H, arom. H), 7.62 (s, 1H, H-1NHCOCH₂), 7.55–7.51 (m, 3H, arom. H), 7.34 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.22 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 6.05 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, CONHCH₂), 5.47–5.30 (m, 4H, Triazol-CH₂, H-1, H-3), 5.11–5.03 (m, 2H, H-4, H-2), 4.40 (d, 2H, *J* = 5.7 Hz, Fmoc-CH₂), 4.32 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, Benzol-CH₂), 4.25 (dd, 1H, *J*_{5,6a} = 4.2 Hz, *J*_{6a,6b} = 12.5 Hz, H-6a), 4.13 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, Fmoc-CH), 4.08–4.05 (m, 1H, H-6b), 3.89–3.87 (m, 1H, H-5), 3.40 (s, 2H, NHCOCH₂CO), 2.01 (s, 6H, CH₃), 1.99 (s, 3H, CH₃), 1.96 (s, 3H, CH₃), 1.55 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 170.7, 170.6, 170.1, 169.6, 168.4, 165.2, 164.7, 156.7 (8C, C=O), 145.8, 143.9, 141.3, 138.8, 135.6, 133.6, 127.8, 127.1, 125.2, 124.8, 123.2, 122.7, 121.1, 120.0 (14C, arom. C), 82.0 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 78.1 (C-1), 73.7 (C-3), 73.0 (C-5), 70.5 (C-2), 68.1 (C-4), 66.9 (1C, Fmoc-CH₂), 61.7 (C-6), 53.8 (1C, Triazol-CH₂), 47.2 (1C, Fmoc-CH), 43.6 (1C, NHCOCH₂CO), 36.4 (1C, Benzol-CH₂), 28.2 (3C, CO₂C(CH₃)₃), 20.8, 20.7 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₄₇H₅₂N₆O₁₅Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 963.338286; gef.: *m/z* 963.338667.

3-{{4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}methyl}-5-[N-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-tert-butylester (3b)

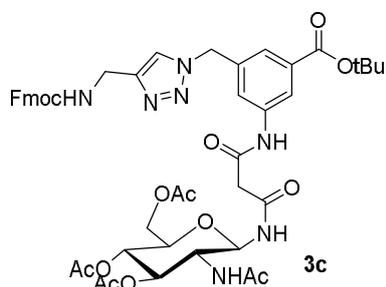


Darstellung nach AAV1 (Variante A).

167 mg **28b** (0.39 mmol; 1.3 äq.), 74 mg EDCI·HCl (0.39 mmol; 1.3 äq.), 53 mg HOBt (0.39 mmol; 1.3 äq.), 0.20 ml DIPEA (1.16 mmol; 3.9 äq.) und 156 mg **8** (0.29 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 15 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1→50:1) 126 mg **3b** (0.13 mmol; 45%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.27 (CHCl₃/MeOH 50:1); [α]_D²⁰: +2.5 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.76 (s, 1H, Benzol-NH), 8.18 (s, 1H, arom. H), 7.91 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 8.9 Hz, H-1NHCOCH₂), 7.77 (s, 1H, arom. H), 7.72 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, arom. H), 7.65 (s, 1H, arom. H), 7.55–7.53 (m, 3H, arom. H), 7.36 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.24 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, arom. H), 5.94 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, CONHCH₂), 5.49 (s, 2H, Triazol-CH₂), 5.45–5.44 (m, 1H, H-4), 5.34–5.29 (m, 1H, H-1), 5.24–5.16 (m, 2H, H-3, H-2), 4.42 (d, 2H, *J* = 5.7 Hz, Fmoc-CH₂), 4.34 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, Benzol-CH₂), 4.17–4.03 (m, 4H, Fmoc-CH, H-6a, H-6b, H-5), 3.40 (s, 2H, NHCOCH₂CO), 2.13, 1.99, 1.98 (3 s, 12H, CH₃), 1.57 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 170.9, 170.5, 170.2, 170.0, 168.2, 156.6 (8C, C=O), 145.8, 143.9, 141.4, 138.9, 133.7, 127.8, 127.1, 125.2, 124.8, 123.3, 122.7, 121.3, 120.1 (13C, arom. C), 82.1 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 78.5 (C-1), 72.5 (C-5), 71.0 (C-3), 68.2 (C-2), 67.3 (C-4), 67.0 (1C, Fmoc-CH₂), 61.3 (C-6), 53.9 (1C, Triazol-CH₂), 47.3 (1C, Fmoc-CH), 43.5 (1C, COCH₂CO), 36.5 (1C, Benzol-CH₂), 28.2 (3C, CO₂C(CH₃)₃), 20.8, 20.7, 20.6 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₄₇H₅₂N₆O₁₅Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 963.338286; gef.: *m/z* 963.337953.

3-{{4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl}-5-[N-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-tert-butylester (3c)

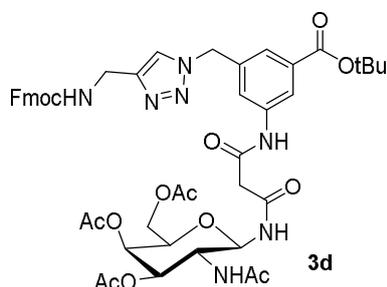


Darstellung nach AAV1 (Variante A).

97 mg **28c** (0.23 mmol; 1.3 äq.), 43 mg EDCI·HCl (0.23 mmol; 1.3 äq.), 31 mg HOBt (0.23 mmol; 1.3 äq.), 0.11 ml DIPEA (0.67 mmol; 3.9 äq.) und 91 mg **8** (0.17 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 15 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1→50:1) 108 mg **3c** (0.11 mmol; 67%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.19 (CHCl₃/MeOH 50:1); [α]_D²⁰: -15.6 (c 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.82 (s, 1H, Benzol-NH), 8.13 (s, 1H, arom. H), 8.02 (d, 1H, J_{1,NH} = 8.0 Hz, H-1NHCOCH₂), 7.72 (d, 2H, J = 7.6 Hz, arom. H), 7.57–7.53 (m, 2H, arom. H), 7.47 (s, 1H, arom. H), 7.36 (t, 2H, J = 7.5 Hz, arom. H), 7.32 (s, 1H, NH), 7.23 (t, 2H, J = 7.5 Hz, arom. H), 6.17 (s, 1H, CONHCH₂), 5.51–5.33 (m, 3 H, Triazol-CH₂, H-3), 5.22 (t, 1H, J_{1,NH} = 8.0 Hz, H-1), 5.10 (t, 1H, J_{3,4} = 9.7 Hz, H-4), 4.50–4.38 (m, 2H, Benzol-CH₂), 4.34–4.27 (m, 3H, Fmoc-CH₂, H-2), 4.24 (dd, 1H, J_{5,6a} = 4.16 Hz, J_{6a,6b} = 12.5 Hz, H-6a), 4.16 (t, 1H, J = 7.1 Hz, Fmoc-CH), 4.09–4.06 (m, 1H, H-6b), 3.84–3.81 (m, 1H, H-5), 3.41–3.26 (m, 2H, NHCOCH₂CO), 2.05, 2.03, 2.01, 1.98 (4s, 12H, CH₃), 1.56 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 173.1, 171.5, 170.8, 168.5, 169.4, 164.8, 164.4, 156.7 (8C, C=O), 145.7, 143.9, 141.4, 139.2, 135.5, 133.2, 133.1, 127.8, 127.1, 125.2, 124.0, 122.9, 122.3, 120.1 (14C, arom. C), 81.9 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 80.3 (C-1), 73.6 (C-5), 72.8 (C-3), 68.4 (C-4), 67.0 (1C, Fmoc-CH₂), 61.9 (C-6), 53.8 (1C, Triazol-CH₂), 52.8 (C-2), 47.3 (1C, Fmoc-CH), 45.1 (1C, NHCOCH₂CO), 36.4 (1C, Benzol-CH₂), 28.3 (3C, CO₂C(CH₃)₃), 23.2, 20.9, 20.8, 20.7 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₄₇H₅₃N₇O₁₄Na [M+Na]⁺: ber.: m/z 962.354271; gef.: m/z 962.353677.

3-{{4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl}-5-[N-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-tert-butylester (3d)

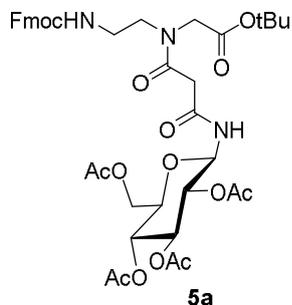


Darstellung nach AAV1 (Variante A).

107 mg **28d** (0.25 mmol; 1.3 äq.), 47 mg EDCI·HCl (0.25 mmol; 1.3 äq.), 34 mg HOBt (0.25 mmol; 1.3 äq.), 0.13 ml DIPEA (0.74 mmol; 3.9 äq.) und 100 mg **8** (0.19 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 15 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1→25:1) 117 mg **3d** (0.12 mmol; 65%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.20 (CHCl₃/MeOH 50:1); [α]_D²⁰: -17.6 (c 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.87 (s, 1H, Benzol-NH), 8.22 (s, 1H, arom. H), 7.95 (d, 1H, J_{1,NH} = 9.4 Hz, H-1NHCOCH₂), 7.74–7.72 (m, 2H, arom. H), 7.56–7.54 (m, 3H, arom. H), 7.46–7.42 (m, 2H, arom. H, NH), 7.36 (t, 2H, J = 7.4 Hz, arom. H), 7.24 (t, 2H, J = 7.4 Hz, arom. H), 7.05 (s, 1H, arom. H), 6.15 (t, 1H, J = 5.6 Hz, CONHCH₂), 5.55–5.43 (m, 3H, Triazol-CH₂, H-3, H-4), 5.29–5.25 (m, 1 H, Triazol-CH₂), 5.14 (dd, 1H, J_{1,2} = 8.2 Hz, J_{1,NH} = 9.4 Hz, H-1), 4.55–4.30 (m, 5 H, H-2, Benzol-CH₂, Fmoc-CH₂), 4.18–4.02 (m, 4H, Fmoc-CH, H-6a, H-6b, H-5), 3.47–3.22 (m, 2H, NHCOCH₂CO), 2.16, 2.09, 2.03, 1.96 (4s, 12H, CH₃), 1.58 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 173.9, 171.1, 170.6, 170.4, 169.8, 164.9, 164.2, 156.7 (8C, C=O), 145.9, 140.0, 143.9, 141.4, 139.4, 133.0, 132.0, 127.8, 127.1, 125.2, 123.7, 122.8, 120.1 (13C, arom. C), 81.8 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 81.1 (C-1), 72.4 (C-5), 70.5 (C-3), 67.0 (1C, Fmoc-CH₂), 66.7 (C-4), 61.5 (C-6), 53.8 (1C, Triazol-CH₂), 49.0 (C-2), 47.3 (1C, Fmoc-CH), 45.8 (1C, Benzol-CH₂), 28.3 (3C, CO₂C(CH₃)₃), 23.4, 20.9, 20.8, 20.7 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₄₇H₅₃N₇O₁₄Na [M+Na]⁺: ber.: m/z 962.354271; gef.: m/z 962.354687.

4.4.4 PEPTIDKUPPLUNG MIT DEM ALIPHATISCHEN RÜCKGRAT

***tert*-Butyl-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonyl]-*N*-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat (**5a**)**

Darstellung nach AAV1 (Variante A).

Amidkupplung unter Verwendung von HBTU, HOBt und DIPEA:

100 mg **28a** (0.23 mmol; 1 äq.), 131 mg HBTU (0.35 mmol; 1.5 äq.), 47 mg HOBt (0.35 mmol; 1.5 äq.), 0.12 ml DIPEA (0.69 mmol; 3 äq.) und 100 mg **20** (0.23 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 72 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:3) 149 mg **5a** (0.18 mmol; 79%), [Lit.^[267]: 57%] als weißen, amorphen Feststoff.

Amidkupplung unter Verwendung von EDCI-HCl, HOBt und DIPEA:

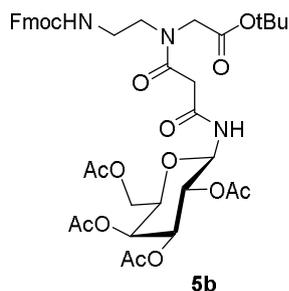
144 mg **28a** (0.33 mmol; 1.3 äq.), 64 mg EDCI-HCl (0.33 mmol; 1.3 äq.), 45 mg HOBt (0.33 mmol; 1.3 äq.), 0.17 ml DIPEA (0.99 mmol; 3.9 äq.) und 111 mg **20** (0.26 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 72 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 200:1→50:1) 83 mg **5a** (0.10 mmol; 40%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.36 (PE/EE 1:3); [α]_D²⁰: +0.6 (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H-NMR (CDCl₃): δ 8.19 (d, 0.5H, *J*_{1,NH} = 9.1 Hz, H-1NHC₂ *trans*-Rotamer), 7.99 (d, 0.5H, *J*_{1,NH} = 9.0 Hz, H-1NHC₂ *cis*-Rotamer), 7.77–7.75 (m, 2H, arom. H), 7.61–7.58 (m, 2H, arom. H), 7.42–7.38 (m, 2H, arom. H), 7.33–7.29 (m, 2H, arom. H), 5.74, 5.45 (t, t, 1H, *J*_a = 5.9 Hz, *J*_b = 5.7 Hz, CONHCH₂ *cis*-/*trans*-Rotamer), 5.28–5.22 (m, 2H, H-1, H-3), 5.09–4.97 (m, 2H, H-4, H-2), 4.44–4.39 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.26–4.18 (m, 2H, H-6a, Fmoc-CH), 4.09–4.03 (m, 1H, H-6b), 3.98–3.89 (m, 2H, NCH₂CO₂C(CH₃)₃), 3.80–3.72 (m, 1H, H-5), 3.54–3.46 (m, 2H, NHCH₂CH₂N), 3.40–3.16 (m, 4H, COCH₂CO), 2.05–2.00 (7s, 12H, CH₃), 1.48–1.47 (2s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 170.1, 169.6, 168.9, 168.3, 168.1, 166.9, 166.6 (7C, C=O), 156.8, 156.7 (Fmoc-C=O *cis*-/*trans*-Rotamer), 144.0, 143.9, 141.4, 127.8, 127.8, 127.2, 125.1, 120.1 (8C, arom. C), 83.6, 82.7 (2C, CO₂C(CH₃)₃ *cis*-/*trans*-Rotamer), 78.0 (C-1), 73.7, 73.6 (2C, C-5 *cis*-/*trans*-Rotamer), 73.1, 72.9 (2C, C-3 *cis*-/*trans*-Rotamer), 70.4, 70.3 (2C, C-4 *cis*-/*trans*-Rotamer), 68.2 (C-2), 66.9, 66.8 (2C, Fmoc-CH₂ *cis*-/*trans*-Rotamer), 61.7, 60.5 (2C, C-6 *cis*-/*trans*-Rotamer), 52.3, 50.0 (2C, NCH₂CO₂C(CH₃)₃ *cis*-/*trans*-Rotamer), 48.9 (1C, COCH₂CO), 47.3 (1C, Fmoc-CH),

40.5, 40.2, 39.0, 38.7 (4C, NHCH₂CH₂N *cis*-/*trans*-Rotamer), 28.1, 28.1 (6C, CO₂C(CH₃)₃ *cis*-/*trans*-Rotamer), 21.1, 20.8, 20.7, 20.7 (4C, CH₃). ESI-TOF-MS C₄₀H₄₉N₃O₁₅ [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 834.305589; gef.: *m/z* 834.305244.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[267] überein.

***tert*-Butyl-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonyl]-*N*-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat (**5b**)**



Darstellung nach AAV1 (Variante A).

Amidkupplung unter Verwendung von HBTU, HOBt und DIPEA:

100 mg **28b** (0.23 mmol; 1 äq.), 131 mg HBTU (0.35 mmol; 1.5 äq.), 47 mg HOBt (0.35 mmol; 1.5 äq.), 0.12 ml DIPEA (0.69 mmol; 3 äq.) und 100 mg **20** (0.23 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 72 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:3) 148 mg **5b** (0.18 mmol; 79%) als weißen, amorphen Feststoff.

Amidkupplung unter Verwendung von EDCI-HCl, HOBt und DIPEA:

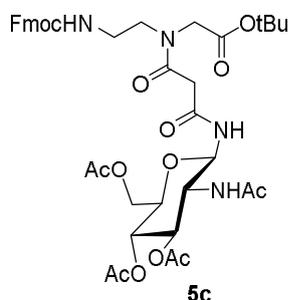
130 mg **28b** (0.30 mmol; 1.3 äq.), 58 mg EDCI-HCl (0.30 mmol; 1.3 äq.), 41 mg HOBt (0.30 mmol; 1.3 äq.), 0.15 ml DIPEA (0.89 mmol; 3.9 äq.) und 100 mg **20** (0.23 mmol; 1 äq.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 72 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1) 87 mg **5b** (0.11 mmol; 47%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.21 (PE/EE 1:3); [α]_D²⁰: +7.0 (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H-NMR (CDCl₃): δ 8.26 (d, 0.5H, *J*_{1,NH} = 8.6 Hz, H-1NHCOCH₂ *trans*-Rotamer), 7.99 (d, 0.5H, *J*_{1,NH} = 8.4 Hz, H-1NHCOCH₂ *cis*-Rotamer), 7.77–7.75 (m, 2H, arom. H), 7.62–7.58 (m, 2H, arom. H), 7.41–7.37 (m, 2H, arom. H), 7.34–7.29 (m, 2H, arom. H), 5.76, 5.50 (t, t, 1H, *J*_a = 6.0 Hz, *J*_b = 5.5 Hz, CONHCH₂ *cis*-/*trans*-Rotamer), 5.40 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 3.3 Hz, *J*_{4,5} = 11.6 Hz, H-4), 5.26–5.16 (m, 2H, H-1, H-2), 5.11–5.05 (m, 1H, H-3), 4.44–4.39 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.23–4.19 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.13–3.90 (m, 5H, H-6a, H-6b, NCH₂CO₂C(CH₃)₃, H-5), 3.56–2.83 (m, 6H, NHCH₂CH₂N, COCH₂CO), 2.14–1.97 (10s, 12H, CH₃), 1.48–1.47 (2s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 170.8, 170.6, 170.5, 170.3, 170.2, 170.0, 169.1, 168.9, 168.3, 168.2, 166.6, 166.4 (12C, C=O), 156.8, 156.7 (2C, Fmoc-C=O *cis*-/*trans*-Rotamer), 144.1, 144.0, 143.9, 141.4, 127.9, 127.8, 127.2, 127.1, 125.2, 125.1, 120.1 (11C, arom. C), 83.7, 82.8 (2C,

CO₂C(CH₃)₃ *cis*-/*trans*-Rotamer), 78.4 (C-1), 72.5, 72.4 (2C, C-5 *cis*-/*trans*-Rotamer), 71.3, 71.2 (2C, C-3 *cis*-/*trans*-Rotamer), 68.2, 68.1 (2C, C-2 *cis*-/*trans*-Rotamer), 67.3, 67.2 (2C, C-4 *cis*-/*trans*-Rotamer), 67.0, 66.8 (2C, Fmoc-CH₂ *cis*-/*trans*-Rotamer), 61.4 (C-6), 52.4, 49.2 (2C, NCH₂CO₂C(CH₃)₃ *cis*-/*trans*-Rotamer), 49.22 (1C, NHCH₂CH₂), 47.4, 47.3 (2C, Fmoc-CH, *cis*-/*trans*-Rotamer), 40.4, 40.2 (2C, COCH₂CO *cis*-/*trans*-Rotamer), 39.6, 39.2 (2C, NHCH₂CH₂ *cis*-/*trans*-Rotamer), 28.2, 28.1 (6C, CO₂C(CH₃)₃, *cis*-/*trans*-Rotamer), 20.8, 20.7, 20.6 (3C, CH₃). FT-ICR-MS C₄₀H₄₉N₃O₁₅ [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 834.305589; gef.: *m/z* 834.304890.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[267] überein.

***tert*-Butyl-[*N*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylamino)-malonyl]-*N*-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat (**5c**)**



Darstellung nach AAV1 (Variante A).

Amidkupplung unter Verwendung von HBTU, HOBt und DIPEA:

100 mg **28c** (0.23 mmol; 1 äq.), 131 mg HBTU (0.35 mmol; 1.5 äq.), 47 mg HOBt (0.35 mmol; 1.5 äq.), 0.12 ml DIPEA (0.69 mmol; 3 äq.) und 100 mg **20** (0.23 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 72 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1→50:1) 141 mg **5c** (0.17 mmol; 75%), [Lit.^[267]: 33%] als weißen, amorphen Feststoff.

Amidkupplung unter Verwendung von EDCI-HCl, HOBt und DIPEA:

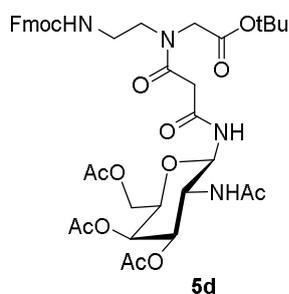
130 mg **28c** (0.30 mmol; 1.3 äq.), 58 mg EDCI-HCl (0.30 mmol; 1.3 äq.), 41 mg HOBt (0.30 mmol; 1.3 äq.), 0.15 ml DIPEA (0.89 mmol; 3.9 äq.) und 100 mg **20** (0.23 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 72 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1→50:1) 106 mg **5c** (0.13 mmol; 57%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.61 (CHCl₃/MeOH 25:1); [α]_D²⁰: -0.7 (c 1.0, CHCl₃). ¹H-NMR (CDCl₃): δ 7.82 (d, 0.5H, J_{1,NH} = 8.4 Hz, H-1NHCOCH₂ *trans*-Rotamer), 7.53 (d, 0.5H, J_{1,NH} = 8.3 Hz H-1NHCOCH₂ *cis*-Rotamer), 7.76–7.74 (m, 2H, arom. H), 7.64–7.58 (m, 2H, arom. H), 7.41–7.37 (m, 2H, arom. H), 7.32–7.28 (m, 2H, arom. H), 7.11, 6.54–6.50 (d, m, 1H, J_a = 8.8 Hz, NH *cis*-/*trans*-Rotamer), 6.54–6.50, 5.99 (m, t,

1H, $J_b = 5.4$ Hz, CONHCH₂ *cis-/trans*-Rotamer), 5.49, 5.28–5.20 (t, m, 1H, $J_a = 9.9$ Hz, H-3 *cis-/trans*-Rotamer), 5.39 (t, 0.5H, $J = 9.0$ Hz, H-1 *cis*-Rotamer), 5.28–5.20 (m, 0.5H, H-1 *trans*-Rotamer), 5.07, 4.96 (t, t, 1H, $J_a = 9.7$ Hz, $J_b = 9.5$ Hz, H-4 *cis-/trans*-Rotamer), 4.63–4.35 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.27–3.99 (m, 5H, Fmoc-CH, H-6a, H-2, H-6b, H-5), 3.89–3.80 (m, 2H, NCH₂CO₂C(CH₃)₃), 3.55–2.96 (m, 6H, NHCH₂CH₂, COCH₂CO), 2.05–1.90 (7s, 12H, CH₃), 1.47–1.43 (2s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 173.2, 172.4, 171.5, 171.2, 170.8, 169.6, 169.5, 168.8, 168.5, 168.3, 168.1, 167.3, 167.1, 156.8 (14C, C=O), 144.0, 143.8, 141.4, 127.9, 127.8, 127.2, 127.1, 125.3, 125.2, 120.1, 120.0 (11C, arom. C), 83.5, 82.4 (2C, CO₂C(CH₃)₃ *cis-/trans*-Rotamer), 80.1, 79.94 (2C, C-1 *cis-/trans*-Rotamer), 73.4, 73.0 (2C, C-5 *cis-/trans*-Rotamer), 72.7, 72.3 (2C, C-3 *cis-/trans*-Rotamer), 68.7, 68.3 (2C, C-4 *cis-/trans*-Rotamer), 67.1, 66.6 (2C, Fmoc-CH₂ *cis-/trans*-Rotamer), 62.0, 61.9 (2C, C-6 *cis-/trans*-Rotamer), 53.0, 52.6 (2C, C-2 *cis-/trans*-Rotamer), 49.9, 49.6 (2C, NCH₂CO₂C(CH₃)₃ *cis-/trans*-Rotamer), 47.4, 47.3 (2C, Fmoc-CH *cis-/trans*-Rotamer), 41.8, 41.7 (2C, COCH₂CO *cis-/trans*-Rotamer) 39.6, 39.0 (2C, NHCH₂CH₂), 28.1 (3C, CO₂C(CH₃)₃), 23.0, 22.9, 20.8, 20.7, 20.6 (5C, CH₃); FT-ICR-MS C₄₀H₅₀N₄O₁₄ [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 833.321573; gef.: *m/z* 833.321147.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[267] überein.

***tert*-Butyl-[*N*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-β-*D*-galactopyranosylamino)-malonyl]-*N*-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat (**5d**)**



Darstellung nach AAV1 (Variante A).

Amidkupplung unter Verwendung von HBTU, HOBt und DIPEA:

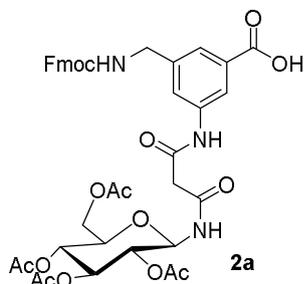
100 mg **28d** (0.23 mmol; 1 äq.), 131 mg HBTU (0.35 mmol; 1.5 äq.), 47 mg HOBt (0.35 mmol; 1.5 äq.), 0.12 ml DIPEA (0.69 mmol; 3 äq.) und 100 mg **20** (0.23 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 72 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1→50:1) 145 mg **5d** (0.18 mmol; 77%) als weißen, amorphen Feststoff.

Amidkupplung unter Verwendung von EDCI-HCl, HOBt und DIPEA:

130 mg **28d** (0.30 mmol; 1.3 äq.), 58 mg EDCI-HCl (0.30 mmol; 1.3 äq.), 41 mg HOBt (0.30 mmol; 1.3 äq.), 0.15 ml DIPEA (0.89 mmol; 3.9 äq.) und 100 mg **20** (0.23 mmol; 1 äq.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 72 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1→50:1) 78 mg **5d** (0.10 mmol; 42%) als weißen, amorphen Feststoff.

R_f: 0.50 (CHCl₃/MeOH 25:1); [α]_D²⁰: -5.7 (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H-NMR (CDCl₃): δ 7.87 (d, 0.5H, *J*_{1,NH} = 8.3 Hz, H-1NHCOCH₂ *trans*-Rotamer), 7.71 (d, 0.5H, *J*_{1,NH} = 7.4 Hz, H-1NHCOCH₂ *cis*-Rotamer), 7.88–7.86 (m, 2H, arom. H), 7.61–7.56 (m, 2H, arom. H), 7.40–7.36 (m, 2H, arom. H), 7.33–7.30 (m, 2H, arom. H), 7.33–7.30, 6.64 (m, d, 1H, *J*_b = 8.9 Hz, NH *cis*-/*trans*-Rotamer), 6.73, 6.09 (s, s, 1H, CONHCH₂ *cis*-/*trans*-Rotamer), 5.58 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 2.7 Hz, *J*_{4,5} = 11.0 Hz, H-4), 5.43 (t, 0.5H, *J* = 8.8 Hz, H-1 *cis*-Rotamer), 5.36–5.25 (m, 1H, H-3), 5.21 (t, 0.5H, *J* = 9.9 Hz, H-1 *trans*-Rotamer), 4.64–2.88 (m, 15H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, H-6a, H-2, H-6b, H-5, NCH₂CO₂C(CH₃)₃, NCH₂CH₂, COCH₂CO), 2.11–1.78 (6s, 12 H, CH₃), 1.47–1.43 (2s, 9 H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 173.7, 171.0, 170.8, 170.5, 170.4, 170.3, 169.0, 168.9, 168.3, 167.7, 167.3, 167.1, 156.9 (13C, C=O), 144.5, 144.0, 143.6, 141.4, 141.3, 127.9, 127.8, 127.3, 127.2, 125.6, 125.2, 120.1, 120.0 (13C, arom. C), 83.6, 82.4 (2C, CO₂C(CH₃)₃ *cis*-/*trans*-Rotamer), 80.6, 80.4 (2C, C-1 *cis*-/*trans*-Rotamer), 72.2, 71.9 (2C, C-5 *cis*-/*trans*-Rotamer), 70.4, 69.8 (2C, C-4 *cis*-/*trans*-Rotamer), 67.4, 66.9 (2C, Fmoc-CH₂ *cis*-/*trans*-Rotamer), 66.8, 66.7 (2C, C-3 *cis*-/*trans*-Rotamer), 61.5, 61.4 (2C, C-6 *cis*-/*trans*-Rotamer), 49.7, 49.6, (NHCH₂CH₂), 49.4, 49.2 (2C, C-2 *cis*-/*trans*-Rotamer), 47.4, 47.0 (2C, Fmoc-CH, *cis*-/*trans*-Rotamer), 41.7 (1C, COCH₂CO), 39.5 (1C, NCH₂CO₂C(CH₃)₃), 28.1 (3C, CO₂C(CH₃)₃), 23.1, 20.9, 20.8, 20.7, 20.3 (5C, CH₃); FT-ICR-MS C₄₀H₅₀N₄O₁₄ [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 833.321573; gef.: *m/z* 833.321729.

Die Signale der ¹H-NMR- bzw. ¹³C-NMR-Spektren können vertauscht sein.

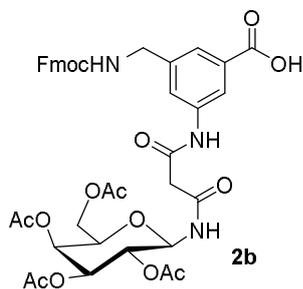
4.4.5 ENTSCHÜTZUNG DER *TERT*-BUTYLESTER DER KOHLENHYDRAT-BAUSTEINE**3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure (2a)**

Darstellung nach AAV 2.

87 mg **1a** (0.10 mmol; 1 äq.) in 3 ml HCO₂H/DCM (abs.) liefern nach 14 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/Aceton 1:1 → PE/Aceton 1:1 + 1% HCO₂H) 77 mg **2a** (0.09 mmol; 95%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.29 (PE/Aceton 1:1 + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: +8.5 (*c* 1.0, DMSO); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 13.01 (s, 1H, CO₂H), 10.31 (s, 1H, Benzol-NH), 8.89 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 9.2 Hz, H-1NHCOCH₂), 8.14 (s, 1H, arom. H), 7.98 (s, 1H, CONHCH₂), 7.88 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, arom. H), 7.69 (s, 3H, arom. H), 7.59 (s, 1H, arom. H), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, arom. H), 7.32 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, arom. H), 5.45–5.34 (m, 2H, H-1, H-3), 4.94–4.83 (m, 2H, H-4, H-2), 4.32–4.11 (m, 7H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, Benzol-CH₂, H-6a, H-5), 3.99 (d, 1H, *J*_{6a,6b} = 11.5 Hz, H-6b), 3.30 (s, 2H, NHCOCH₂CO), 2.00 (s, 6H, CH₃), 1.96, 1.93 (2s, 6H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 170.0, 169.5, 169.4, 169.2, 167.2, 167.0, 165.3, 156.4 (8C, C=O), 143.9, 140.9, 140.7, 139.1, 131.6, 127.6, 127.1, 125.2, 123.0, 121.8, 120.1, 118.5 (12C, arom. C), 76.9 (C-1), 72.8 (C-3), 72.2 (C-5), 70.6 (C-2), 67.9 (C-4), 65.6 (1C, Fmoc-CH₂), 61.8 (C-6), 46.7 (1C, Fmoc-CH), 44.7 (1C, Benzol-CH₂), 43.7 (1C, NHCOCH₂CO), 20.6, 20.4, 20.3 (4C, CH₃); ESI-TOF-MS C₄₀H₄₁N₃O₁₅Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 826.24299; gef.: *m/z* 826.24282; Anal. ber. für C₄₀H₄₁N₃O₁₅(803.76): C 59.77; H 5.23; N 5.23; gef.: C 59.51; H 5.16; N 4.82.

3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure (2b**)**

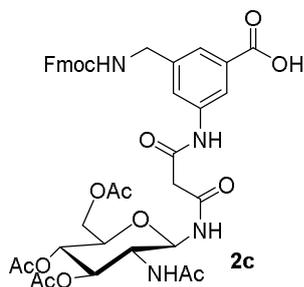


Darstellung nach AAV 2.

152 mg **1b** (0.18 mmol; 1 äq.) in 6 ml HCO₂H/DCM (abs.) liefern nach 14 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃ + 1% HCO₂H) 126 mg **2b** (0.16 mmol; 90%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.45 (CHCl₃ + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: -6.8 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 12.97 (s, 1H, CO₂H), 10.26 (s, 1H, Benzol-NH), 8.93 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 9.6 Hz, H-1NHCOCH₂), 8.14 (s, 1H, arom. H), 7.99 (t, 1H, *J* = 6.1 Hz, CONHCH₂), 7.89 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, arom. H), 7.70–7.68 (m, 3H, arom. H), 7.58 (s, 1H, arom. H), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.32 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, arom. H), 5.38 (t, 1H, *J*_{1,NH} = 9.5 Hz, H-1), 5.31–5.28 (m, 2H, H-3, H-4), 5.06–5.01 (m, 1H, H-2), 4.35–4.30 (m, 3H, H-5, Fmoc-CH₂), 4.25–4.20 (m, 3H, Fmoc-CH, Benzol-CH₂), 4.04 (dd, 1H, *J*_{5,6a} = 5.6 Hz, *J*_{6a,6b} = 11.3 Hz, H-6a), 3.97 (dd, 1H, *J*_{5,6b} = 6.8 Hz, *J*_{6a,6b} = 11.3 Hz, H-6b), 3.32–3.24 (m, 2H, NHCOCH₂CO), 2.11, 1.99, 1.98, 1.91 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 170.0, 169.9, 169.5, 169.4, 167.1, 167.0, 165.3, 156.4 (8C, C=O), 143.9, 141.0, 140.7, 139.1, 131.3, 127.7, 127.1, 125.2, 123.0, 121.9, 120.1, 118.5 (12C, arom. C), 77.16 (C-1), 71.4 (C-5), 70.8 (C-3), 68.2 (C-2), 67.6 (C-4), 65.6 (1C, Fmoc-CH₂), 61.5 (C-6), 46.7 (1C, Fmoc-CH), 44.6 (1C, Benzol-CH₂), 43.7 (1C, NHCOCH₂CO), 20.6, 20.5, 20.4 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₄₀H₄₁N₃O₁₅Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 826.242989; gef.: *m/z* 826.242409; Anal. ber. für C₄₀H₄₁N₃O₁₅(803.76): C 59.77; H 5.23; N 5.23; gef.: C 59.33; H 5.19; N 4.87.

3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure (2c**)**

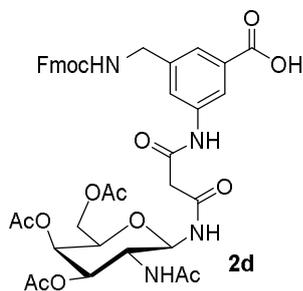


Darstellung nach AAV 2.

110 mg **1c** (0.13 mmol; 1 äq.) in 4.5 ml HCO₂H/DCM (abs.) liefern nach 14 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃ + 1% HCO₂H) 70 mg **2c** (0.09 mmol; 68%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.19 (CHCl₃ + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: +4.5 (c 1.0, DMSO); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 12.99 (s, 1H, CO₂H), 10.26 (s, 1H, Benzol-NH), 8.72 (d, 1H, *J*_{1,NH} = Hz, 9.2 Hz, H-1NHC₂O), 8.14 (s, 1H, arom. H), 8.00–7.95 (m, 2H, CONHCH₂, NH), 7.90 (s, 1H, arom. H), 7.88 (s, 1H, arom. H), 7.71–7.67 (m, 3H, arom. H), 7.58 (s, 1H, arom. H), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.32 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 5.18 (t, 1H, *J*_{1,NH} = 9.5 Hz, H-1), 5.11 (t, 1H, *J*_{3,4} = 9.8 Hz, H-3), 4.84 (t, 1H, *J*_{3,4} = 9.8 Hz, H-4), 4.31 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, Fmoc-CH₂), 4.25–4.16 (m, 4H, Fmoc-CH, Benzol-CH₂, H-6b), 3.98–3.90 (m, 2H, H-6b, H-2), 3.88–3.83 (m, 1H, H-5), 3.29 (s, 2H, NHC₂O), 2.00, 1.97, 1.91, 1.75 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 170.1, 169.6, 169.5, 169.4, 167.1, 167.1, 165.3, 156.4 (8C, C=O), 143.9, 141.0, 140.7, 139.1, 131.4, 127.7, 127.1, 125.2, 123.0, 121.9, 120.2, 118.5 (12C, arom. C), 78.1 (C-1), 73.3 (C-3), 72.3 (C-5), 68.4 (C-4), 65.6 (1C, Fmoc-CH₂), 61.8 (C-6), 52.0 (C-2), 46.7 (1C, Fmoc-CH), 44.64 (Benzol-CH₂), 43.7 (1C, NHC₂O), 22.6, 20.6, 20.4, 20.4 (4C, CH₃); ESI-TOF-MS C₄₀H₄₂N₄O₁₄Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 801.26248; gef.: *m/z* 801.26279.

3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure (2d**)**

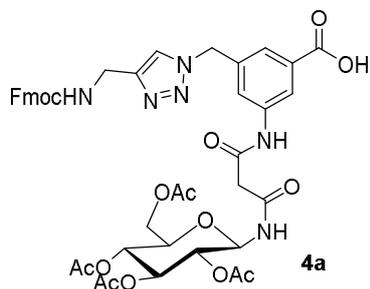


Darstellung nach AAV 2.

176 mg **1d** (0.20 mmol; 1 äq.) in 6 ml HCO₂H/DCM (abs.) liefern nach 14 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 50:1→CHCl₃/MeOH 10:1 + 1% HCO₂H) 155 mg **2d** (0.19 mmol; 94%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.37 (CHCl₃/MeOH 10:1 + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: +12.2 (*c* 1.0, DMSO); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 13.12 (s, 1H, CO₂H), 20.23 (s, 1H, Benzol-NH), 8.66 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 9.2 Hz, H-1NHCOCH₂), 8.12 (s, 1H, arom. H), 7.99 (t, 1H, *J* = 6.1 Hz, CONHCH₂), 7.94 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, NH), 7.90–7.88 (m, 2H, arom. H), 7.71–7.67 (m, 3H, arom. H), 7.58 (s, 1H, arom. H), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.32 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, arom. H), 5.27 (d, 1H, *J*_{3,4} = 3.3 Hz, H-4), 5.11 (t, 1H, *J*_{1,NH} = 9.5 Hz, H-1), 5.02 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 3.3 Hz, *J*_{2,3} = 11.2 Hz, H-3), 4.31 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, Fmoc-CH₂), 4.25–4.20 (m, 3H, Fmoc-CH, Benzol-CH₂), 4.13–3.94 (m, 4H, H-5, H-2, H-6a, H-6b), 3.28 (s, 2H, NHCOCH₂CO), 2.10, 1.98, 1.90, 1.77 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 170.0, 169.9, 169.6, 167.0, 165.3, 156.3 (8C, C=O), 143.9, 140.8, 140.7, 139.0, 127.6, 127.1, 125.2, 123.0, 121.6, 120.1, 118.6 (11C, arom. C), 78.9 (C-1), 71.4 (C-5), 70.8 (C-3), 66.7 (C-4), 65.6 (1C, Fmoc-CH₂), 61.7 (C-6), 48.2 (C-2), 46.7 (1C, Fmoc-CH), 44.6 (1C, NHCOCH₂CO), 43.7 (1C, Benzol-CH₂), 22.7, 20.6, 20.5, 20.4 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₄₀H₄₂N₄O₁₄Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 825.258973; gef.: *m/z* 825.258697.

3-{[4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[N-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure (4a)

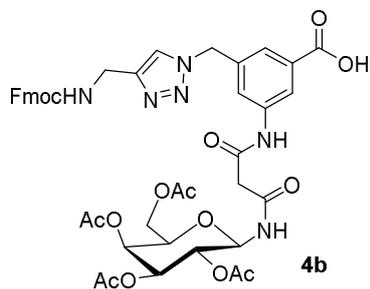


Darstellung nach AAV 2.

114 mg **3a** (0.12 mmol; 1 äq.) in 3 ml HCO₂H/DCM (abs.) liefern nach 14 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/Aceton 1:1→PE/Aceton 2:3 + 1% HCO₂H) 98 mg **4a** (0.11 mmol; 92%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.28 (PE/Aceton 2:3 + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: +4.0 (*c* 1.0, MeOH); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 10.33 (s, 1H, Benzol-NH), 8.87 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 9.5 Hz, H-1NHCOCH₂), 7.92 (s, 1H, arom. H), 7.88 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, arom. H), 7.83 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, CONHCH₂), 7.70–7.66 (m, 3H, arom. H), 7.62 (s, 1H, arom. H), 7.40 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, arom. H), 7.29 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz, arom. H), 5.62 (s, 1H, Triazol-CH₂), 5.43–5.33 (m, 2H, H-1, H-3), 4.92–4.81 (m, 2H, H-4, H-2), 4.30 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz, Fmoc-CH₂), 4.24–4.08 (m, 5H, Fmoc-CH, Benzol-CH₂, H-6a, H-5), 3.98 (d, 1H, *J*_{6a,6b} = 10.7 Hz, H-6b), 3.28 (s, 2H, NHCOCH₂CO), 2.00, 1.99, 1.95, 1.93 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 172.3, 171.6, 171.5, 171.3, 169.8, 168.7, 167.2, 158.7 (8C, C=O), 147.4, 145.2, 142.6, 140.6, 137.9, 133.4, 128.8, 128.1, 126.2, 125.7, 124.4, 124.3, 122.0, 120.9 (14C, arom. C), 79.0 (C-1), 74.7 (C-5), 74.6 (C-3), 71.9 (C-2), 69.6 (C-4), 67.8 (1C, Fmoc-CH₂), 63.1 (C-6), 54.5 (1C, Triazol-CH₂), 48.8 (1C, Fmoc-CH), 48.4 (1C, NHCOCH₂CO), 37.0 (Benzol-CH₂), 20.7, 20.6, 20.5 (4C, CH₃); ESI-TOF-MS C₄₃H₄₄N₆O₁₅Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 907.27569; gef.: 907.27724.

3-{[4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[N-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure (4b)

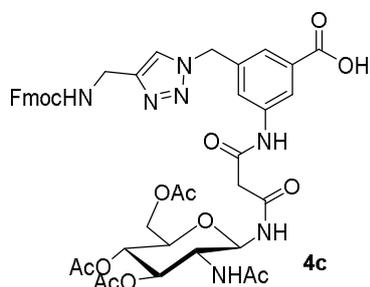


Darstellung nach AAV 2.

88 mg **3b** (0.09 mmol; 1 äq.) in 3 ml HCO₂H/DCM (abs.) liefern nach 14 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1 + 1% HCO₂H → CHCl₃/MeOH 50:1 + 1% HCO₂H) 70 mg **4b** (0.08 mmol; 84%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.33 (CHCl₃/MeOH 50:1 + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: +20.0 (*c* 1.0, DMSO); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 13.19 (s, 1H, CO₂H), 10.32 (s, 1H, Benzol-NH), 8.93 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 9.6 Hz, H-1NHC(=O)CH₂), 8.19 (s, 1H, arom. H), 7.92 (s, 1H, arom. H), 7.89–7.83 (m, 3H, arom. H, CONHCH₂), 7.71–7.62 (m, 3H, arom. H), 7.62 (s, 1H, arom. H), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.29 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 5.62 (s, 2H, Triazol-CH₂), 5.37 (t, 1H, *J*_{1,NH} = 9.4 Hz, H-1), 5.31–5.28 (m, 2H, H-3, H-4), 5.06–5.01 (m, 1H, H-2), 4.34–4.29 (m, 3H, H-5, Fmoc-CH₂), 4.24–4.19 (m, 3H, Fmoc-CH, Benzol-CH₂), 4.04 (dd, 1H, *J*_{6,6a} = 5.9 Hz, *J*_{6a,6b} = 11.4 Hz, H-6a), 3.97 (dd, 1H, *J*_{5,6b} = 6.8 Hz, *J*_{6a,6b} = 11.4 Hz, H-6b), 3.31–3.23 (m, 2H, NHC(=O)CH₂CO), 2.11, 1.99, 1.97, 1.91 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 169.9, 169.8, 169.5, 169.4, 166.9, 166.8, 165.4 (8C, C=O), 145.6, 143.9, 140.7, 139.5, 137.2, 127.6, 127.1, 125.2, 123.7, 122.9, 122.2, 120.1, 119.5 (13C, arom. C), 77.2 (C-1), 71.4 (C-5), 70.8 (C-3), 68.2 (C-2), 67.6 (C-4), 65.5 (1C, Fmoc-CH₂), 61.5 (C-6), 52.3 (1C, Triazol-CH₂), 46.7 (1C, Fmoc-CH), 44.6 (1C, NHC(=O)CH₂CO), 36.0 (1C, Benzol-CH₂), 20.6, 20.5, 20.4 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₄₃H₄₄N₆O₁₅Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 907.275686; gef.: *m/z* 907.275151.

3-{{4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl}-5-[*N*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure (4c)

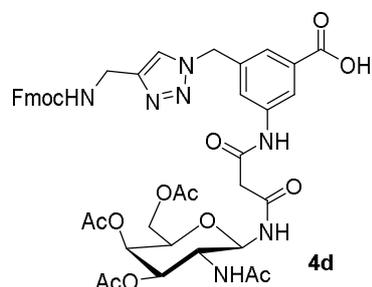


Darstellung nach AAV 2.

60 mg **3c** (0.06 mmol; 1 äq.) in 3 ml HCO₂H/DCM (abs.) liefern nach 14 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 30:1→CHCl₃/MeOH 10:1 + 1% HCO₂H) 52 mg **4c** (0.05 mmol; 91%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.24 (CHCl₃/MeOH 30:1 + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: +3.0 (*c* 1.0, DMSO); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 13.10 (s, 1H, CO₂H), 10.32 (s, 1H, Benzol-NH), 8.72 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 9.1 Hz, H-1NHCOCH₂), 8.21 (s, 1H, arom. H), 7.97–7.93 (m, 2H, arom. H, NH), 7.89–7.84 (m, 3H, arom. H, CONHCH₂), 7.71–7.67 (m, 3H, arom. H), 7.62 (s, 1H, arom. H), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.29 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 5.63 (s, 2H, Triazol-CH₂), 5.17 (t, 1H, *J*_{1,NH} = 9.5 Hz, H-1), 5.11 (t, 1H, *J*_{3,4} = 9.8 Hz, H-3), 4.83 (t, 1H, *J*_{3,4} = 9.8 Hz, H-4), 4.30 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, Fmoc-CH₂), 4.23–4.16 (m, 4H, Benzol-CH₂, Fmoc-CH, H-6a), 3.97–3.90 (m, 2H, H-6b, H-2), 3.86–3.83 (m, 1H, H-5), 3.28 (s, 2H, NHCOCH₂CO), 2.00, 1.97, 1.91, 1.74 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 170.1, 169.6, 169.5, 169.3, 167.0, 166.8, 165.4, 156.2 (8C, C=O), 145.6, 143.9, 140.7, 139.5, 137.3, 131.8, 127.6, 127.1, 125.2, 123.7, 122.9, 122.4, 120.1, 119.5 (14C, arom. C), 78.1 (C-1), 73.3 (C-3), 72.3 (C-5), 68.3 (C-4), 65.5 (1C, Fmoc-CH₂), 61.8 (C-6), 52.3 (1C, Triazol-CH₂), 52.0 (C-2), 46.7 (1C, Fmoc-CH), 44.6 (1C, NHCOCH₂CO), 36.0 (1C, Benzol-CH₂), 22.6, 20.6, 20.4, 20.3 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₄₃H₄₅N₇O₁₄Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 906.291670; gef.: *m/z* 906.291523.

3-{{4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl}-5-[N-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure (4d)

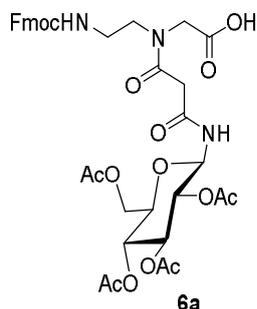


Darstellung nach AAV 2.

107 mg **3d** (0.11 mmol; 1 äq.) in 3 ml HCO₂H/DCM (abs.) liefern nach 14 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 30:1→CHCl₃/MeOH 10:1 + 1% HCO₂H) 94 mg **4d** (0.10 mmol; 94%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.16 (CHCl₃/MeOH 30:1 + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: +12.2 (*c* 1.0, DMSO); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 13.31 (s, 1H, CO₂H), 10.29 (s, 1H, Benzol-NH), 8.66 (d, 1H, *J*_{1,NH} = 9.2 Hz, H-1NHCOCH₂), 8.18 (s, 1H, arom. H), 7.95–7.92 (m, 2H, CONHCH₂, arom. H), 7.88–7.83 (m, 3H, NH, arom. H), 7.71–7.67 (m, 3H, arom. H), 7.62 (s, 1H, arom. H), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.29 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 5.61 (s, 2H, Triazol-CH₂), 5.27 (d, 1H, *J*_{3,4} = 3.3 Hz, H-4), 5.10 (t, 1H, *J*_{1,NH} = 9.2 Hz, H-1), 5.01 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 3.3 Hz, *J*_{2,3} = 11.2 Hz, H-3), 4.30 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, Fmoc-CH₂), 4.24–4.19 (m, 3H, Benzol-CH₂, Fmoc-CH), 4.12–3.94 (m, 4H, H-5, H-2, H-6a, H-6b), 3.27 (s, 2H, NHCOCH₂CO), 2.09, 1.98, 1.90, 1.76 (4s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 170.0, 169.9, 169.6, 166.9, 165.4, 156.2 (8C, C=O), 145.6, 143.9, 140.7, 139.4, 137.0, 127.6, 127.1, 125.2, 123.7, 122.9, 121.9, 120.1, 119.6 (13C, arom. C), 78.9 (C-1), 71.4 (C-5), 70.8 (C-3), 66.7 (C-4), 65.5 (1C, Fmoc-CH₂), 61.7 (C-6), 52.4 (1C, Triazol-CH₂), 48.2 (C-2), 46.7 (1C, Fmoc-CH), 44.6 (1C, NHCOCH₂CO), 36.0 (1C, Benzol-CH₂), 22.7, 20.6, 20.5, 20.4 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₄₃H₄₅N₇O₁₄Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 906.291670; gef.: *m/z* 906.292359.

[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonyl]-*N*-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat (6a**)**



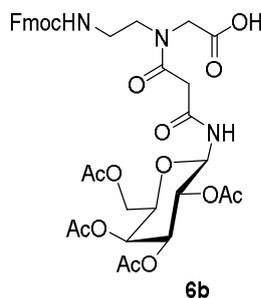
Darstellung nach **AAV 2**.

294 mg **5a** (0.36 mmol; 1 äq.) in 12 ml HCO₂H/DCM (abs.) liefern nach 38 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 50:1 + 1% HCO₂H → CHCl₃/MeOH 25:1 + 1% HCO₂H) 269 mg **6a** (0.36 mmol; 98%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.52 (CHCl₃/MeOH 25:1 + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: -2.0 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 12.89 (s, 1H, CO₂H), 8.84 (t, 1H, *J*_{1,NH} = 10.3 Hz, H-1NHCO), 7.89-7.88 (m, 2H, arom. H), 7.68-7.66 (m, 2H, arom. H), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.35-7.31 (m, 3H, arom. H, NH), 5.42-5.32 (m, 2H, H-1, H-3), 4.89 (t, 1H, *J*_{3,4} = 9.6 Hz, H-4), 4.84-4.77 (m, 1H, H-2), 4.32-4.27 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.21 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz, Fmoc-CH), 4.16-4.07 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-5), 3.98-3.89 (m, 2H, CH₂CO₂H), 3.48-3.10 (m, 6H, NHCH₂CH₂, COCH₂CO), 1.99, 1.97, 1.92 (3s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 170.8, 170.1, 169.5, 169.4, 169.3, 169.2, 167.7, 167.2, 167.0, 166.8 (10C, C=O), 156.3, 156.1 (2C, Fmoc-C=O *cis*-/*trans*-Rotamer), 143.9, 143.9, 140.7, 140.7, 127.7, 127.1, 125.2, 125.1, 120.2 (9C, arom. C), 76.8 (C-1), 72.8 (C-3), 72.2 (C-5), 70.5 (C-2), 67.9 (C-4), 65.5 (1C, Fmoc-CH₂), 61.8 (C-6), 48.1 (1C, CH₂CO₂H), 47.8 (1C, COCH₂CO), 46.7 (1C, Fmoc-CH), 40.8 (1C, NHCH₂CH₂), 20.5, 20.4, 20.4, 20.3 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₃₅H₄₁N₃O₁₅Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 778.242989; gef.: *m/z* 778.242857.

Die Signale der ¹H-NMR- bzw. ¹³C-NMR-Spektren können vertauscht sein.

[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonyl]-*N*-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxy-carbonylaminoethyl)glycinat (6b**)**



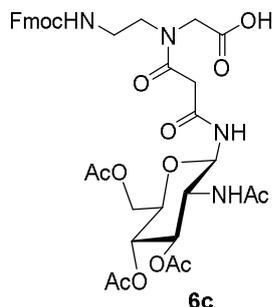
Darstellung nach **AAV 2**.

243 mg **5b** (0.30 mmol; 1 äq.) in 6 ml HCO₂H/DCM (abs.) liefern nach 38 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 50:1 + 1% HCO₂H → CHCl₃/MeOH 25:1 + 1% HCO₂H) 219 mg **6b** (0.29 mmol; 97%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.50 (CHCl₃/MeOH 25:1 + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: +6.3 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 12.92 (s, 1H, CO₂H), 8.89 (t, 1H, *J*_{1,NH} = 8.5 Hz, H-1NHCO), 7.89-7.87 (m, 2H, arom. H), 7.68-7.66 (m, 2H, arom. H), 7.41 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.35-7.31 (m, 3H, arom. H, NH), 5.37-5.28 (m, 3H, H-1, H-4, H-3), 5.03-4.99 (m, 1H, H-2), 4.32-4.22 (m, 4H, Fmoc-CH₂, H-5, Fmoc-CH), 4.06-3.94 (m, 4H, H-6a, H-6b, CH₂CO₂H), 3.36-3.09 (m, 6H, NHCH₂CH₂, COCH₂CO), 2.09, 1.99, 1.98, 1.96, 1.91 (5s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 170.7, 169.9, 169.9, 169.5, 169.4, 167.8, 167.3, 167.0, 166.9 (9C, C=O), 156.3, 156.1 (2C, Fmoc-C=O *cis*-/*trans*-Rotamer), 143.9, 143.9, 140.8, 140.7, 127.7, 127.1, 125.2, 125.2, 120.2 (9C, arom. C), 77.2 (C-1), 71.4 (C-5), 70.8 (C-3), 68.1 (C-2), 67.6 (C-4), 65.5 (1C, Fmoc-CH₂), 61.5 (C-6), 48.1 (1C, CH₂CO₂H), 47.8 (1C, COCH₂CO), 46.7 (1C, Fmoc-CH), 41.2, 40.7 (2C, NHCH₂CH₂), 20.5, 20.5, 20.4, 20.4 (4C, CH₃); FT-ICR-MS C₃₅H₄₁N₃O₁₅Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 778.242989; gef.: *m/z* 778.243134.

Die Signale der ¹H-NMR- bzw. ¹³C-NMR-Spektren können vertauscht sein.

[N-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylamino)malonyl]-N-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat (6c**)**



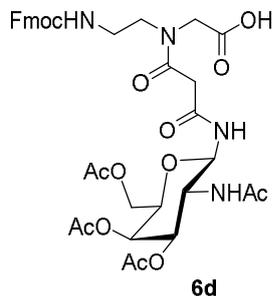
Darstellung nach **AAV 2**.

273 mg **5c** (0.34 mmol; 1 äq.) in 12 ml HCO₂H/DCM (abs.) liefern nach 38 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 50:1 + 1% HCO₂H → CHCl₃/MeOH 25:1 + 1% HCO₂H) 245 mg **6c** (0.32 mmol; 97%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.28 (CHCl₃/MeOH 25:1 + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: +0.7 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 12.84 (s, 1H, CO₂H), 8.77-8.73 (m, 1H, H-1NHCO *cis*-/*trans*-Rotamer), 7.95-7.92 (m, 1H, NH), 7.89-7.87 (m, 2H, arom. H), 7.68-7.66 (m, 2H, arom. H), 7.43-7.39 (m, 2H, arom. H), 7.35-7.31 (m, 3H, arom. H, CONHCH₂), 5.22-5.09 (m, 2H, H-1, H-3), 4.82 (t, 1H, *J*_{3,4} = 9.8 Hz, H-4), 4.32-4.26 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.23-4.14 (m, 2H, Fmoc-CH Rotamer a,b, H-6a), 4.04-3.81 (m, 5H, H-2, H-6b, H-5, COCH₂CO), 3.42-3.26 (m, 4H, CH₂COH, NHCH₂CH₂), 3.22-3.07 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 1.99, 1.98, 1.96, 1.90, 1.76, 1.73 (6s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 171.3, 170.9, 170.1, 169.7, 169.6, 169.4, 167.7, 167.2, 167.0, 166.9 (10C, C=O), 156.3, 156.1 (2C, Fmoc-C=O *cis*-/*trans*-Rotamer), 143.9, 143.8, 140.8, 140.7, 127.7, 127.1, 125.3, 125.1, 120.2 (9C, arom. C), 78.0, 78.0 (C-1 *cis*-/*trans*-Rotamer), 73.3 (C-3), 72.3 (C-5), 68.4 (C-4), 65.5 (1C, Fmoc-CH₂), 61.8 (C-6), 52.1, 52.0 (2C, C-2 *cis*-/*trans*-Rotamer), 50.9 (1C, COCH₂CO), 48.1, (1C, CH₂CO₂H), 47.8, 46.7 (2C, Fmoc-CH *cis*-/*trans*-Rotamer), 41.2, 40.8 (2C, NHCH₂CH₂), 22.6, 20.6, 20.4, 20.4 (6C, CH₃); FT-ICR-MS C₃₆H₄₂N₄O₁₄Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 777.258973; gef.: *m/z* 777.258435.

Die Signale der ¹H-NMR- bzw. ¹³C-NMR-Spektren können vertauscht sein.

[N-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-β-D-galactopyranosylamino)malonyl]-N-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat (6d)



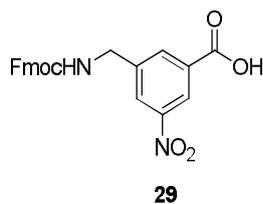
Darstellung nach AAV 2.

124 mg **5d** (0.15 mmol; 1 äq.) in 6 ml HCO₂H/DCM (abs.) liefern nach 38 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 50:1 + 1% HCO₂H → CHCl₃/MeOH 10:1 + 1% HCO₂H) 111 mg **6d** (0.15 mmol; 97%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.23 (CHCl₃/MeOH 25:1 + 1% HCO₂H); [α]_D²⁰: +1.3 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 12.88 (s, 1H, CO₂H), 8.69-8.67 (m, 1H, H-1NHCO *cis*-/*trans*-Rotamer), 7.92-7.88 (m, 3H, NH, arom. H), 7.69-7.66 (m, 2H, arom. H), 7.43-7.31 (m, 5H, arom. H, CONHCH₂), 5.26-5.25 (m, 1H, H-3), 5.13-5.07 (m, 1H, H-1), 5.05-5.01 (m, 1H, H-4), 4.32-4.22 (m, 3H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH), 4.06-3.91 (m, 6H, H-5, H-6a, H-6b, H-2, COCH₂CO), 3.35-3.10 (m, 6H, NHCH₂CH₂, CH₂CO₂H), 2.09, 2.08, 1.98, 1.97, 1.89, 1.78, 1.75 (7s, 12H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 170.1, 170.0, 169.6, 167.8, 167.8, 167.2, 167.1, 166.9 (8C, C=O), 156.3, 156.1 (2C, Fmoc-C=O, *cis*-/*trans*-Rotamer), 143.9, 143.9, 140.8, 140.7, 127.7, 127.1, 120.2, 120.1 (8C, arom. C), 78.8, 78.7 (2C, C-1 *cis*-/*trans*-Rotamer), 71.4 (1C, C-5), 70.8 (1C, C.4), 66.7 (1C, C-3), 65.5 (1C, Fmoc-CH₂), 61.6 (1C, C-6), 51.7 (1C, C-2), 48.3 (1C, COCH₂CO), 48.2 (1C, CH₂CO₂H), 46.7 (1C, Fmoc-CH), 40.7 (2C, NHCH₂CH₂), 22.7, 20.6, 20.5, 20.5 (6C, CH₃). ESI-TOF-MS C₃₆H₄₁N₄O₁₄ [M-H]⁻: ber.: *m/z* 753.26248; gef.: *m/z* 753.26314.

Die Signale der ¹H-NMR- bzw. ¹³C-NMR-Spektren können vertauscht sein.

3-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-nitrobenzoesäure (29)



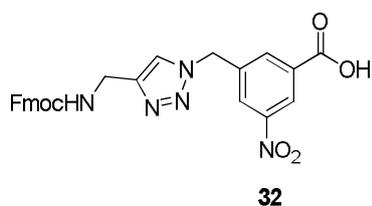
Darstellung nach AAV 2.

120 mg **16** (0.25 mmol; 1 äq.) in 6 ml HCO₂H/DCM (abs.) liefern nach 14 h bei RT und

säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 50:1→CHCl₃/MeOH 25:1 + 1% HCO₂H) 99 mg **29** (0.24 mmol; 93%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.42 (CHCl₃/MeOH 25:1 + 1% HCO₂H); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 13.72 (s, 1H, CO₂H), 8.50 (s, 1H, arom. H), 8.35 (s, 1H, arom. H), 8.27 (s, 1H, arom. H), 8.10 (t, 1H, *J* = 6.1 Hz, CONHCH₂), 7.88 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, arom. H), 7.69 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.31 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 4.39–4.35 (m, 4H, Fmoc-CH₂, Benzol-CH₂), 4.24 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz, Fmoc-CH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 165.5, 156.4 (2C, C=O), 148.0, 143.1, 140.8, 133.8, 132.6, 127.1, 125.6, 125.1, 122.3, 120.2 (10C, arom. C), 65.6 (1C, Fmoc-CH₂), 46.7 (1C, Fmoc-CH), 43.0 (1C, Benzol-CH₂); FT-ICR-MS C₂₃H₁₈N₂O₆Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 441.105707; gef.: *m/z* 441.105876.

3-{[4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-nitrobenzoessäure (**32**)

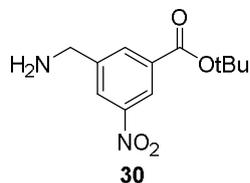


Darstellung nach **AAV 2**.

308 mg **17** (0.55 mmol; 1 äq.) in 18 ml HCO₂H/DCM (abs.) liefern nach 14 h bei RT und säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 50:1→CHCl₃/MeOH 25:1 + 1% HCO₂H) 258 mg **32** (0.52 mmol; 93%) als weißen Feststoff.

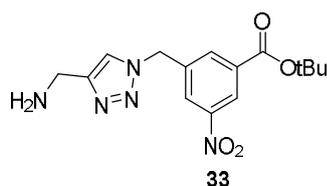
R_f: 0.63 (CHCl₃/MeOH 25:1 + 1% HCO₂H); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 13.86 (s, 1H, CO₂H), 8.56 (s, 1H, arom. H), 8.46 (s, 1H, arom. H), 8.31 (s, 1H, arom. H), 8.08 (s, 1H, arom. H), 7.88–7.85 (m, 3H, arom. H, CONHCH₂), 7.67 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.29 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 5.83 (s, 2H, Triazol-CH₂), 4.30 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, Fmoc-CH₂), 4.25 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz, Benzol-CH₂), 4.20 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz, Fmoc-CH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 165.2, 156.2 (2C, C=O), 148.1, 145.7, 143.8, 140.7, 138.9, 134.9, 133.1, 127.6, 127.0, 126.8, 125.2, 123.5, 123.3, 120.1 (14C, arom. C), 65.5 (1C, Fmoc-CH₂), 51.3 (1C, Triazol-CH₂), 46.7 (1C, Fmoc-CH), 35.9 (1C, Benzol-CH₂); FT-ICR-MS C₂₆H₂₁N₅O₆Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 522.138405; gef.: *m/z* 522.138737; Anal. ber. für C₂₆H₂₁N₅O₆(499.47): C 62.52; H 4.24; N 14.02; gef.: C 62.78; H 4.12; N 14.01.

4.4.6 ABSPALTUNG DER FMOC-SCHUTZGRUPPE

3-(Aminomethyl)-5-nitrobenzoesäure-*tert*-butylester (30)

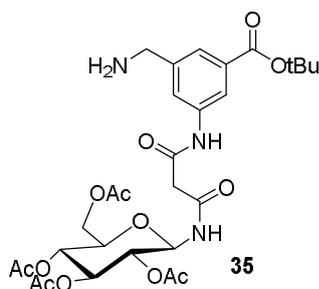
Darstellung nach AAV 4.

107 mg **16** (0.23 mmol; 1 äq.) in 2 ml einer 20% igen Lösung von Piperidin in DMF (v/v) liefern nach 3.5 h bei RT 57 mg **30** (0.23 mmol; quant.) als weißen Feststoff, der ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt wird.

3-{[4-(Aminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-nitrobenzoesäure-*tert*-butylester (33)

Darstellung nach AAV 4.

222 mg **17** (0.40 mmol; 1 äq.) in 4.5 ml einer 20% igen Lösung von Piperidin in DMF (v/v) liefern nach 3.5 h bei RT 133 mg **33** (0.40 mmol; quant.) als weißen Feststoff, der ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt wird.

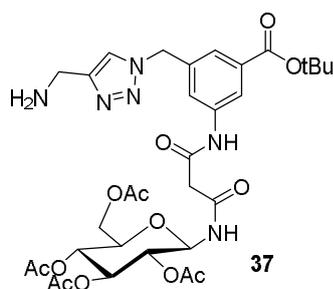
3-(Aminomethyl)-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-glucopyranosylamino)malonylamino]-benzoesäure-*tert*-butylester (35)

Darstellung nach AAV 4.

103 mg **1a** (0.12 mmol; 1 äq.) in 4.5 ml einer 20% igen Lösung von Piperidin in DMF (v/v) liefern

nach 3.5 h bei RT 76 mg **35** (0.12 mmol; quant.) als weißen Feststoff, der ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt wird.

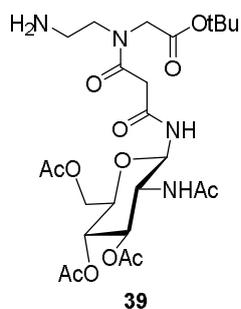
3-{[4-(Aminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester (37**)**



Darstellung nach AAV 4.

114 mg **3a** (0.12 mmol; 1 äq.) in 4.5 ml einer 20% igen Lösung von Piperidin in DMF (v/v) liefern nach 3.5 h bei RT 87 mg **37** (0.12 mmol; quant.) als weißen Feststoff, der ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt wird.

***tert*-Butyl-[*N*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylamino)malonyl]-*N*-2-(aminoethyl)-glycinat (**39**)**

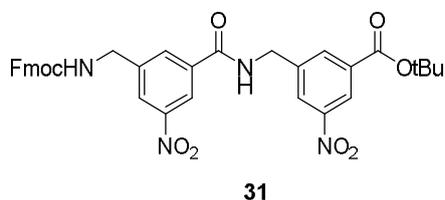


Darstellung nach AAV 4.

133 mg **5c** (0.16 mmol; 1 äq.) in 4.5 ml einer 20% igen Lösung von Piperidin in DMF (v/v) liefern nach 3.5 h bei RT 97 mg **39** (0.16 mmol; quant.) als weißen Feststoff, der ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt wird.

4.5 SYNTHESE DER AROMATISCHEN UND ALIPHATISCHEN DIMERE

3-{[3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-nitrobenzoyl]aminomethyl}-5-nitrobenzoesäure-*tert*-butylester (**31**)

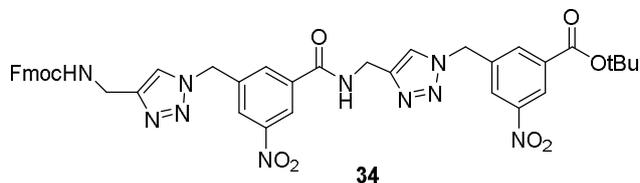


Darstellung nach **AAV1 (Variante A)**.

96 mg **29** (0.23 mmol; 1 äq.), 113 mg HBTU (0.30 mmol; 1.3 äq.), 40 mg HOBt (0.30 mmol; 1.3 äq.), 0.15 ml DIPEA (0.39 mmol; 3.9 äq.) und 57 mg **30** (0.23 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE 1:1) 110 mg **31** (0.17 mmol; 73%) als weißen Feststoff. Eine analytische Probe wurde aus *n*-Hexan/CHCl₃ umkristallisiert.

R_f: 0.37 (PE/EE 1:1); Smp.: 131 °C (*n*-Hexan/CHCl₃); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 9.64 (t, 1H, *J* = 5.9 Hz, NH), 8.65 (s, 1H, arom. H), 8.47–8.45 (m, 2H, arom. H), 8.29–8.25 (m, 3H, arom. H), 8.08 (t, 1H, *J* = 6.1 Hz, NH), 7.88 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, arom. H), 7.68 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.39 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.29 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, arom. H), 4.69 (d, 2H, *J* = 5.7 Hz, Benzol'-CH₂), 4.37–4.34 (m, 4H, Fmoc-CH₂, Benzol-CH₂), 4.23 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz, Fmoc-CH), 1.56 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 164.4, 163.0, 156.4 (3C, C=O), 148.0, 147.9, 143.8, 142.8, 142.4, 140.7, 135.2, 134.0, 132.8, 132.6, 128.9, 127.6, 127.3, 127.0, 126.3, 125.1, 124.5, 122.1, 121.4, 120.4, 120.1, 120.0 (22C, arom. C), 82.3 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 65.6 (1C, Fmoc-CH₂), 46.7 (1C, Fmoc-CH), 43.2 (1C, Benzol'-CH₂), 42.2 (1C, Benzol-CH₂), 27.6 (3C, CO₂C(CH₃)₃); FT-ICR-MS C₃₅H₃₂N₄O₉Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 675.206150; gef.: *m/z* 675.206367; Anal. ber. für C₃₅H₃₂N₄O₉(652.65): C 64.41; H 4.94; N 8.58; gef.: C 64.76; H 4.94; N 8.29.

3-{3-[[4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl]-5-nitrobenzoyl]aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-nitrobenzoesäure-*tert*-butylester
(34)

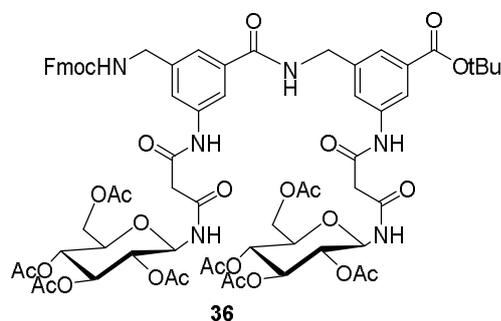


Darstellung nach AAV1 (Variante A).

168 mg **32** (0.34 mmol; 1 äq.), 166 mg HBTU (0.44 mmol; 1.3 äq.), 59 mg HOBT (0.44 mmol; 1.3 äq.), 0.22 ml DIPEA (1.31 mmol; 3.9 äq.) und 112 mg **33** (0.34 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 200:1→25:1) 241 mg **34** (0.30 mmol; 88%) als blass gelben Feststoff. Eine analytische Probe wurde aus Et₂O/CHCl₃ umkristallisiert.

R_f: 0.27 (CHCl₃/MeOH 25:1); Smp.: 128 °C (Et₂O/CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.87 (s, 1H, NH), 8.64 (s, 1H, arom. H), 8.47 (s, 1H, arom. H), 8.22 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz, arom. H), 8.09 (d, 2H, *J* = 12.2 Hz, arom. H), 7.82 (s, 1H, arom. H), 7.67 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, arom. H), 7.59 (s, 1H, arom. H), 7.48 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.31 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 7.18 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, arom. H), 6.22 (s, 1H, NH), 5.64 (s, 2H, Benzol-CH₂), 5.52 (s, 2H, Benzol'-CH₂), 4.62 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz, Triazol-CH₂), 4.39 (d, 2H, *J* = 4.2 Hz, Triazol'-CH₂), 4.29 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz, Fmoc-CH₂), 4.08 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz, Fmoc-CH), 1.58 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 164.6, 162.9, 156.7 (3C, C=O), 148.7, 148.4, 146.1, 145.3, 143.9, 141.3, 137.2, 136.9, 136.4, 134.7, 133.0, 127.8, 127.1, 126.5, 125.5, 125.1, 124.6, 123.9, 122.9, 122.7, 120.1 (21C, arom. C), 80.4 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 66.9 (1C, Fmoc-CH₂), 53.0 (1C, Benzol-CH₂), 52.8 (1C, Benzol'-CH₂), 47.2 (1C, Fmoc-CH), 36.4 (1C, Triazol-CH₂), 35.3 (1C, Triazol'-CH₂), 28.2 (3C, CO₂C(CH₃)₃); FT-ICR-MS C₄₁H₃₈N₁₀O₉Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 837.271544; gef.: *m/z* 837.270940.

3-[[3-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[N-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoyl]aminomethyl]-5-[N-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-tert-butylester (36)

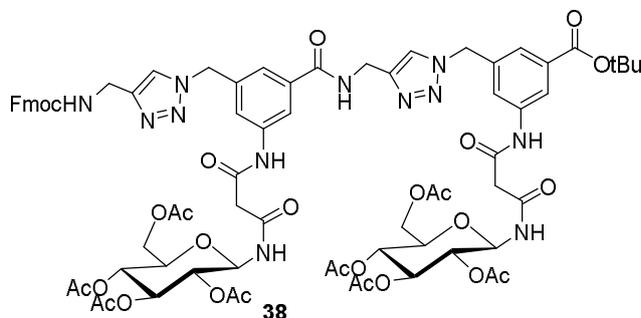


Darstellung nach AAV1 (Variante A).

95 mg **2a** (0.12 mmol; 1 äq.), 58 mg HBTU (0.15 mmol; 1.3 äq.), 21 mg HOBt (0.15 mmol; 1.3 äq.), 0.08 ml DIPEA (0.46 mmol; 3.9 äq.) und 75 mg **35** (0.12 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 50:1 → 25:1) 86 mg **36** (0.06 mmol; 51%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.35 (CHCl₃/MeOH 25:1); [α]_D²⁰: -9.0 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.51 (s, 1H, NH), 9.30 (s, 1H, NH), 8.09-7.95 (m, 4H, NH, arom. H), 7.72-7.70 (m, 2H, arom. H), 7.57-7.55 (m, 4H, NH, arom. H), 7.39-7.32 (m, 5H, arom. H), 7.25-7.21 (m, 2H, arom. H), 6.36 (s, 1H, NH), 5.34-5.25 (m, 4H, H-1, H-1', H-3, H-3'), 5.06-4.97 (m, 4H, H-4, H-4', H-2, H-2'), 4.49 (s, 2H, Benzol'-CH₂), 4.35 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, Fmoc-CH₂), 4.19-4.17 (m, 5H, H-6a, H-6a', Fmoc-CH, Benzol-CH₂), 4.03-4.00 (m, 2H, H-6b, H6b'), 3.83-3.81 (m, 2H, H-5, H-5'), 3.39-3.35 (m, 4H, NHCOCH₂CO), 2.01, 2.00, 1.98, 1.97, 1.95, 1.93 (6s, 24H, CH₃), 1.55 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 170.8, 170.7, 170.6, 170.1, 170.0, 169.6, 168.7, 168.5, 167.6, 165.6, 165.3, 165.2, 157.3 (15C, C=O), 144.0, 141.3, 140.2, 139.5, 138.3, 138.2, 132.8, 127.8, 127.2, 125.3, 124.0, 122.0, 121.8, 121.4, 120.1, 119.5, 117.0 (17C, arom. C), 81.7 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 78.2, 78.1 (2C, C-1, C-1'), 73.8, 73.7 (2C, C-5, C-5'), 73.2, 73.1 (2C, C-3, C-3'), 70.6, 70.4 (2C, C-4, C-4'), 68.2, 68.1 (2C, C-2, C-2'), 67.2 (1C, Fmoc-CH₂), 61.8, 61.7 (2C, C-6, C-6'), 47.1 (1C, Fmoc-CH), 44.6 (1C, Benzol-CH₂), 44.1 (1C, Benzol'-CH₂), 43.6 (1C, NHCOCH₂CO), 28.1 (3C, CO₂C(CH₃)₃), 20.7, 20.6 (8C, CH₃); ESI-TOF-MS C₆₉H₇₈N₆O₂₇Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 1445.48071; gef.: *m/z* 1445.48129.

3-{3-[[4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoyl]aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester (38**)**

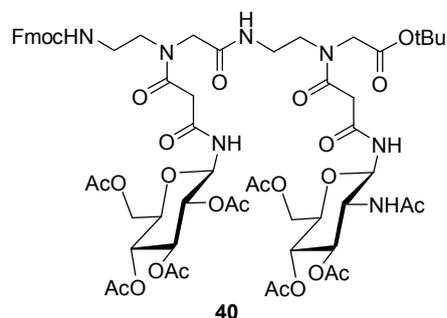


Darstellung nach AAV1 (Variante A).

108 mg **4a** (0.12 mmol; 1 äq.), 60 mg HBTU (0.16 mmol; 1.3 äq.), 22 mg HOBt (0.16 mmol; 1.3 äq.), 0.08 ml DIPEA (0.48 mmol; 3.9 äq.) und 87 mg **37** (0.12 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 13 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 50:1→25:1) 106 mg **38** (0.07 mmol; 55%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.29 (CHCl₃/MeOH 25:1); [α]_D²⁰: +6.0 (*c* 1.0, DMSO); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 10.40-10.30 (m, 2H, NH), 9.07-9.06 (m, 1H, NH), 8.90-8.70 (m, 2H, NH), 8.16-8.14 (m, 1H, arom. H), 8.05-8.02 (m, 2H, arom. H), 7.91-7.81 (m, 4H, arom. H, NH), 7.69-7.67 (m, 3H, arom. H), 7.57 (s, 3H, arom. H), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, arom. H), 7.29 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, arom. H), 5.62 (s, 2H, Triazol-CH₂), 5.58 (s, 2H, Triazol'-CH₂), 5.44-4.75 (m, 8H, H-1, H-1', H-3, H-3', H-4, H-4', H-2, H-2'), 4.50-4.49 (m, 2H, Benzol-CH₂), 4.31-3.88 (m, 11H, Fmoc-CH₂, Benzol'-CH₂, Fmoc-CH, H-6a, H-6a', H-5, H-5', H-6b, H-6b'), 3.31-3.22 (m, 4H, NHCOCH₂CO), 2.08, 2.02, 2.01, 1.99, 1.97, 1.95, 1.94 (7s, 24H, CH₃), 1.52 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 170.4, 170.1, 170.0, 169.6, 169.3, 169.2, 167.2, 167.1, 167.0, 166.9, 165.8, 165.4, 165.3, 164.4, 156.2 (15C, C=O), 145.6, 145.2, 143.9, 140.8, 139.6, 139.4, 137.3, 136.8, 135.5, 132.3, 127.7, 127.1, 125.2, 123.4, 122.8, 122.0, 121.4, 120.1, 119.2, 118.2 (20C, arom. C), 81.1 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 77.1, 76.9 (2C, C-1, C-1'), 72.8, 72.6 (2C, C-3, C-3'), 72.5, 72.2 (2C, C-5, C-5'), 70.6, 69.8 (2C, C-2, C-2'), 67.9 (2C, C-4, C-4'), 65.6 (1C, Fmoc-CH₂), 61.8 (2C, C-6, C-6'), 52.7, 52.3 (2C, Benzol-CH₂, Benzol'-CH₂), 46.7 (1C, Fmoc-CH), 44.8, 44.7 (2C, Triazol-CH₂, Triazol'-CH₂), 27.8 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6, 20.5, 20.4, 20.3 (8C, CH₃); ESI-TOF-MS C₇₅H₈₄N₁₂O₂₇Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 1607.54611; gef.: *m/z* 1607.54480.

***tert*-Butyl-3-[*N*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylamino)malonyl]-12-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-1,7-dioxo-9-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonyl]-3,6,9,12-tetraazadodecanoat (40)**



Darstellung nach **AAV1 (Variante)**.

124 mg **6a** (0.16 mmol; 1 äq.), 80 mg HBTU (0.21 mmol; 1.3 äq.), 32 mg HOBt (0.21 mmol; 1.3 eq), 0.11 ml DIPEA (0.62 mmol; 3.9 äq.) und 97 mg **39** (0.16 mmol; 1 äq.) in 12 ml DMF (abs.) liefern nach 2 h bei 0 °C und 14 h bei RT sowie säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 100:1→25:1) 126 mg **40** (0.09 mmol; 58%) als weißen Feststoff.

R_f: 0.27 (CHCl₃/MeOH 25:1); [α]_D²⁰: -8.3 (c 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.77, 8.39, 8.32, 8.21, 8.11, 7.98, 7.71, 7.53, 7.12, 6.95, 6.75, 6.17, 5.75 (d, d, d, d, d, m, d, d, d, d, d, s, s, 4H, H-1NH, H-1'NH, CONHCH₂, H-2'NH *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer), 7.77-7.75 (m, 2H, arom. H), 7.61-7.59 (m, 2H, arom. H), 7.41-7.37 (m, 2H, arom. H), 7.33-7.29 (m, 2H, Arom. H), 5.38-5.19 (m, 4 H, H-1, H-1', H-3, H-3' *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer), 5.13-4.99 (m, 3H, H-4', H-4, H-2 *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer), 4.41-3.01 (m, 26H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, H-6a, H-6b, H-6a', H-6b', H-5, H-5', H-2', NCH₂'CO₂C(CH₃)₃, NHCH₂'CH₂'N, NCH₂CON, NHCH₂CH₂N, COCH₂CO, CHCH₂'CO *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer), 2.05, 2.05, 2.05, 2.03, 2.02, 2.01, 2.00, 1.99, 1.95, 1.94, 1.93, 1.92 (12s, 24H, CH₃ *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer), 1.47, 1.46, 1.44, 1.42 (4s, 9H, CO₂C(CH₃)₃ *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 171.0, 170.8, 170.7, 170.3, 170.2, 169.7, 169.6, 169.3, 168.9, 168.7, 168.4, 168.4, 168.2, 167.8, 167.5, 167.3, 156.9, 156.8 (15C, C=O *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer), 144.1, 144.1, 144.1, 144.0, 144.0, 141.4, 127.9, 127.2, 125.2, 120.1 (10C, C-aryl *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer), 84.0, 83.5, 83.3, 82.7 (1C, CO₂C(CH₃)₃ *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer), 79.6, 79.6, 79.0, 78.1, 78.1 (2C, C-1, C-1' *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer), 73.8, 73.7, 73.6, 73.5, 73.4, 73.2, 73.1, 73.0 (2C, C-5, C-5' *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer), 70.7, 70.5 (1C, C-4 *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer), 68.5, 68.5, 68.3, 68.2, 68.2 (2C, C-2, C-4' *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer), 66.9, 66.8 (1C, Fmoc-CH₂ *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer), 62.2, 62.1, 62.0, 61.9, 61.9, 61.7 (2C, C-6, C-6' *trans*-/*trans*-, *trans*-/*cis*-, *cis*-/*trans*-, *cis*-/*cis*-Rotamer), 53.0, 52.7,

52.7, 52.6 (1C, C-2' *trans/trans*-, *trans/cis*-, *cis/trans*-, *cis/cis*-Rotamer), 51.0, 50.8, 50.3, (2C, NCH₂CO₂C(CH₃)₃, NCH₂CONH *trans/trans*-, *trans/cis*-, *cis/trans*-, *cis/cis*-Rotamer), 49.0, 48.4 (2C, COCH₂CO, COCH₂'CO *trans/trans*-, *trans/cis*-, *cis/trans*-, *cis/cis*-Rotamer), 47.3, 46.3 (1C, Fmoc-CH *trans/trans*-, *trans/cis*-, *cis/trans*-, *cis/cis*-Rotamer), 41.7, 41.7, 41.3, 41.2, 39.8, 39.8, 39.7, 39.6, 39.5, 36.7, 36.7, 36.7, (4C, NHCH₂CH₂N, NHCH₂'CH₂'N *trans/trans*-, *trans/cis*-, *cis/trans*-, *cis/cis*-Rotamer), 28.2, 28.1, 28.1 (12C, CO₂C(CH₃)₃ *trans/trans*-, *trans/cis*-, *cis/trans*-, *cis/cis*-Rotamer), 23.2, 22.9, 20.9, 20.9, 20.8, 20.8, 20.7, 20.6 (8C, CH₃ *trans/trans*-, *trans/cis*-, *cis/trans*-, *cis/cis*-Rotamer). ESI-TOF-MS C₆₁H₇₉N₇O₂₆Na [M+Na]⁺: ber.: *m/z* 1348.49670; gef.: *m/z* 1348.49739.

Die Signale der ¹H-NMR- bzw. ¹³C-NMR-Spektren können vertauscht sein.

4.6 SPOT-SYNTHESE UND SCREENING DER *N*-GLYCOPEPTIDE

4.6.1 DERIVATISIERUNG DER GLAS-WELLPLATE

1) Benötigte Geräte:

- SPOT-Robot Intavis ASP 222 (Kapitel 3.7.4)
- Teflon-Wascheinsatz für 4 *Glas-Wellplates* (**Abbildung 66**)

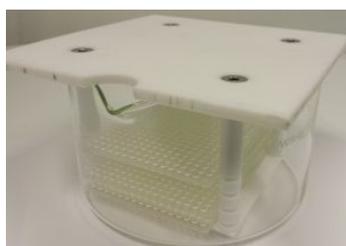


Abbildung 66: Teflon-Wascheinsatz

- Ultraschallbad
- Trockenschrank
- Glasschalen/Petrischalen
- Exsikkator

2) Benötigte Reagenzien/Lösungsmittel:

Tabelle 20: Benötigte Reagenzien/Lösungsmittel.

Eintrag	Lösungsmittel/Reaktant	Lieferant	Menge
1	konz. H ₂ SO ₄ 96%	CVU	2.5 l
	30%ige H ₂ O ₂	VWR Chemicals	1 l
2	1,4-Dioxan 99.5%	ROTH	1 l
3	Methanol HPLC grade		2.5 l
4	GOPTS 98%	Sigma Aldrich	100 ml
5	Aceton CHROMASOLV® for HPLC 99.8%	Sigma Aldrich	2.5 l
6	4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin 97%	Sigma Aldrich	100 ml
7	PfpOH 99+%	ACROS	10 g
8	DIC 99%	Sigma Aldrich	25 g
9	Rink-Amid-Linker	ABCR	5 g
10	NMP abs. (aus NMP 99.5% peptide grade)	ABCR	2.5 l
11	DMF abs. (aus DMF 99.8%)	Sigma Aldrich	2.5 l
12	Acetanhydrid dest. (aus Ac ₂ O 99%)	Sigma Aldrich	2.5 l
13	DIPEA 99.5% biotech grade	Sigma Aldrich	100 ml
14	Ethanol absolute 99.9%	Sigma Aldrich	2.5 l
15	Piperidin ReagentPlus® 99%	Sigma Aldrich	500 ml
16	Fmoc-Gly-OPfp 97%	Sigma Aldrich	5 g
17	HODhbt in DMF ~25%	Sigma Aldrich	100 ml

3) Reinigung/Aktivierung mit Piranha-Lösung (4 Glas-Wellplates)

- 2 x 2 h mit je 500 ml einer 3N NaOH-Lösung waschen (mittels „Teflon-Wascheinsatz“; Ultraschallbad)
- Jede einzelne Wellplate mit je 500 ml demin. H₂O waschen
- Mit Stickstoff trocknen
- 20-30 min in den Trockenschrank (80 °C)
- Im Exsikkator unter Argon einlagern
- 1 x 2 h mit 500 ml Caroscher Säure (konz. H₂SO₄/30%ige H₂O₂-Lösung 3:2) aktivieren (Ultraschallbad)
- Jede Wellplate mit je 200 ml 1,4-Dioxan (99.5%) sowie 200 ml MeOH (HPLC grade) waschen
- Im Stickstoffstrom trocknen
- 30 min im Trockenschrank (80 °C) trocknen

4) Derivatisierung mit GOPTS und 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin**a) Reaktion mit dem GOPTS**

GOPTS mit einer 12-Kanal-Eppendorfpipette auftragen:

- Parameter: 10 µl/Well
- Glas-Wellplate 6 h bei 80 °C in den Trockenschrank
- Mit 200 ml Aceton (HPLC grade) waschen
- Im Stickstoffstrom trocknen
- 1 h im Trockenschrank (80 °C) trocknen

b) Reaktion mit dem 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin

4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin mit einer 12-Kanal-Eppendorfpipette auftragen:

- Parameter: 10 µl/Well
- 18 h im Trockenschrank bei 80 °C reagieren lassen
- Mit 200 ml MeOH (HPLC grade) waschen
- pH-Wert überprüfen (pH ~ 7)
- Im Stickstoffstrom trocknen
- 2 h im Exsikkator am Hochvakuum trocknen

5) Umsetzung mit dem Rink-Amid-Linker

Rink-Amid-Linker mit dem SPOT-Roboter aufspotten (Parameter für eine Wellplate):

- 46 mg PfpOH (0.25 mmol; 1 äq.) in 1 ml NMP (abs.) lösen; 135 mg Rink-Amid-Linker (0.25 mmol; 1 äq.) sowie 40 µl DIC (0.25 mmol; 1 äq.) zugeben; kurz schütteln und 30 min reagieren lassen
- Parameter: 1.25 µl/Well; c = 0.25 mol/l; Rkt-Zeit: 30 min; 2 Wiederholungen
- Glas-Wellplate 3 x 5 min mit einer Lösung aus je 20 ml DMF (abs.), 4 ml DIPEA sowie 2 ml Ac₂O (dest.) cappen
- Mit 200 ml DMF (abs.) sowie 200 ml EtOH (HPLC grade) waschen
- Im Stickstoffstrom trocknen
- 14 h im Exsikkator am Hochvakuum trocknen

6) Fmoc-Abspaltung mit einer 20%igen Piperidin-Lösung (v/v)

20%Piperidin-Lösung (v/v) (2 ml Piperidin und 8 ml DMF (abs.)) mit einer 12-Kanal-Eppendorfpipette auftragen:

- Parameter: 10 µl/Well
- 30 min bei RT reagieren lassen
- Mit 200 ml DMF (abs.) sowie 200 ml EtOH (HPLC grade) waschen
- Im Stickstoffstrom trocknen
- 30 min im Exsikkator am Hochvakuum trocknen

7) Anbindung des Fmoc-Gly-OPfp

Fmoc-Gly-OPfp mit dem SPOT-Roboter aufspotten (Parameter für eine Wellplate):

- 116 mg Fmoc-Gly-OPfp (0.25 mmol; 1 äq.) in 1 ml NMP (abs.) lösen
- Parameter: 1.25 µl/Well; c = 0.25 mol/l; Rkt-Zeit: 30 min; 2 Wiederholungen
- Glas-Wellplate 3 x 5 min mit einer Lösung aus je 20 ml DMF (abs.) sowie 0.8 ml Ac₂O (dest.) cappen
- Mit 200 ml EtOH (HPLC grade) waschen
- Im Stickstoffstrom trocknen
- 14 h im Exsikkator am Hochvakuum trocknen

8) Wiederholung von 5)**9) Aufspotten der aromatischen und aliphatischen Kohlenhydrat-Bausteine**

Freie, Fmoc-geschützte, Carbonsäuren mit dem SPOT-Roboter aufspotten (Parameter für eine Wellplate):

- 46 mg PfpOH (0.25 mmol; 3.1 äq.) in Eppendorf-Tube vorlegen
- 0.3-0.4 ml NMP (abs.) zugeben
- Carbonsäure (0.1 mmol; 1.25 äq.) zugeben
- 40 µl DIC (0.25 mmol; 3.1 äq.) zugeben
- 52.2 mg \approx 52 µl HODhbt (25% in DMF) (0.08 mmol; 1 eq) zugeben
- Mit NMP (abs.) auf 1 ml auffüllen
- Kurz schütteln und 30 min bei RT reagieren lassen
- Parameter: 1.25 µl/Well; c = 0.1 mol/l; Rkt-Zeit: 30 min; 2 Wiederholungen
- Glas-Wellplate 3 x 5 min mit einer Lösung aus je 20 ml DMF (abs.) sowie 0.8 ml Ac₂O (dest.) cappen
- Mit 200 ml EtOH (HPLC grade) waschen
- Im Stickstoffstrom trocknen
- 20 min im Exsikkator am Hochvakuum trocknen

10) Wiederholung von 5)**11) Wiederholung von 8)****12) Abspaltung der Acetylschutzgruppen mit 7N NH₃ in MeOH**

- Glas-Wellplate mit 20 ml einer 7N NH₃ in MeOH-Lösung benetzen und 3 h bei RT im Exsikkator reagieren lassen
- Mit 200 ml EtOH (HPLC grade) waschen
- Im Stickstoffstrom trocknen
- 4 h im Exsikkator am Hochvakuum trocknen

Die derivatisierte Glas-Wellplate kann daraufhin einem Screening unterzogen werden.

4.6.2 DURCHFÜHRUNG DER SCREENINGS

1) Benötigte Geräte:

- INTEGRA Viaflo 96 Multi-Kanal-Pipette (Abbildung 67)



Abbildung 67: Viaflo 96 Multi-Kanal-Pipette.

- Mikroplatten-Reader (BMG Labtech – CLARIO Star) (Abbildung 68)



Abbildung 68: Mikroplatten-Reader.

- Trockenschrank/Inkubator

2) Benötigte Lösungen:

- **Blockierpuffer-Lösung** (3% BSA in PBS mit 0.05% Tween 20; 1X)
- **Waschpuffer-Lösung** (0.5% Tween 20 in PBS; 1X)
- **PBS-Lösung** (pH 7.4; 1X)
- **PNA-Alexa Fluor 488-Lösung** (1 mg Lektin in 100 ml PBS-Lsg. und einer 100 μ l CaCl_2 -Lsg. (0.1 M))

3) Inkubation mit dem Blockierpuffer

- **Blockierpuffer-Lösung** mit der Multi-Kanal-Pipette von INTEGRA auftragen
- Parameter: 15 μ l/Well (Manuelles Pipettieren)
- 1 h bei 37 °C inkubieren
- Blockierpuffer abnehmen (Manuelles Pipettieren: 15 μ l)

4) Reinigung/Waschen mit dem Waschpuffer

- **Waschpuffer-Lösung** mit der Multi-Kanal-Pipette von INTEGRA auftragen (Pipettieren und Mischen: Aufnehmen 15 μ l; Mischen 10 μ l; Mischzyklen 3; Aufnahmegeschwindigkeit: 4; Abgabegeschwindigkeit: 4)
- 15 min bei RT stehen lassen
- Waschpuffer abnehmen (Manuelles Pipettieren: 15 μ l)

- 5) **Reinigung/Waschen** 2 x wiederholen

- 6) **Inkubation mit der PNA-Alexa-Fluor 488-Lösung**
 - PNA-Lösung mit der Multi-Kanal-Pipette von INTEGRA auftragen
 - Parameter: 15 µl/Well (Manuelles Pipettieren)
 - 1 h bei 37 °C inkubieren
 - PNA-Lösung abnehmen (Manuelles Pipettieren: 15 µl)

- 7) **Wiederholung von 4)**

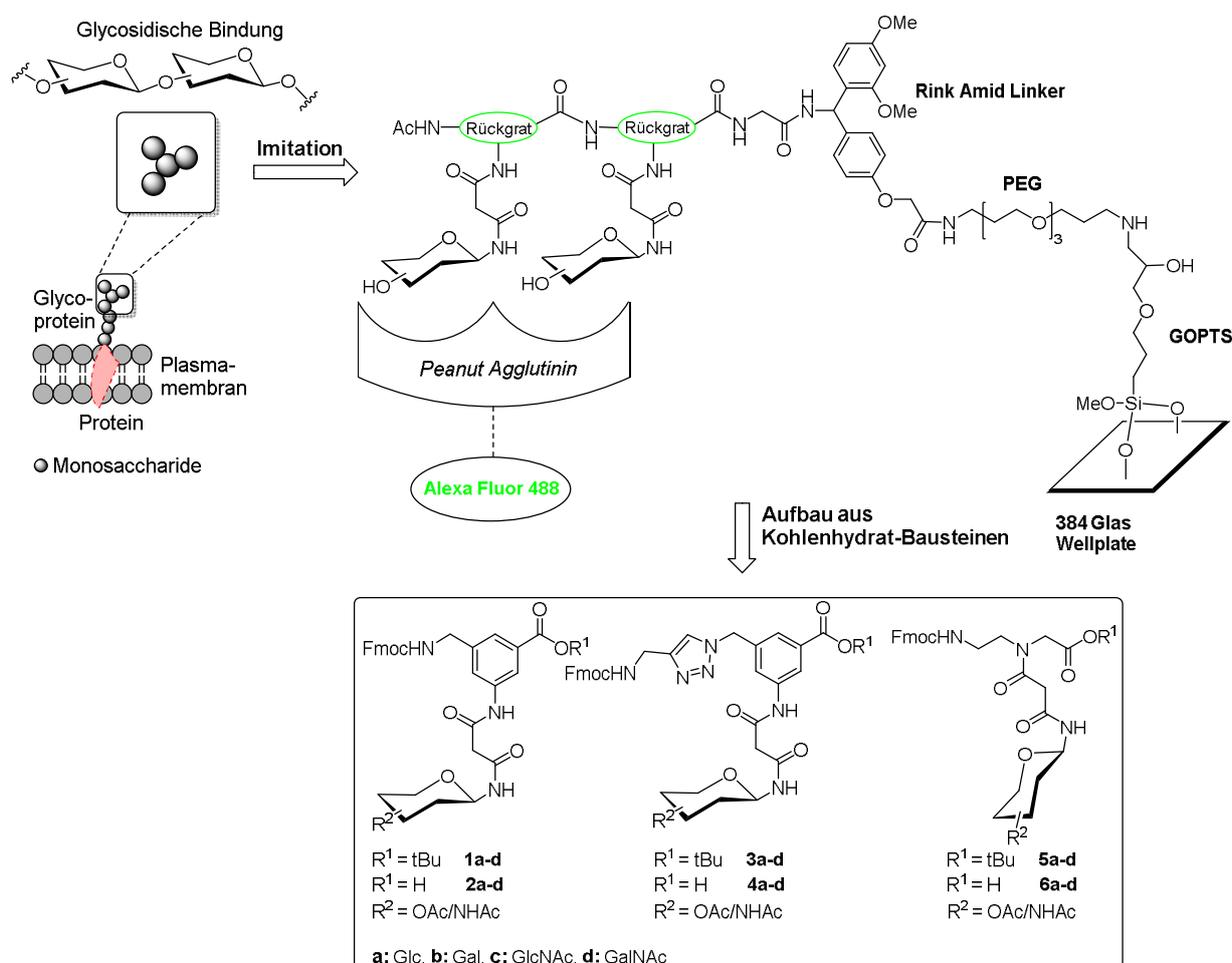
- 8) **Messung der Fluoreszenzintensität** mit dem Fluoreszenzreader
 - **PBS-Lsg.** (pH 7.4; 1X) auf die Glas-Wellplate auftragen
 - Parameter: 15 µl/Well (Manuelles Pipettieren)
 - **Messung:**
 - i. **Parameter:**
 1. **Basic settings:**
 - a. Measurement type: Fluorescence (Fl)
 2. **Endpoint settings:**
 - a. No. of flashes per well: 20
 - b. Scan mode: orbital averaging
 - c. Scan diameter [mm]: 2
 3. **Optic settings**
 - a. Presetname: Alexa Fluor 488
 - b. Excitation: 488-14 (Alexa Fluor 488)
 - c. Dichroic filter: auto 507.5
 - d. Emission: 535-30 (Alexa Fluor 488)
 - e. Gain: **1789**
 - f. Focal height [mm]: 12.2

- 9) **Wiederholung von 4)**

- 10) **Wiederholung von 7)**

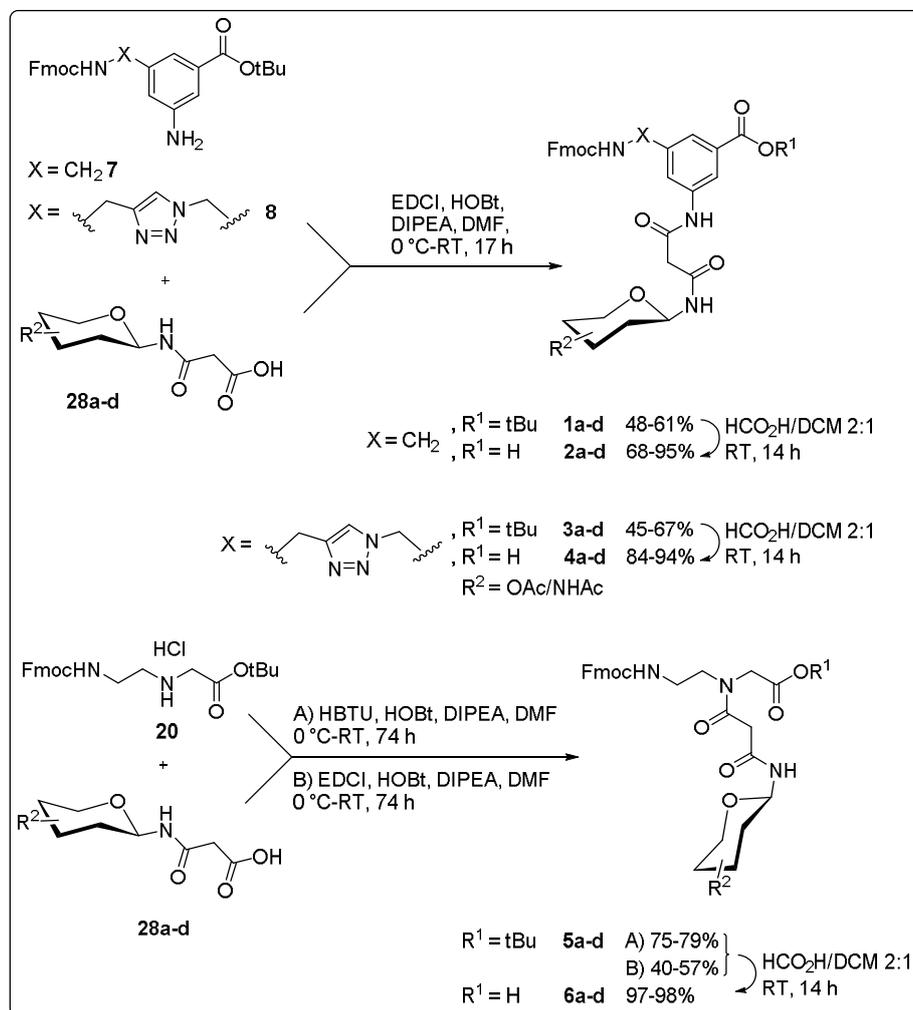
5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Ziel der vorliegenden Arbeit war die festphasenvermittelte Darstellung neuartiger, dimerer aromatischer sowie aliphatischer *N*-Glycopeptidmimetika aus einzelnen Kohlenhydrat-Bausteinen (**2a-d**, **4a-d** und **6a-d**), welche aus trifunktionalen, aromatischen Aminobenzoesäurederivaten bzw. der aliphatischen Peptid-Nukleinsäure (PNA) bestehen, die über einen Malonsäurespacer *N*-glycosidisch mit vier unterschiedlichen Sacchariden (Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc) verknüpft sind. Darüber hinaus sollte die Wechselwirkung dieser Mimetika mit dem Lektin der Erdnuss (*Peanut Agglutinin*), das eine Affinität zu einfachen, mono- sowie dissacharidischen Glycoconjugaten, wie z.B. dem TF-Antigen (Thomsen-Friedenreich-Antigen) aufweist, mit einem Lektin-Assay untersucht werden (**Schema 69**).



Schema 69: Imitation von Oligosacchariden durch Verknüpfung einzelner Kohlenhydrat-Bausteine.

Die Synthese der aromatischen Glycokonjugate **1a-d** sowie **3a-d** erfolgte aus den aromatischen, trifunktionalen Rückgraten **7** bzw. **8** und den Saccharidderivaten **28a-d** unter Verwendung von EDCI als Kupplungsreagenz. Hierbei konnten Ausbeuten von 48-61% bzw. 45-67% erzielt werden. Bei der Darstellung der aliphatischen, PNA-basierten Glycokonjugate **5a-d** wurden ebenfalls EDCI sowie HBTU verwendet, wobei die Ausbeuten 40-57% bzw. 75-79% betragen (**Schema 70**). Die Hydrolyse der aromatischen und aliphatischen Glycokonjugate **1a-d**, **3a-d** sowie **5a-d** erfolgte unter sauren Bedingungen ($\text{HCO}_2\text{H}/\text{DCM}$ 2:1), wobei die freien Carbonsäurederivate **2a-d**, **4a-d** sowie **6a-d**, mit Ausnahme des Glucosaminderivats **2c** (68%), mit sehr guten Ausbeuten von 84-98% isoliert werden konnten (**Schema 70**).



Schema 70: Darstellung der aromatischen und aliphatischen Kohlenhydrat-Bausteine.

Im Anschluss an die nasschemische Synthese der Kohlenhydrat-Bausteine (**2a-d**, **4a-d** und **6a-d**) erfolgte die festphasenvermittelte Darstellung der dimeren, aromatischen sowie aliphatischen *N*-Glycopeptidmimetika (**Abbildung 71**). Unter Verwendung eines teilautomatisierten Pipettier-Roboters wurden die mit Pentafluorphenol *in situ* aktivierten Carbonsäuren **2a-d**, **4a-d** sowie **6a-d** kombinatorisch an die aminofunktionalisierte Oberfläche einer 384er Glas-Wellplate gebunden, sodass pro Rückgrat 16 verschiedene Disaccharidmimetika dargestellt werden konnten. Nach der Abspaltung der saccharidischen Acetylschutzgruppen unter basischen Bedingungen mit einer methanolischen Ammoniak-Lösung wurden die festphasengebundenen Mimetika mit einem Alexa Fluor 488 gelabelten *Peanut Agglutinin* inkubiert, infolgedessen die Stärke der jeweiligen Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen, im Vergleich zu einer Positiv- sowie Negativ-Kontrolle, durch Auslesen der Fluoreszenzintensitäten mit einem Mikroplatten-Reader ermittelt wurden.

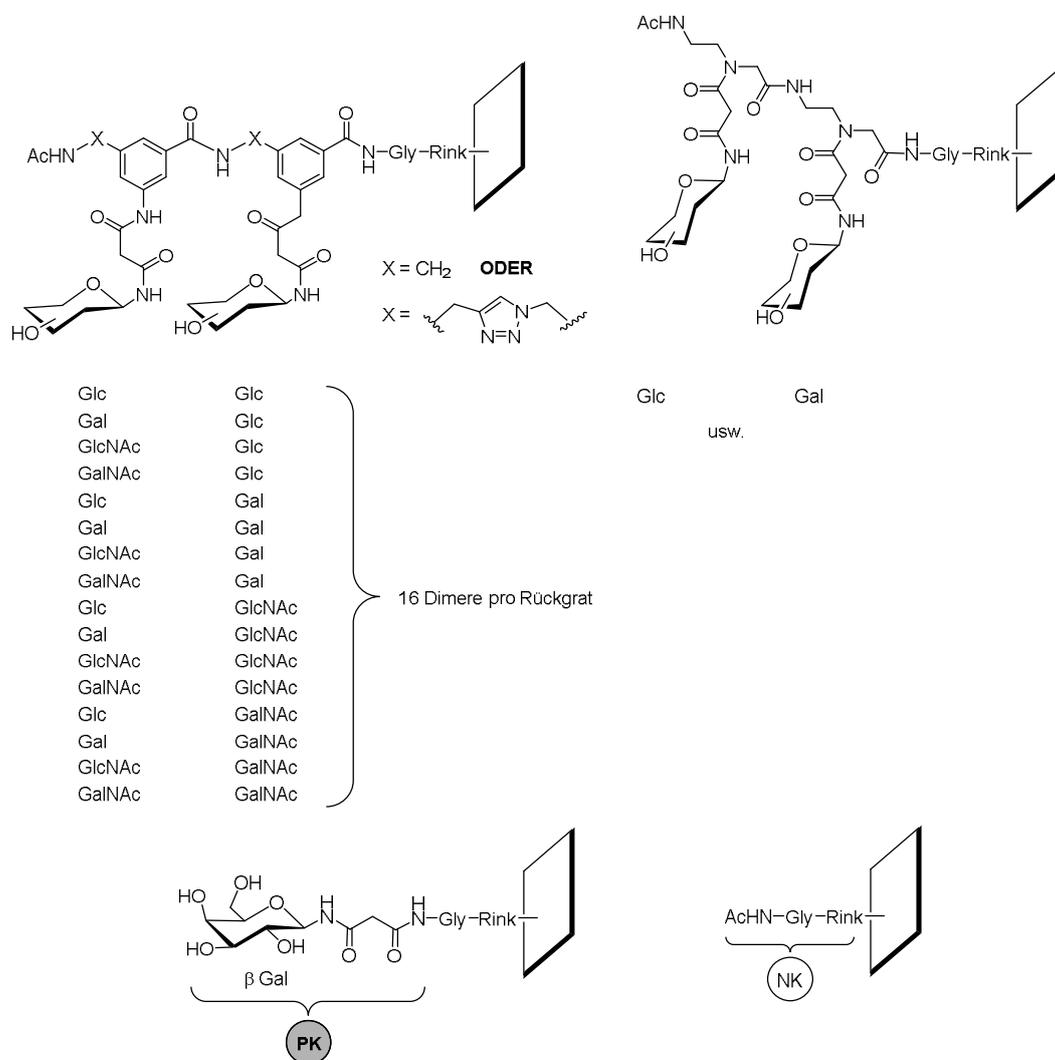


Abbildung 71: Aromatische und aliphatische *N*-Glycopeptidmimetika, kovalent gebundenes, deacetyliertes β-*N*-Galactosid **28b** als Positiv-Kontrolle (**PK**) und Linkersystem als Negativ-Kontrolle (**NK**).

Nach dem Screening der dimeren *N*-Glycokonjugate stellte sich heraus, dass die aromatischen Glycopeptide vernachlässigbar schwach mit dem *Peanut Agglutinin* wechselwirken, wohingegen die Lektin-Saccharid Bindung unter Beteiligung der aliphatischen Glycopeptide deutlich stärker ist. Im Falle der dimeren, aliphatischen *N*-Glycokonjugate kann zunächst festgehalten werden, dass nur diejenigen Saccharid-Kombinationen (**2**, **5**, **6**, **7**, **8**, **10** und **14**) vom Lektin der Erdnuss erkannt werden, welche einen D-Galactose-Baustein beinhalten (**Abbildung 72**).

Desweiteren konnte nach der Untersuchung festgestellt werden, dass das aliphatische Dimer **16**, bestehend aus zwei *N*-Acetyl-D-galactosamin-Bausteinen, ebenfalls mit dem *Peanut Agglutinin* zu interagieren scheint. Darüber hinaus kann konstatiert werden, dass die Wechselwirkung der dimeren, aliphatischen *N*-Glycokonjugate **6** (Gal-Gal) und **7** (GlcNAc-Gal) mit dem *Peanut Agglutinin* am stärksten ist (**Abbildung 72**).

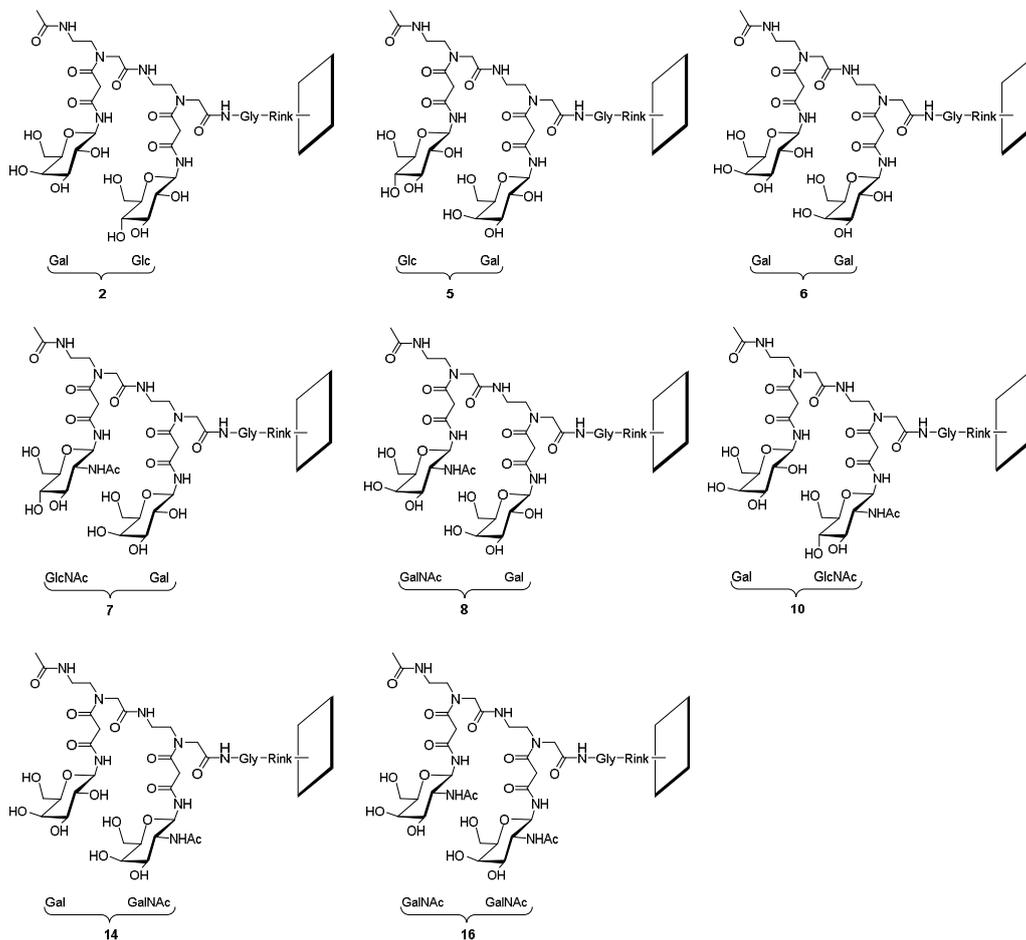


Abbildung 72: Aliphatische, dimere *N*-Glycokonjugate, die mit dem *Peanut Agglutinin* interagieren.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann die festphasenvermittelte Synthese der monomeren, als auch dimeren *N*-Glycokonjugate in weiteren, noch ausstehenden Untersuchungen einer gezielten Optimierung unterworfen werden, wobei die Reaktionsbedingungen, die Spacerart oder die Anbindung des jeweiligen Saccharids an das entsprechende Rückgrat variiert werden können. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, die dimeren Peptide zu erweitern und komplexere Verbindungen, wie tri- oder tetramere *N*-Glycopeptide zu synthetisieren, mit welchen Hochdurchsatz-Screenings (engl. *HTS - high-throughput-screening*)^[268-270] oder weitere, ausgiebige Bindungsstudien, beispielsweise an einer festen Phase mithilfe von Inhibitions-Assays^[9], oder in Lösung mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC)^[156-157] und Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)^[158-159], durchgeführt werden können.

6 ANHANG

6.1 BEZIFFERUNG DER VERBINDUNGEN

- 1a** 3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester
- 1b** 3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester
- 1c** 3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester
- 1d** 3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester
- 2a** 3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure
- 2b** 3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure
- 2c** 3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure
- 2d** 3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure
- 3a** 3-{[4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester
- 3b** 3-{[4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester
- 3c** 3-{[4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[*N*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester

- 3d** 3- {[4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[N-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester
- 4a** 3- {[4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[N-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure
- 4b** 3- {[4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[N-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure
- 4c** 3- {[4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[N-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure
- 4d** 3- {[4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[N-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure
- 5a** *tert*-Butyl-[N-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosylamino)malonyl]-N-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat
- 5b** *tert*-Butyl-[N-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosylamino)malonyl]-N-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat
- 5c** *tert*-Butyl-[N-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosylamino)malonyl]-N-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat
- 5d** *tert*-Butyl-[N-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-β-D-galactopyranosylamino)malonyl]-N-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat
- 6a** [N-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosylamino)malonyl]-N-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat
- 6b** [N-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosylamino)malonyl]-N-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat
- 6c** [N-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosylamino)malonyl]-N-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat

- 6d** [N-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosylamino)malonyl]-N-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylaminoethyl)glycinat
- 7** 3-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-aminobenzoessäure-*tert*-butylester
- 8** 3-{[4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-aminobenzoessäure-*tert*-butylester
- 9** 5-Nitro-isophthalsäure-monomethylester
- 10** 3-Azidomethyl-5-nitrobenzoessäuremethylester
- 11** 3-Azidomethyl-5-nitrobenzoessäure
- 12** 3-Azidomethyl-5-nitrobenzoessäure-*tert*-butylester
- 13** 3-Amino-5-methyl-benzoessäure-*tert*-butylester
- 14** 3-Amino-5-aminomethylbenzoessäure-*tert*-butylester
- 15** 3-Aminomethyl-5-nitrobenzoessäure-*tert*-butylester
- 16** 3-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-nitrobenzoessäure-*tert*-butylester
- 17** 3-{[4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-nitrobenzoessäure-*tert*-butylester
- 18** *tert*-Butylbromacetat
- 19** *tert*-Butyl-N-(2-Aminoethyl)glycinat
- 20** *tert*-Butyl-N-[2-(N-9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl]glycinathydrochlorid
- 21a** D-Glucose
- 21b** D-Galactose
- 21c** 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose
- 21d** 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose
- 22a** 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucoopyranosylazid
- 22b** 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylazid

- 22c** 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid
- 22d** 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosylazid
- 23a** 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamin
- 23b** 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamin
- 23c** 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylamin
- 23d** 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosylamin
- 24** mono-*tert*-Butylmalonat
- 25** mono-Benzylmalonat
- 26a** *N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-malonamidsäure-*tert*-butylester
- 26b** *N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-malonamidsäure-*tert*-butylester
- 26c** *N*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-malonamidsäure-*tert*-butylester
- 26d** *N*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosyl)-malonamidsäure-*tert*-butylester
- 27a** *N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-malonamidsäurebenzylester
- 27b** *N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-malonamidsäurebenzylester
- 27c** *N*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-malonamidsäurebenzylester
- 27d** *N*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosyl)-malonamidsäurebenzylester
- 28a** *N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-malonamidsäure
- 28b** *N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-malonamidsäure
- 28c** *N*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-malonamidsäure
- 28d** *N*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosyl)-malonamidsäure
- 29** 3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-nitrobenzoesäure
- 30** 3-(Aminomethyl)-5-nitrobenzoesäure-*tert*-butylester

- 31 3- {[3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-nitrobenzoyl]aminomethyl}-5-nitrobenzoesäure-*tert*-butylester
- 32 3- {[4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-nitrobenzoesäure
- 33 3- {[4-(Aminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-nitrobenzoesäure-*tert*-butylester
- 34 3- {[3-[[4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl]-5-nitrobenzoyl]aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-nitrobenzoesäure-*tert*-butylester
- 35 3-(Aminomethyl)-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester
- 36 3- {[3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoyl]aminomethyl}-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester
- 37 3- {[4-(Aminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester
- 38 3- {[3-[[4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoyl]aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoesäure-*tert*-butylester
- 39 *tert*-Butyl-[*N*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]-*N*-2-(aminoethyl)-glycinat
- 40 *tert*-Butyl-3-[*N*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylamino)malonyl]-1,7-dioxo-12-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-9-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonyl]-3,6,9,12-tetraazadodecanoat
- 41 [*N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonyl]-*N*-2-glycinamid
- 42 [*N*-(β -D-Galactopyranosylamino)malonyl]-*N*-2-glycinamid
- 43 {3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-nitrobenzoyl}-*N*-glycinamid

- 44 {3-[[4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl]-5-nitro-benzoyl}-*N*-glycinamid
- 45 {3-[[3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-nitrobenzoyl]aminomethyl]-5-nitro-benzoyl}-*N*-glycinamid
- 46 {3-[3-[[4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl]-5-nitrobenzoyl]aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl]-5-nitrobenzoyl}-*N*-glycinamid
- 47 {3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoyl}-*N*-glycinamid
- 48 {3-[[4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoyl}-*N*-glycinamid
- 49 2,5-Dioxo-7-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonyl]-10-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazadecanat
- 50 {3-[[3-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoyl]aminomethyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosylamino)malonylamino]benzoyl}-*N*-glycinamid
- 51 {3-[3-[[4-[(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl]-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoyl]aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-5-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonylamino]benzoyl}-*N*-glycinamid
- 52 7-[*N*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylamino)malonyl]-2,5,11-trioxo-16-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-13-[*N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamino)malonyl]-1,4,7,10,13,16-hexaazahexadecanoat

6.2 ABKÜRZUNGEN

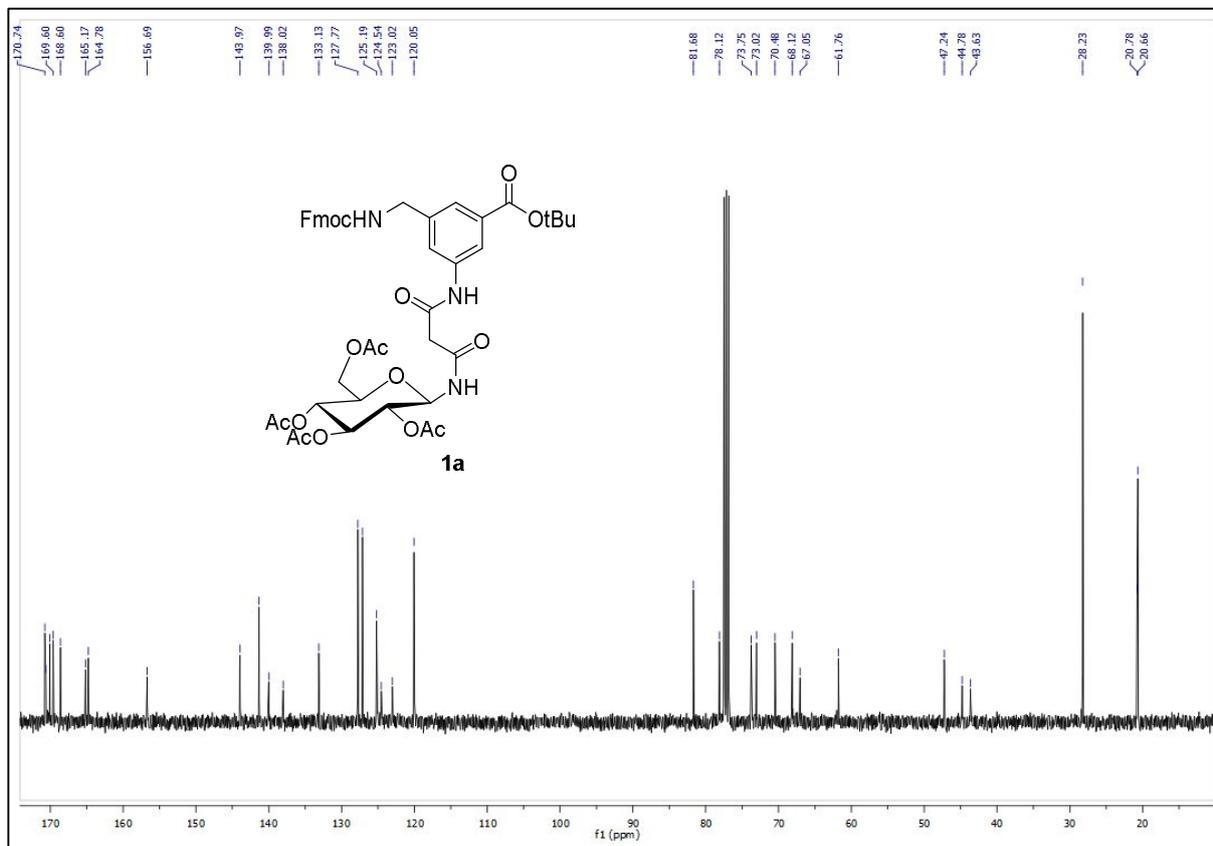
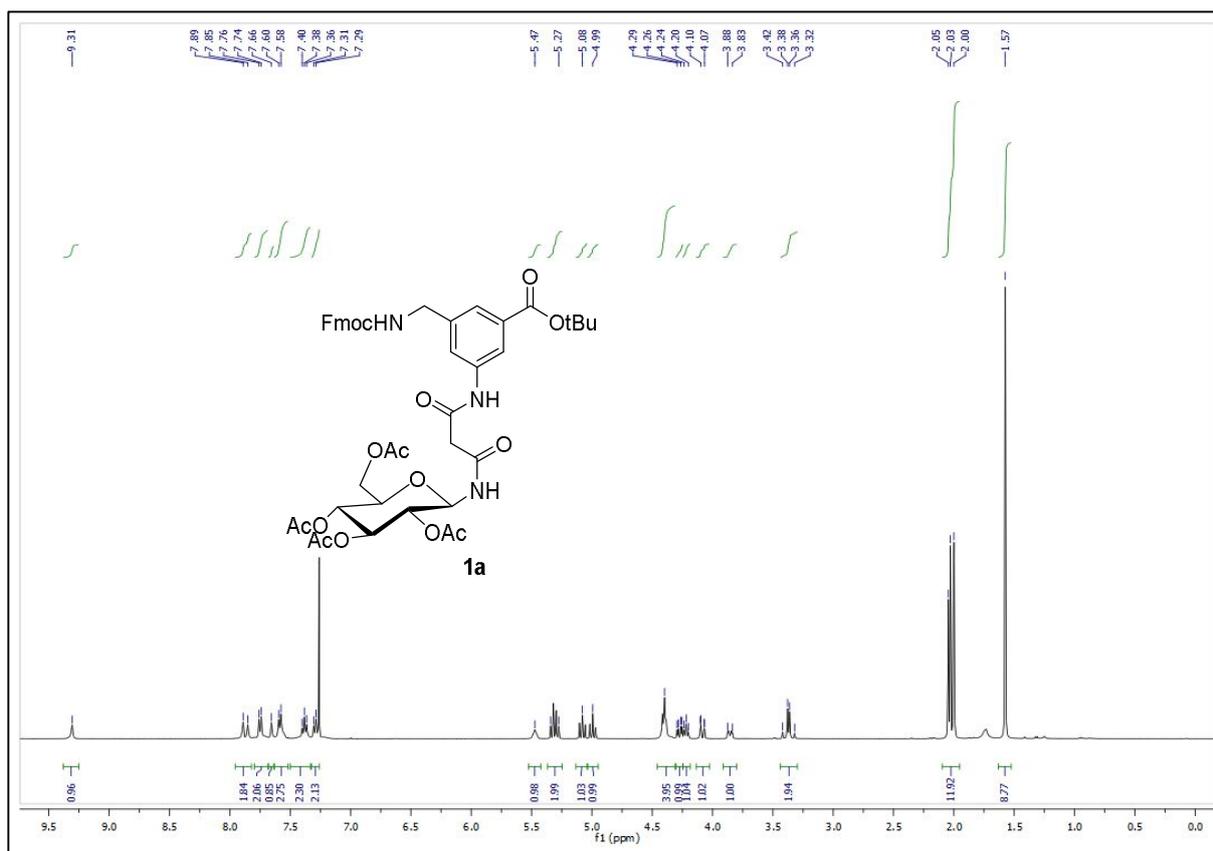
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
abs.	absolut (bezüglich Lösemitteln)
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AP	Alkalische Phosphatase
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
APTMS	(3-Aminopropyl)trimethoxysilan
Ber.	berechnet
Bn	Benzyl
BPB	Bromphenolblau
CDI	Carbonyldiimidazol
COSY	correlated spectroscopy
d	Tage (bezüglich Zeitangaben) oder Dublett (bezüglich NMR Signalen)
DAPEG	Diaminopolyethylenglycol
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCH	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylharnstoff
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dubletts
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin

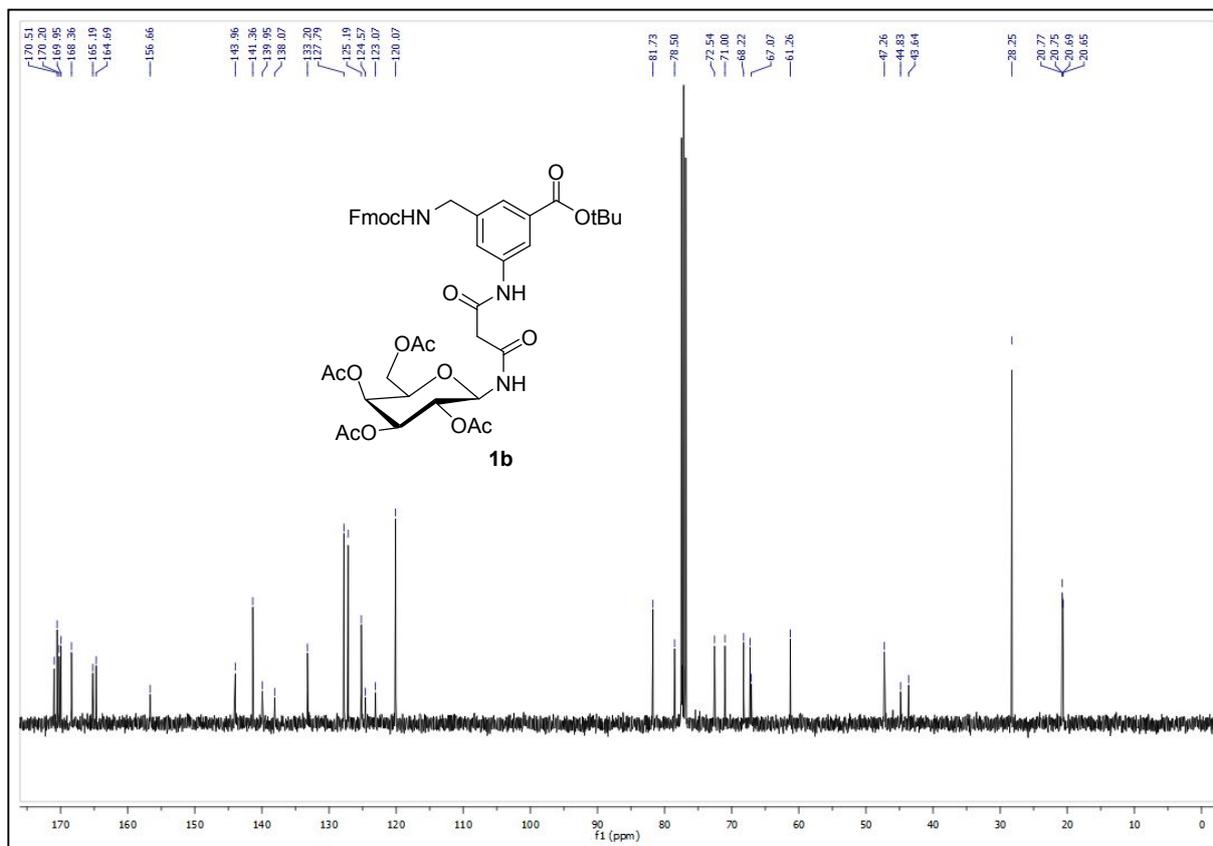
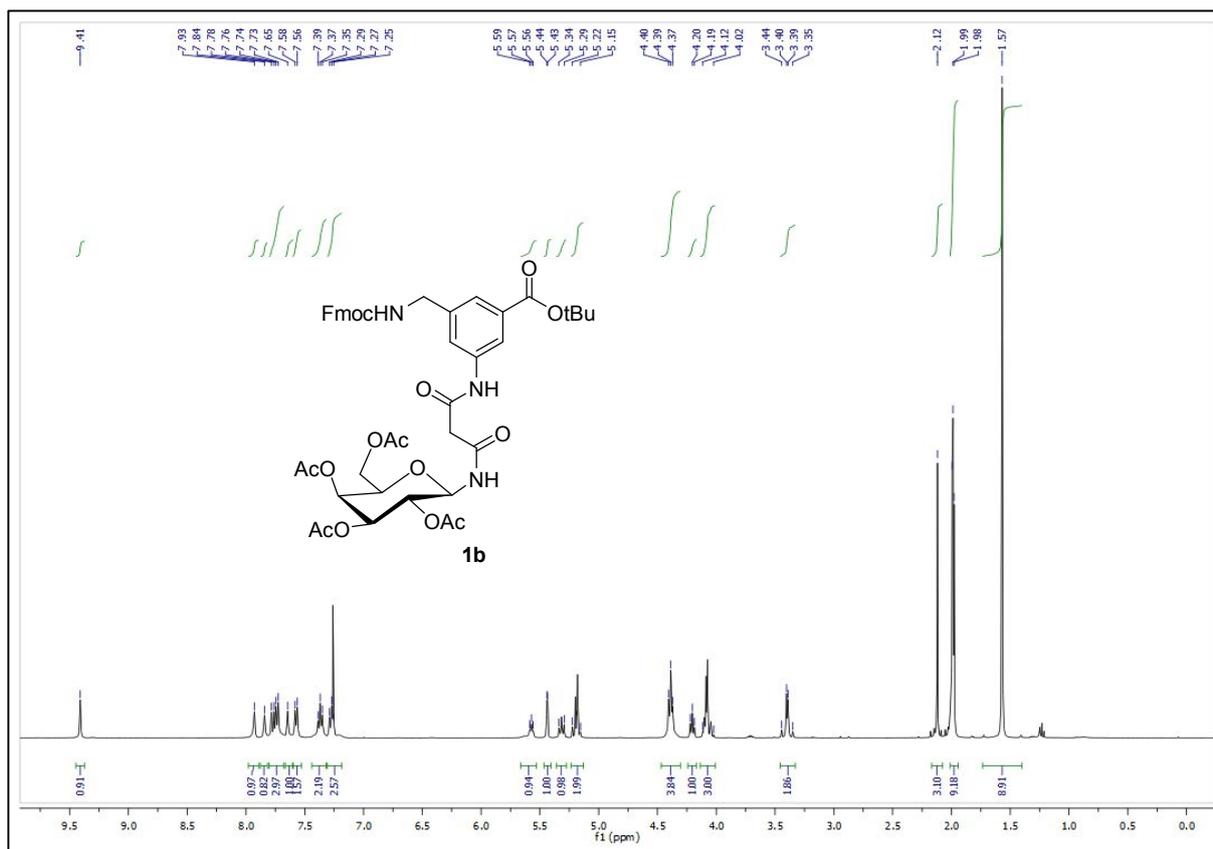
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
EA	Elementaranalyse
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EE	Essigsäureethylester
ELLA	enzyme linked lectin assay
ESI	electron spray ionisation
Et	Ethyl
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
eq	Equivalent
FAB	fast atomic bombardment
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FmocCl	Fluorenylmethoxycarbonylchlorid
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
gef.	gefunden
gem.	gemessen
ges.	gesättigt
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GOPTS	(3-Glycidylxypropyl)trimethoxysilan
GOPTES	(3-Glycidylxypropyl)triethoxysilan
h	Stunde

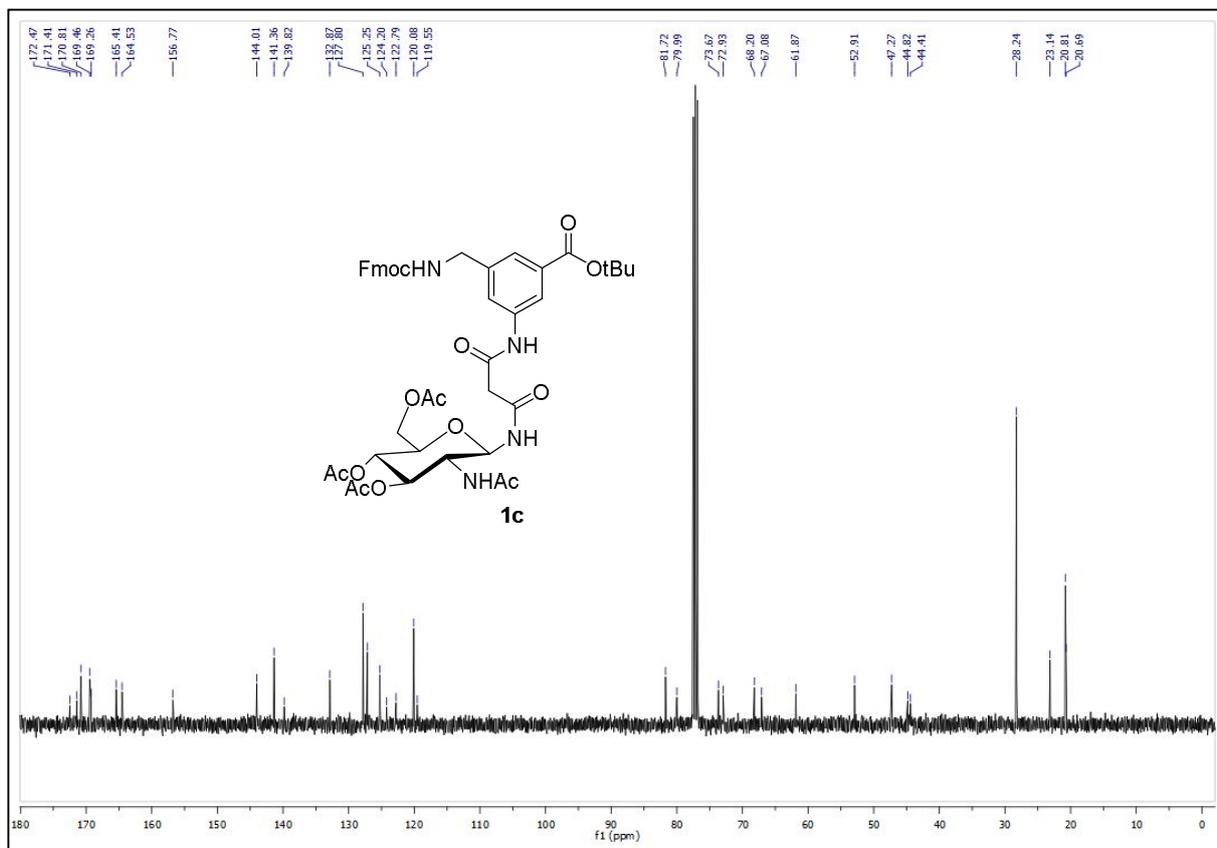
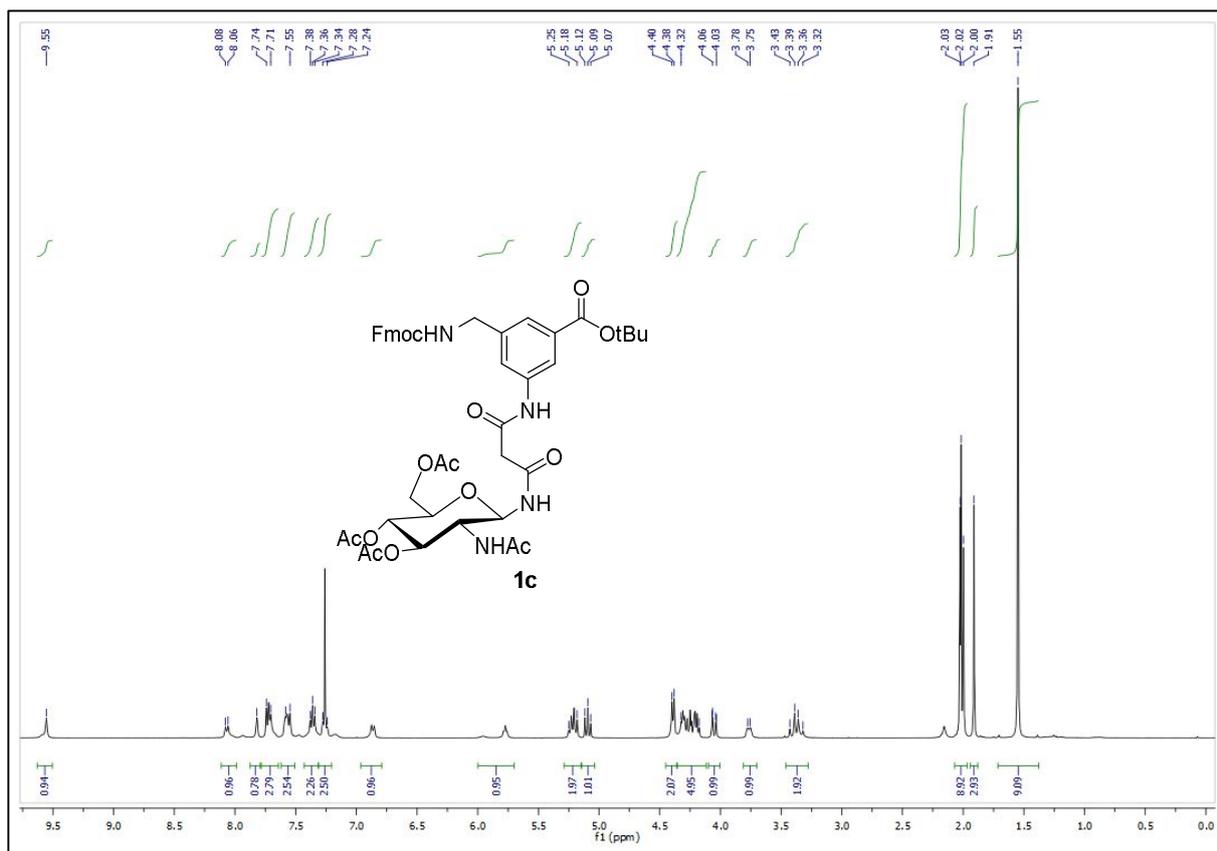
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	(<i>O</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HMBC	heteronuclear multiple-bond correlation
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HODhbt	3-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4-(3 <i>H</i>)-one
Hz	Hertz
IR	Infrarot
kat.	katalytisch
LA	lectin assay
Lit.	Literatur
LM	Lösungsmittel
Lsg.	Lösung
M	Mega
m	Milli (bezüglich Mengenangaben) oder Multiplett (bezüglich NMR Signalen)
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
Ms	Mesyl
Me	Methyl
MeOH	Methanol
NaOAc	Natriumacetat
NaOMe	Natriummethanolat

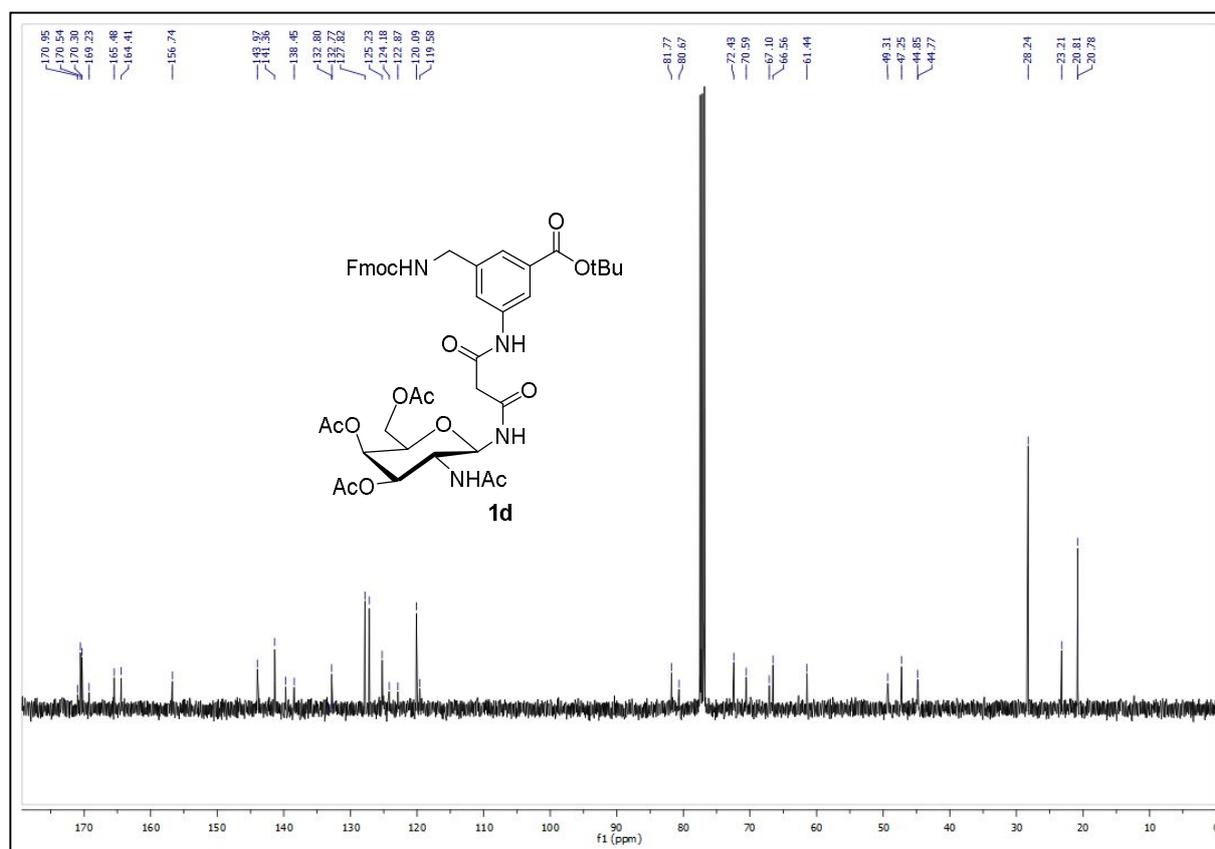
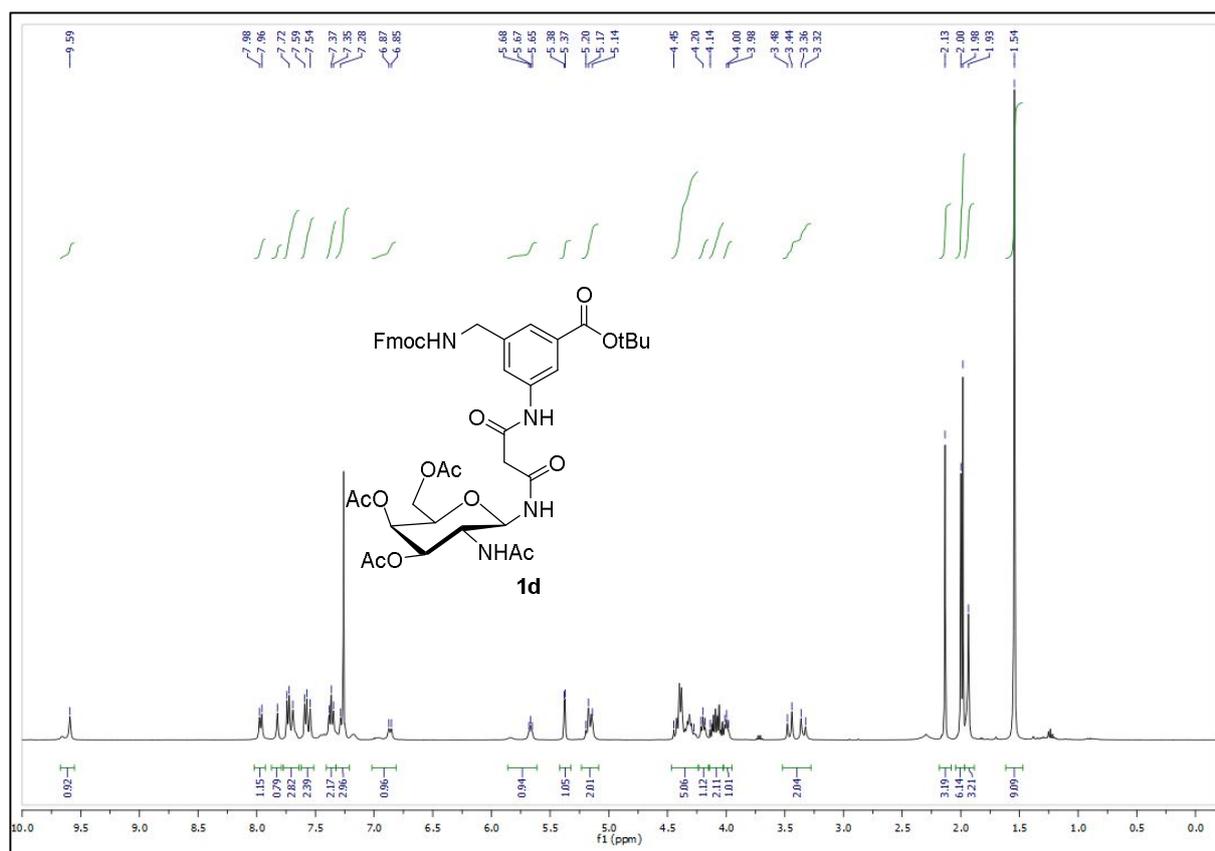
NeuNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-neuraminsäure
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	nuclear magnetic resonance
PBS	Phosphate buffered saline
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglycol
Ph	Phenyl
PfpOH	Pentafluorphenol
PPh ₃	Triphenylphosphin
PNA	Peptid-Nukleinsäure
POD	Peroxidase
Py	Pyridin
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
RT	Raumtemperatur
Smp.	Schmelzpunkt
SPPS	solid phase peptide synthesis
<i>tert</i>	Tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TOF	time of flight
<i>p</i> -Tos	<i>para</i> -Tosylat

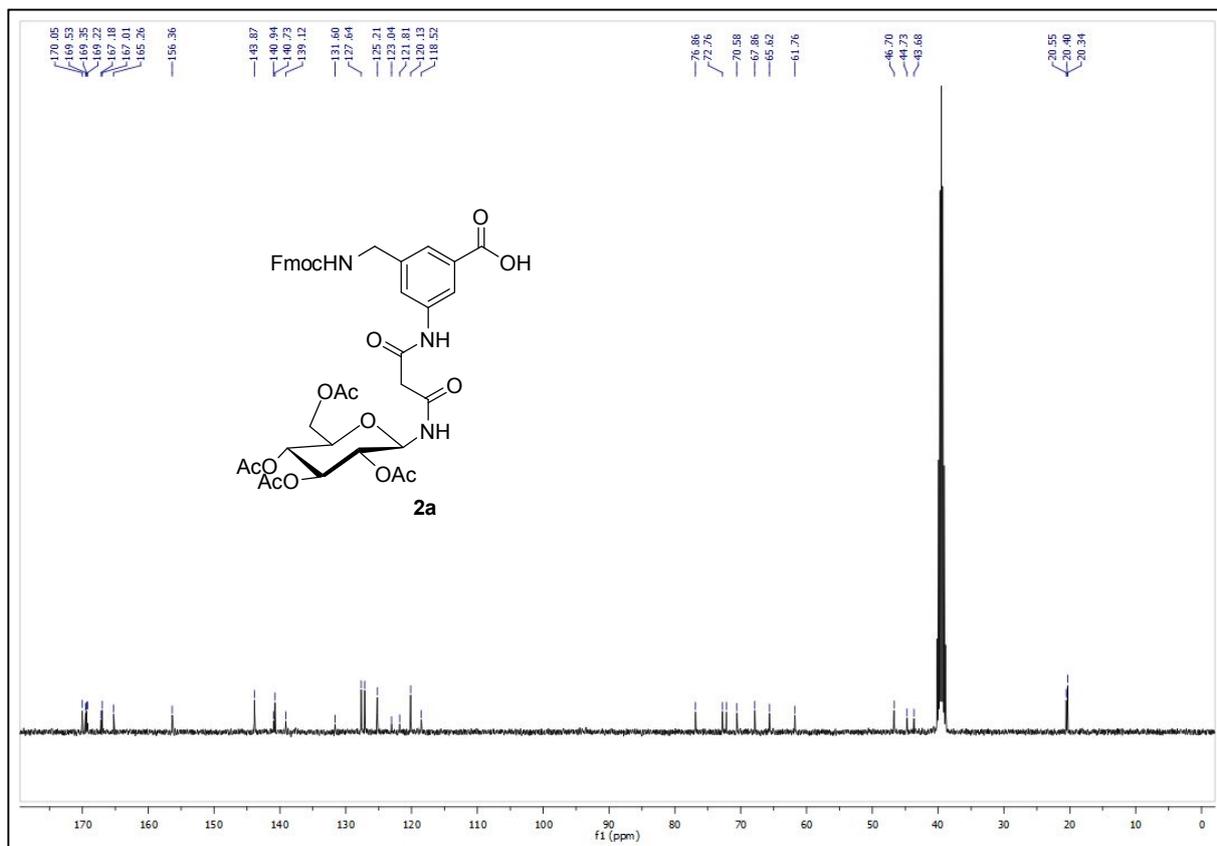
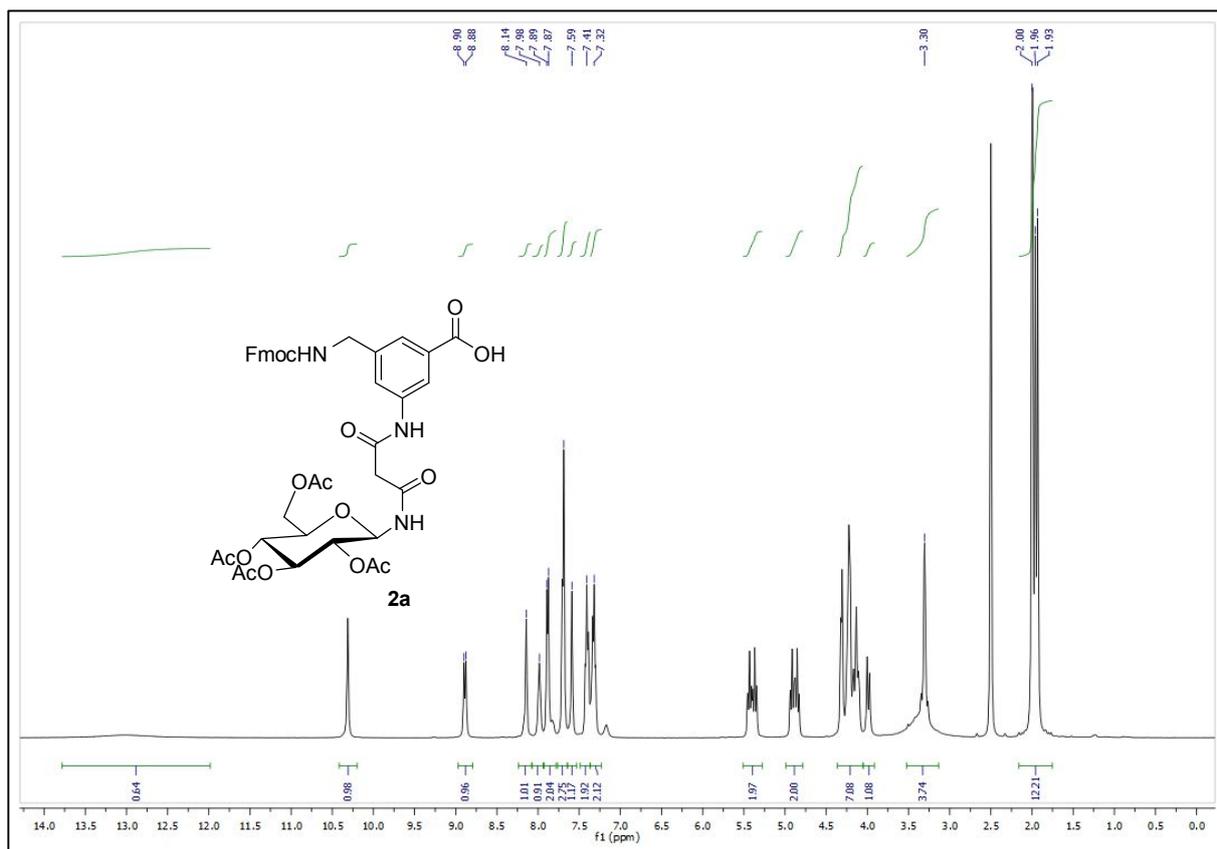
6.3 NMR-SPEKTREN

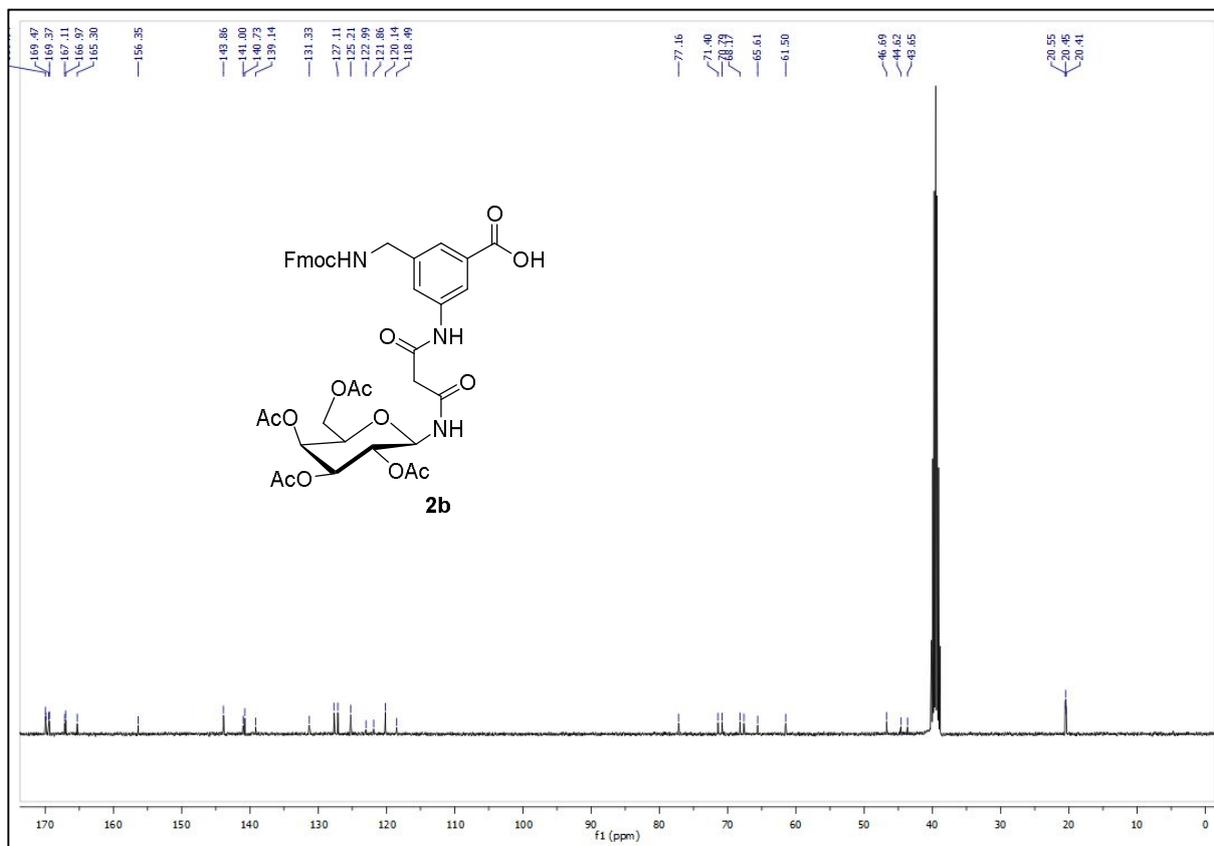
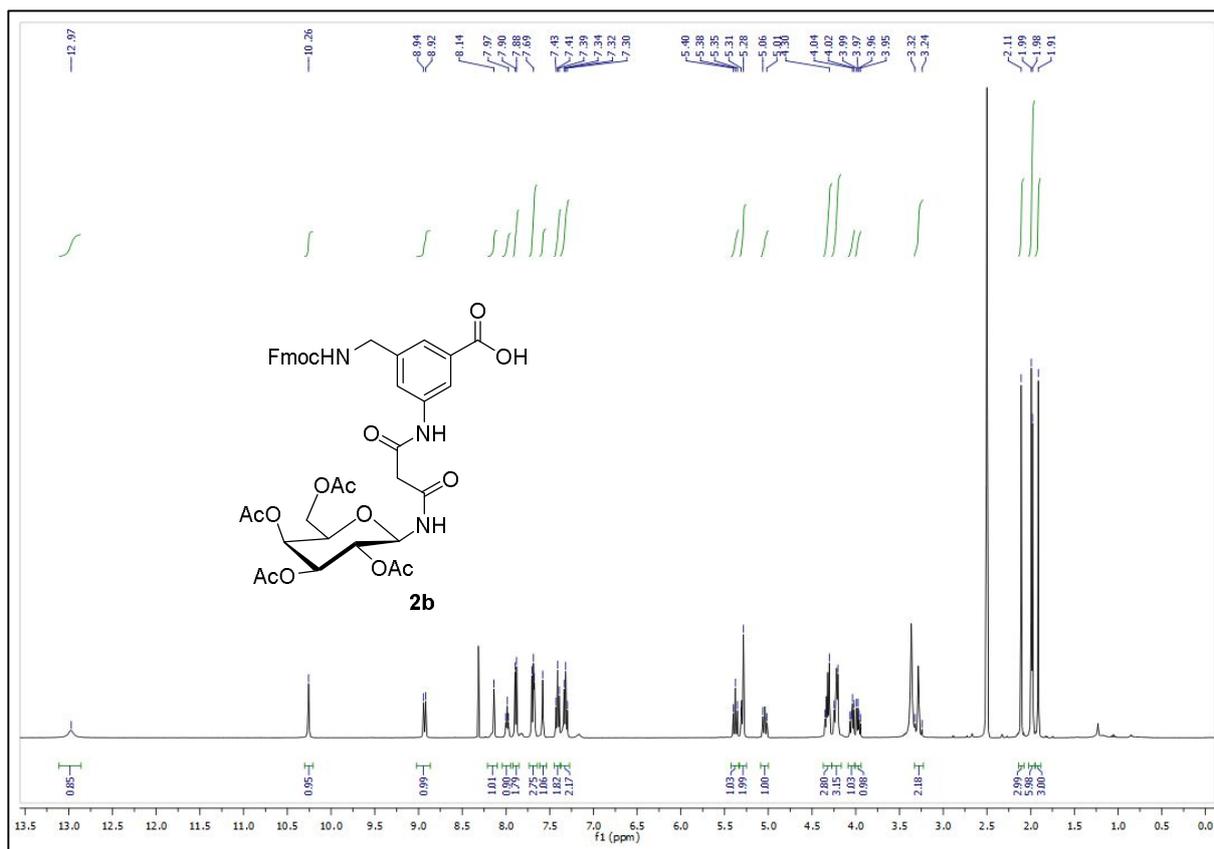


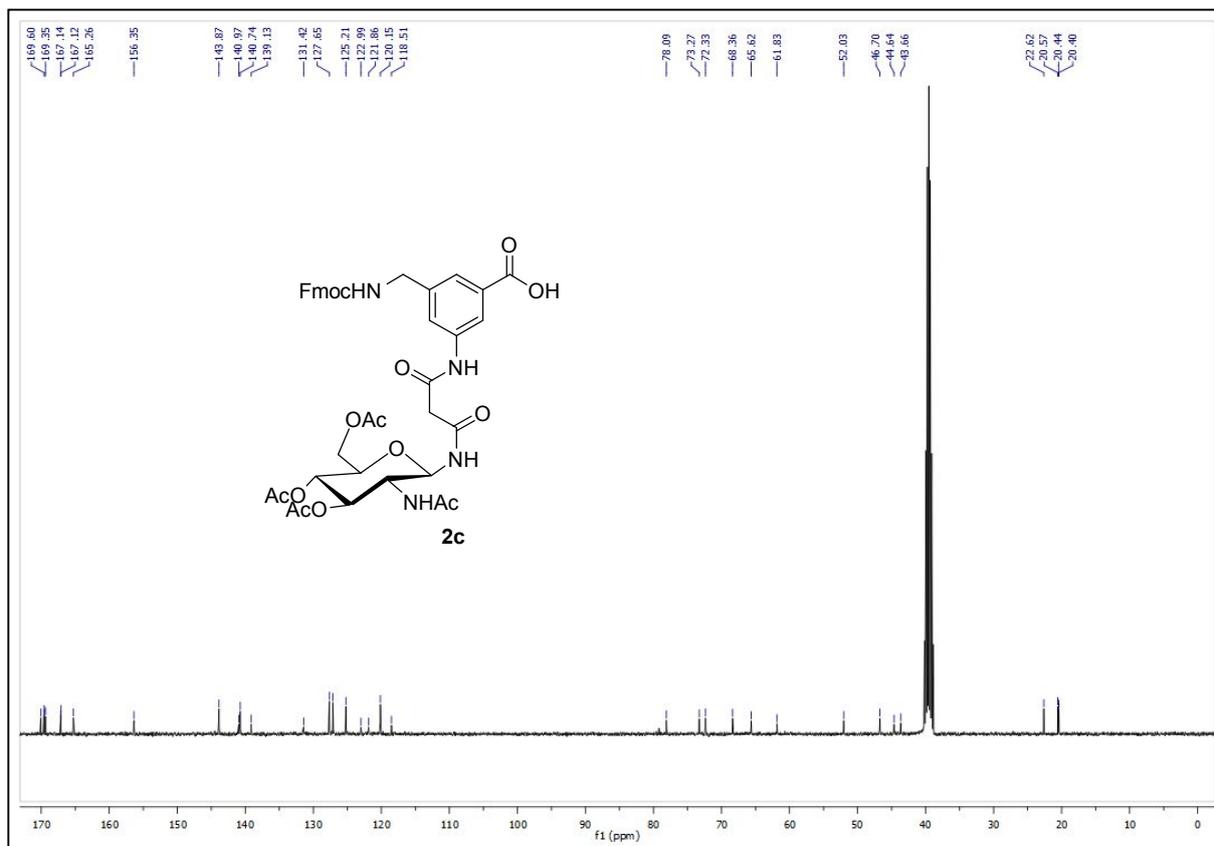
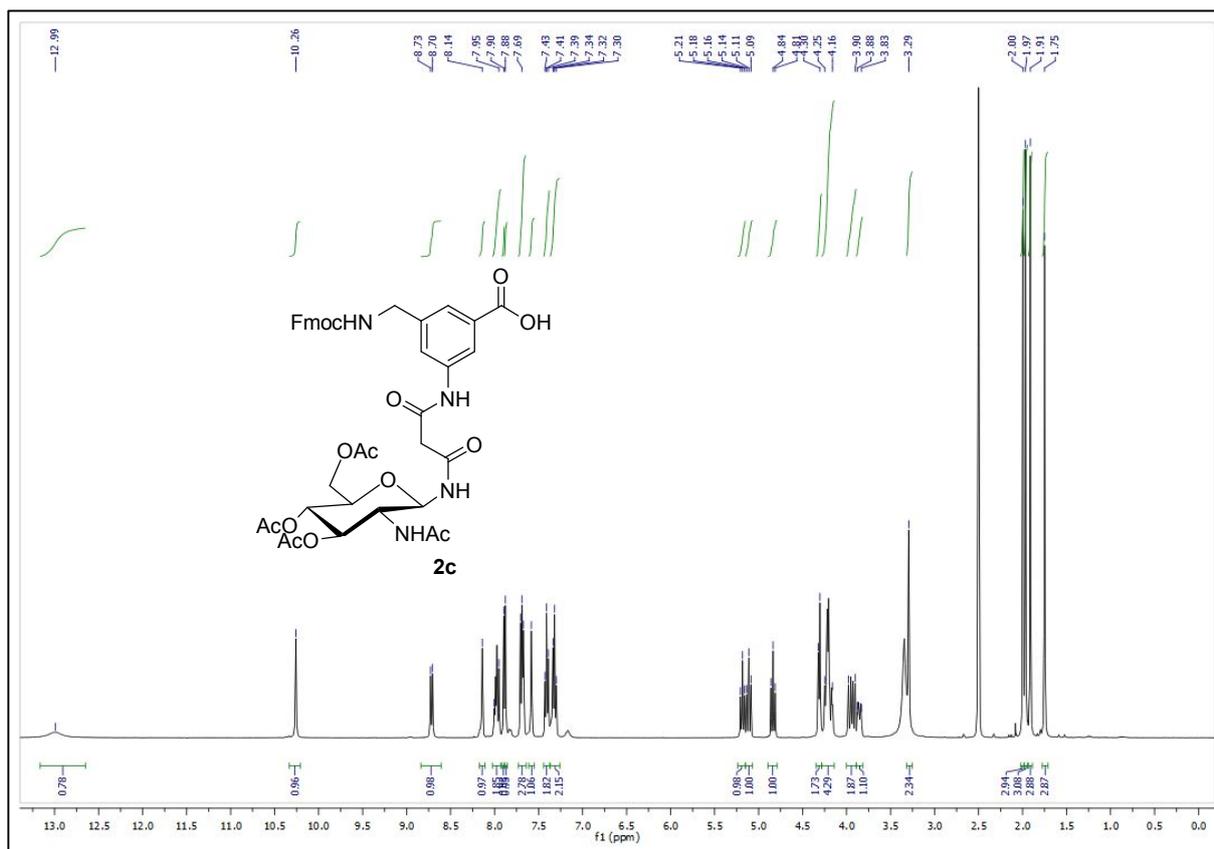


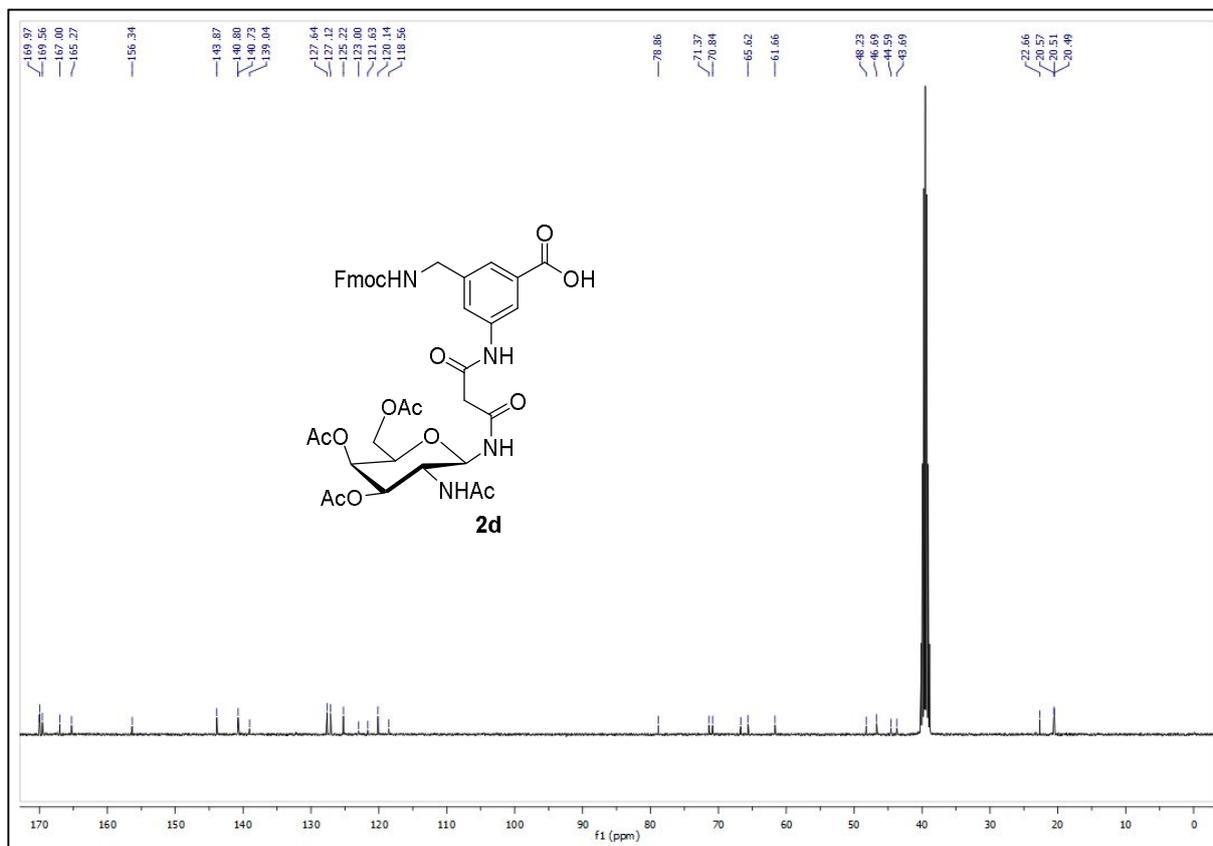
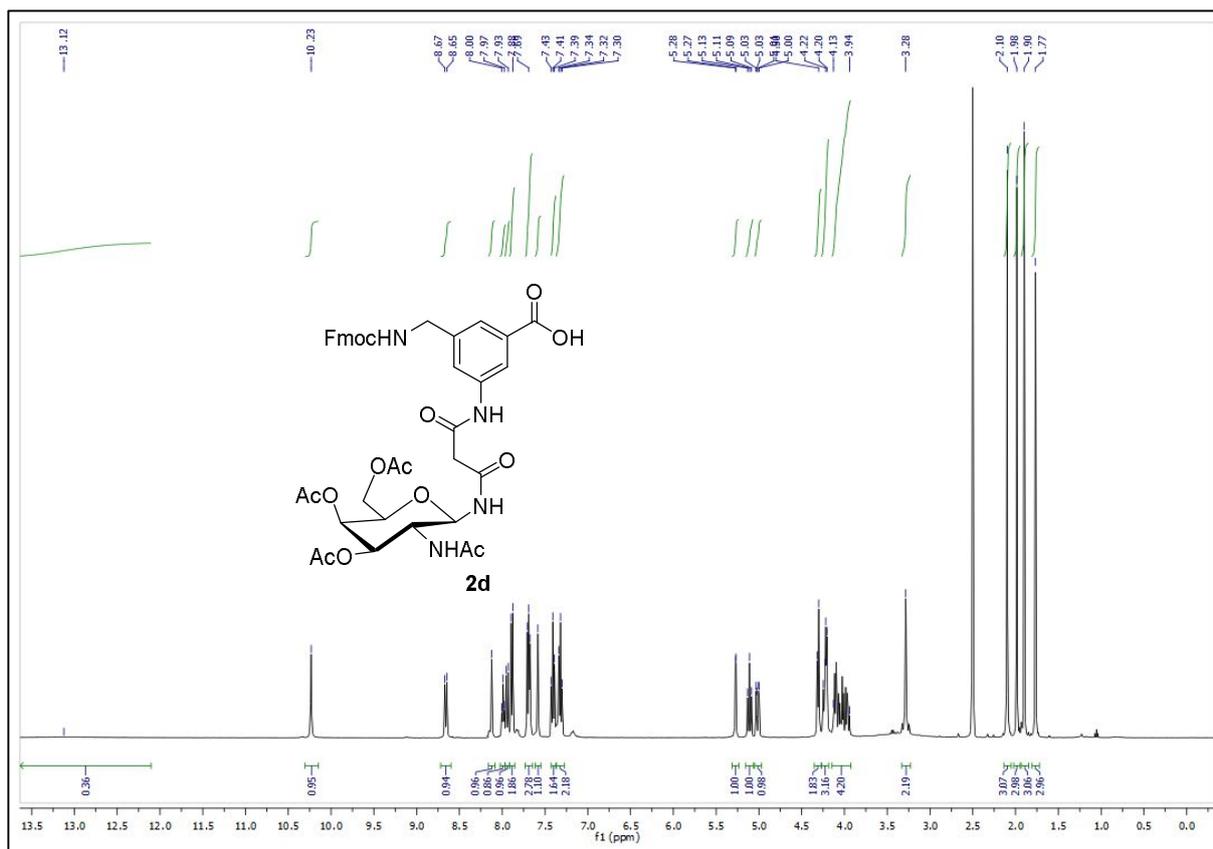


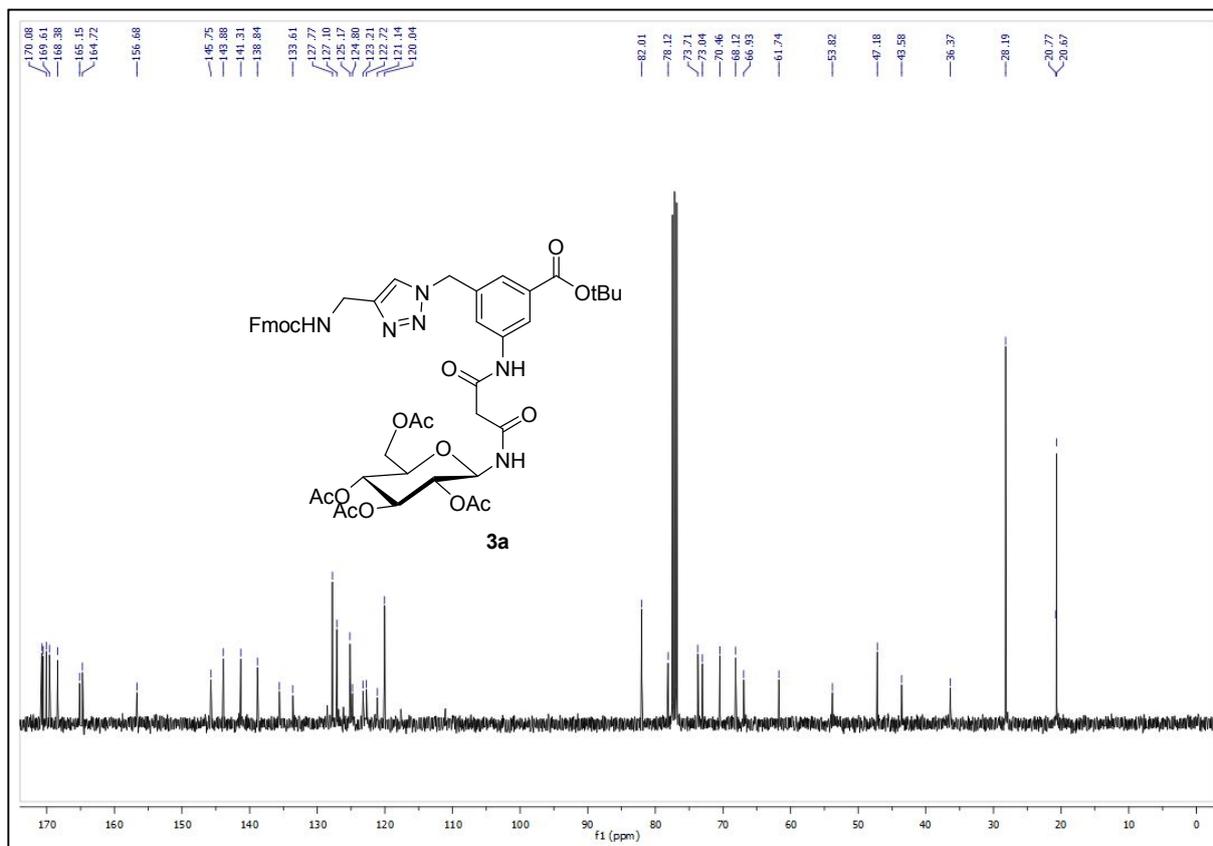
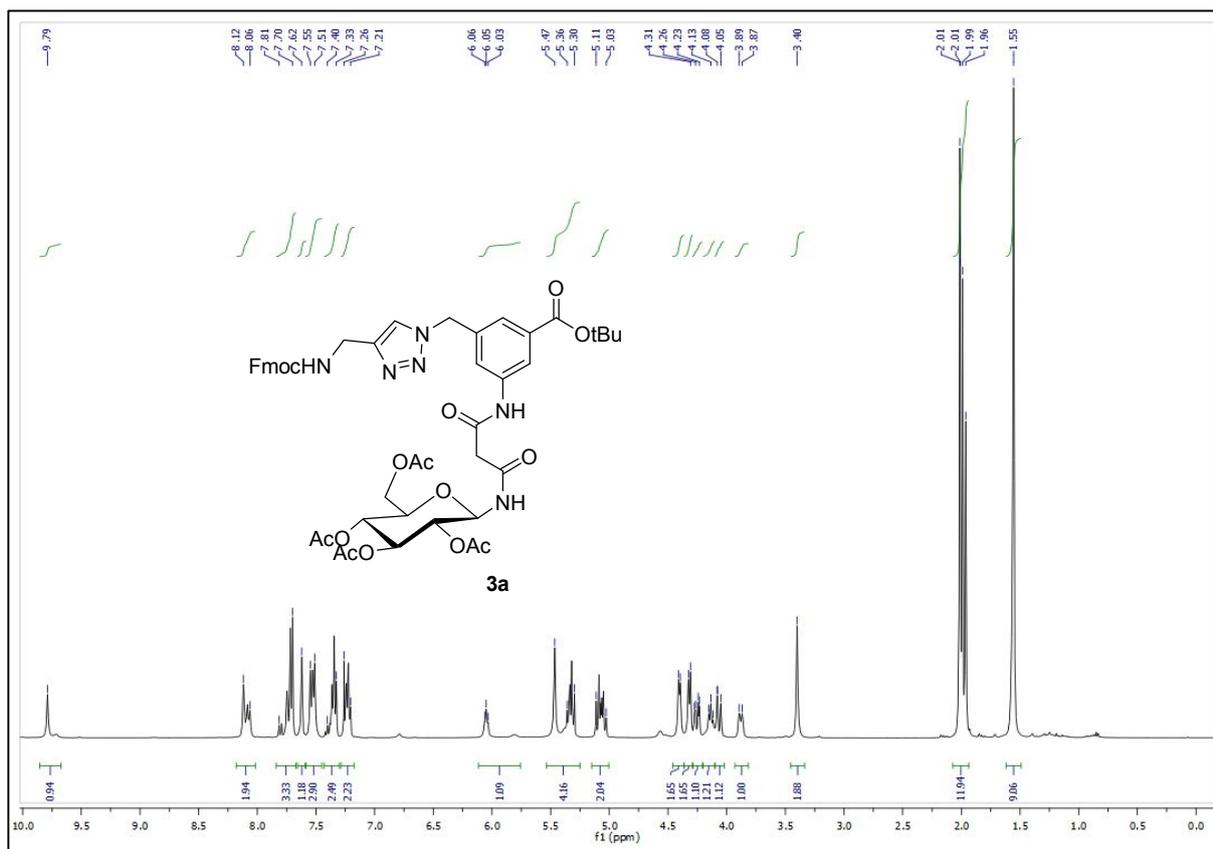


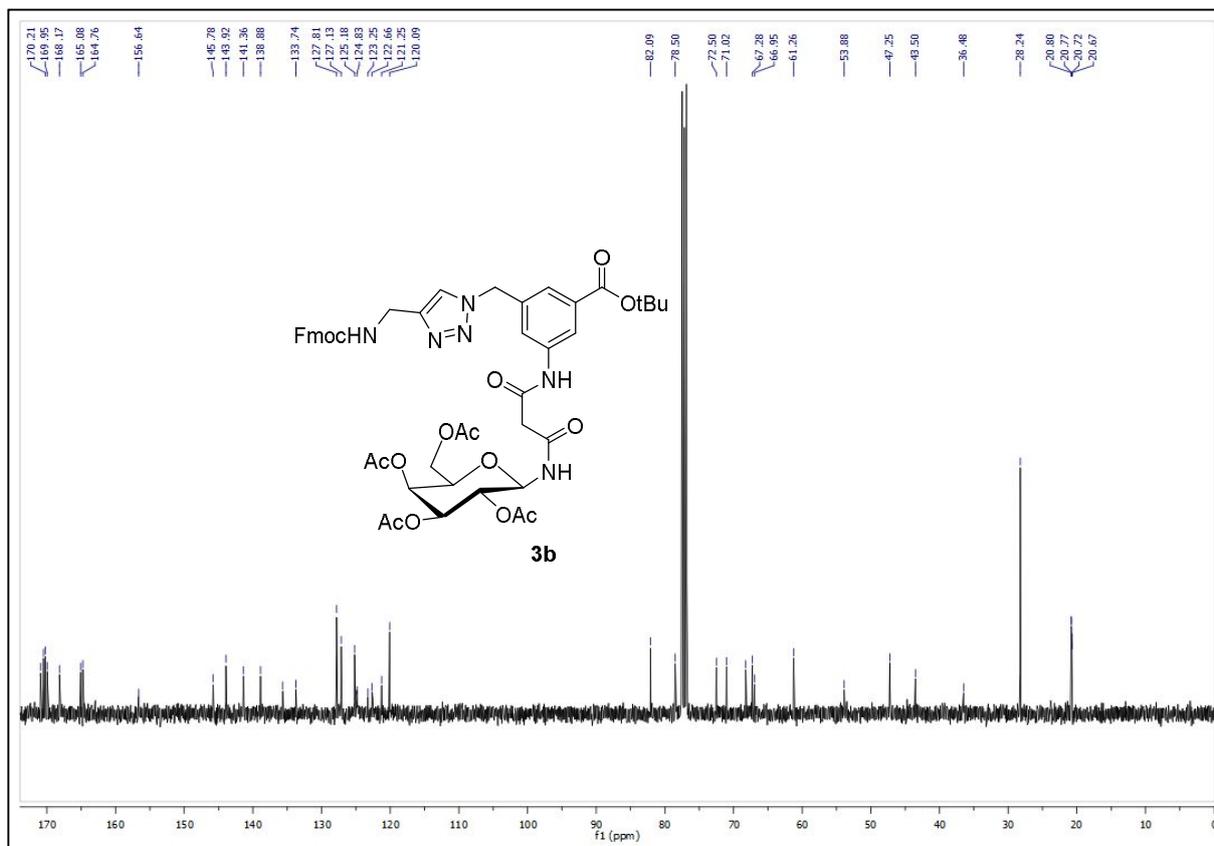
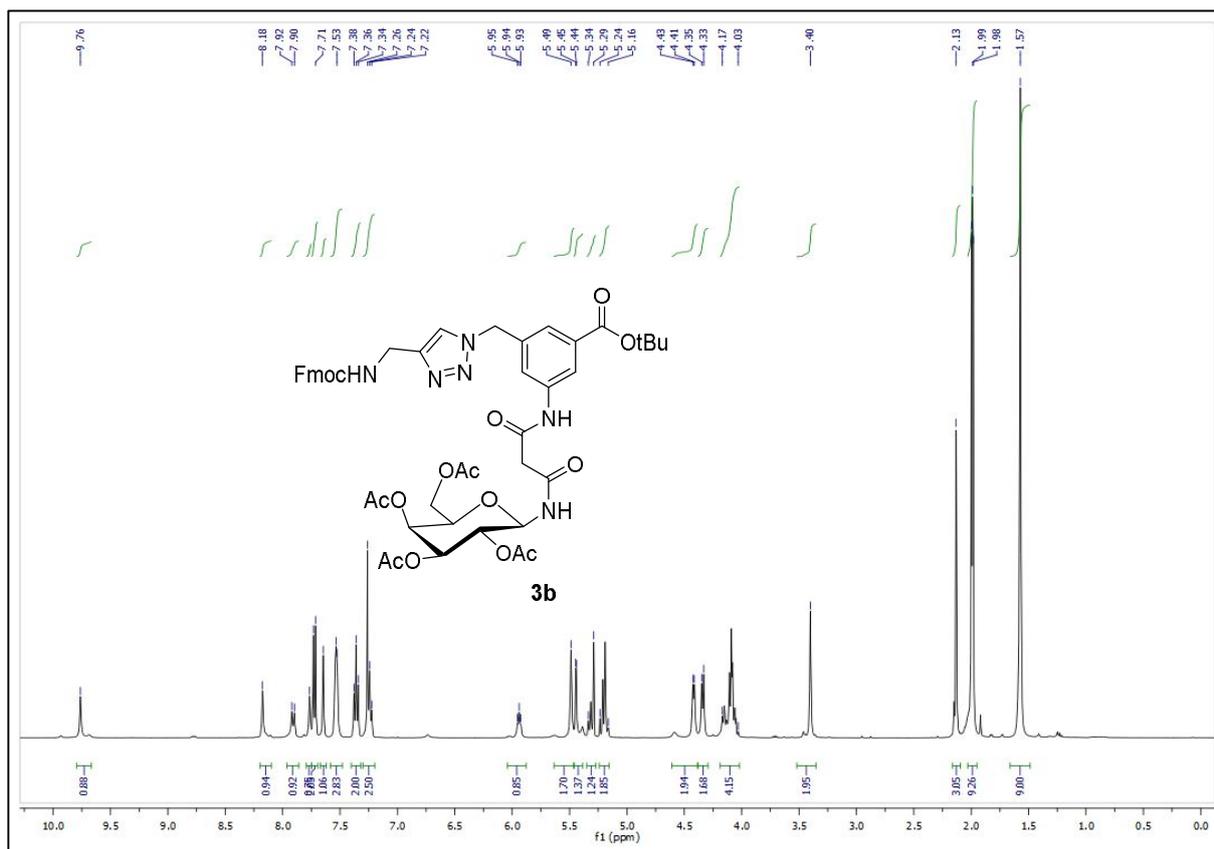


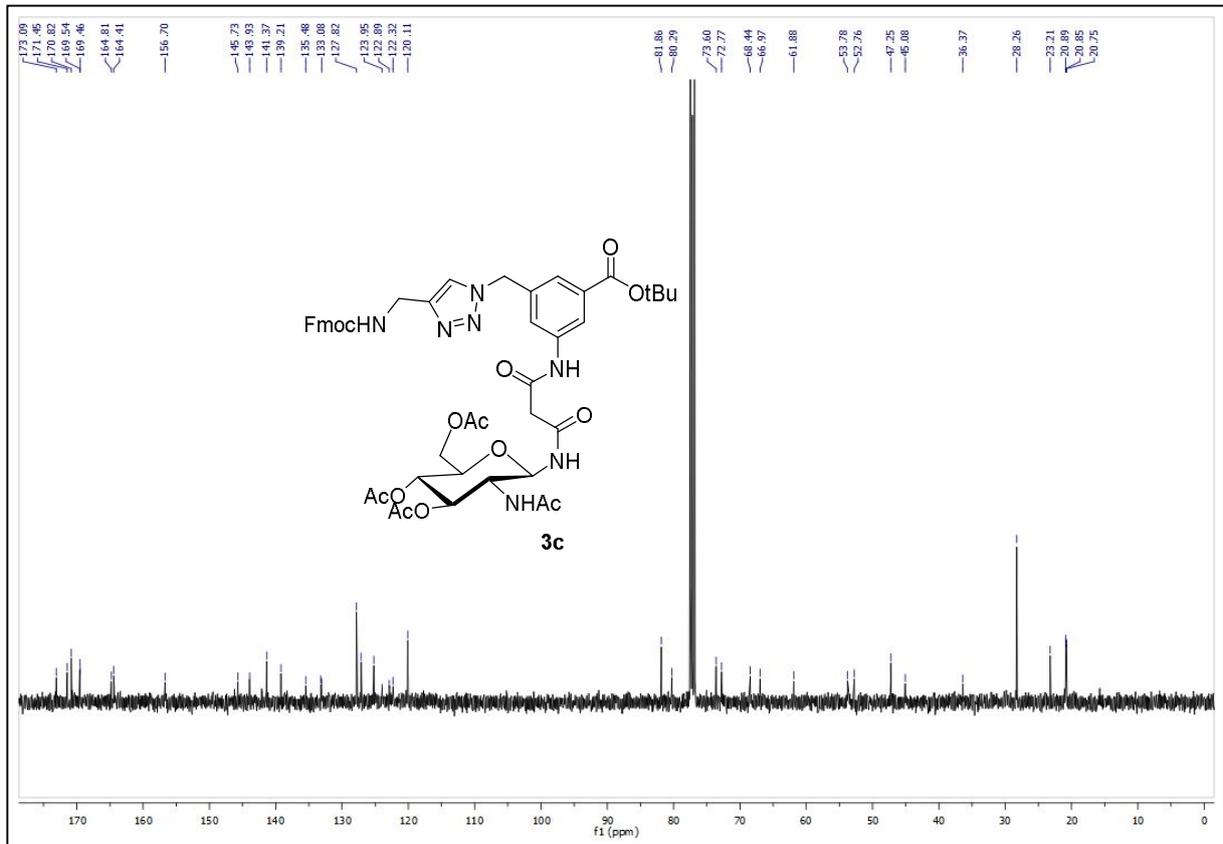
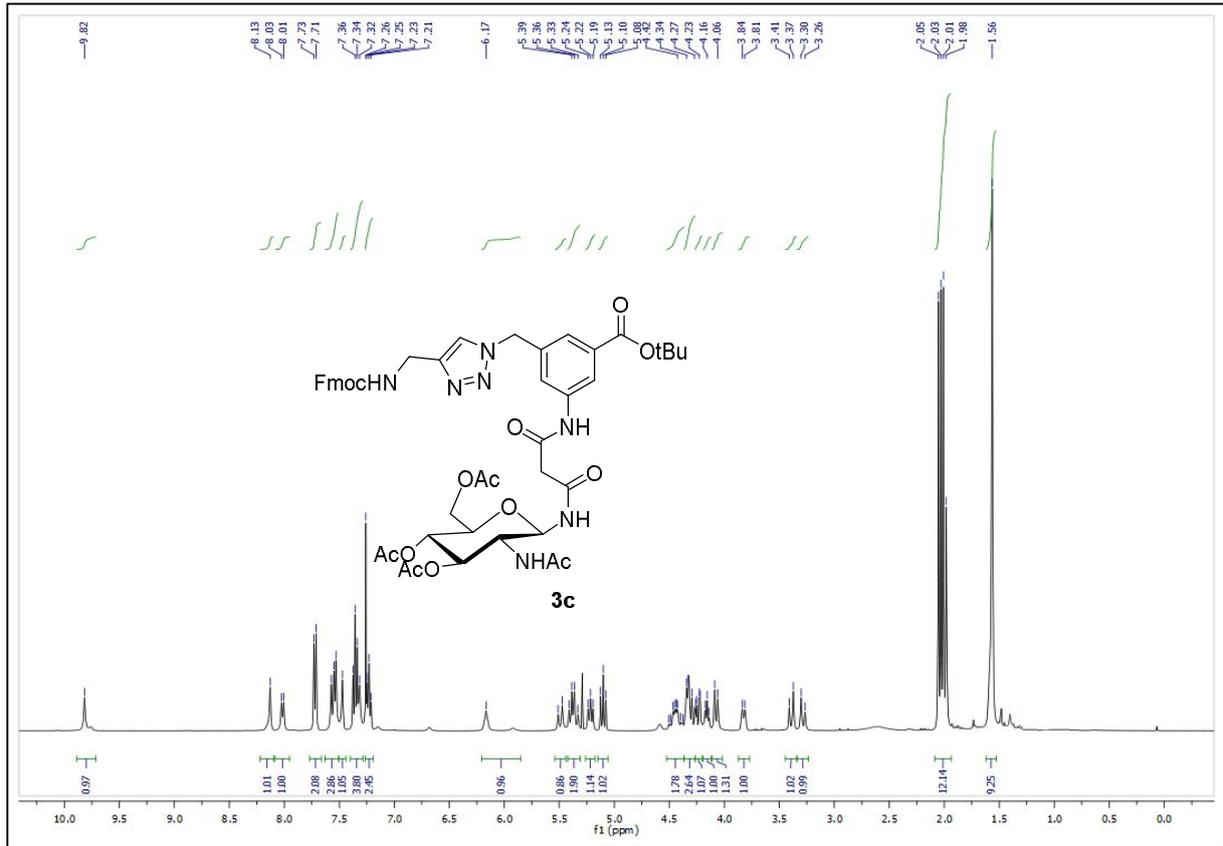


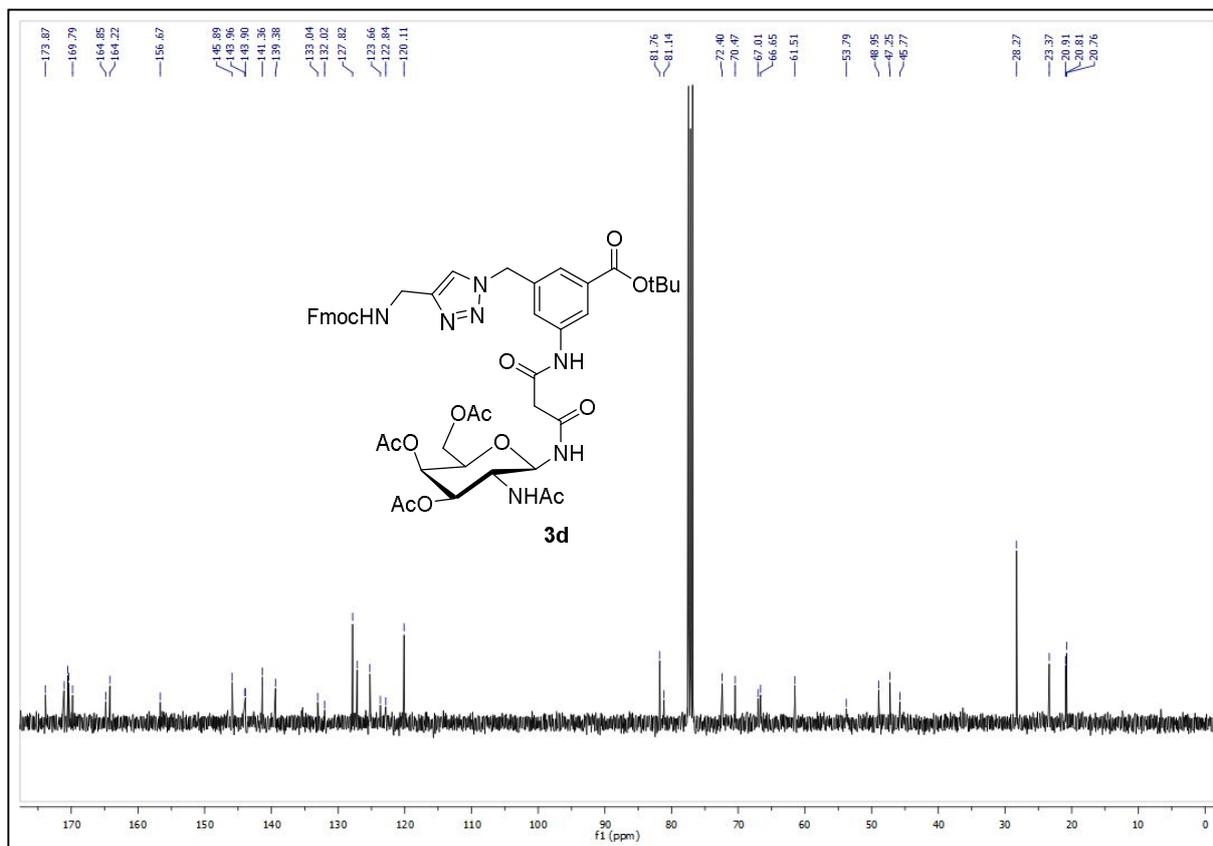
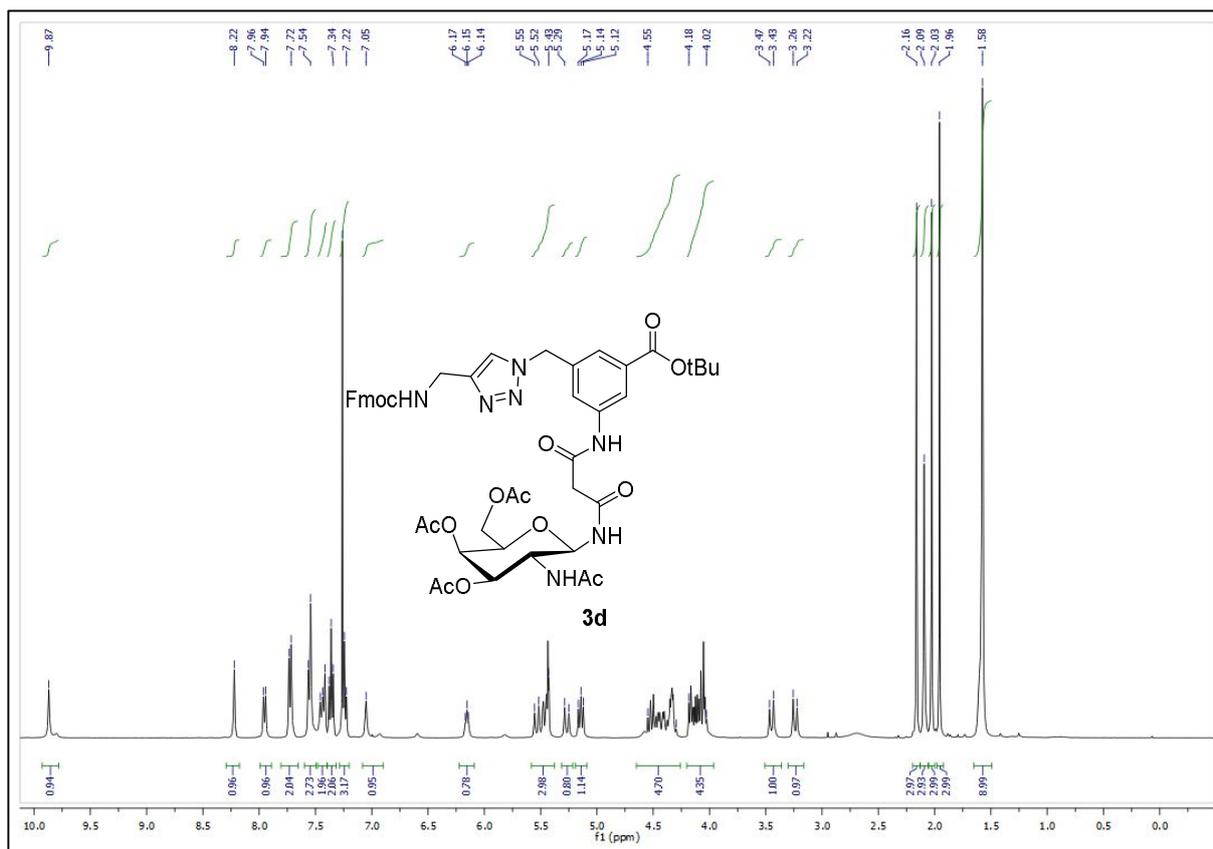


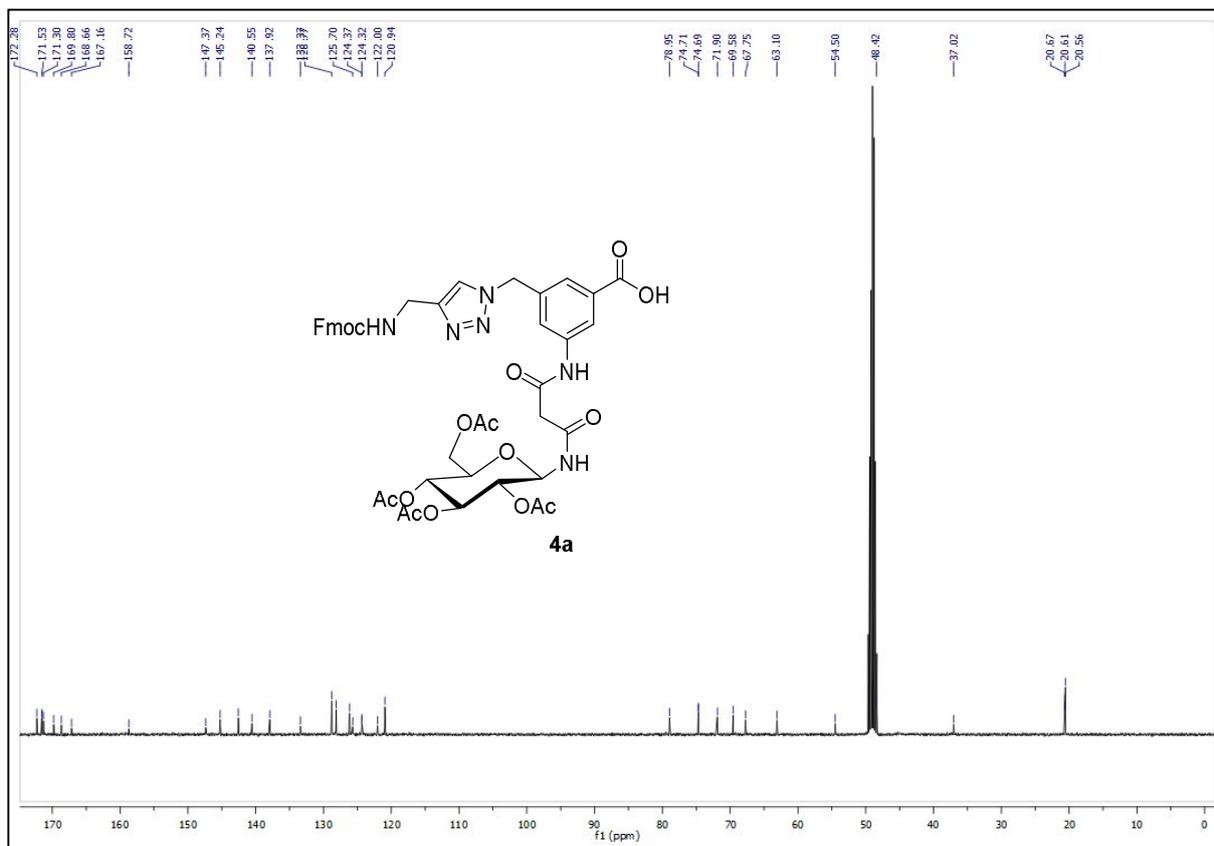
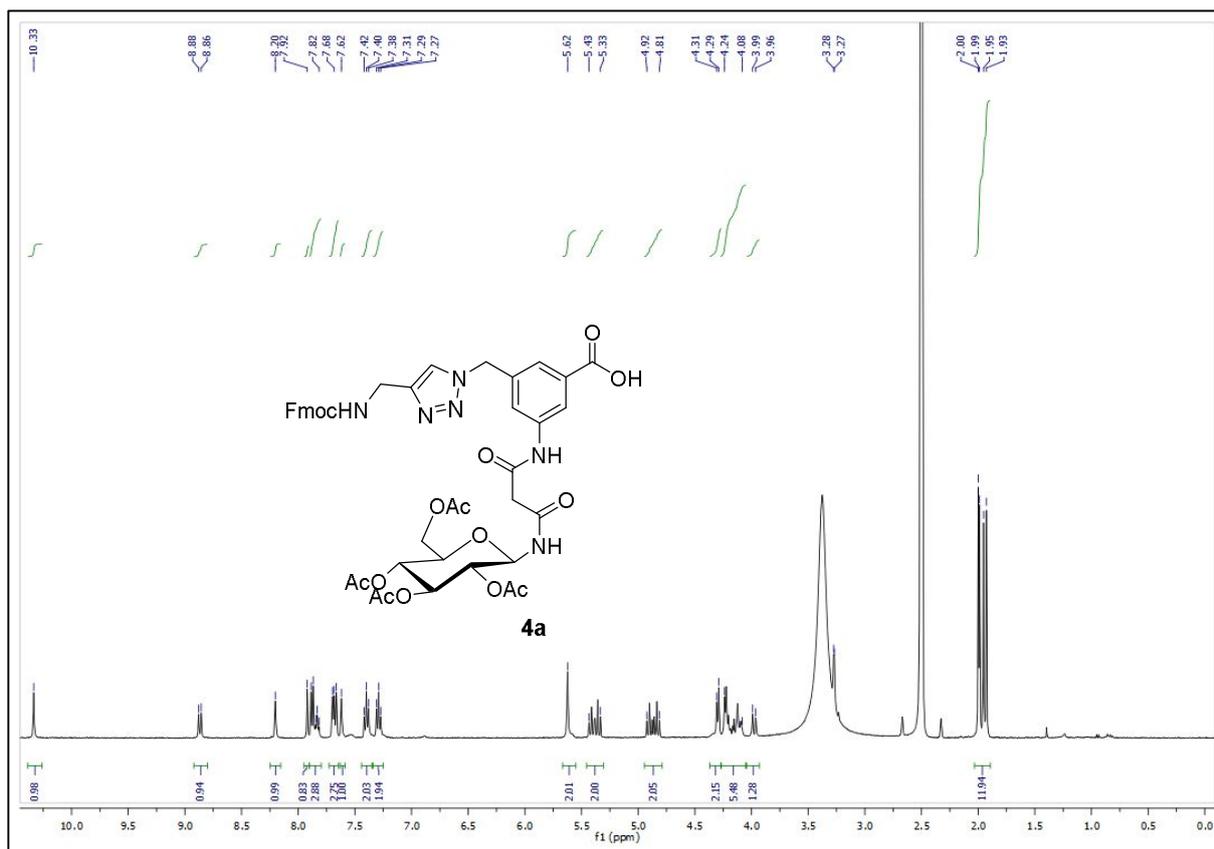


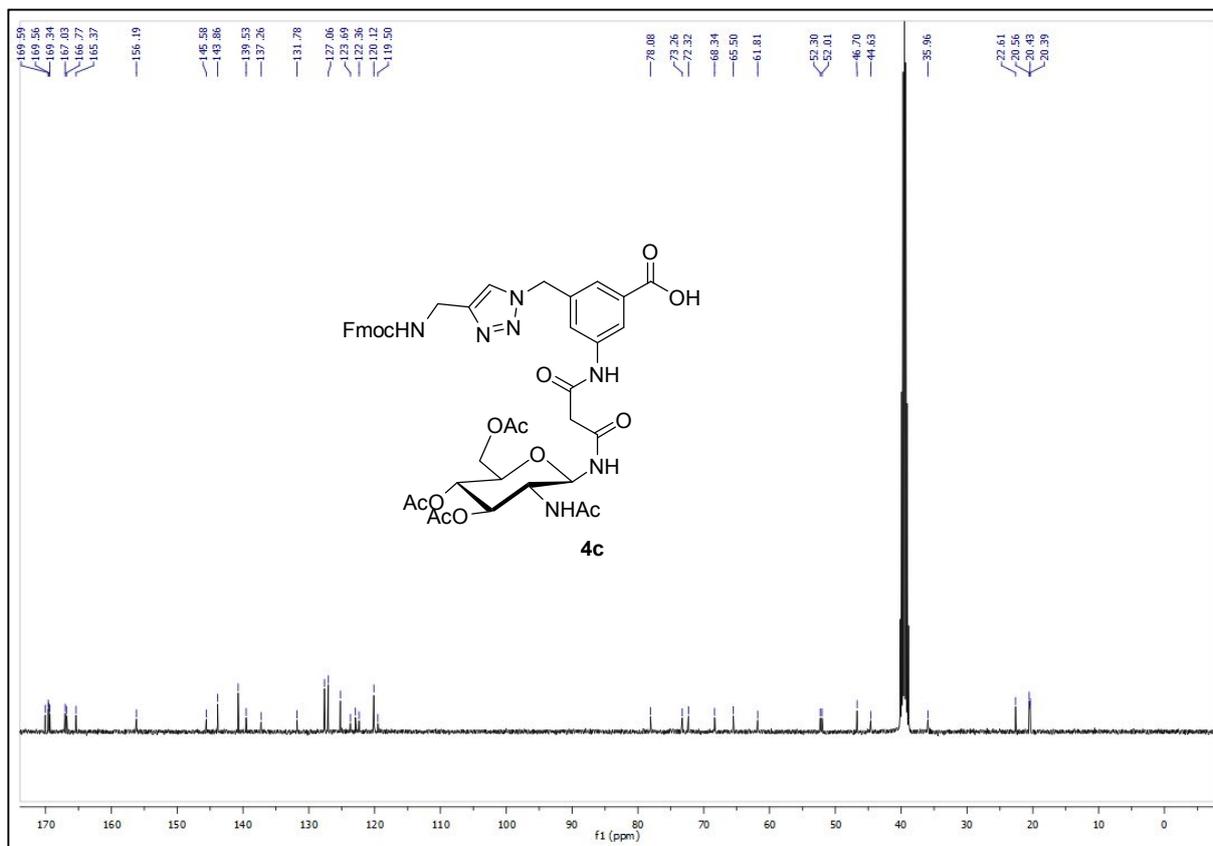
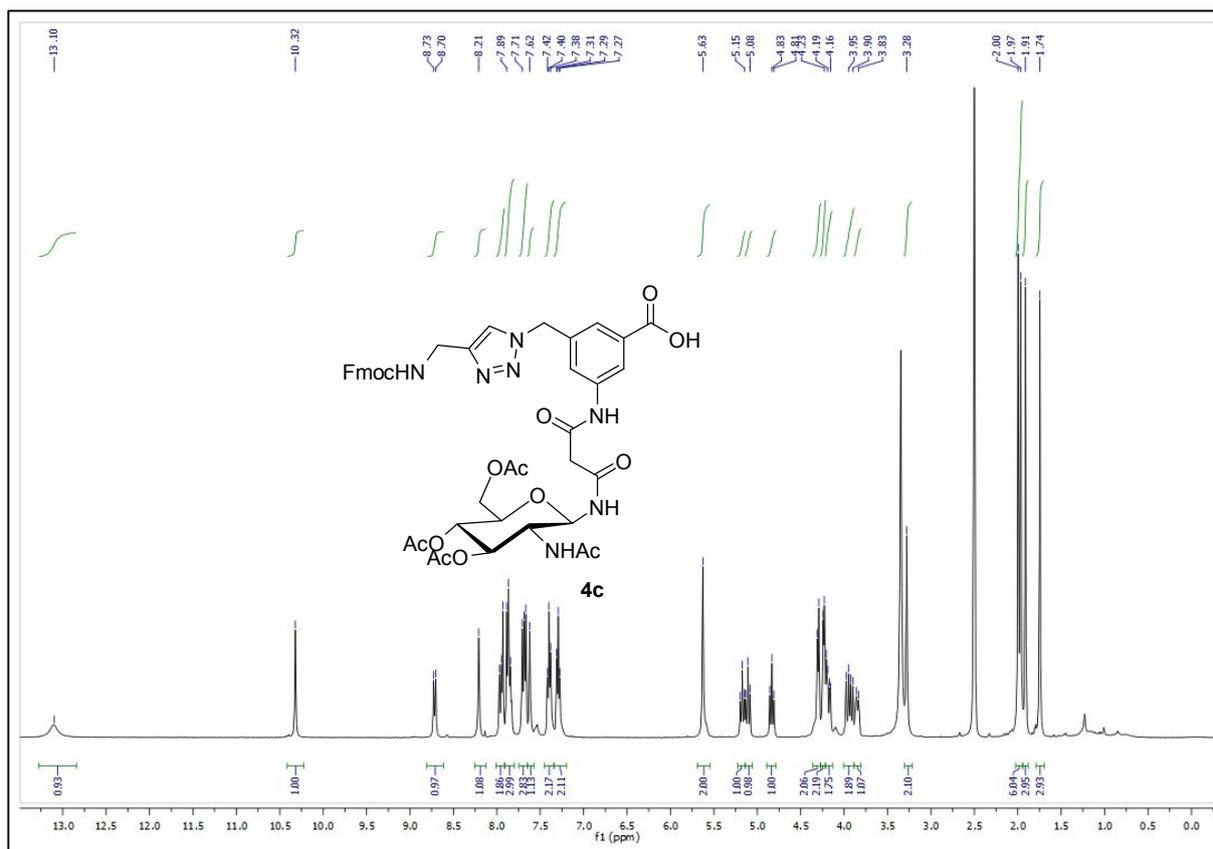


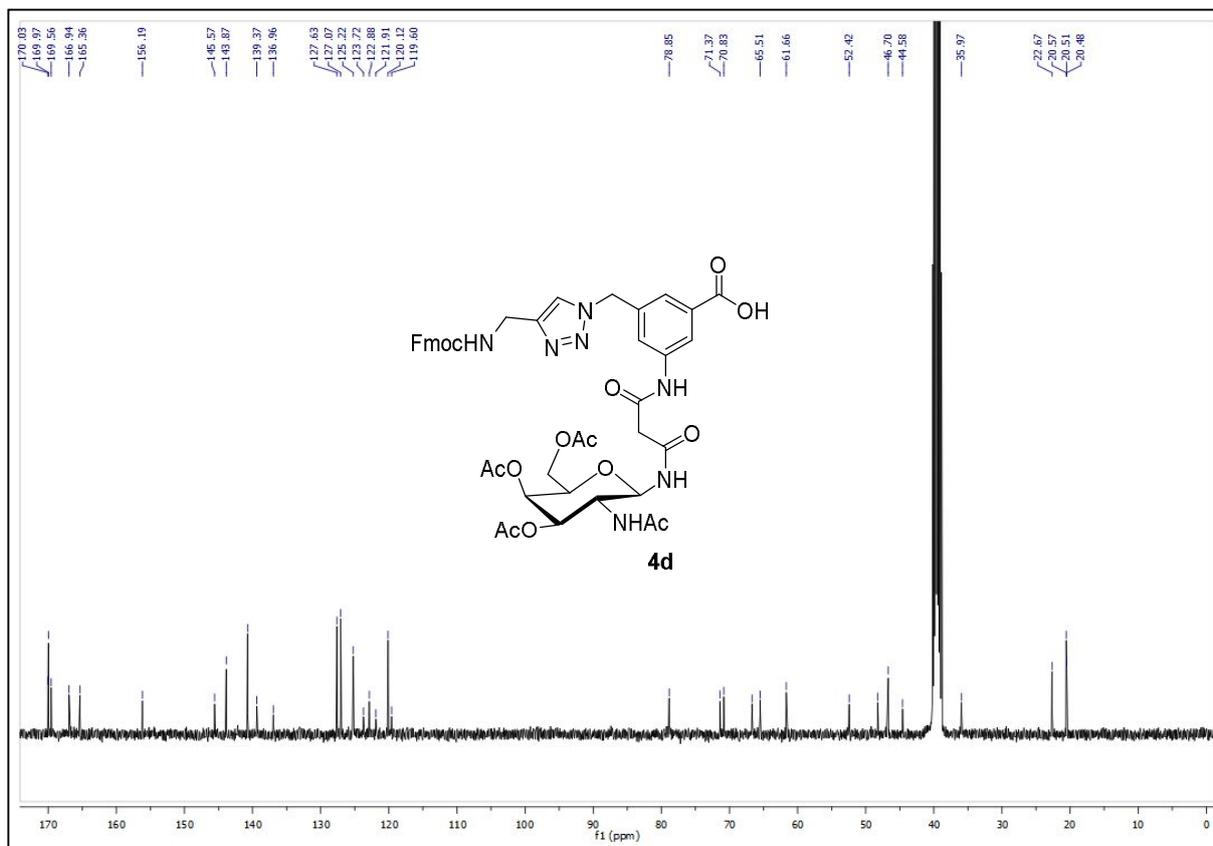
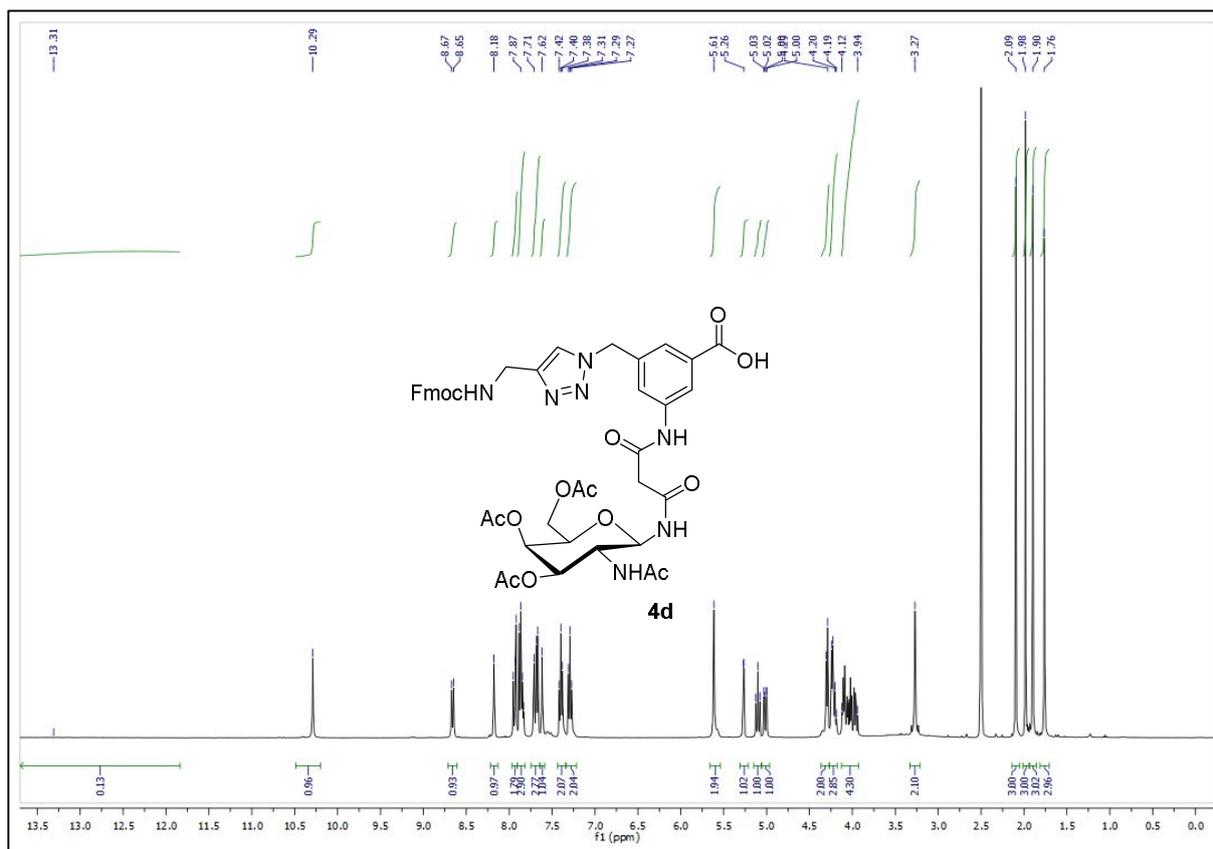


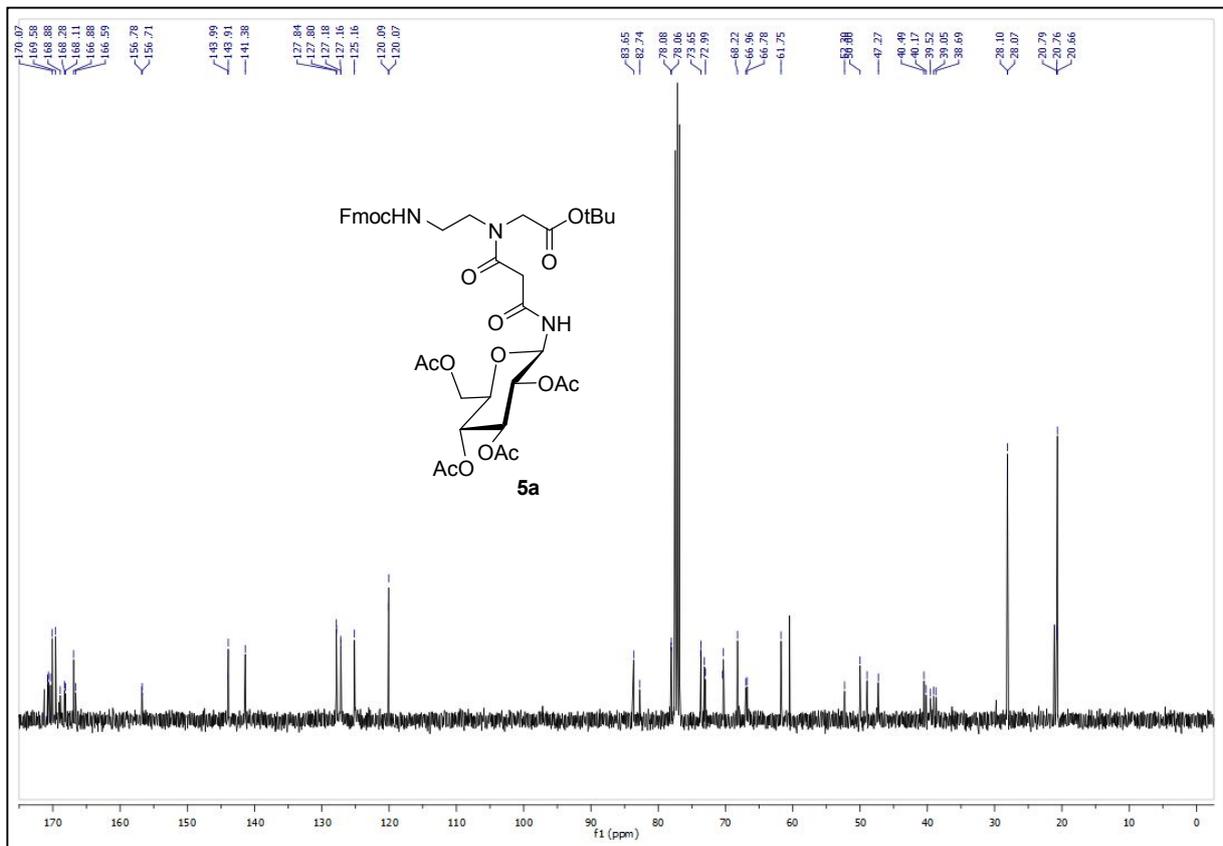
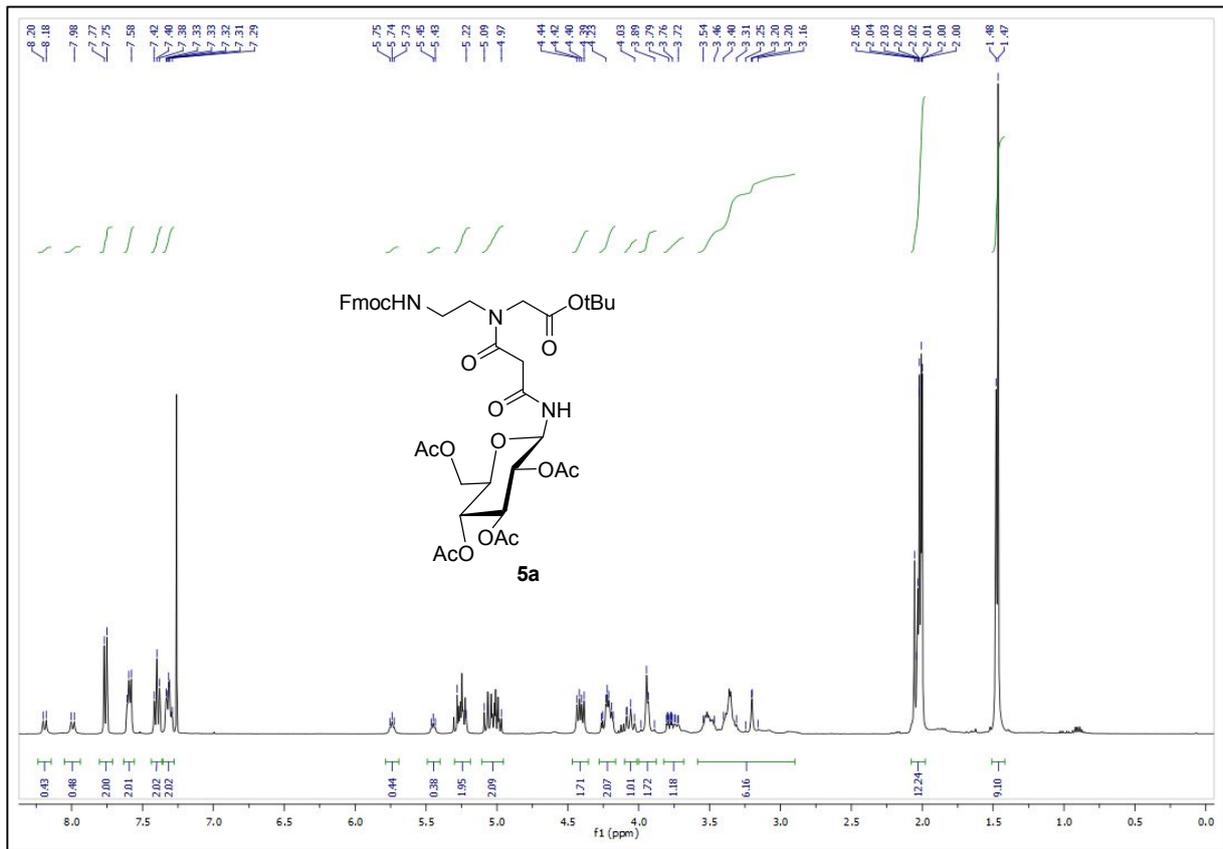


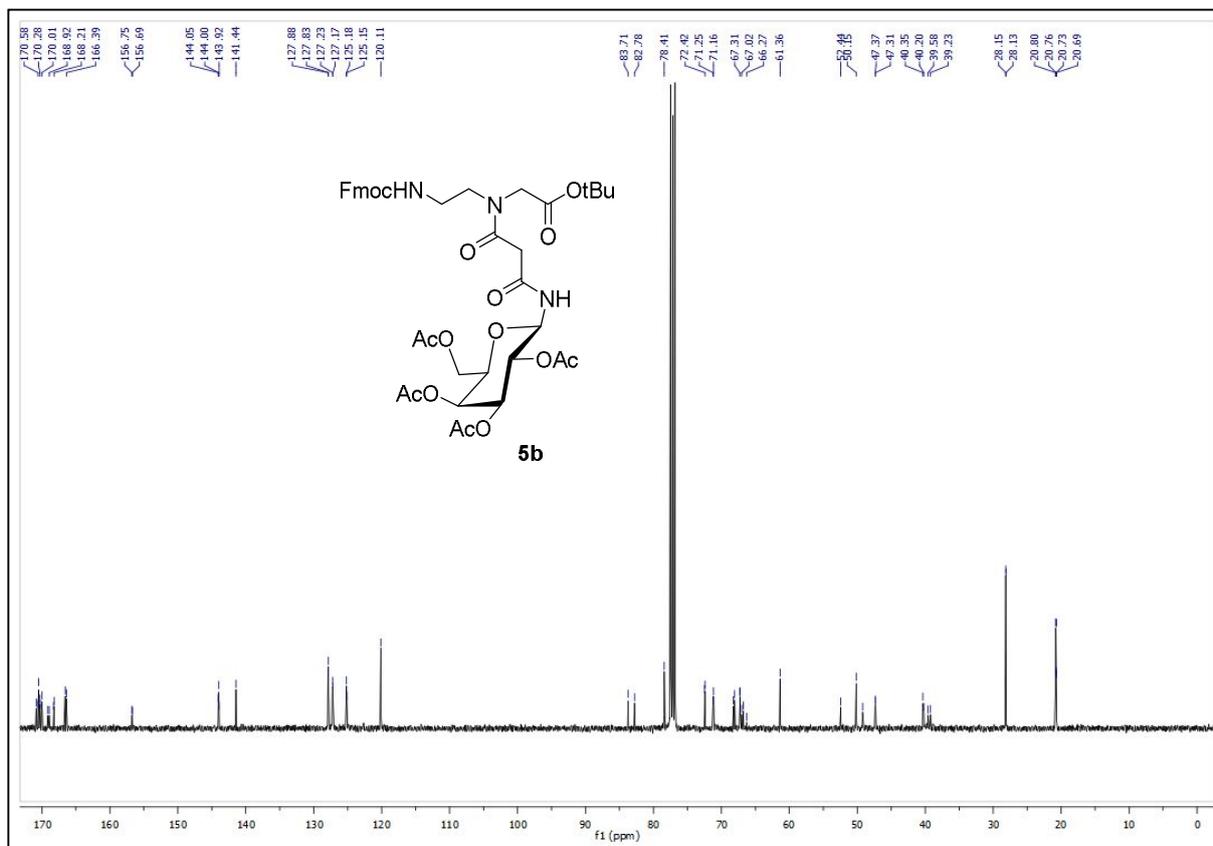
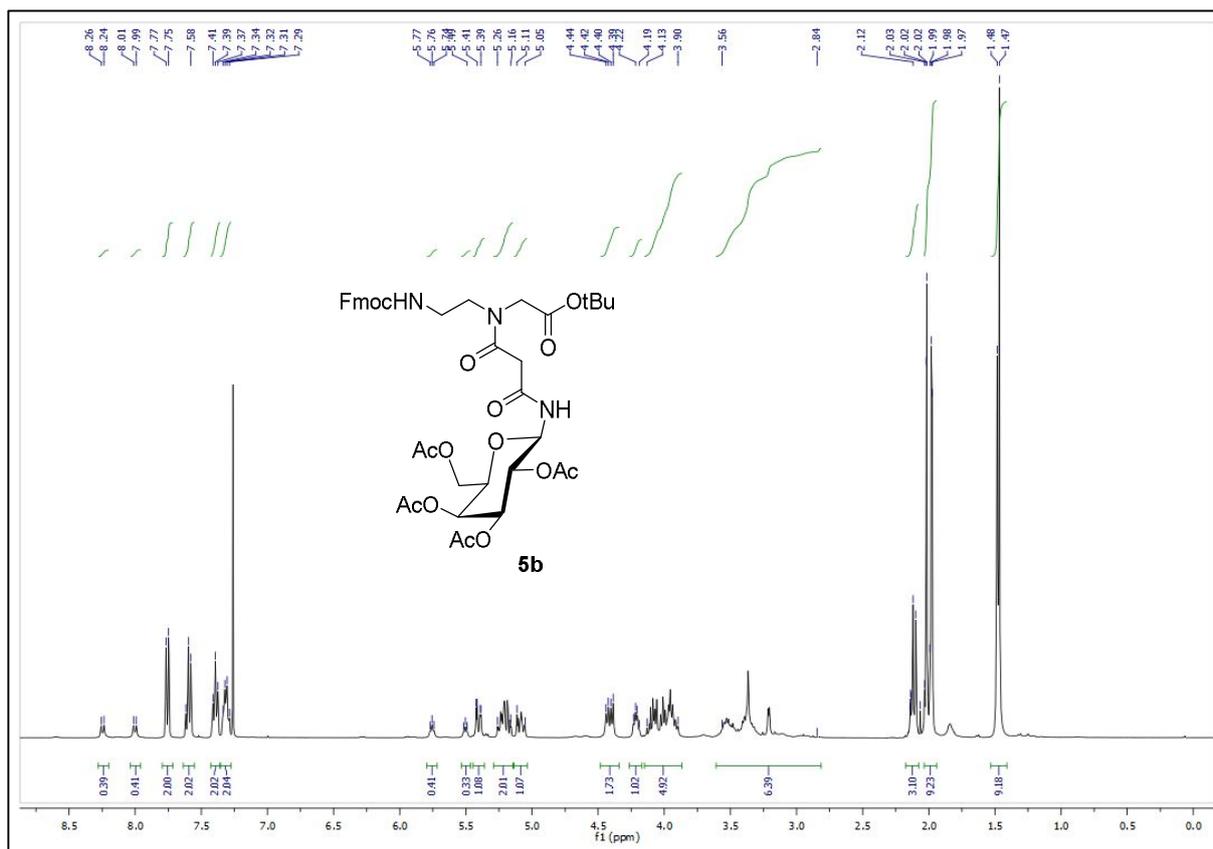


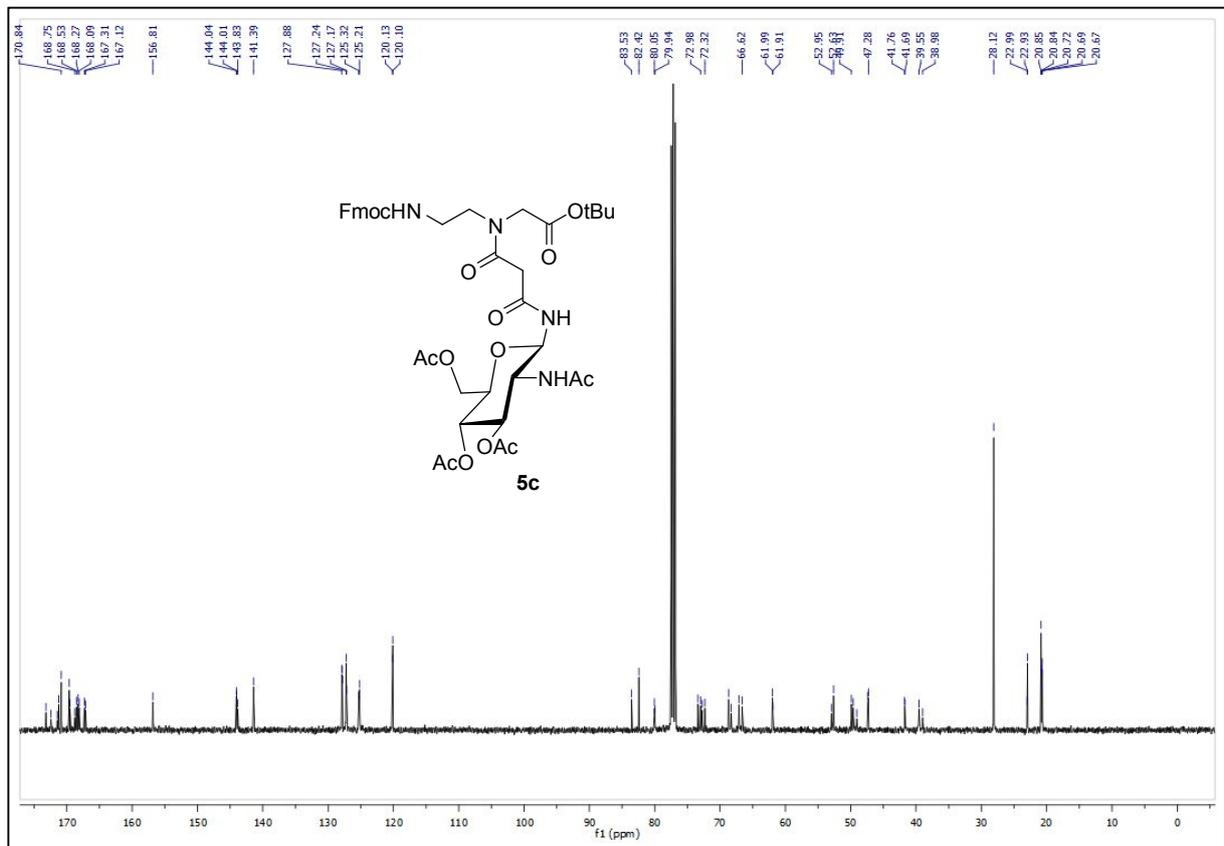
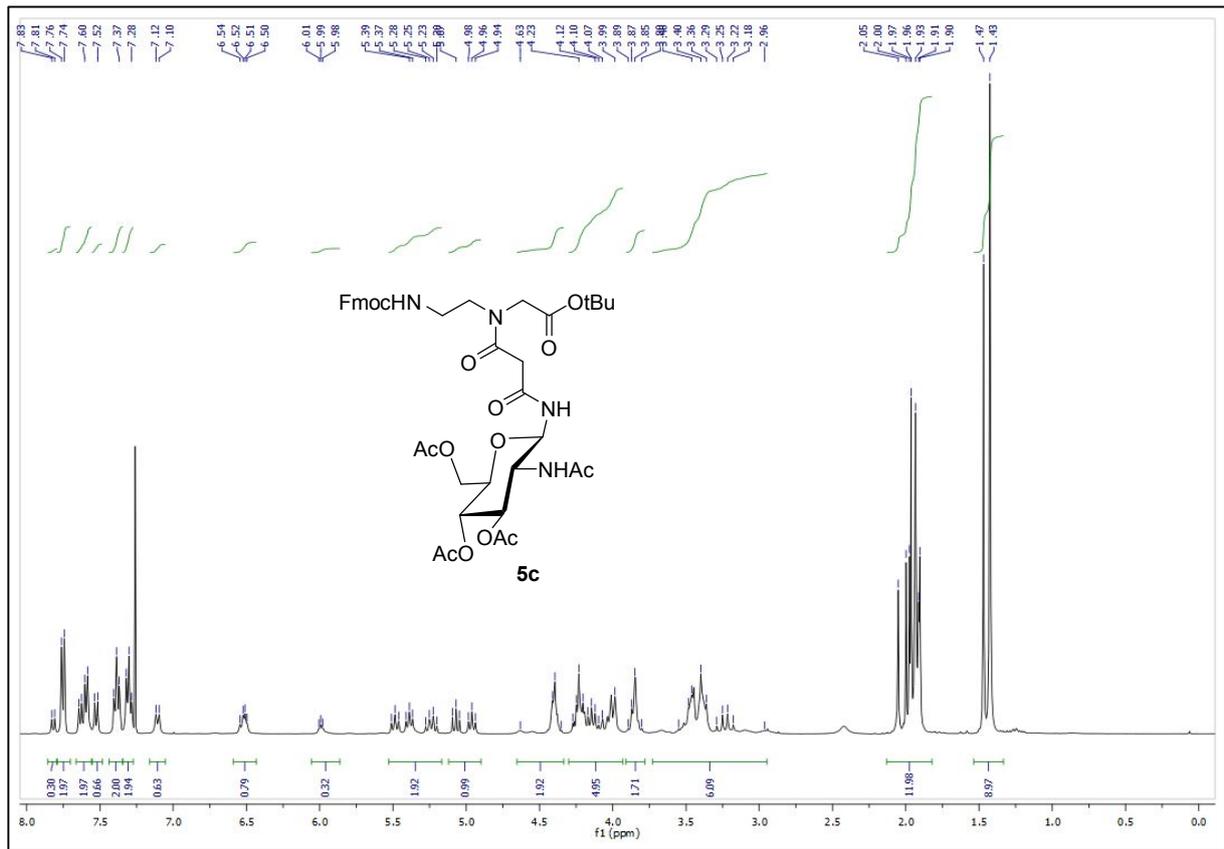


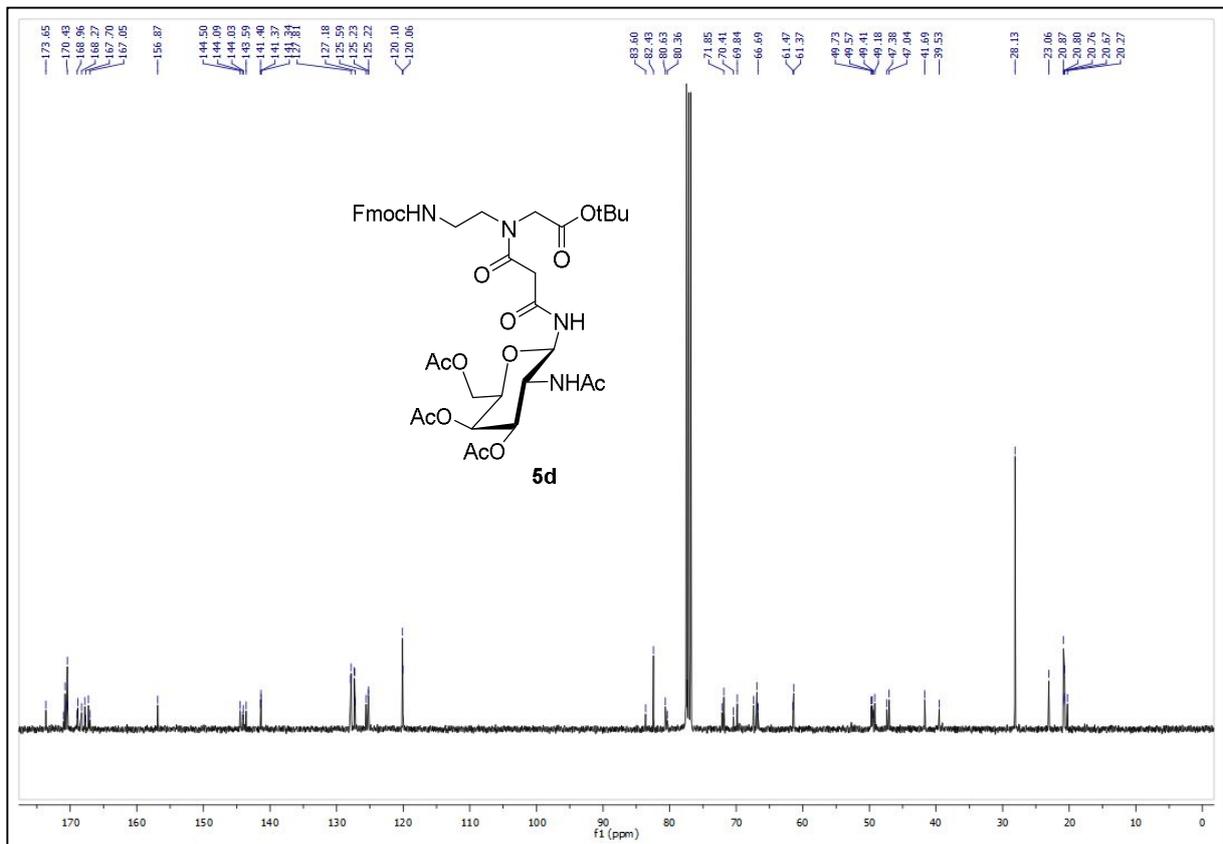
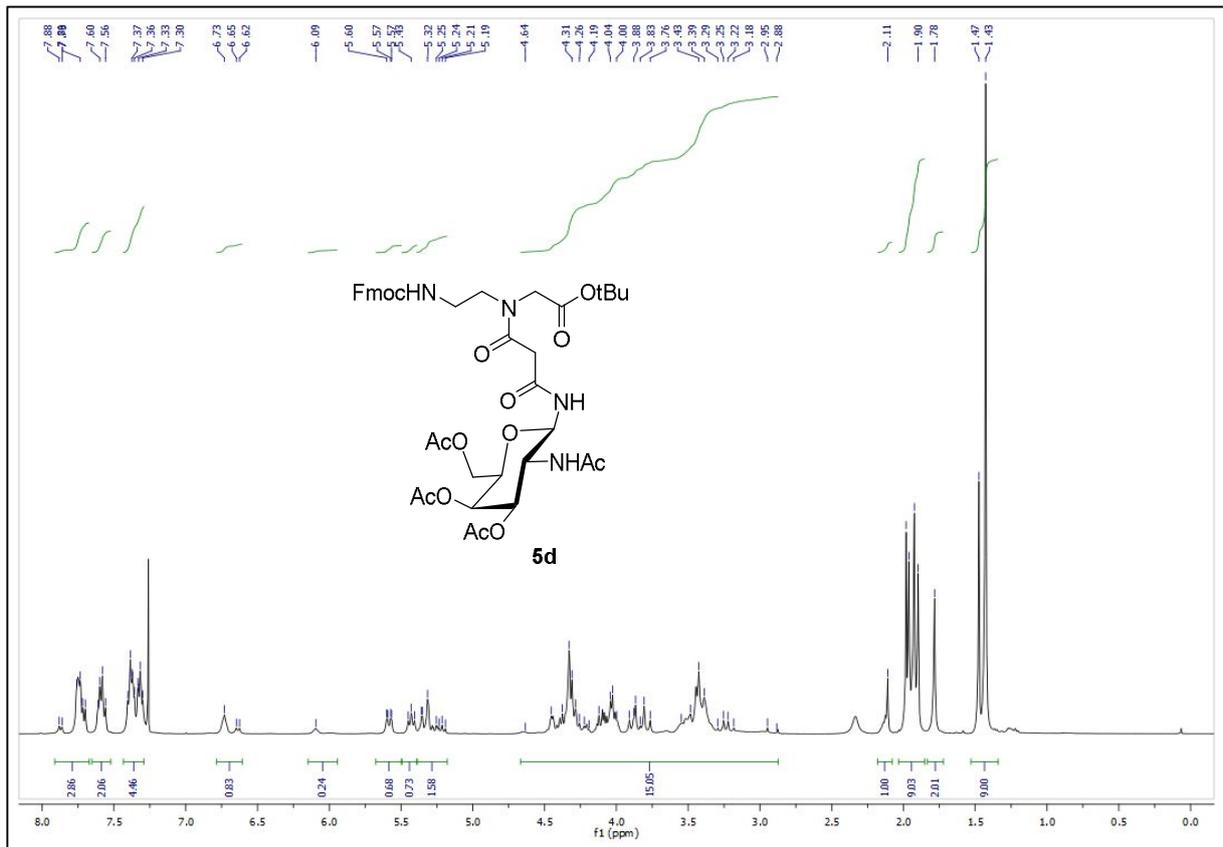


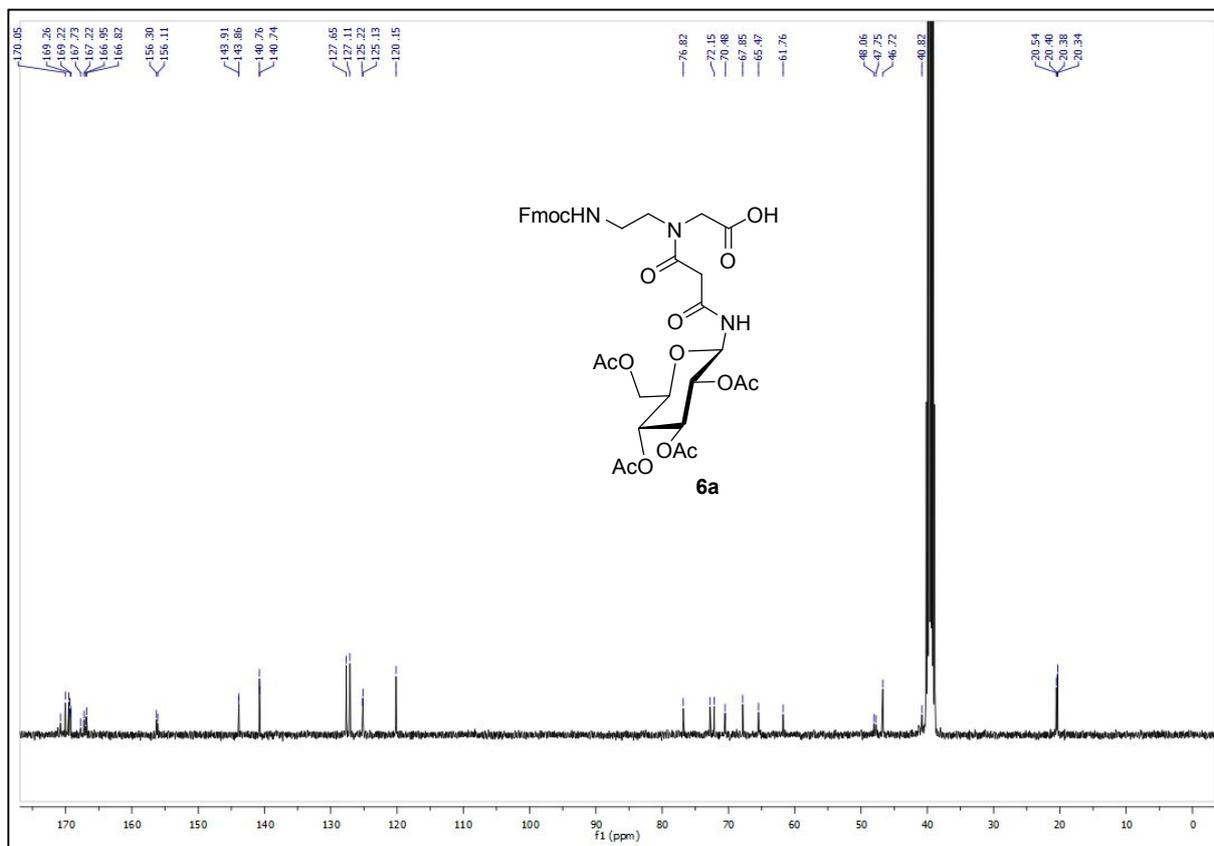
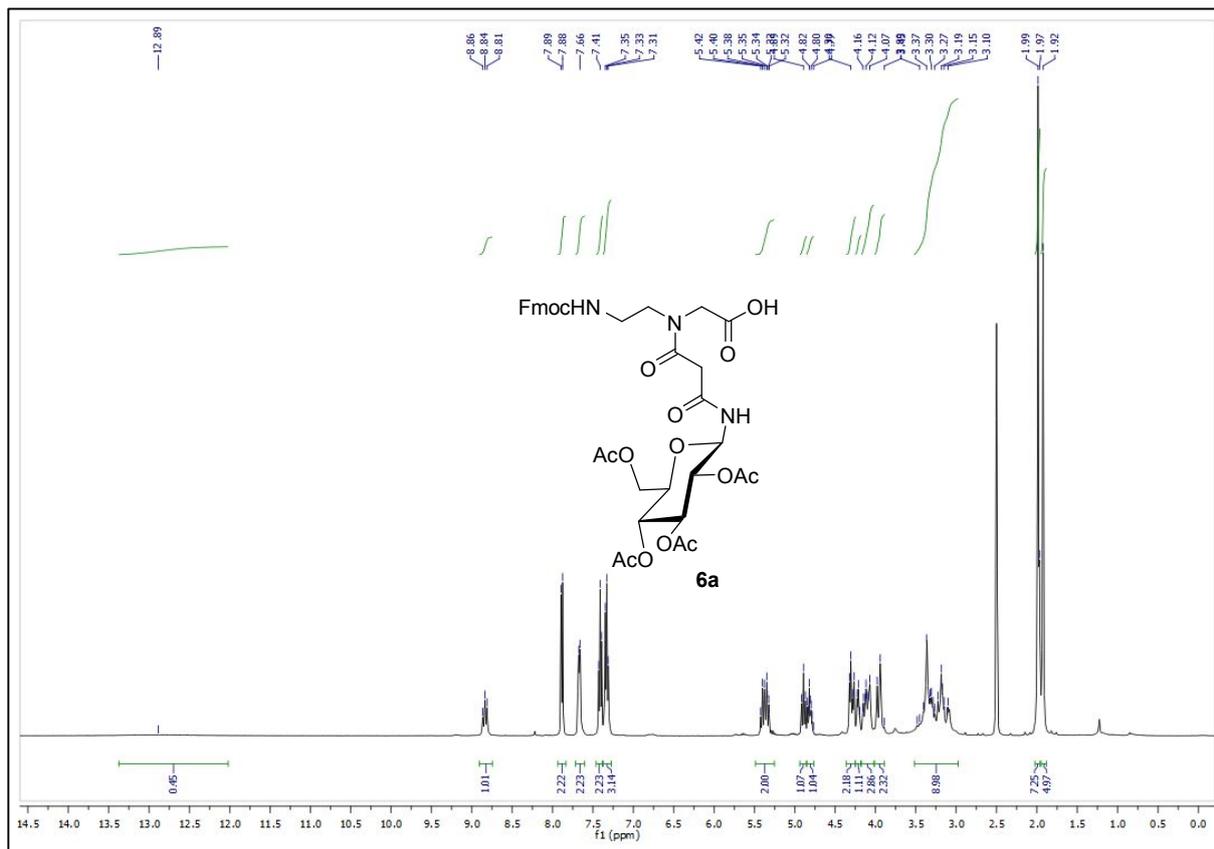


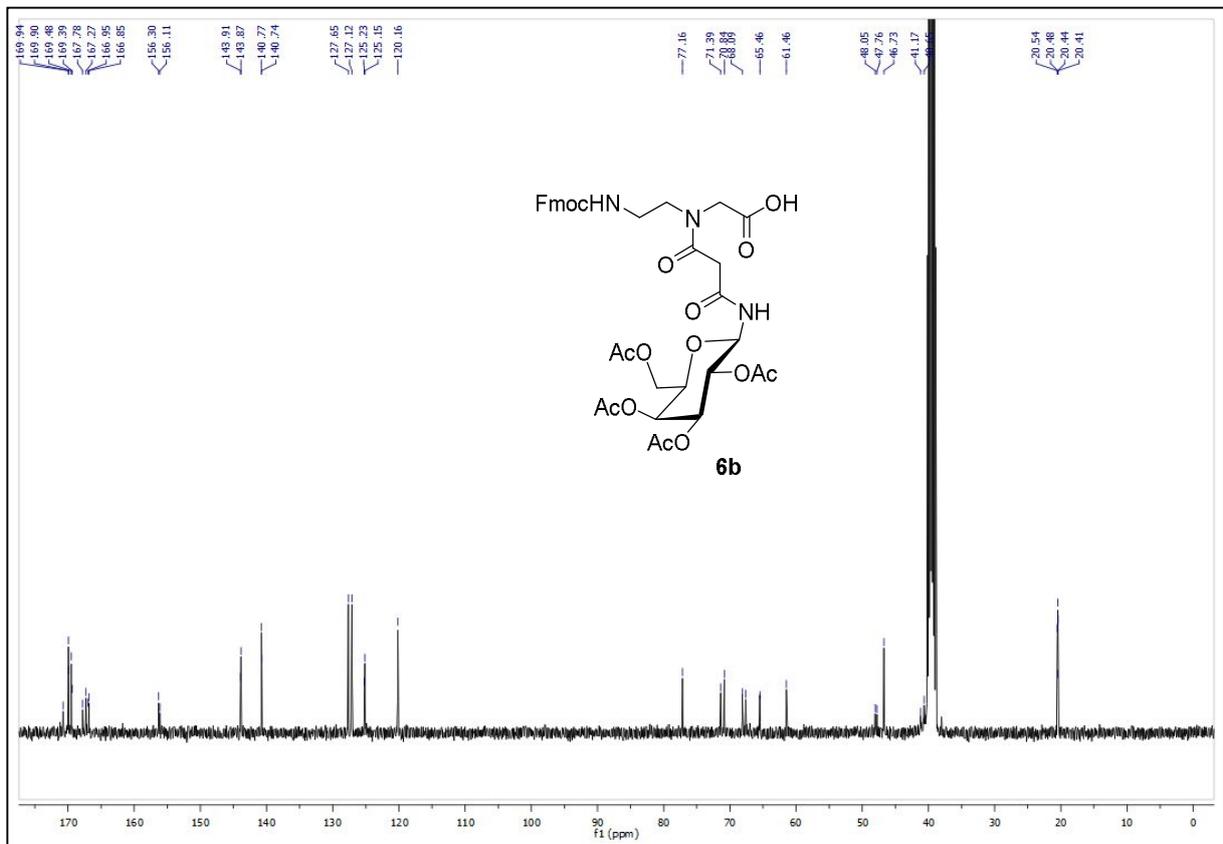
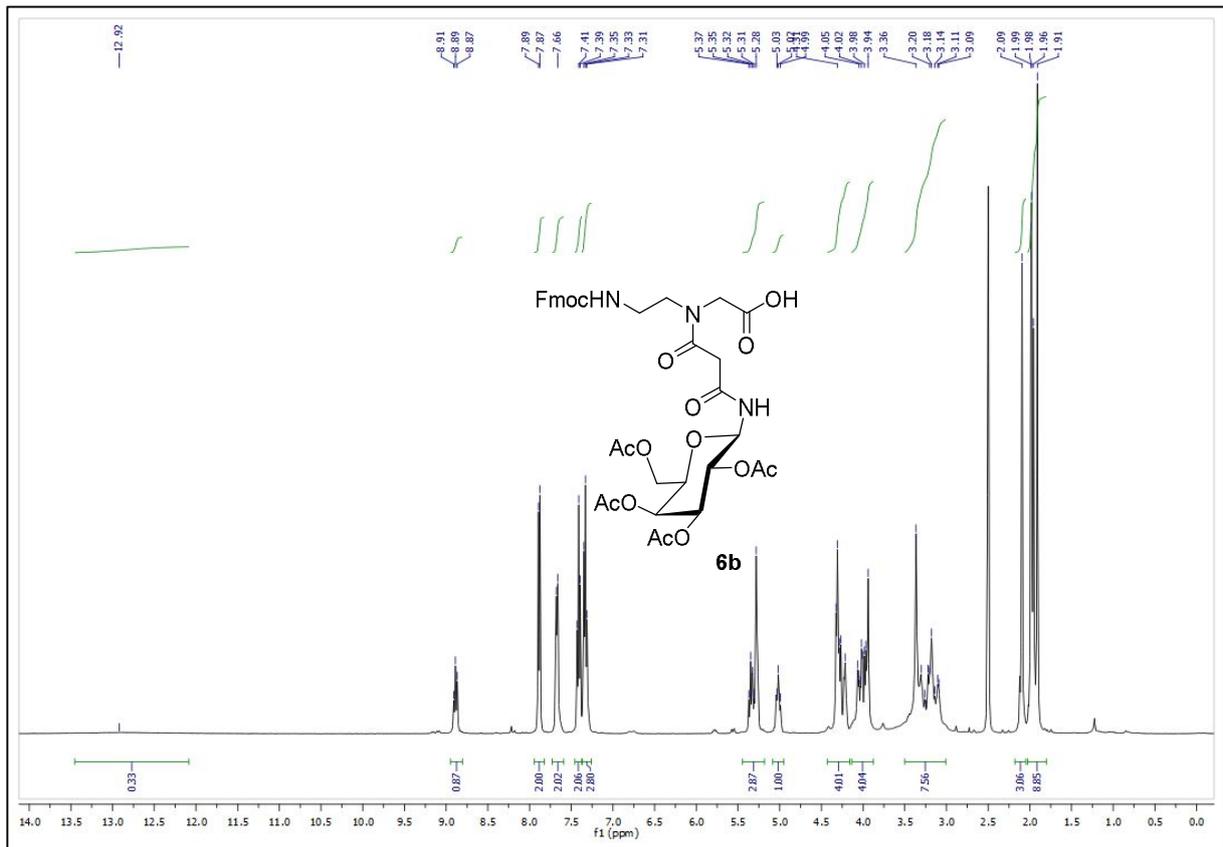


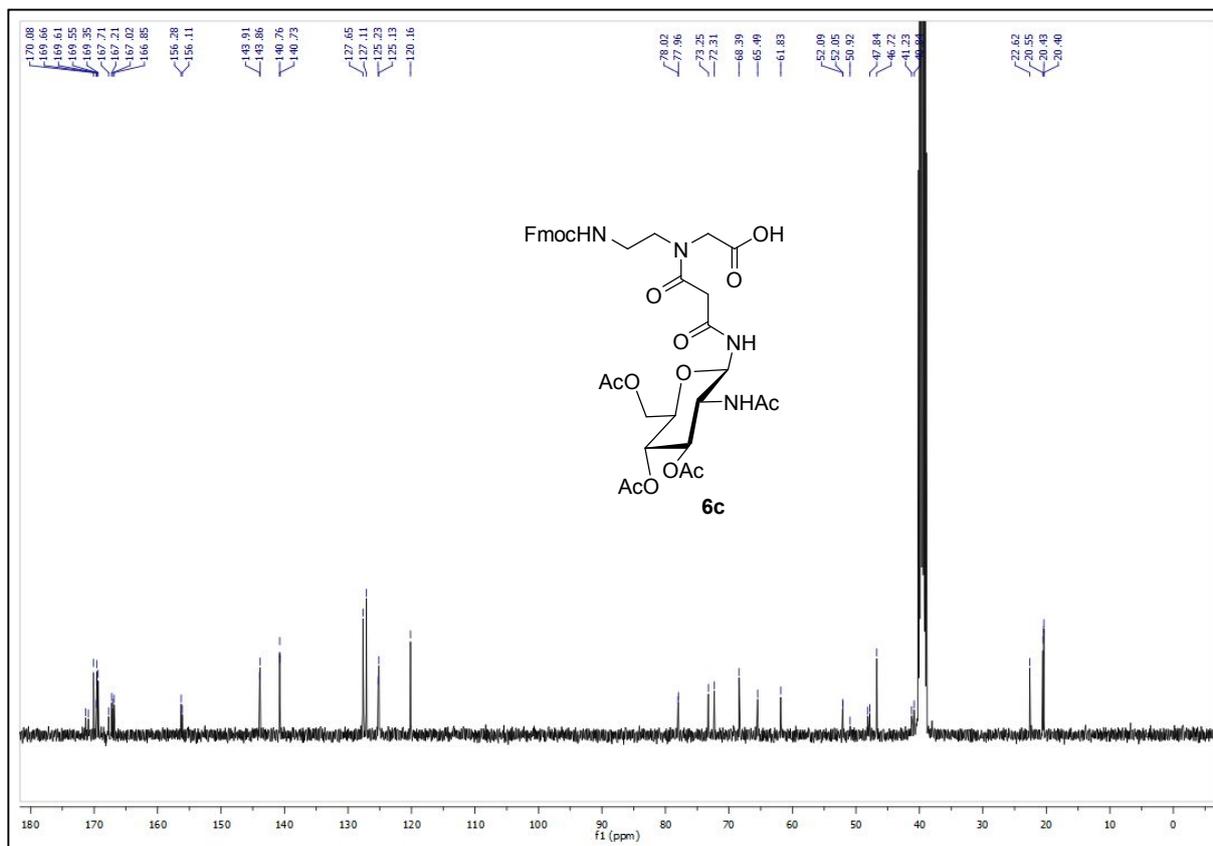
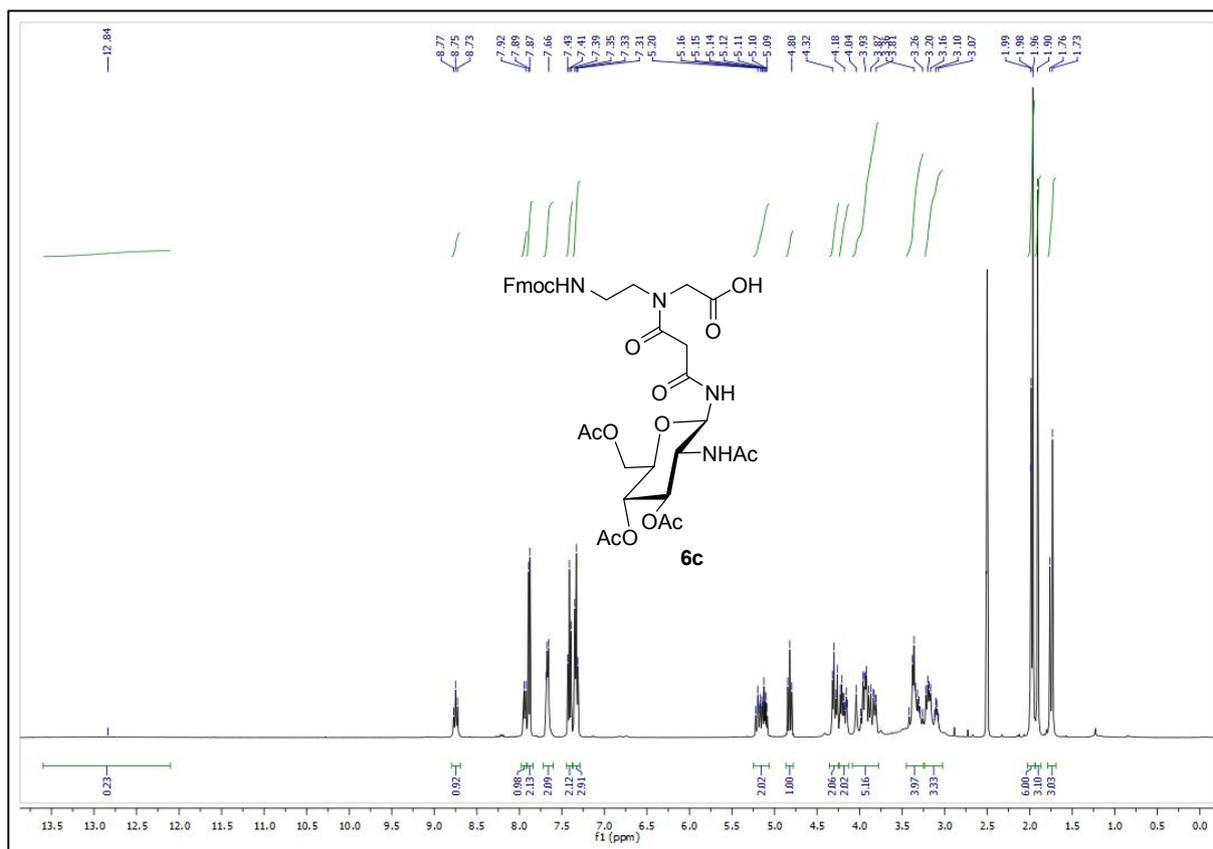


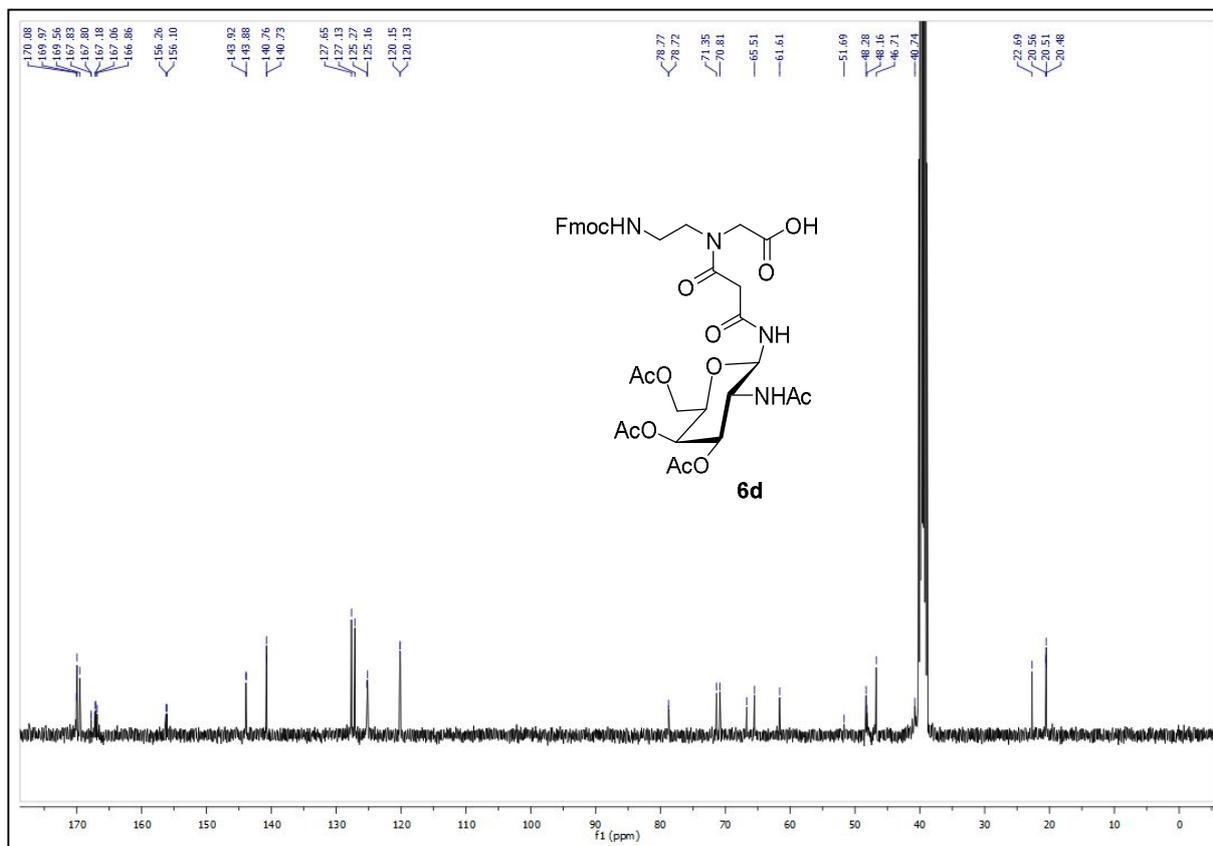
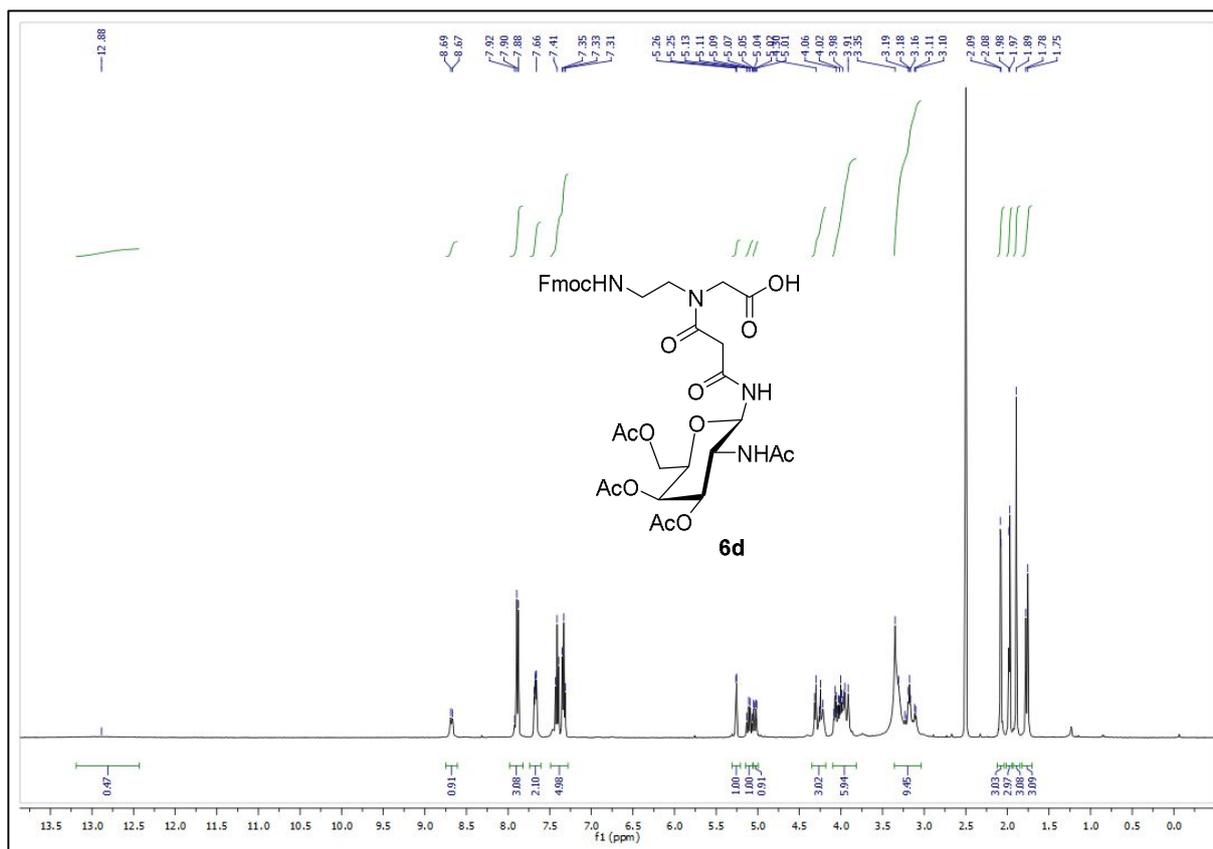


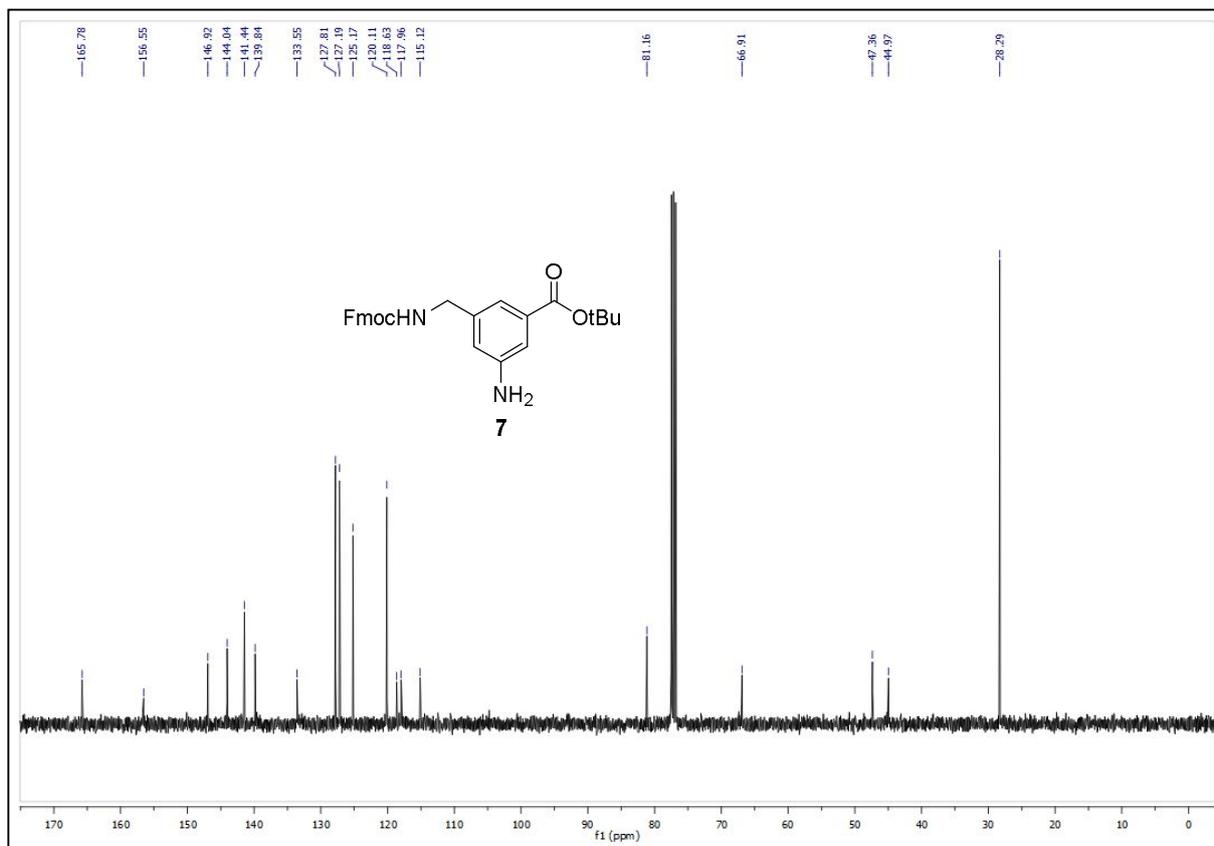
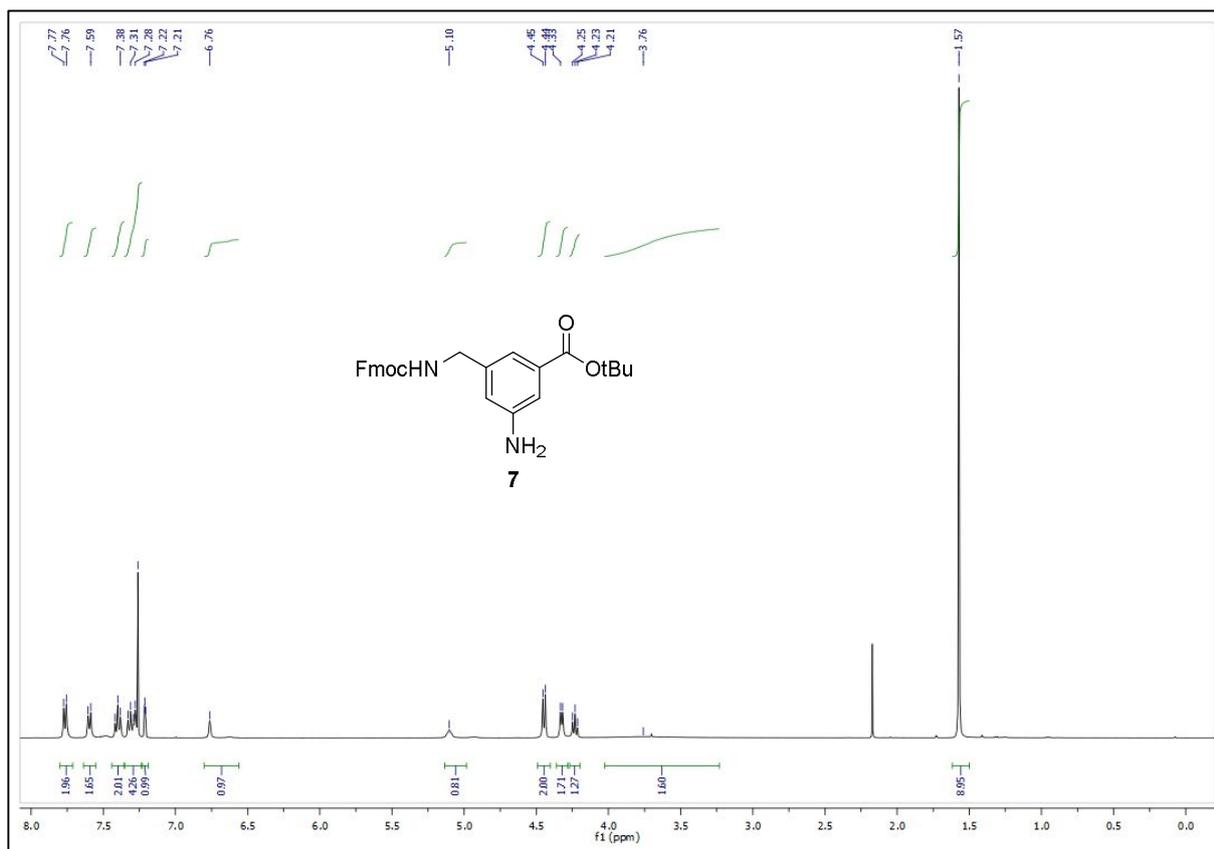


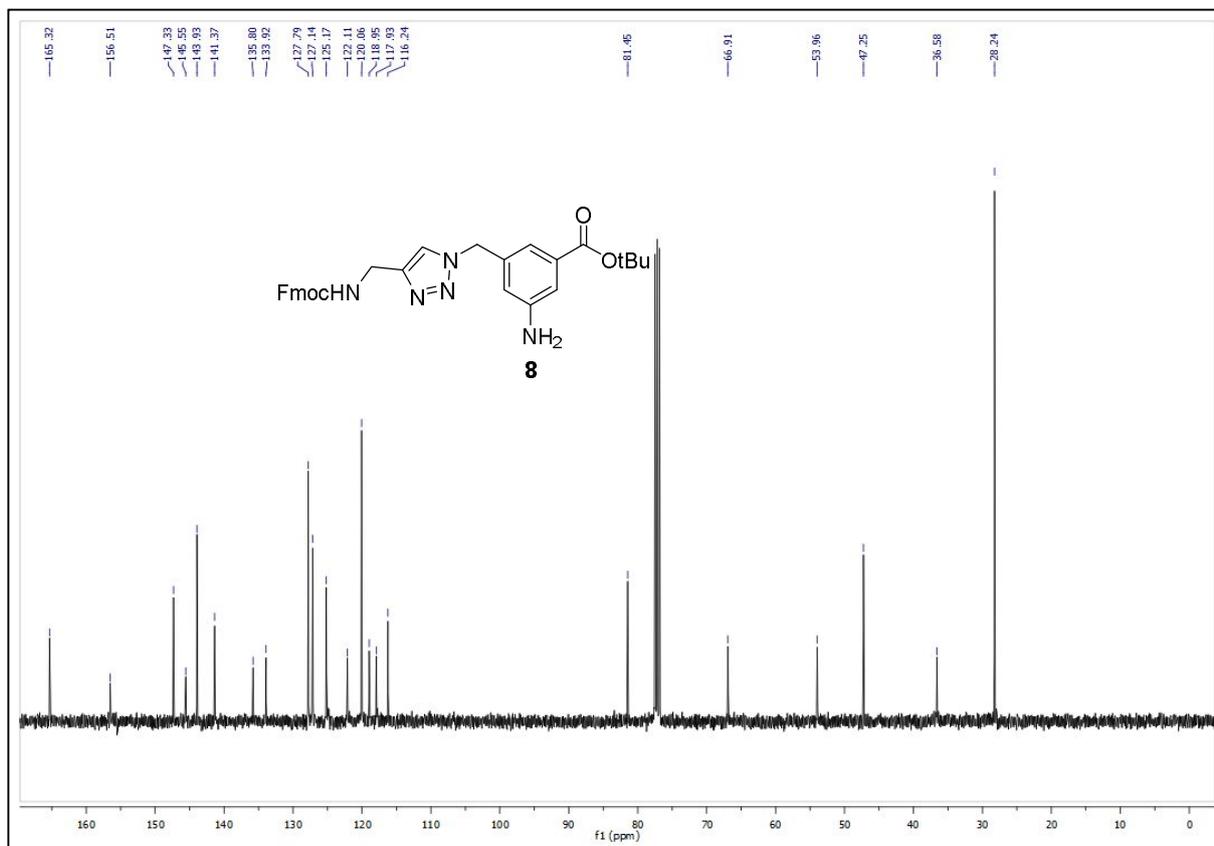
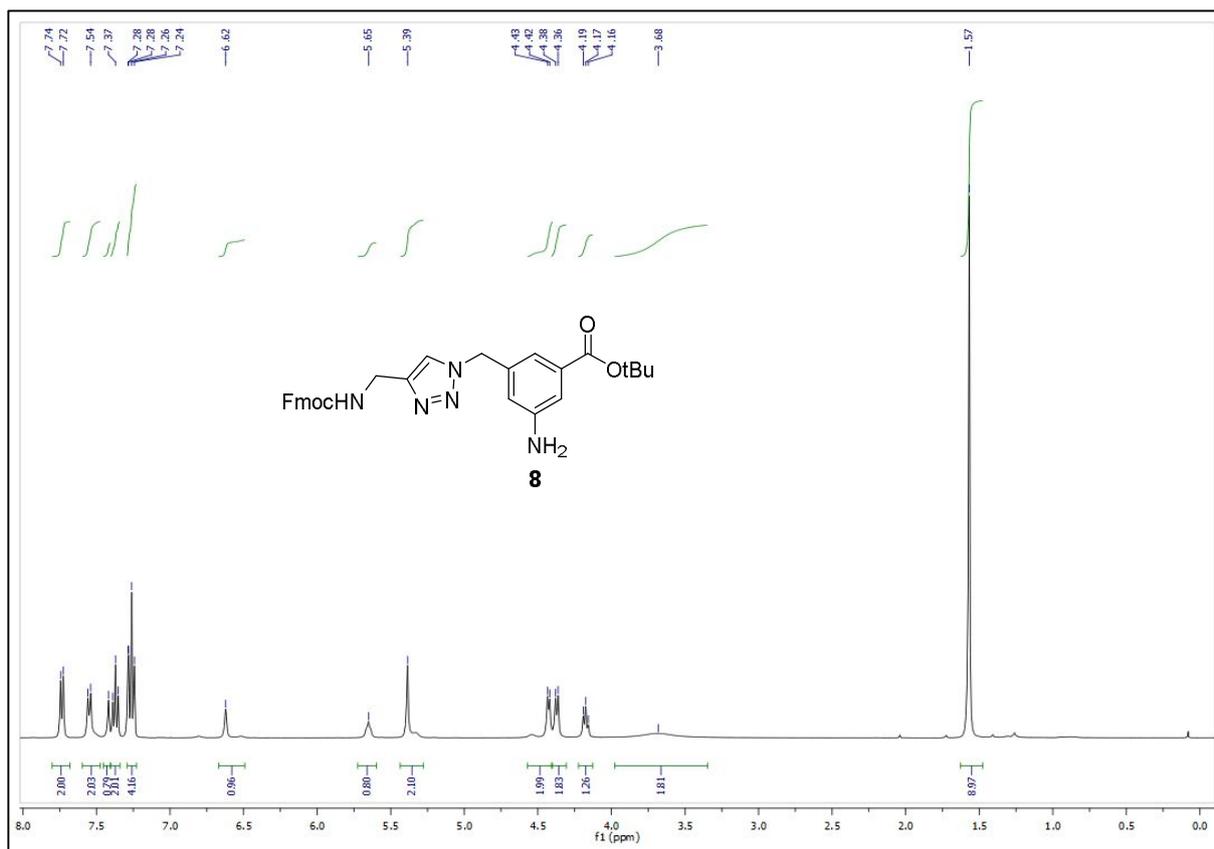


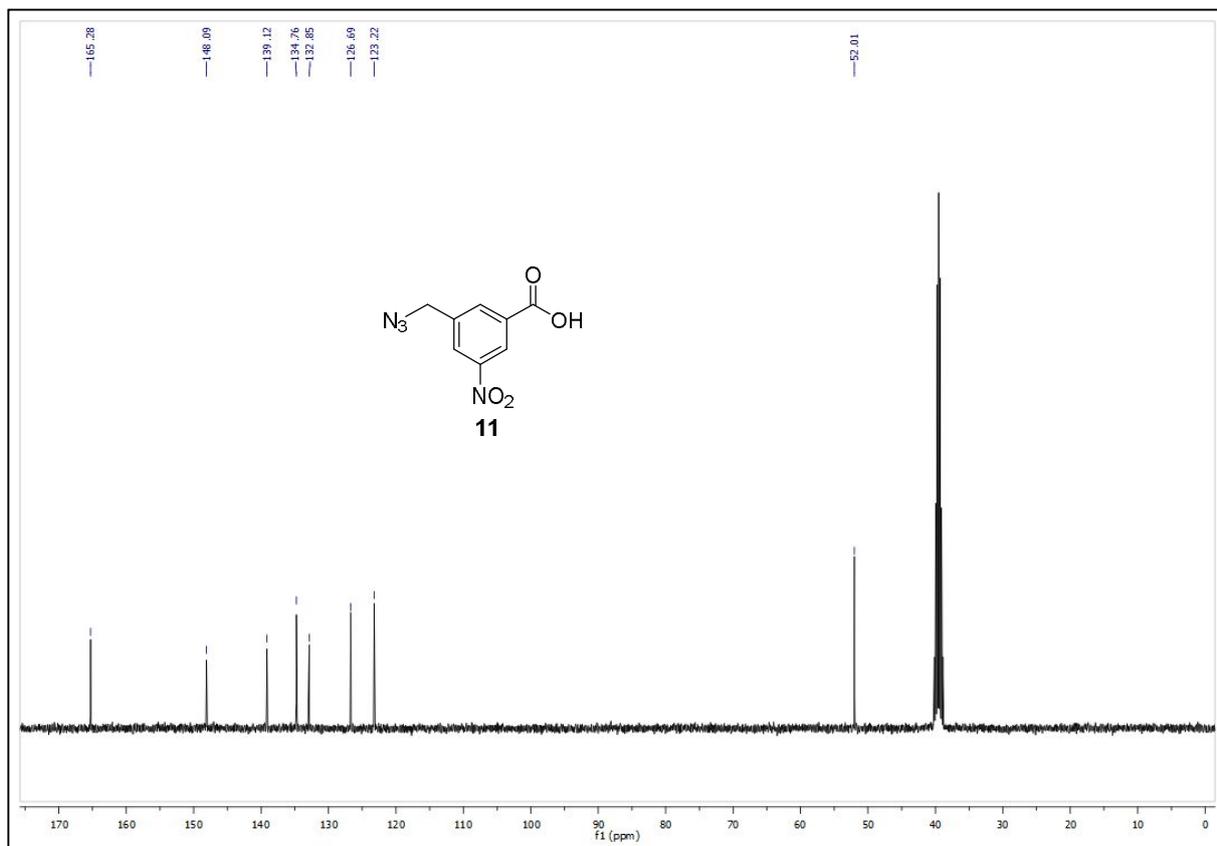
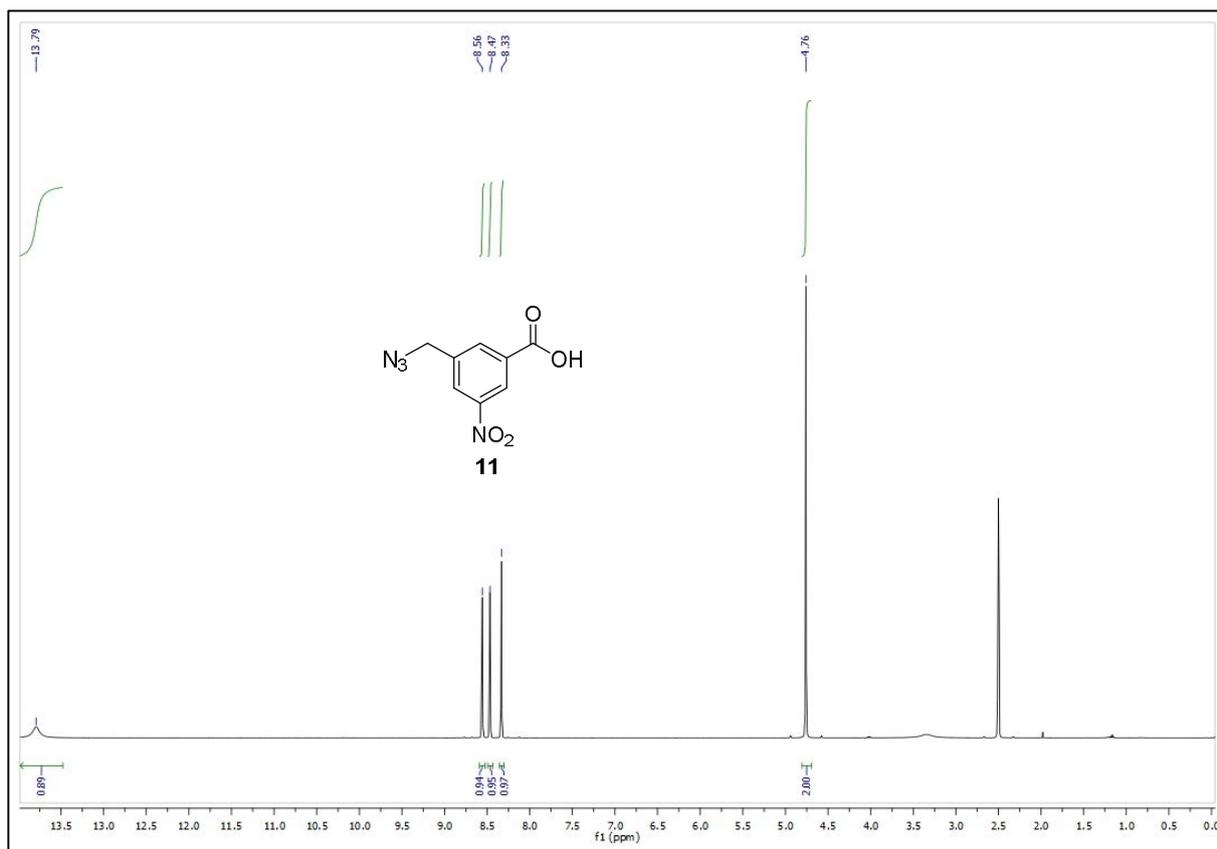


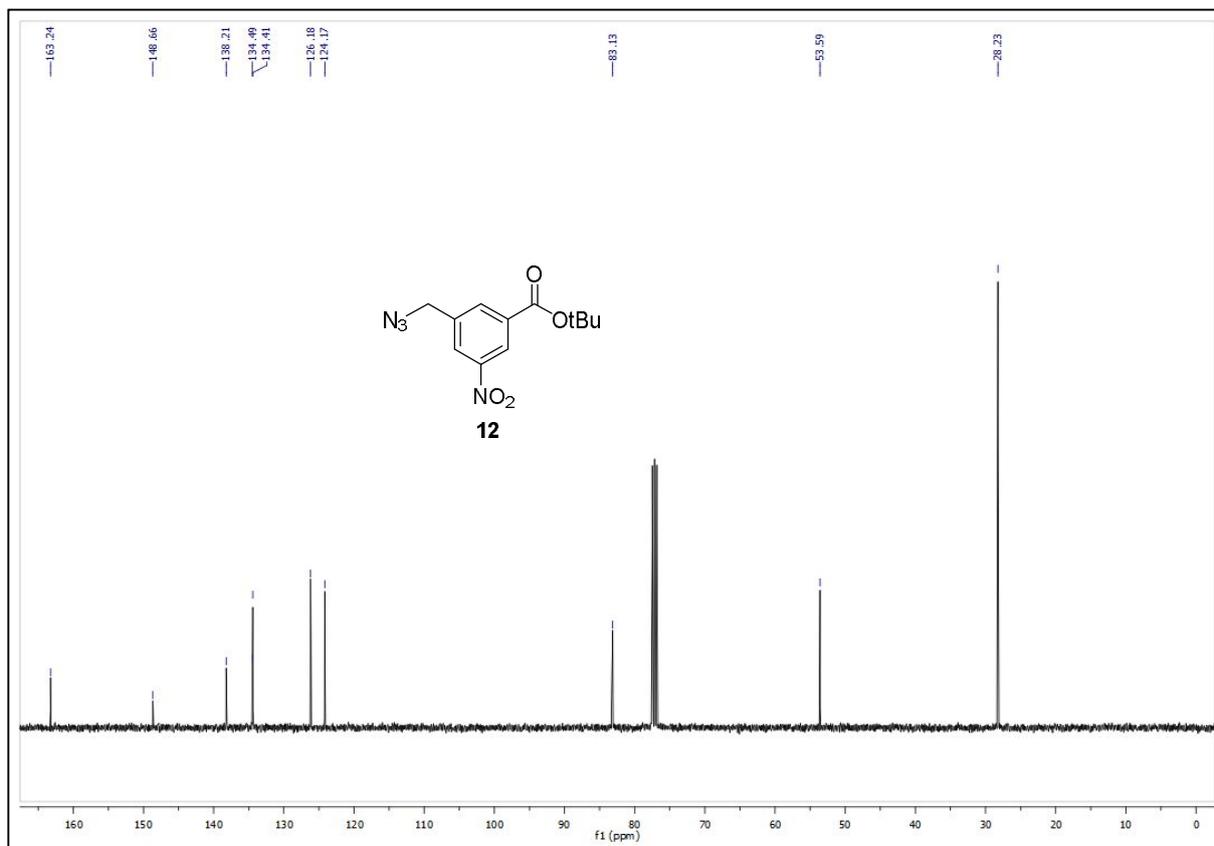
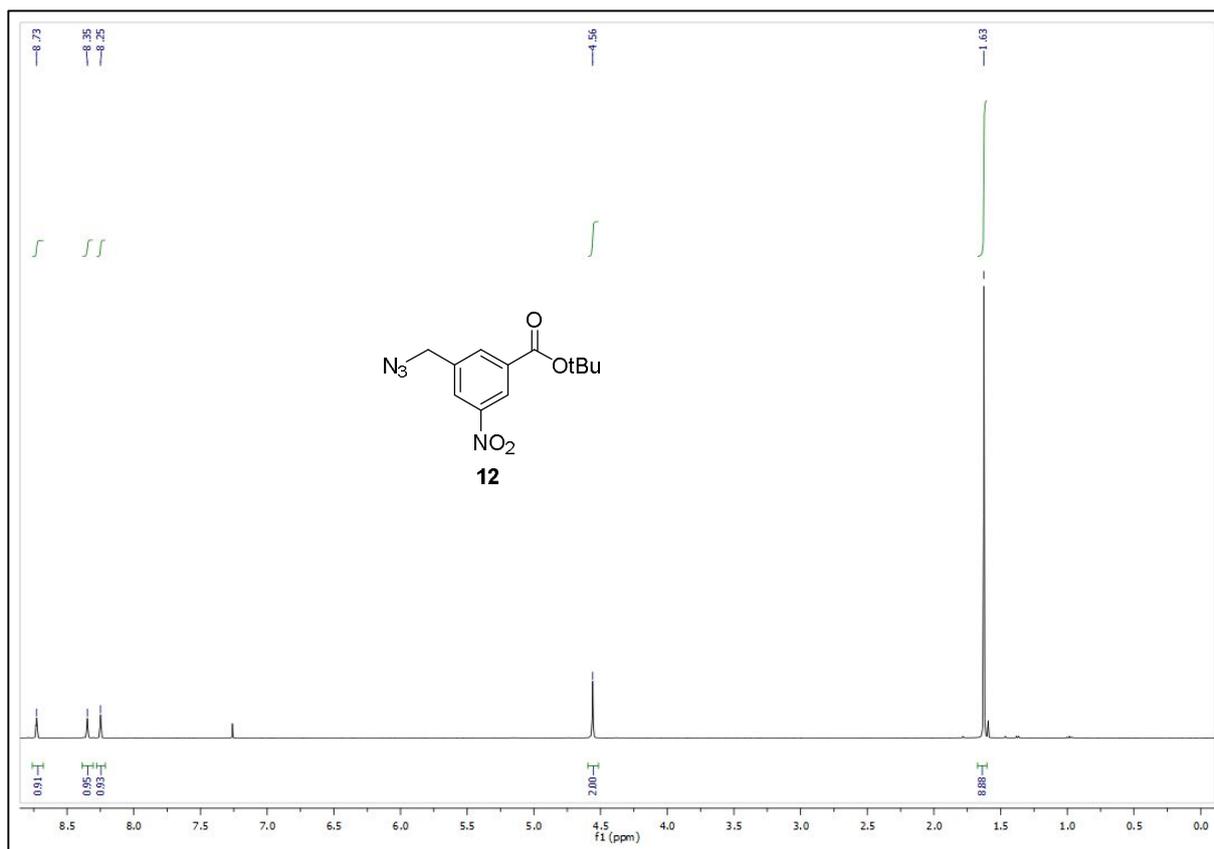


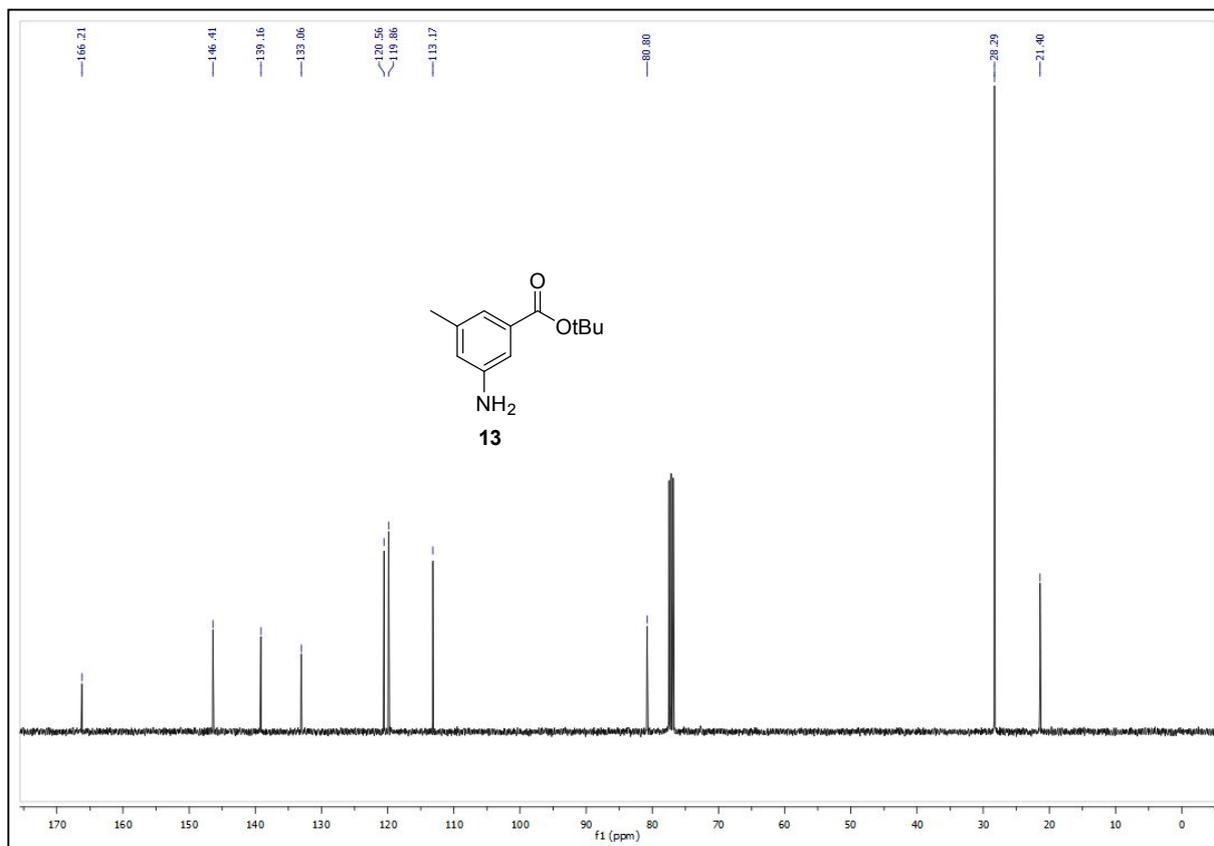
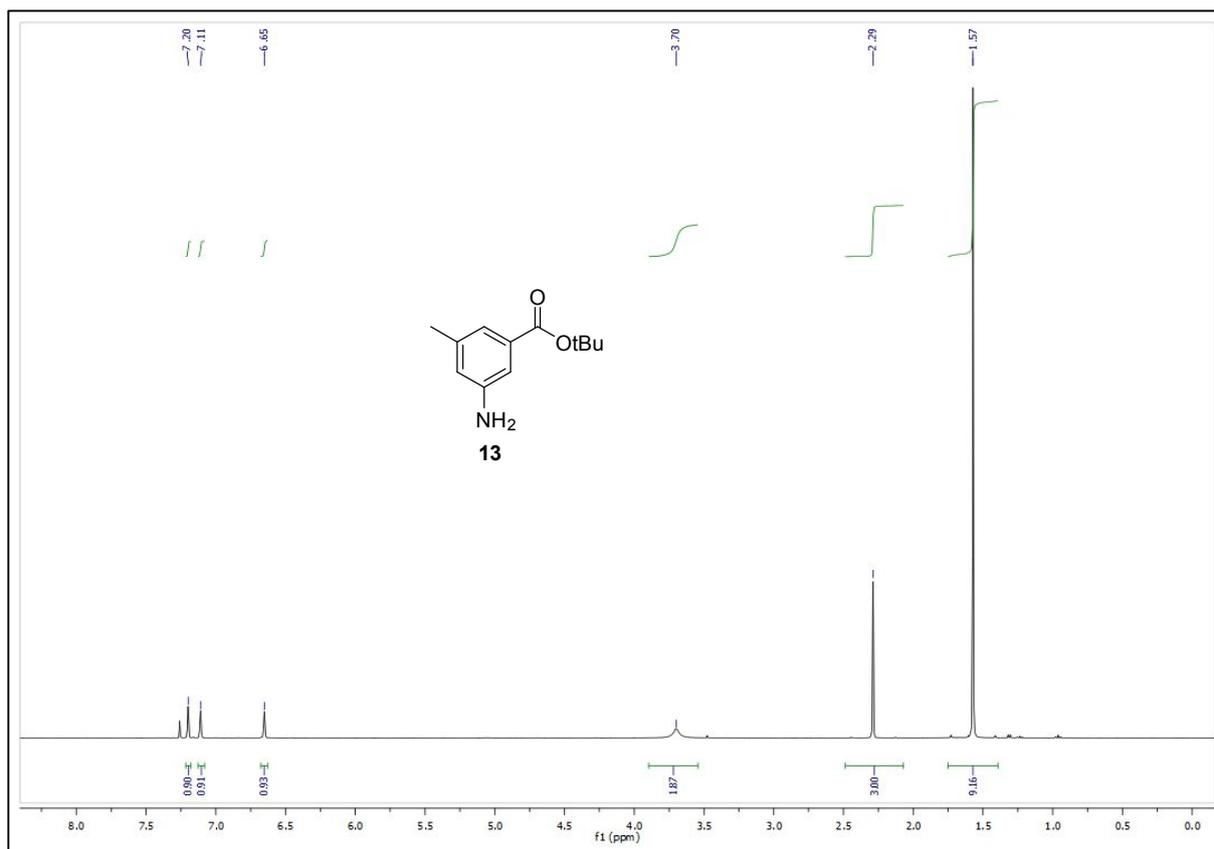


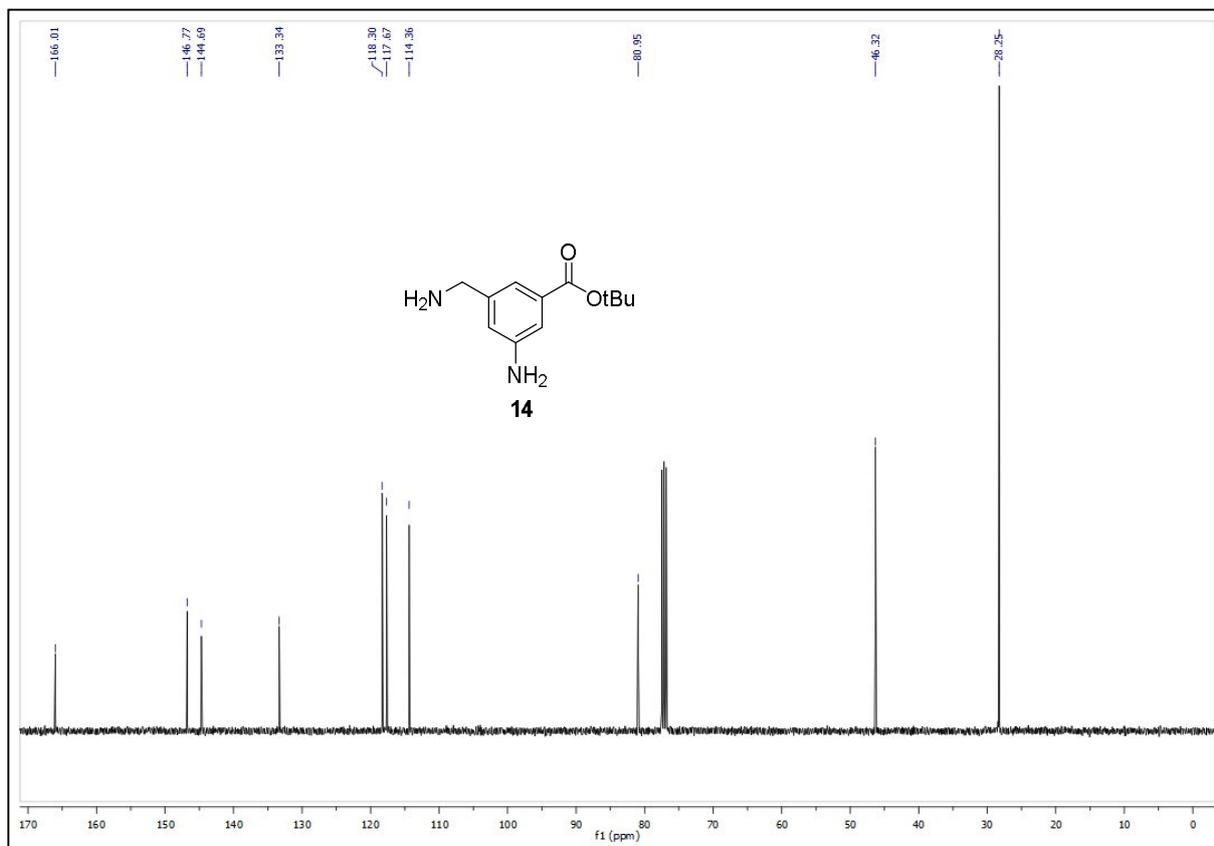
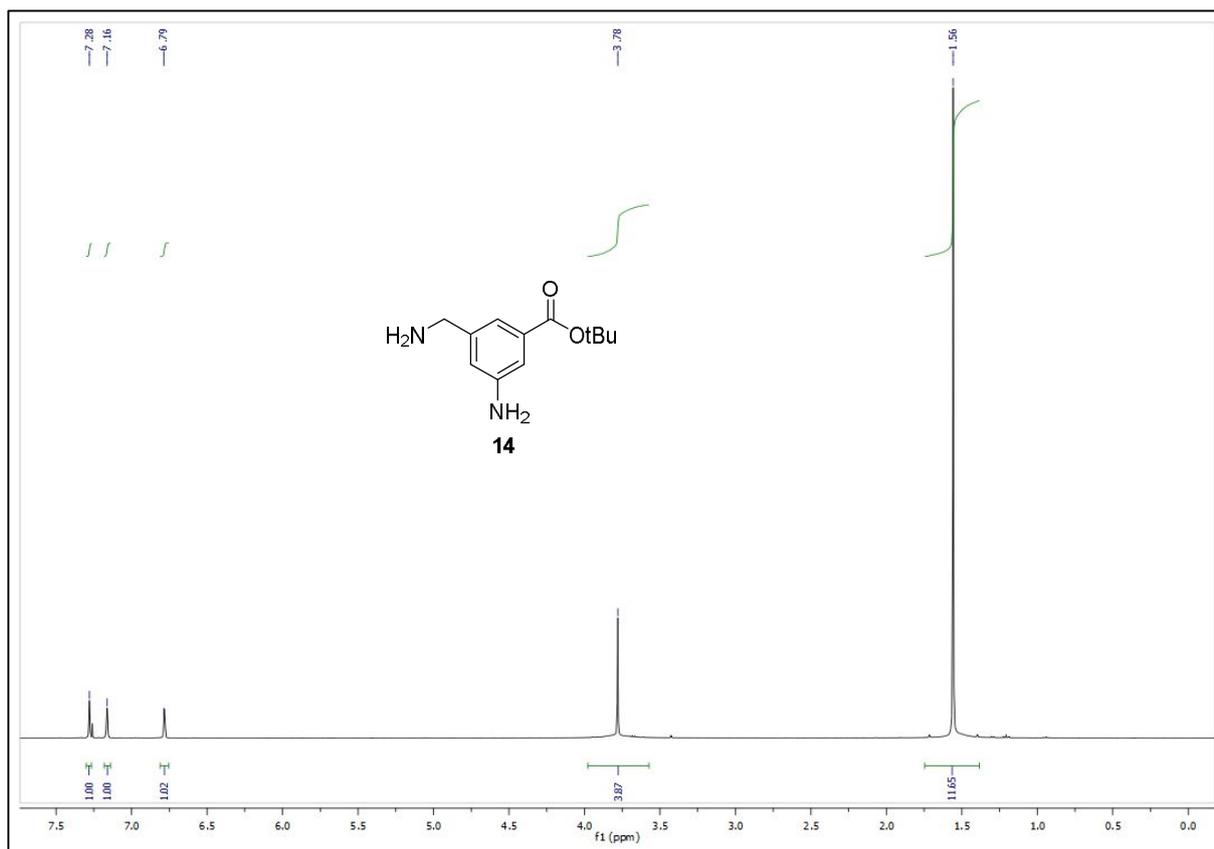


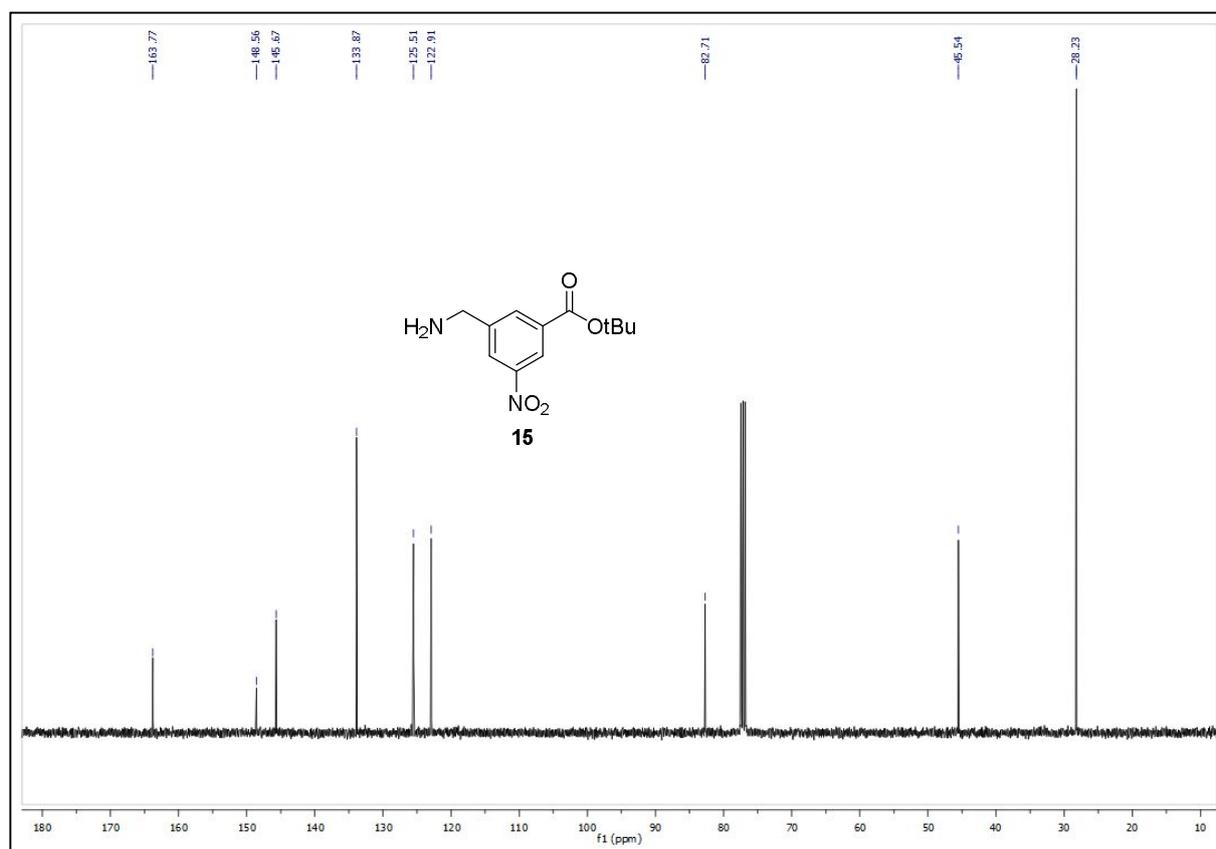
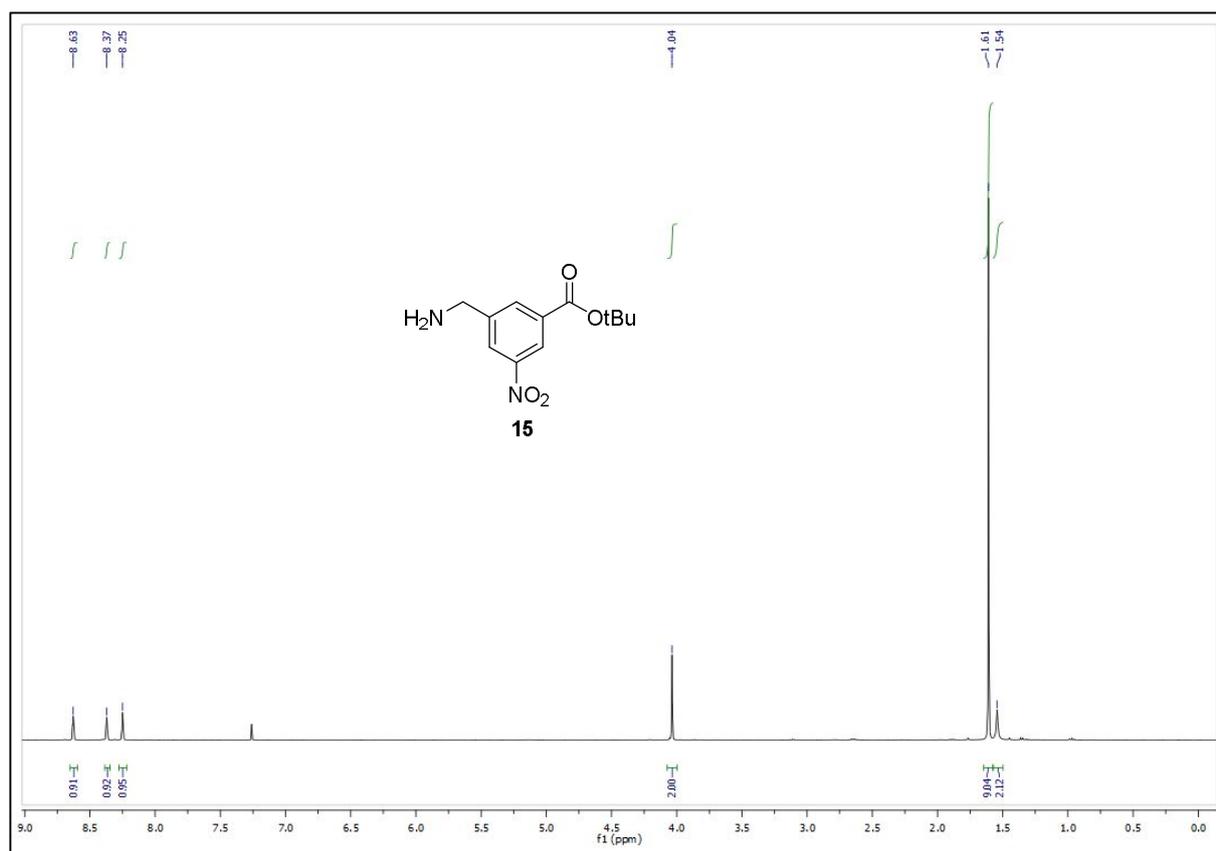


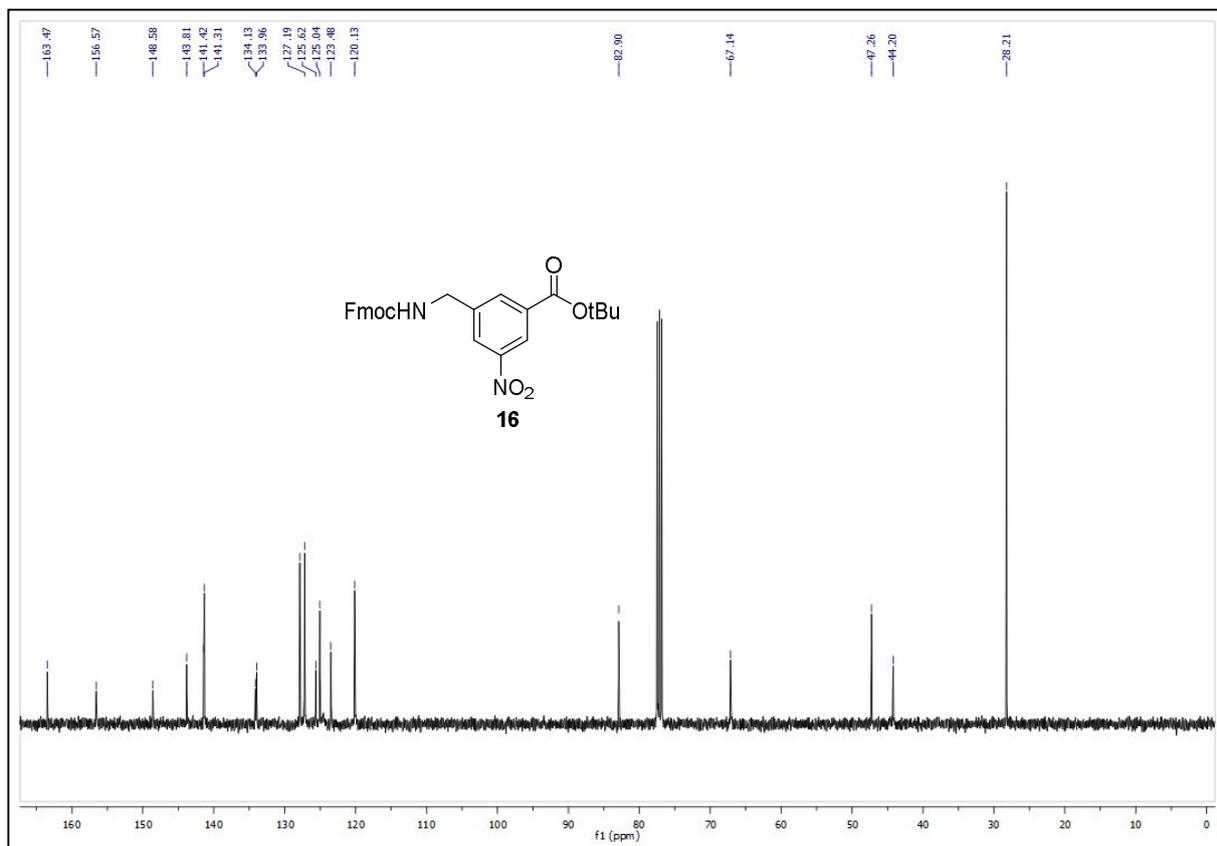
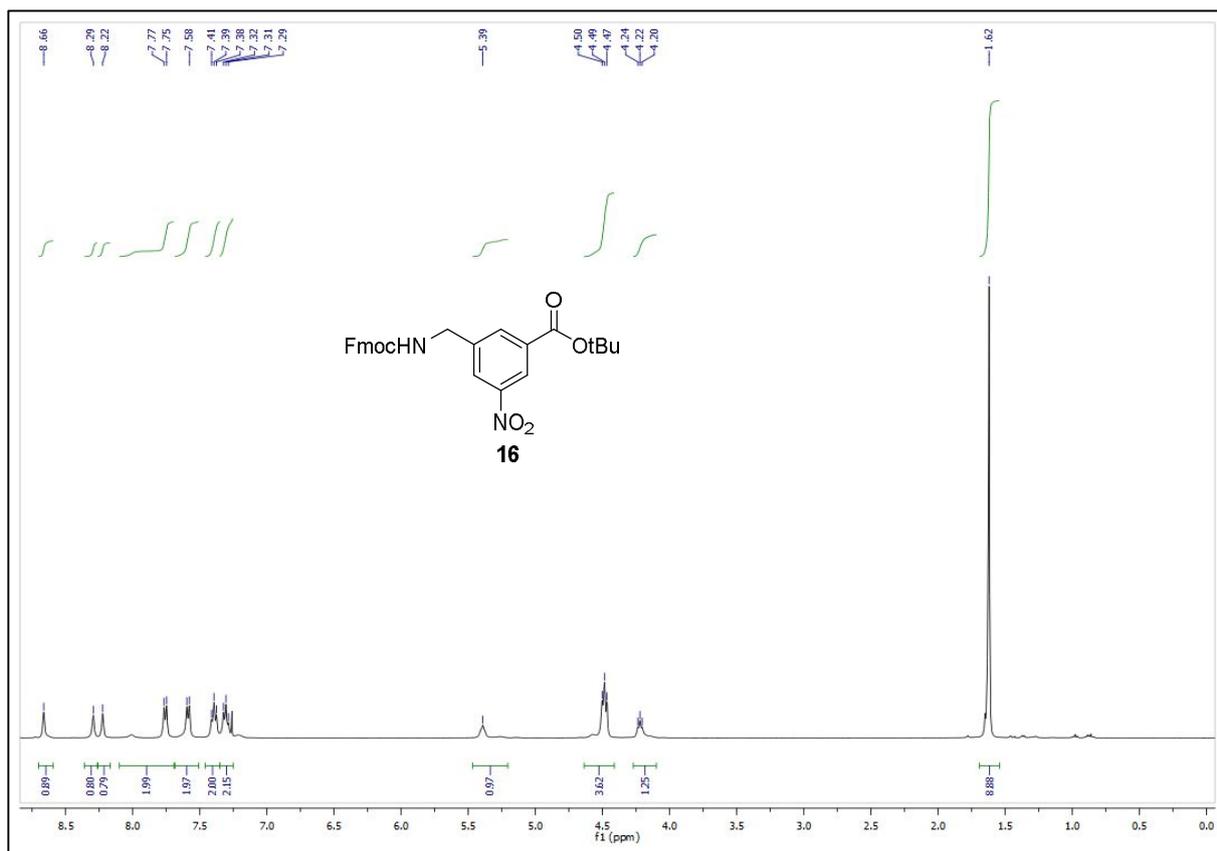


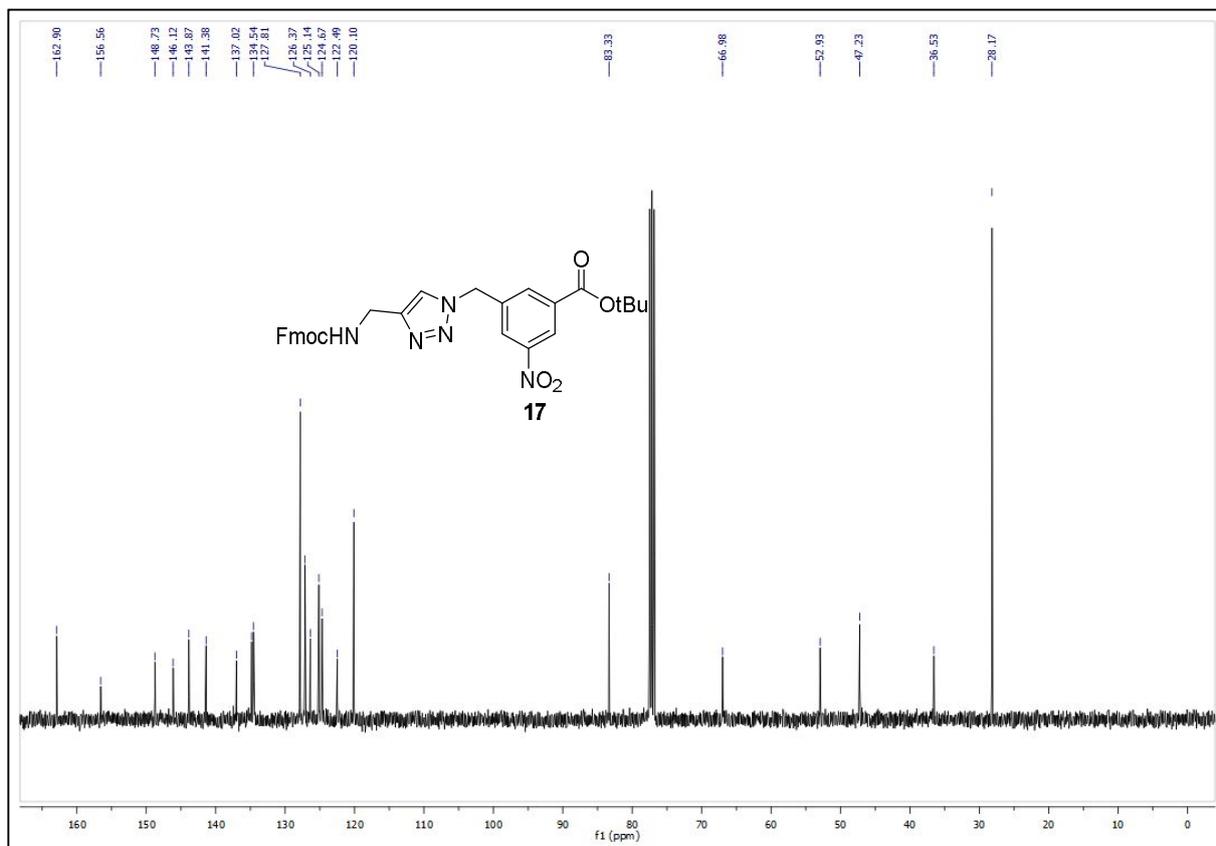
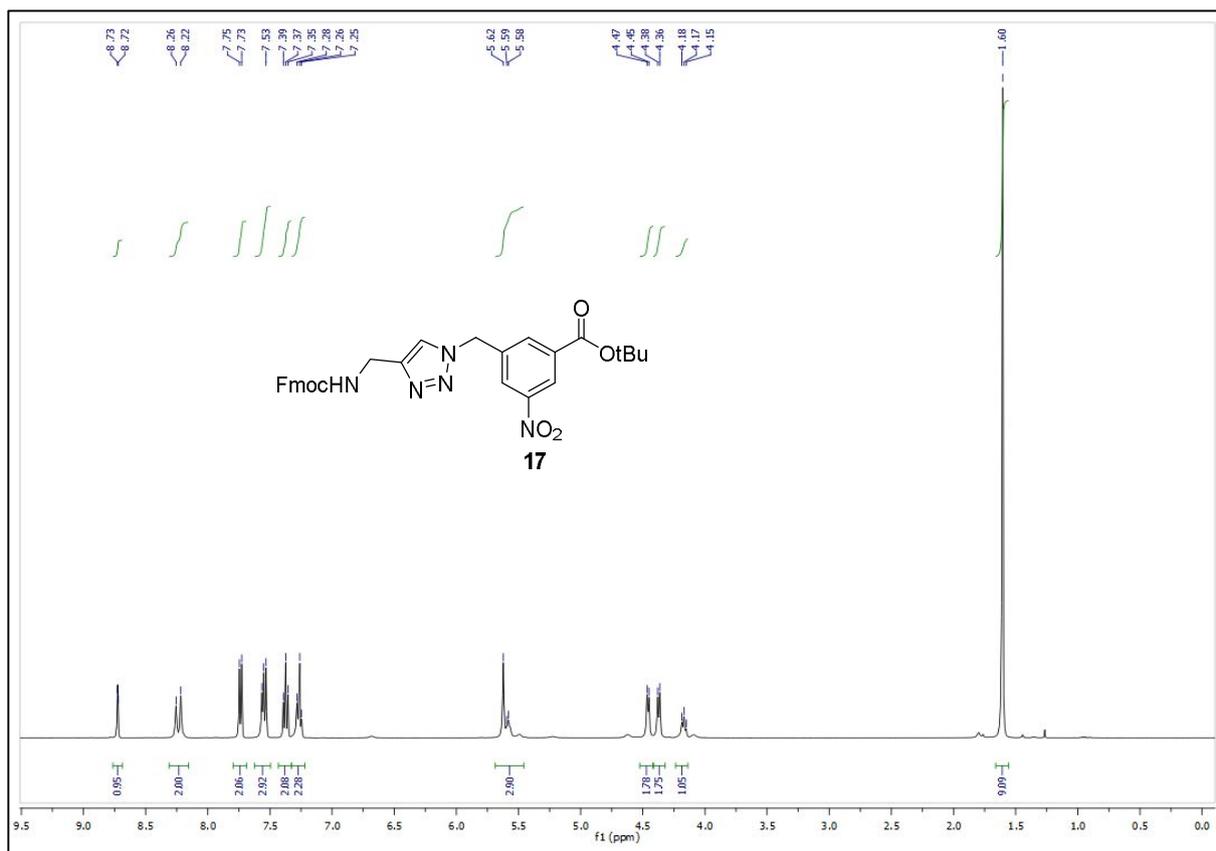


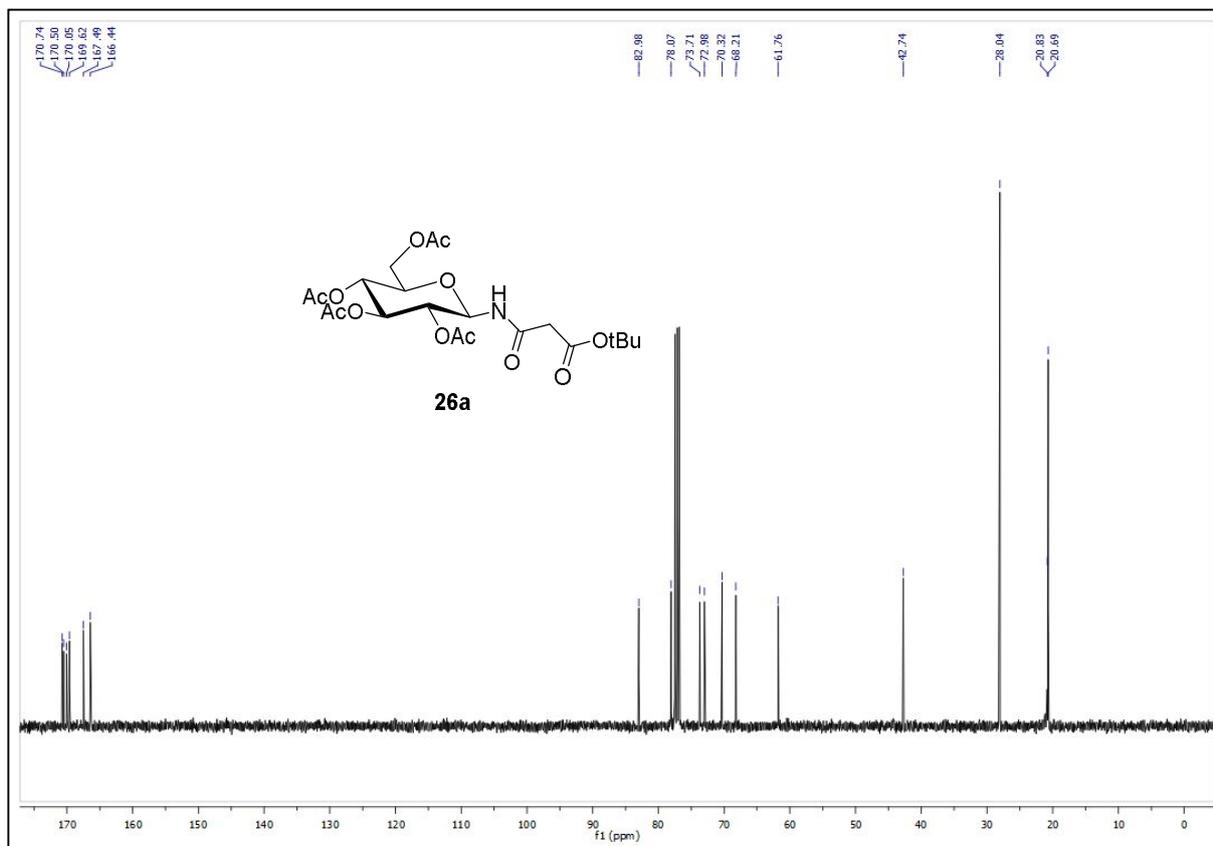
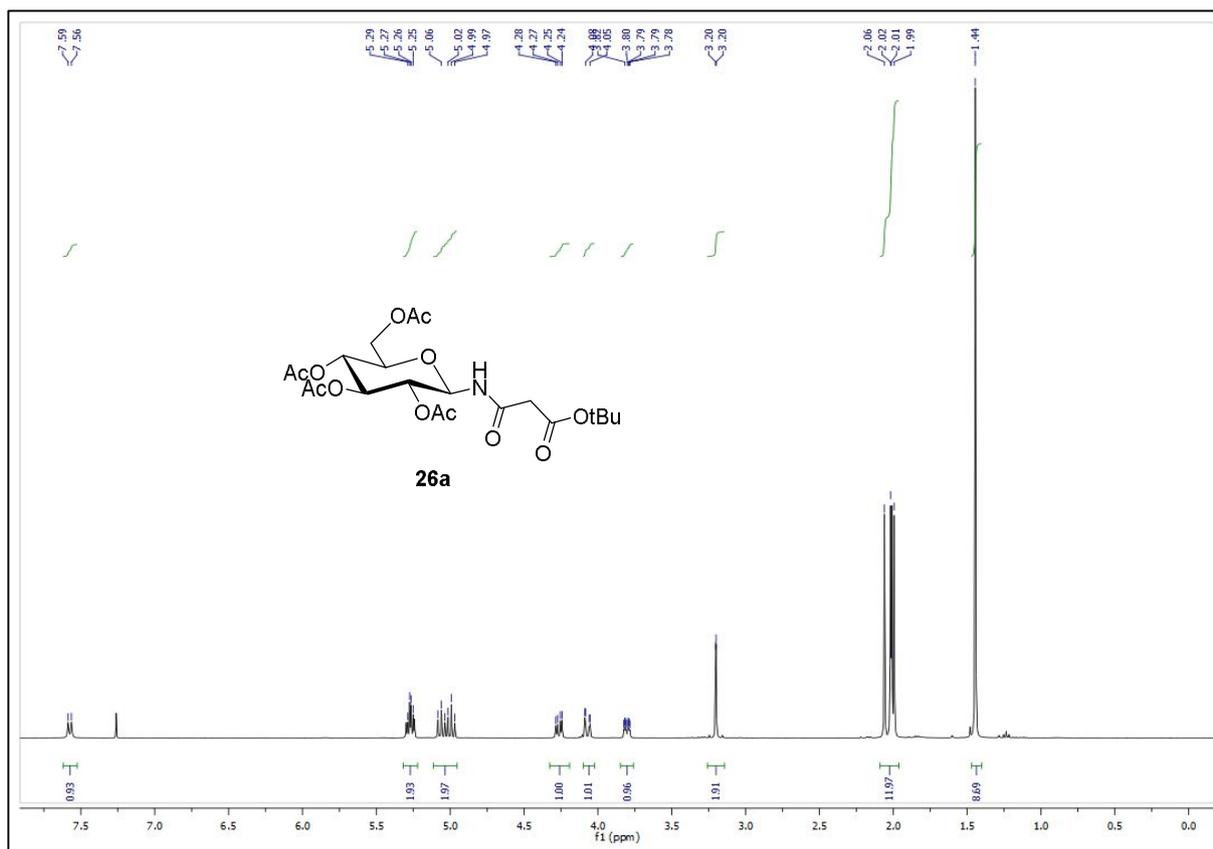


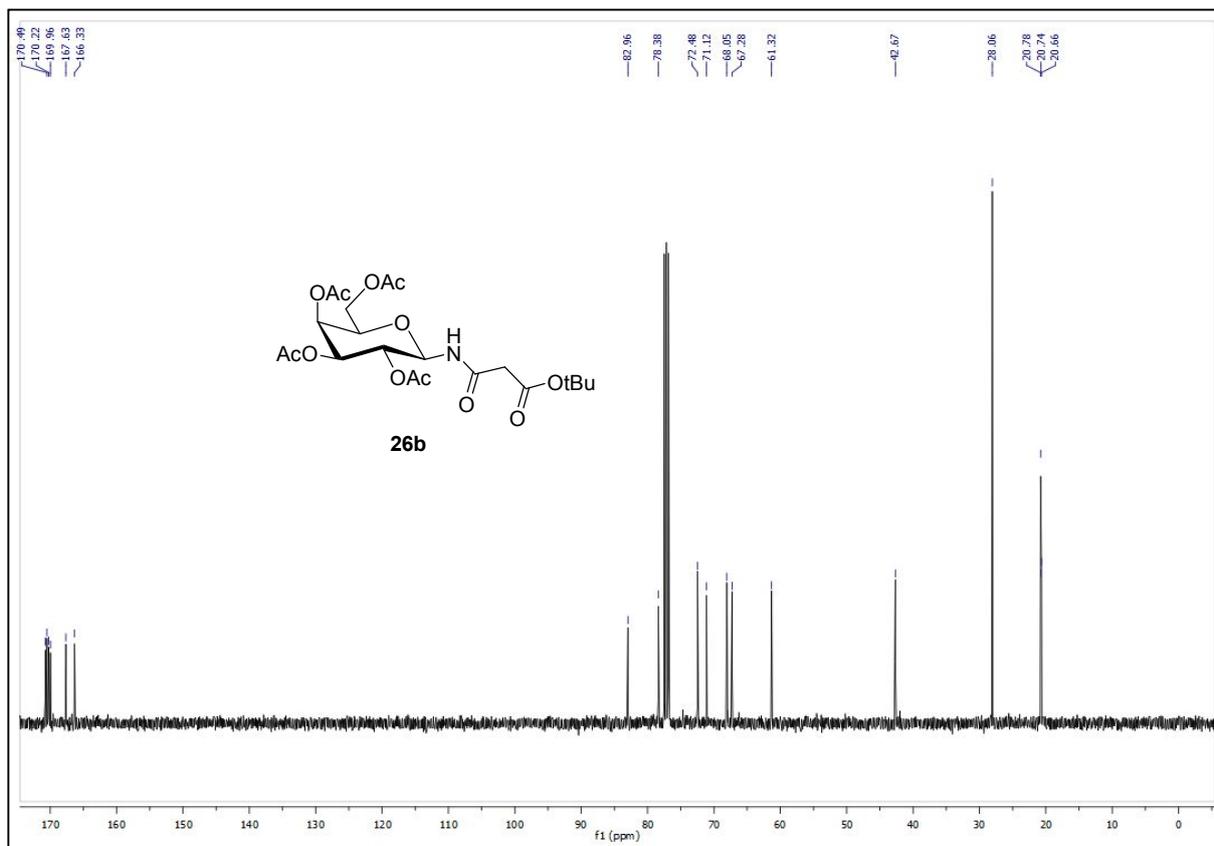
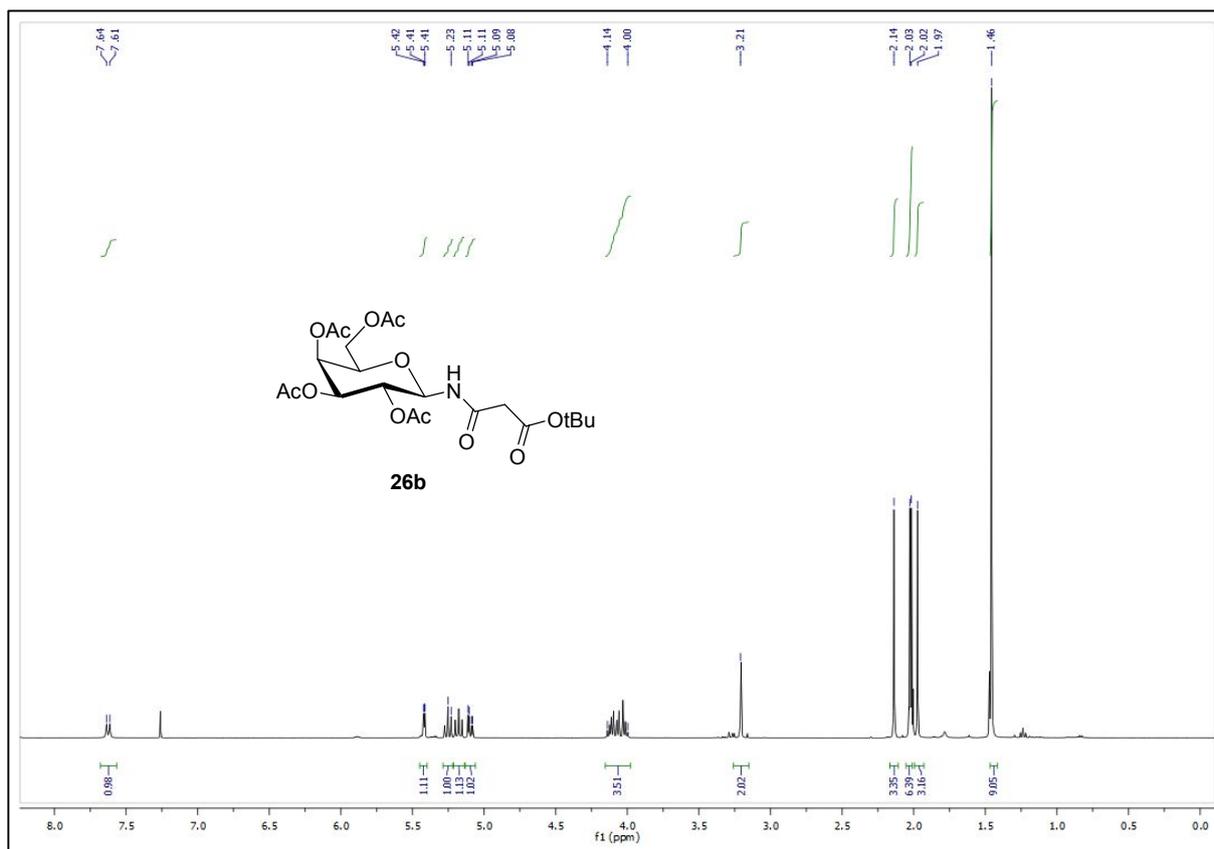


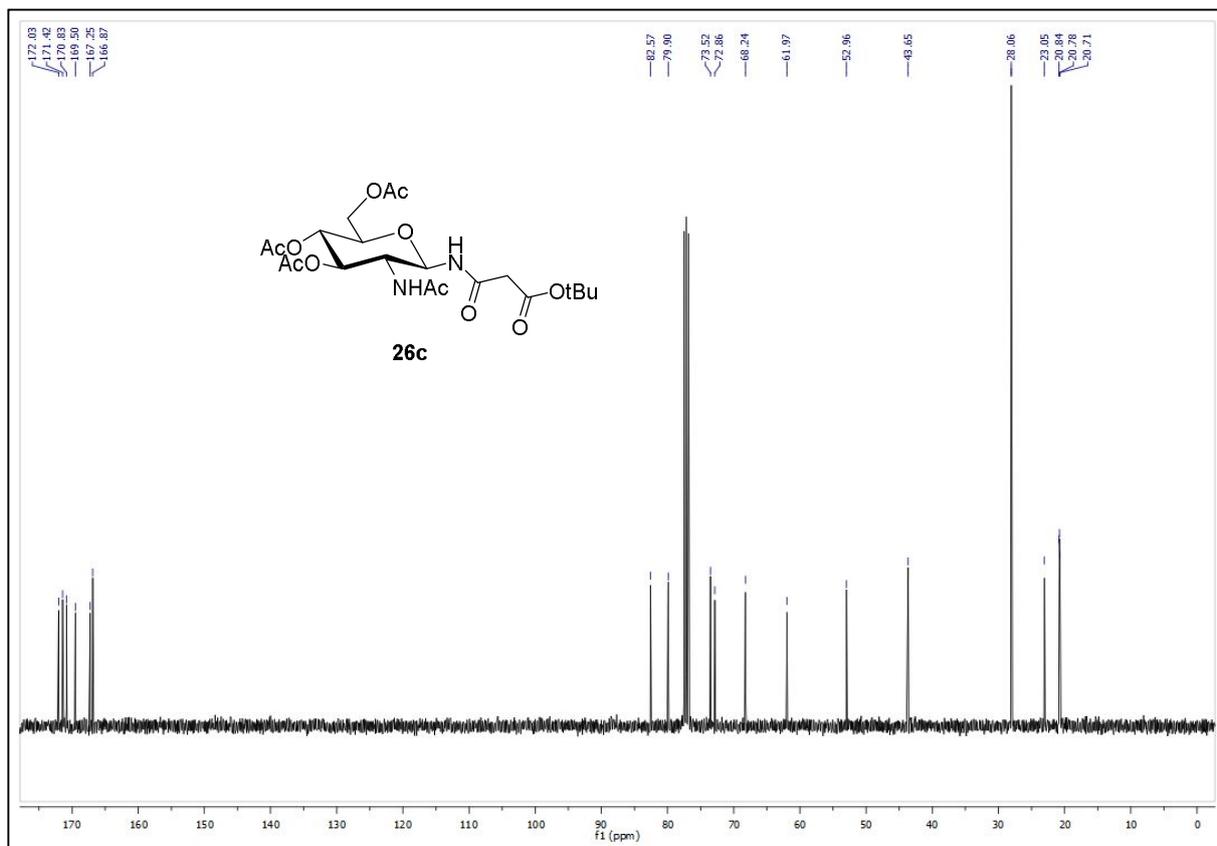
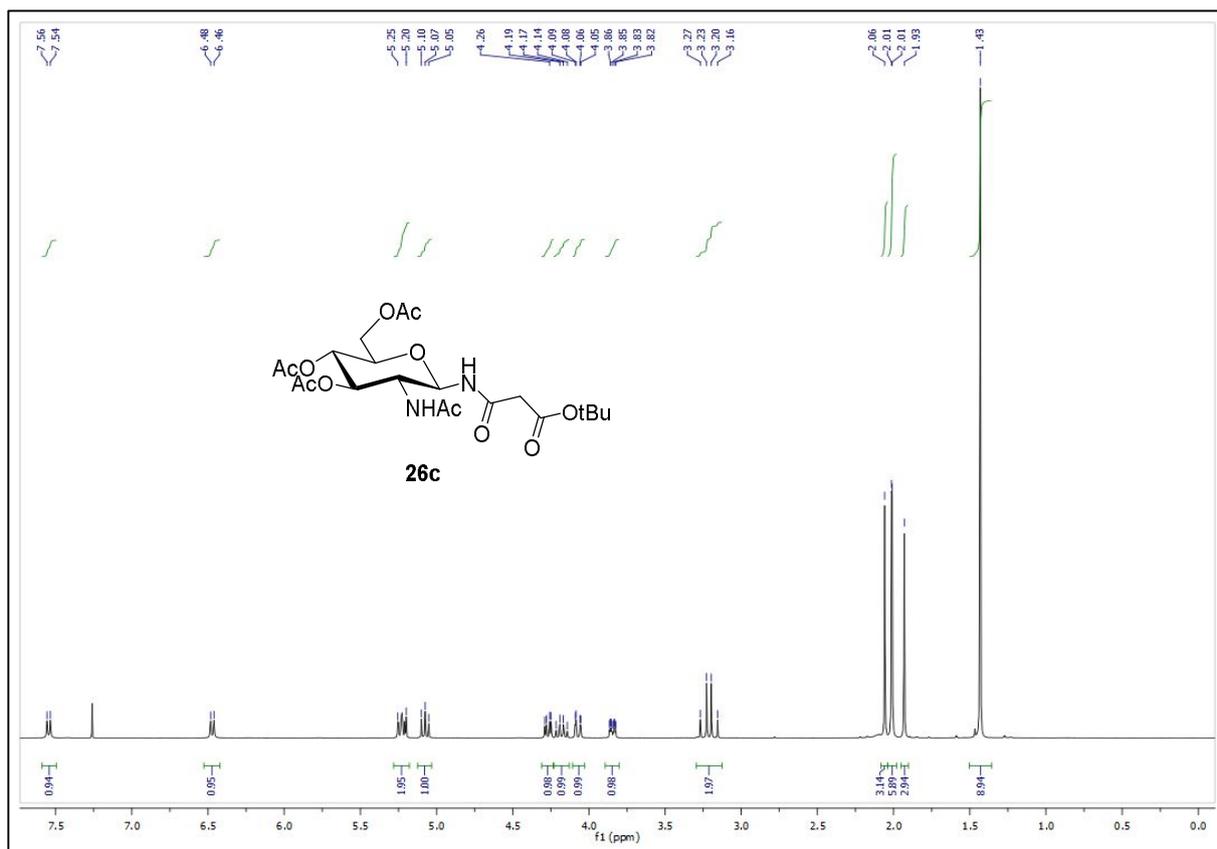


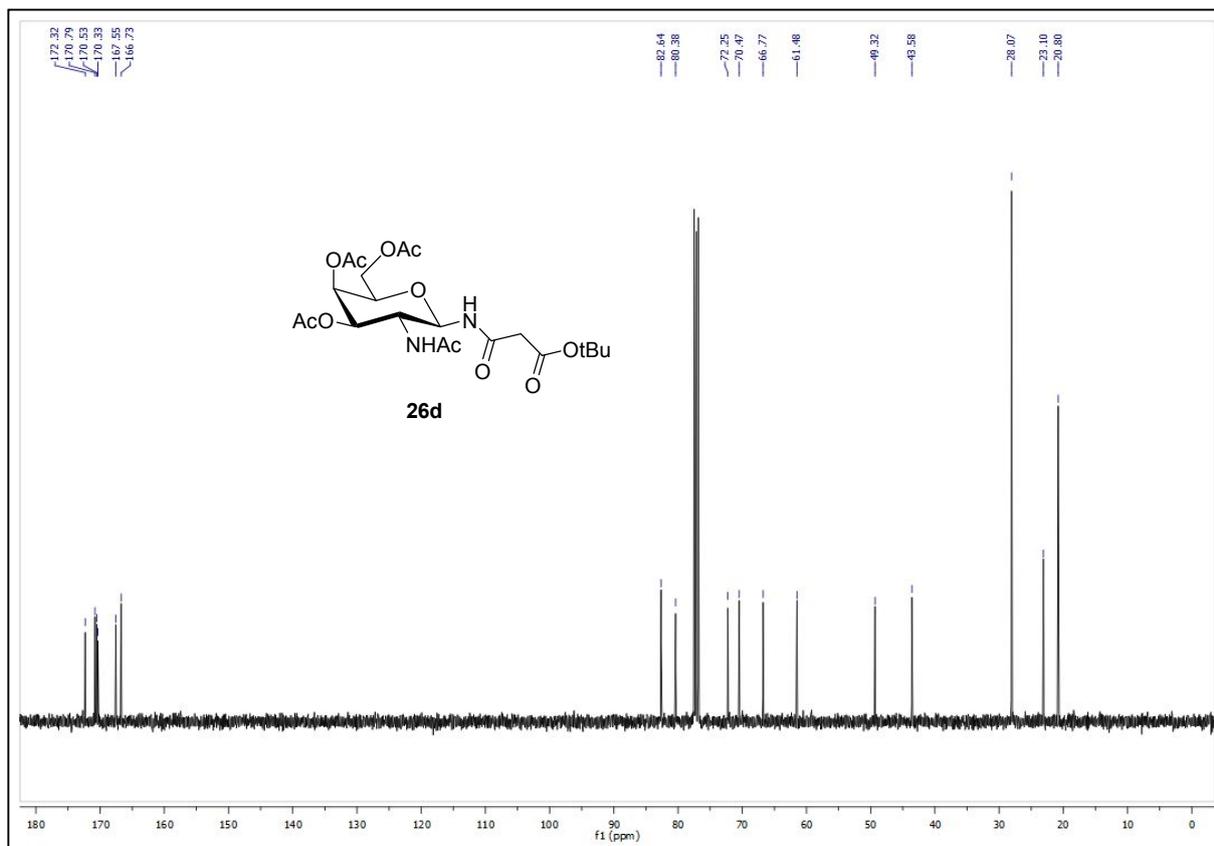
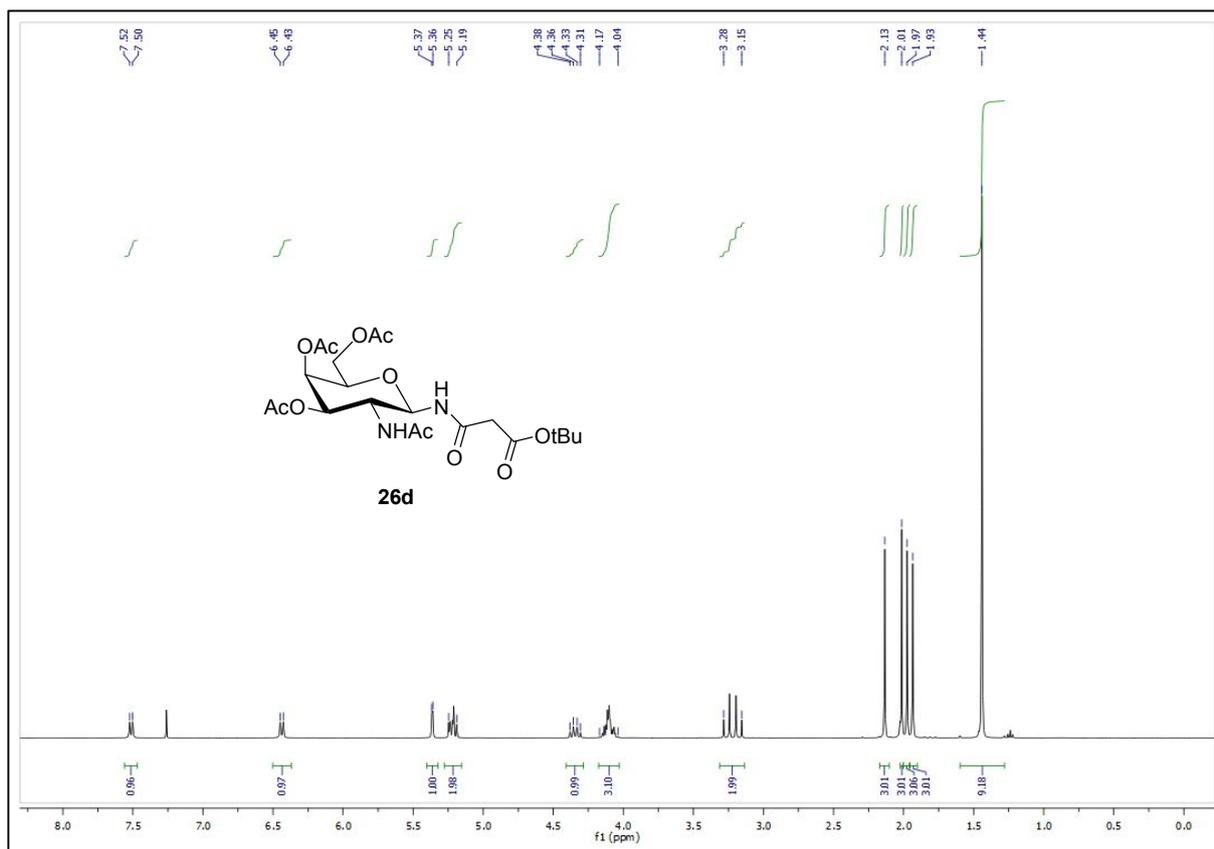


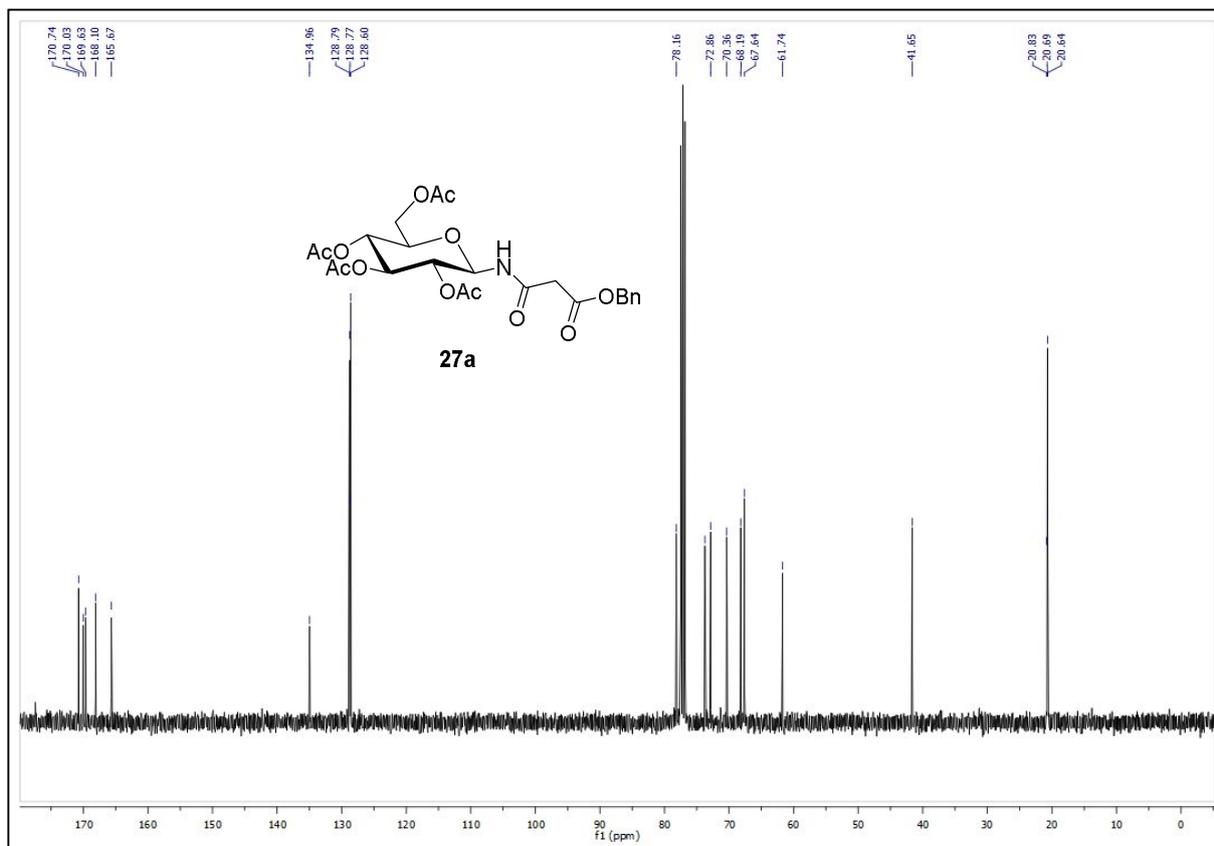
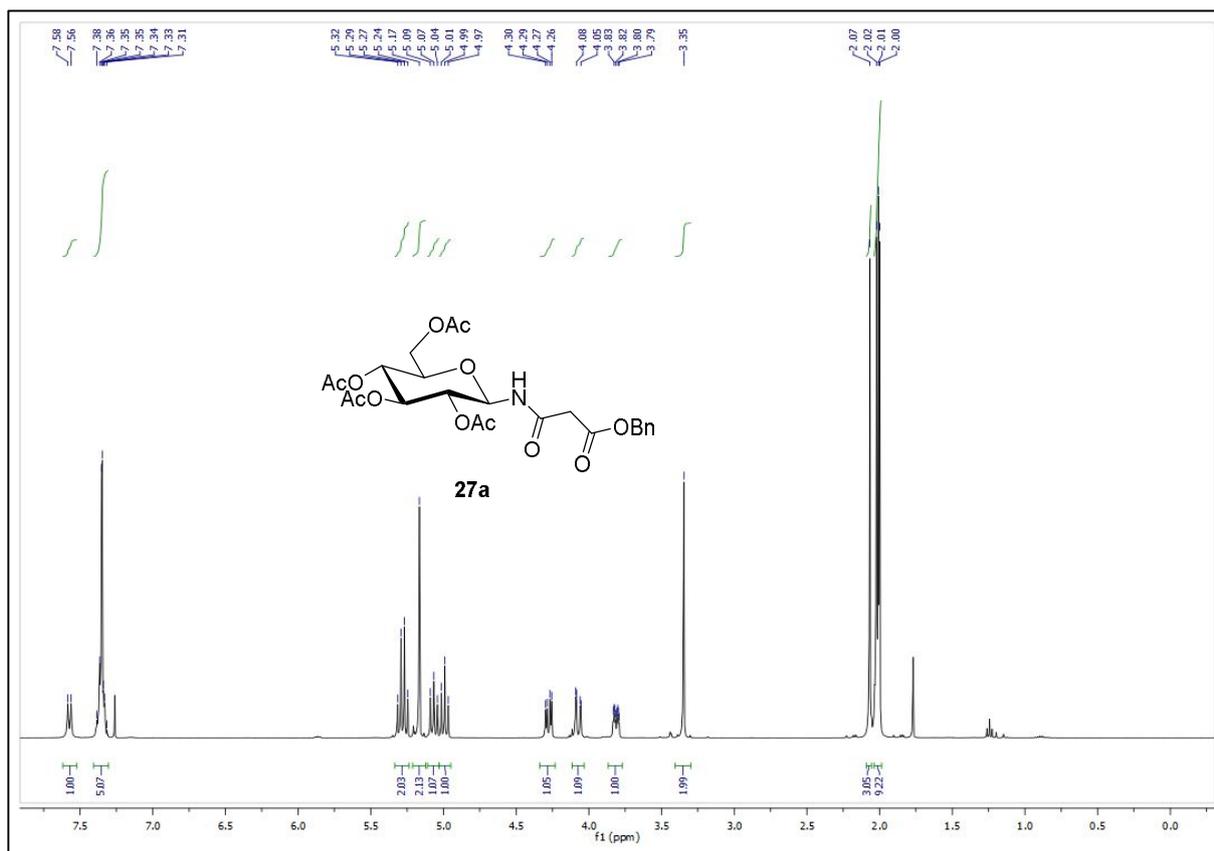


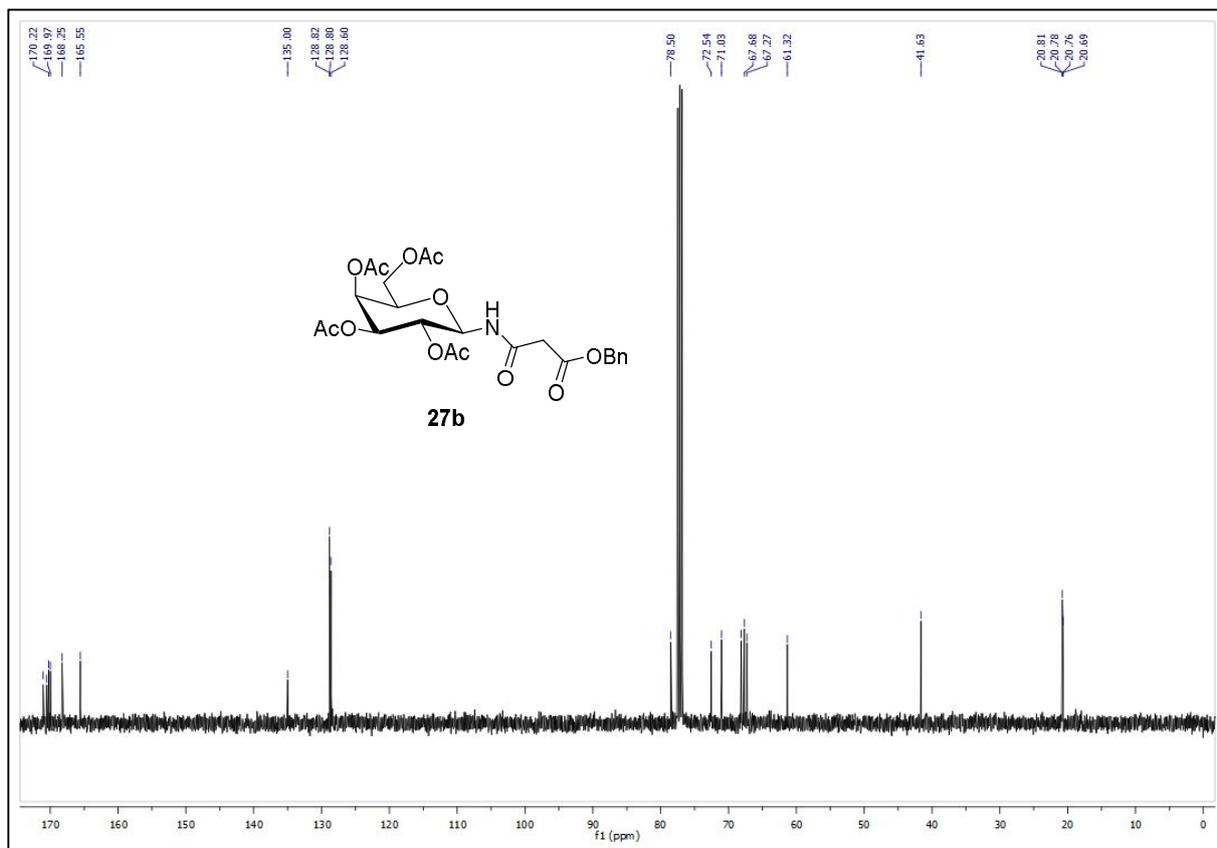
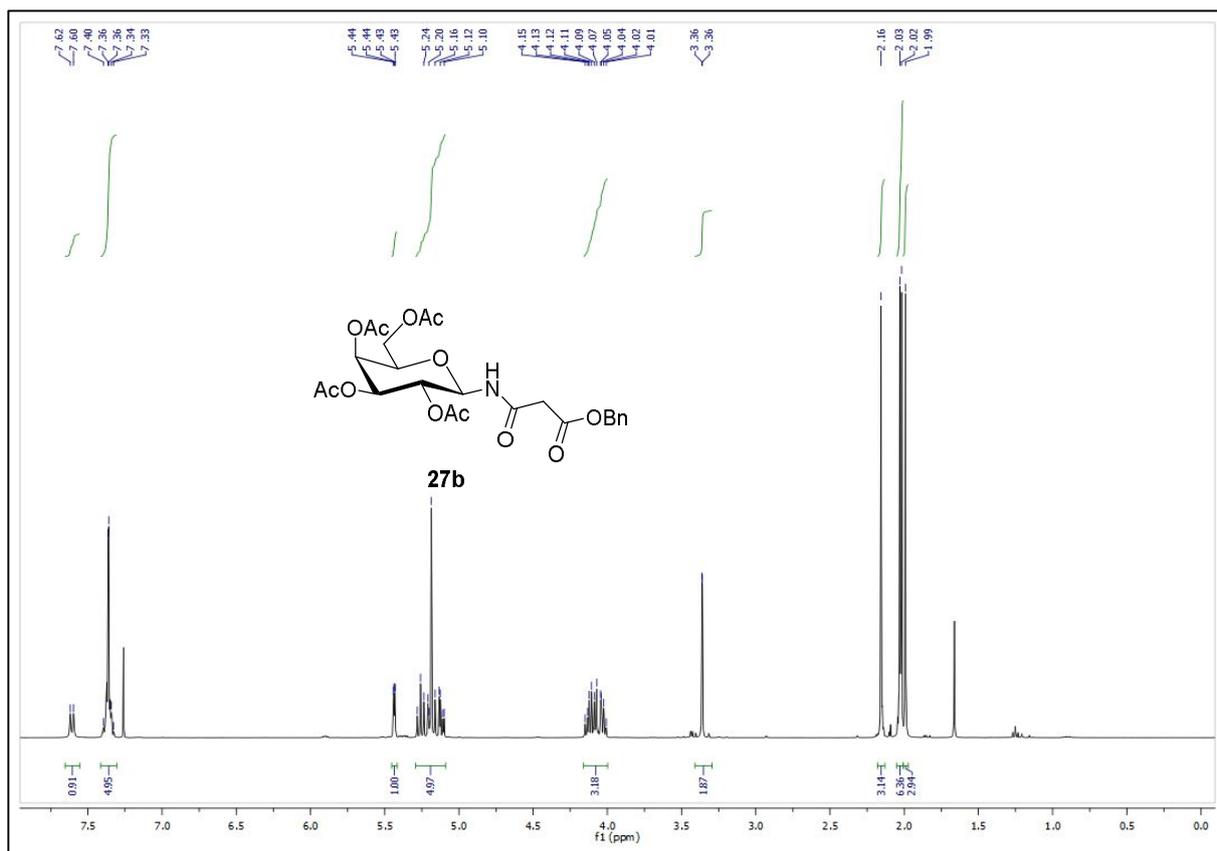


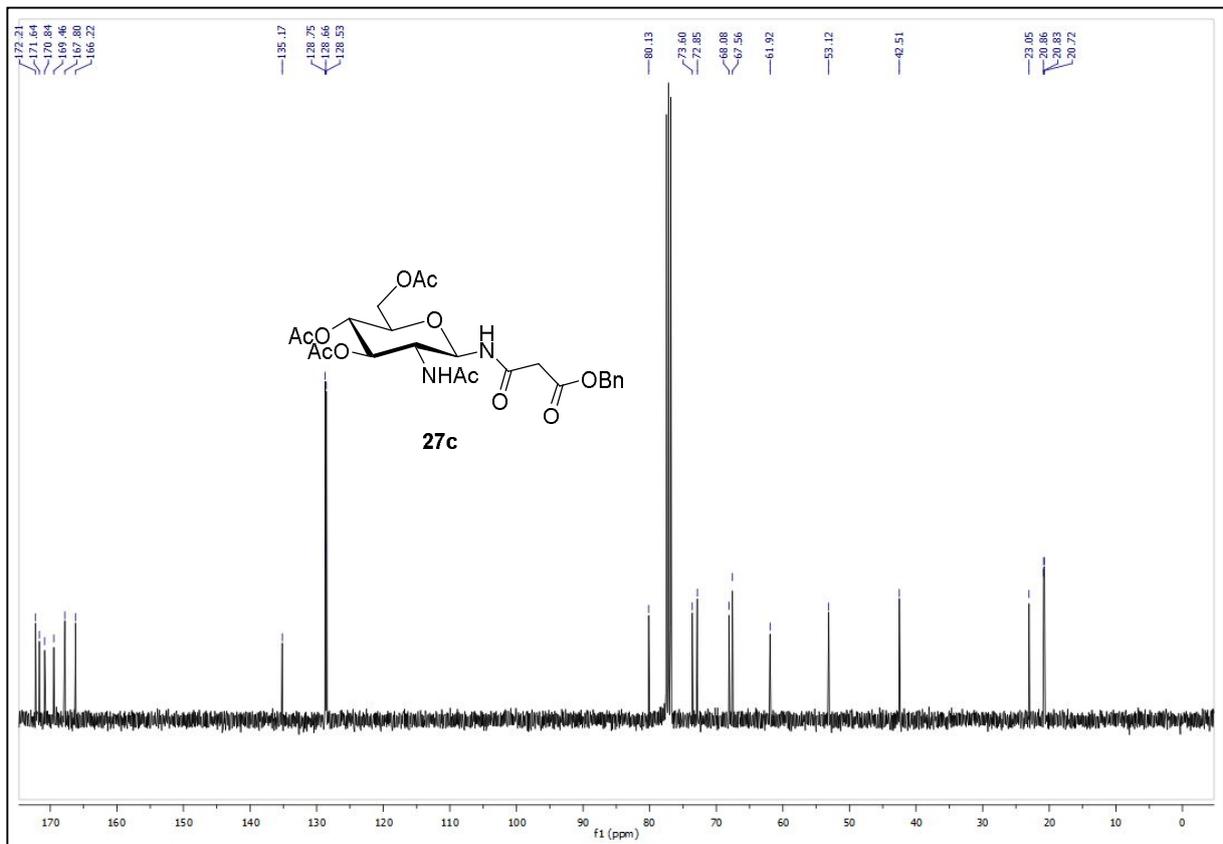
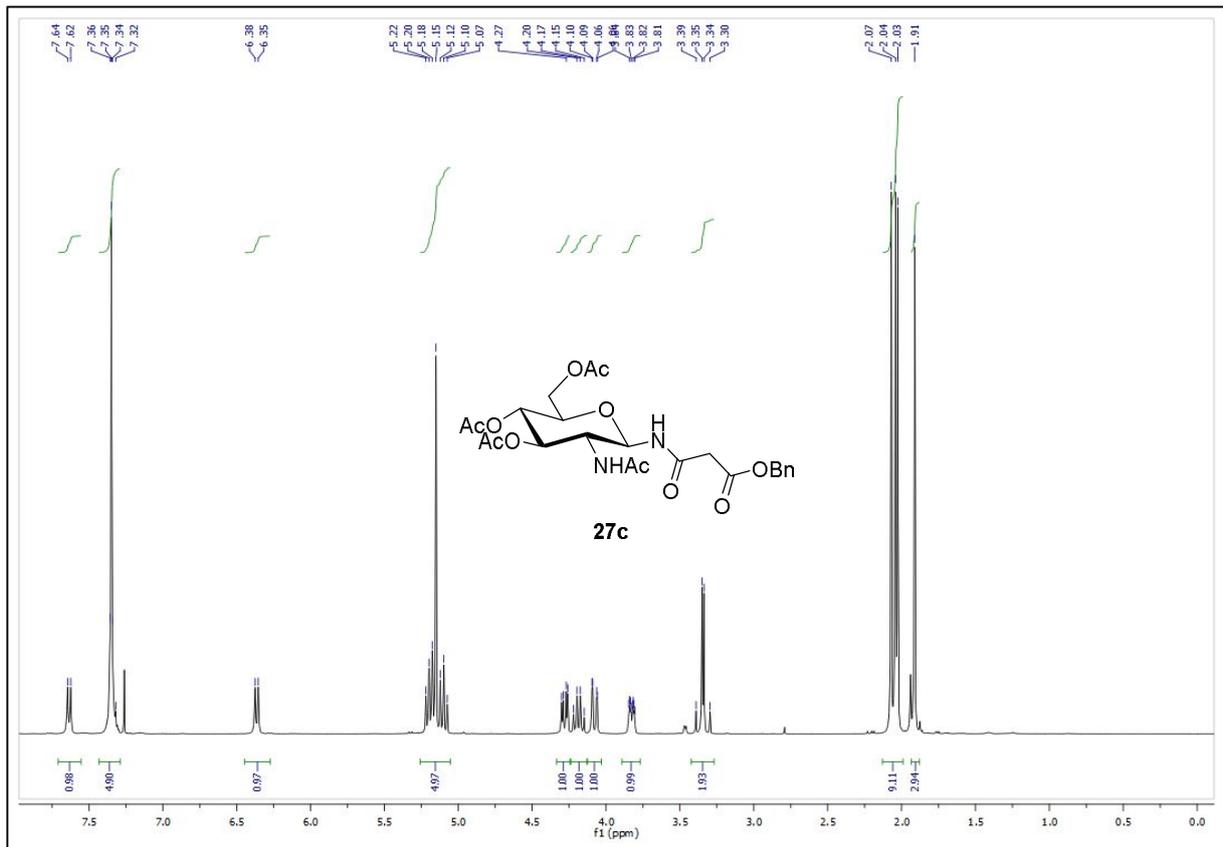


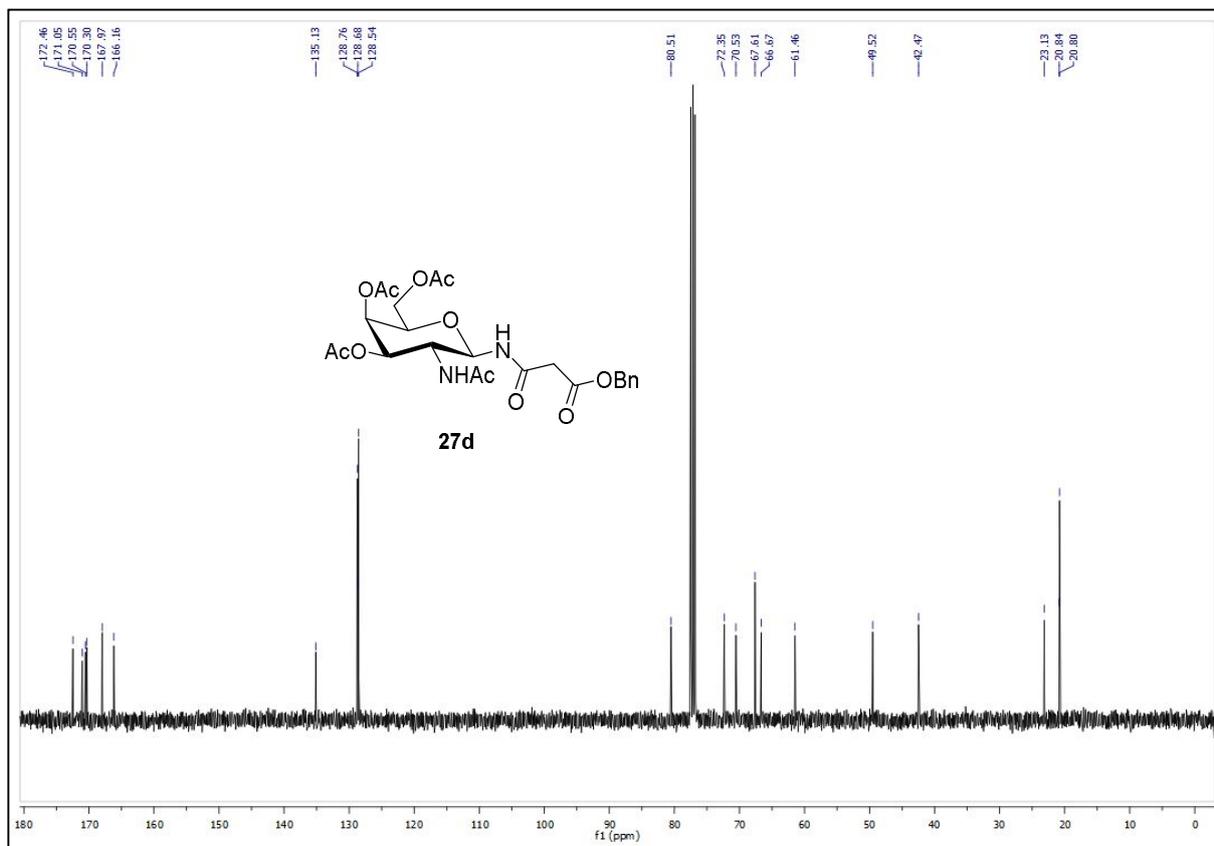
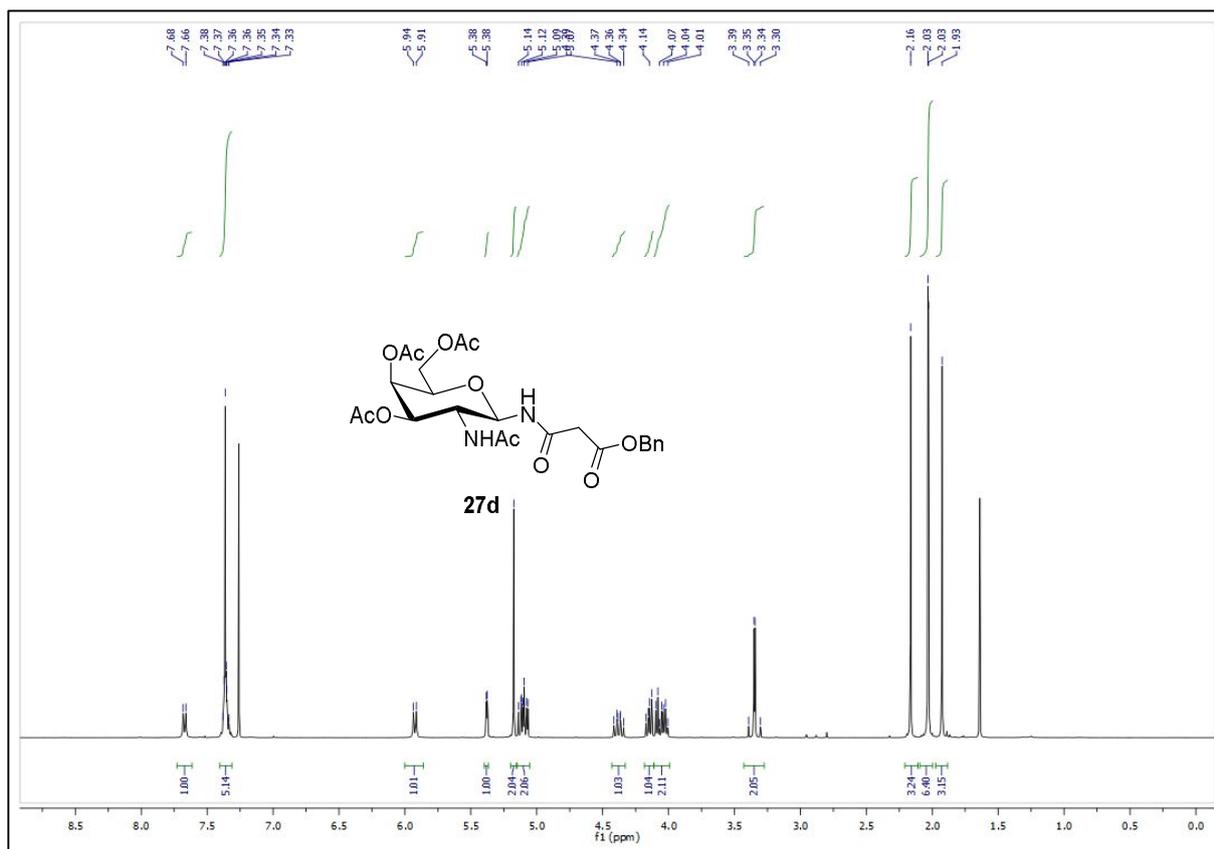


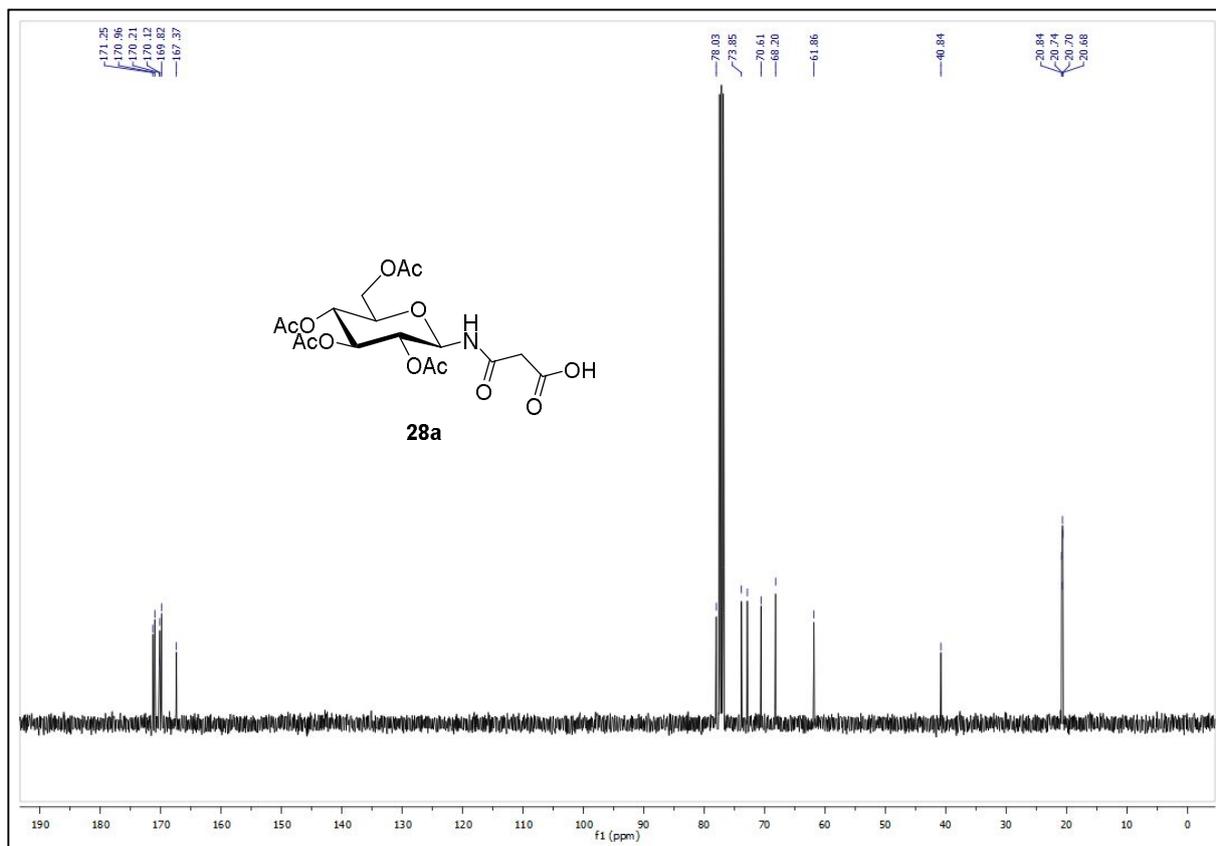
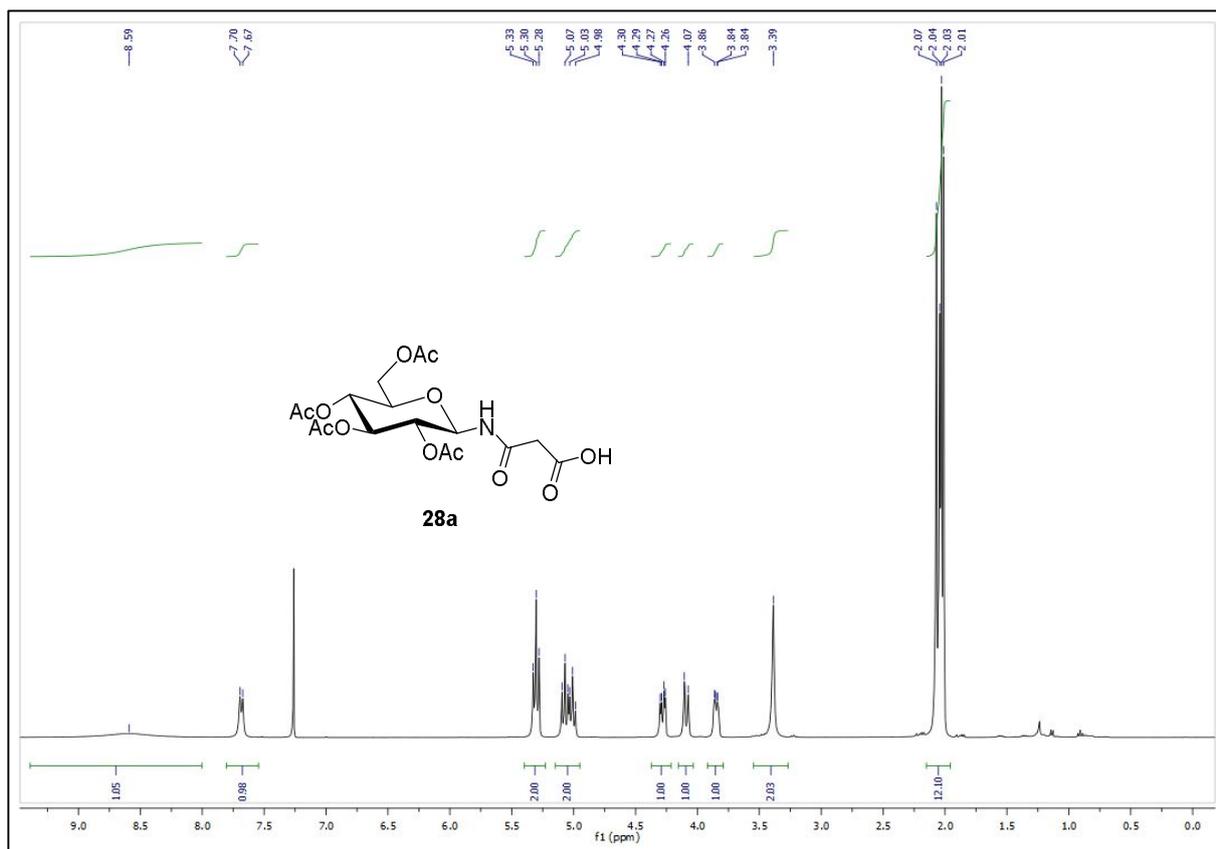


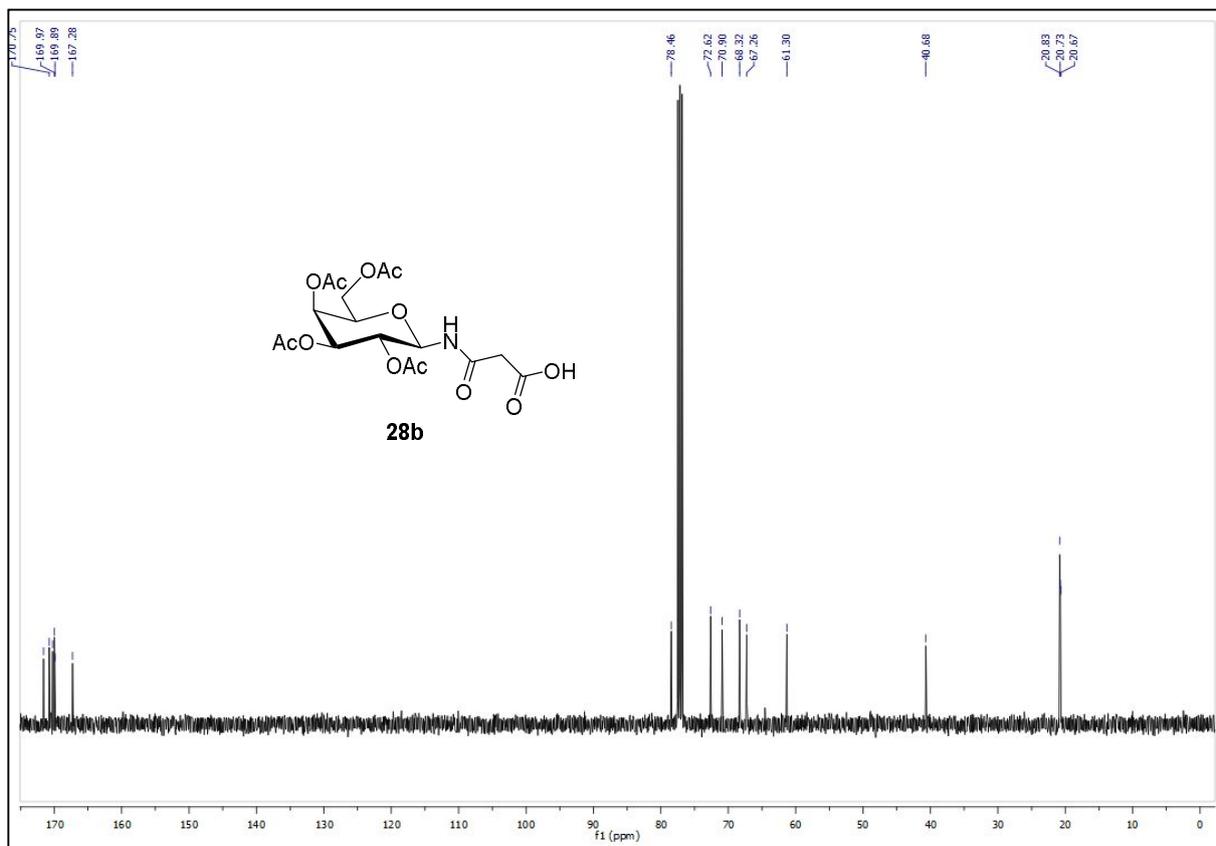
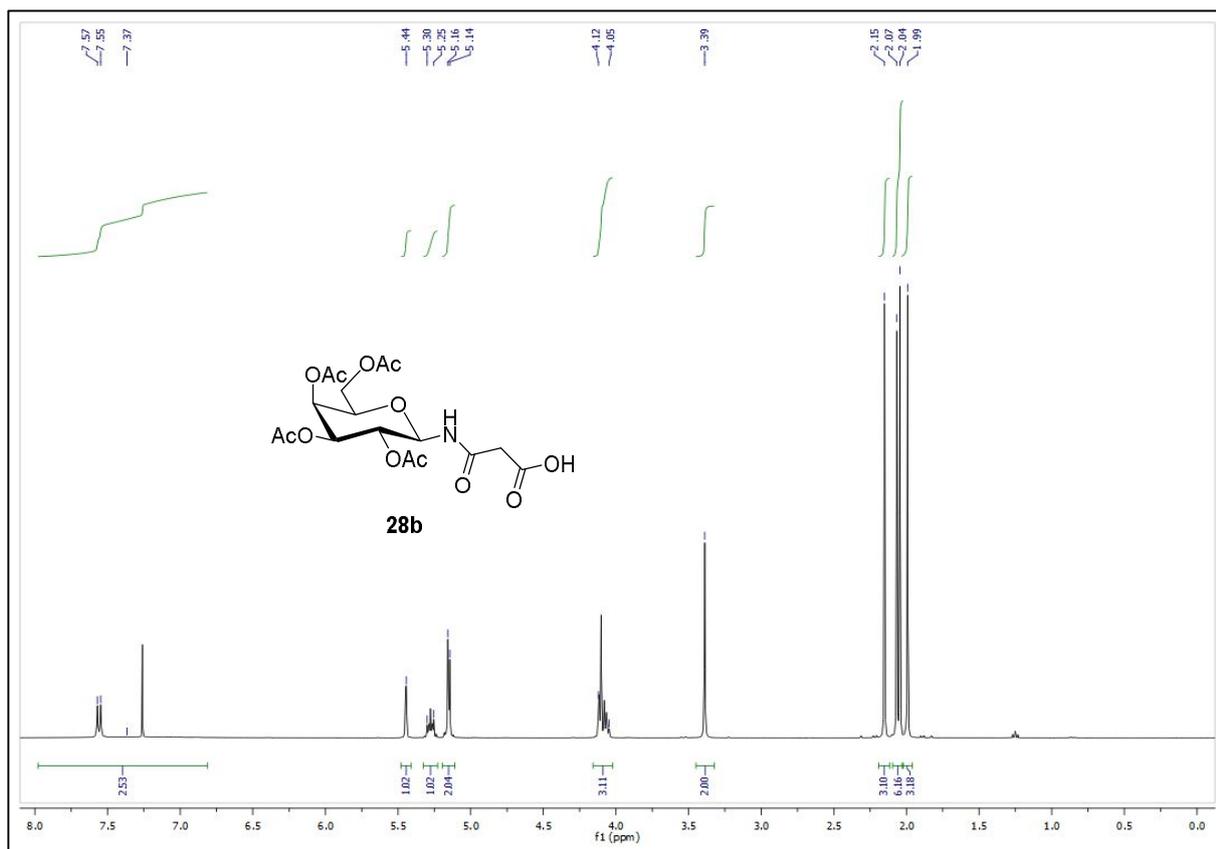


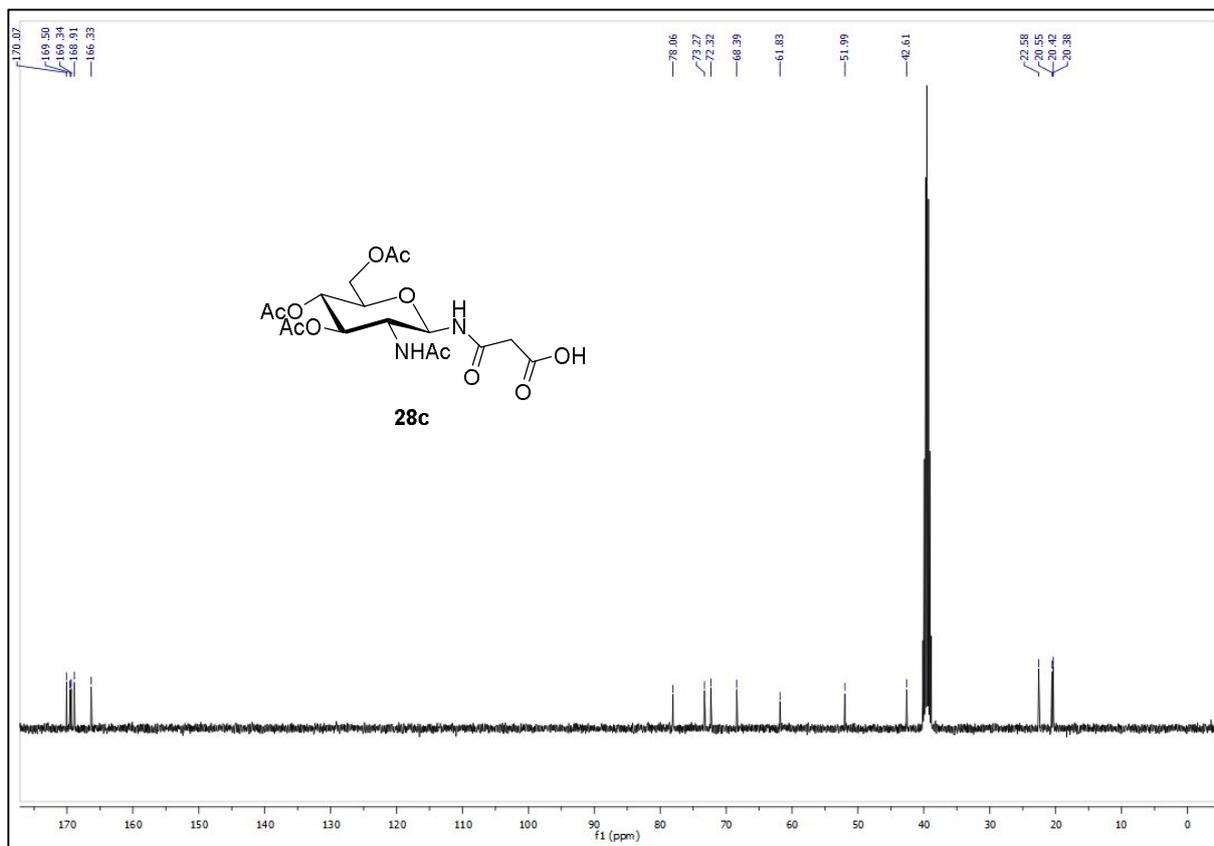
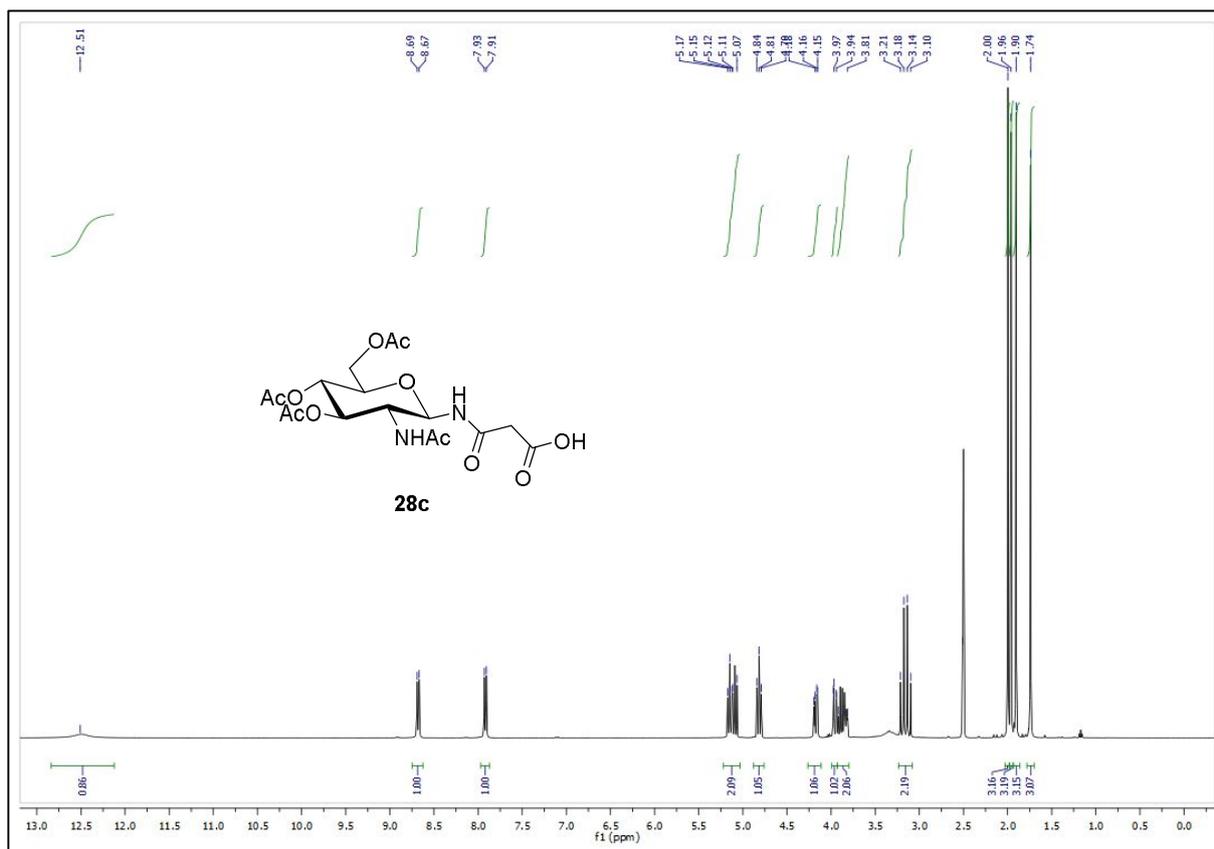


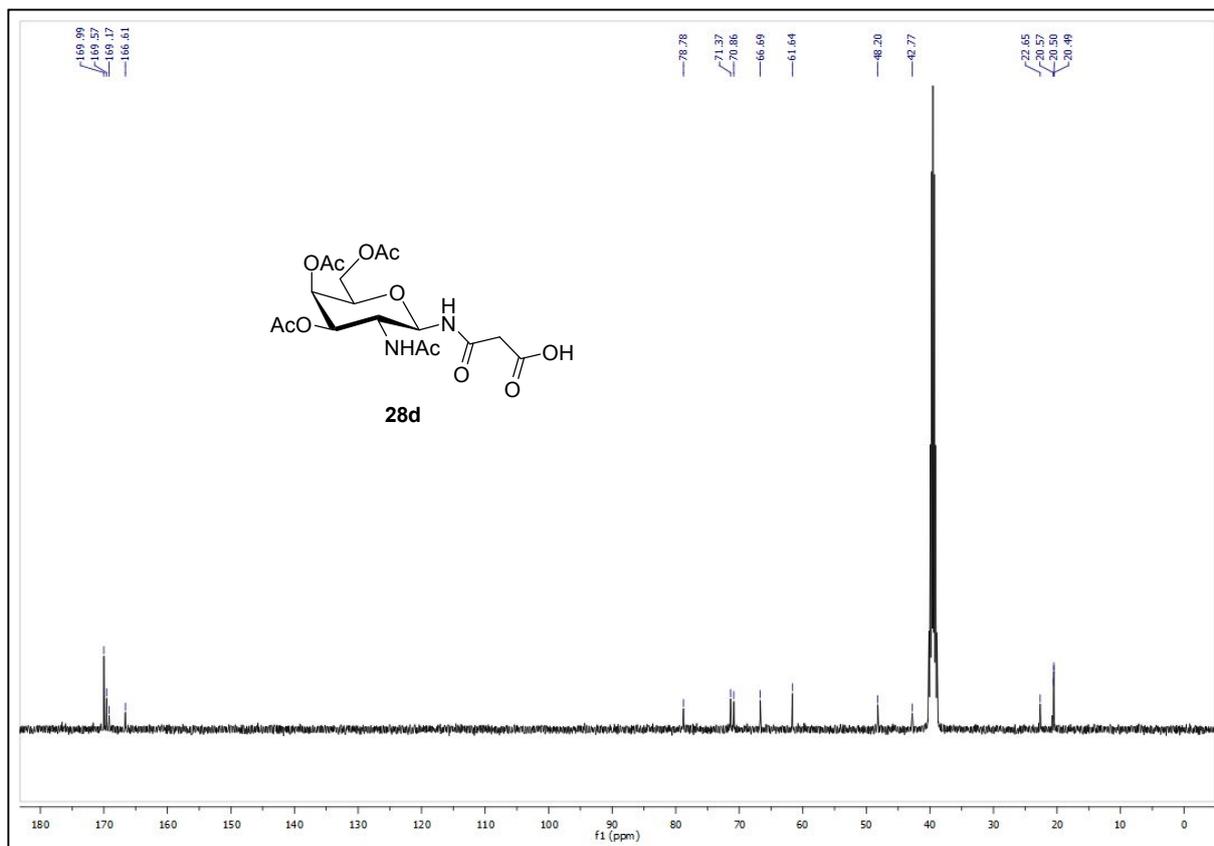
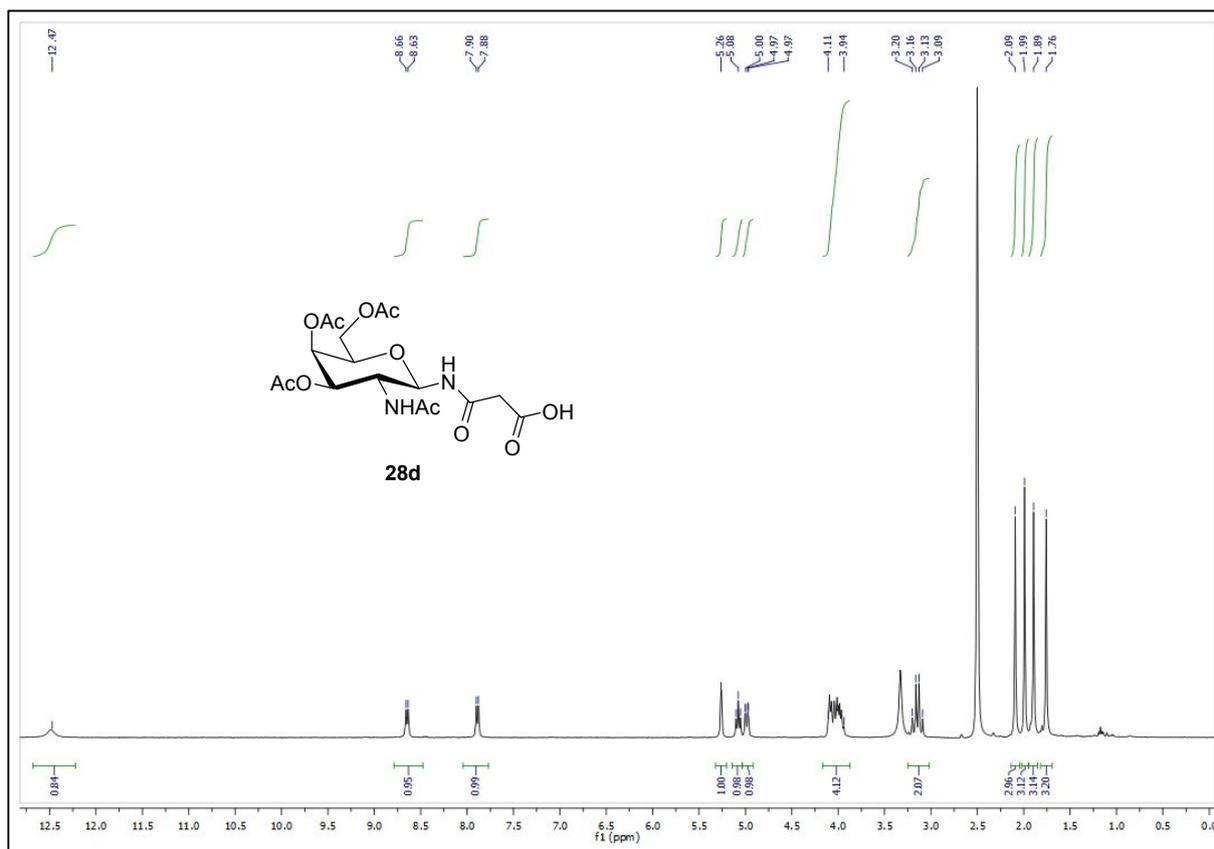


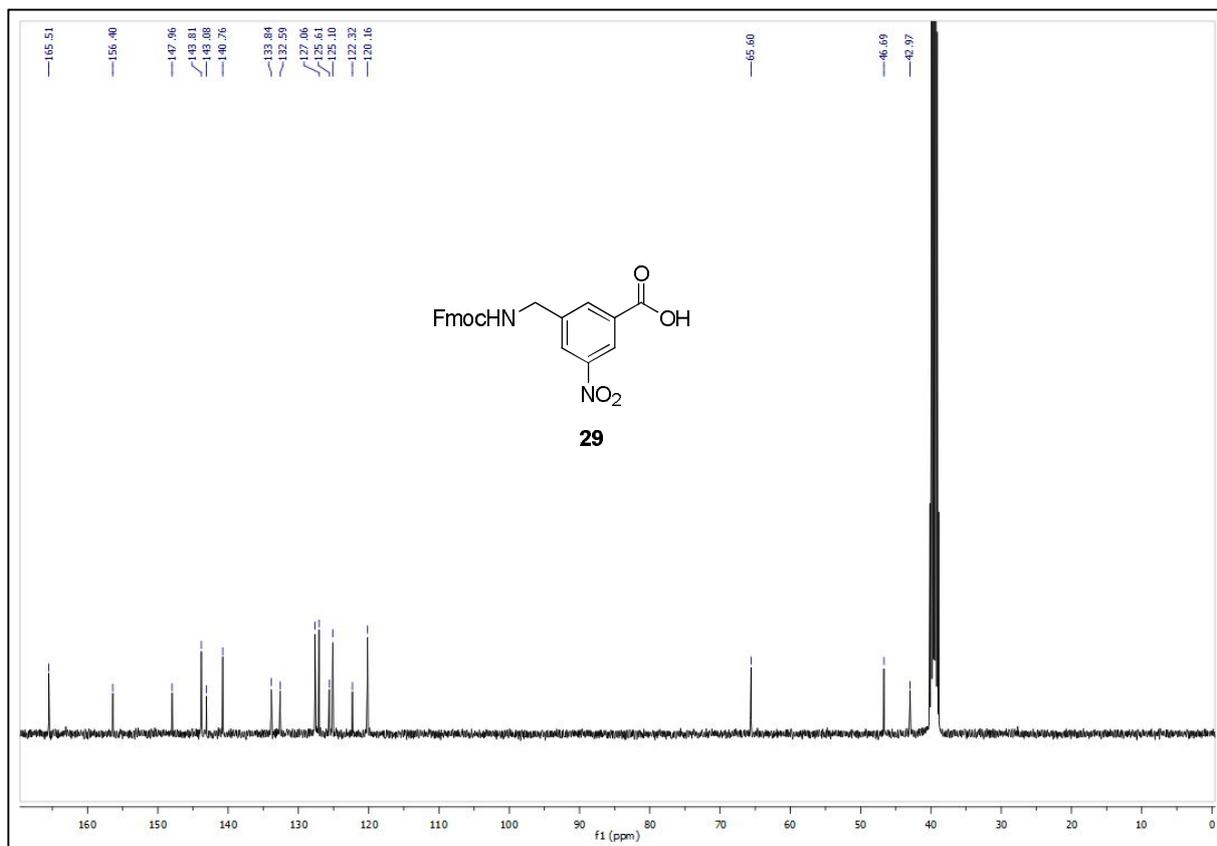
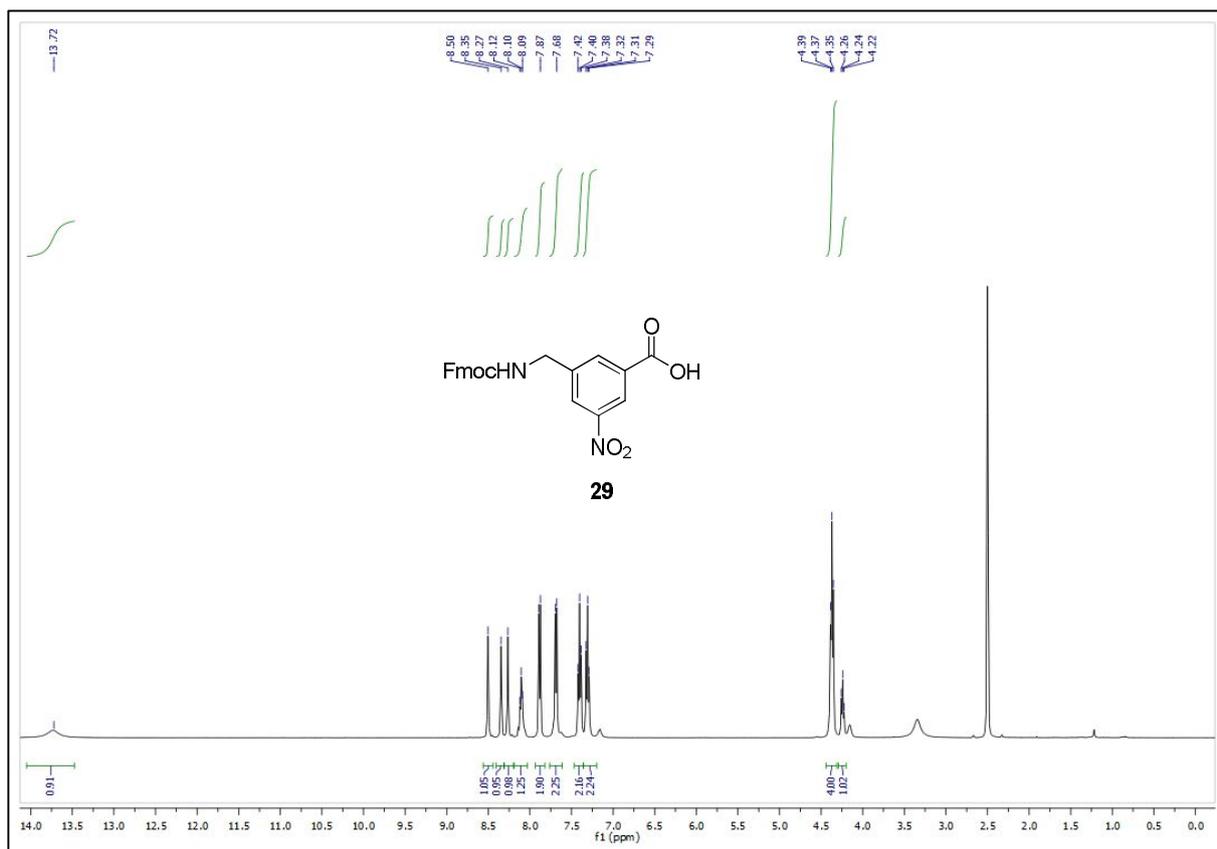


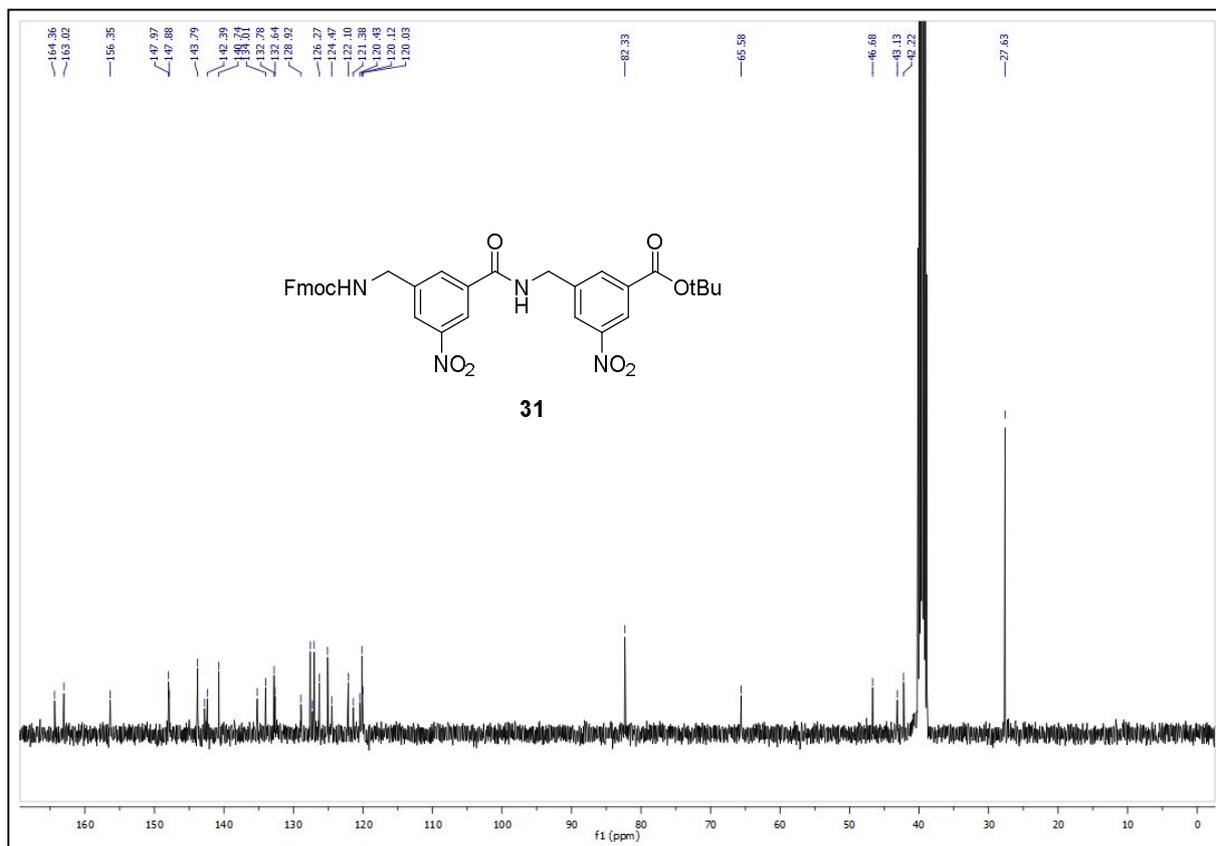
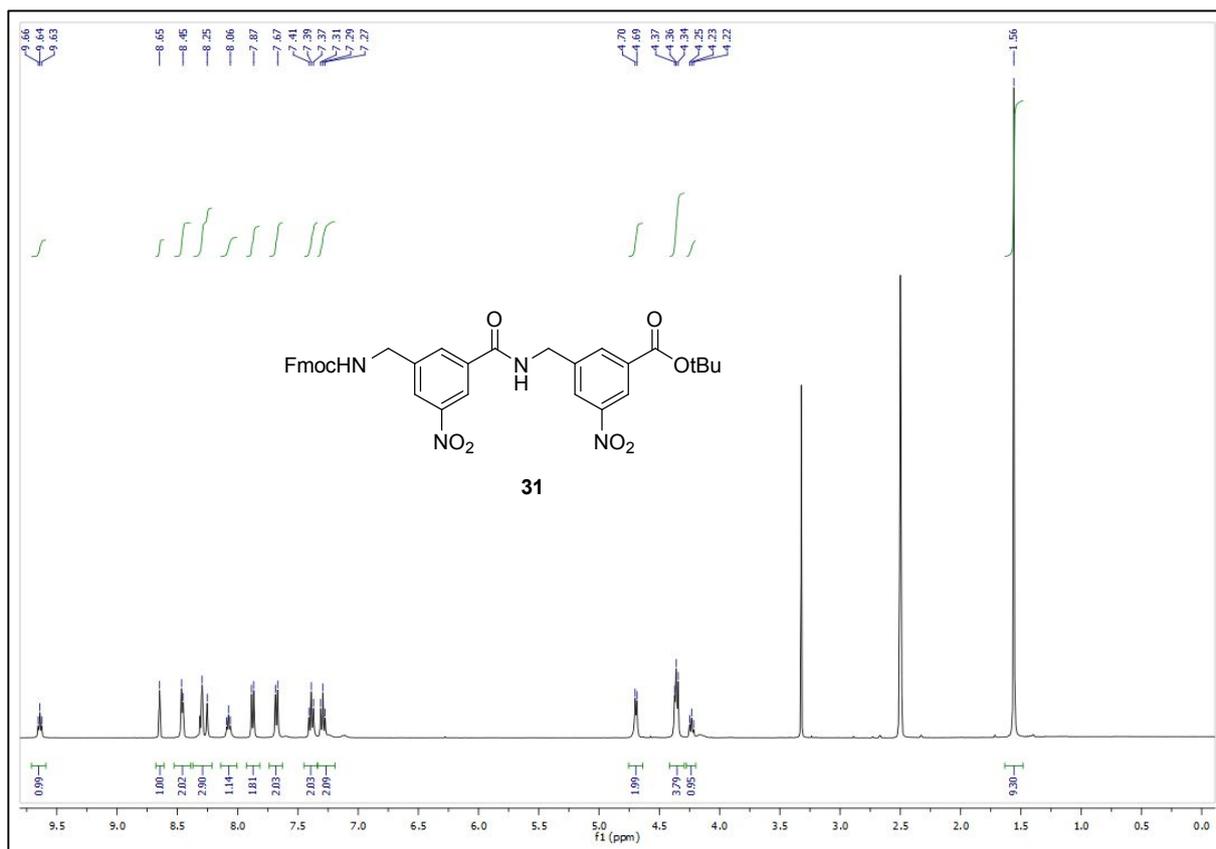


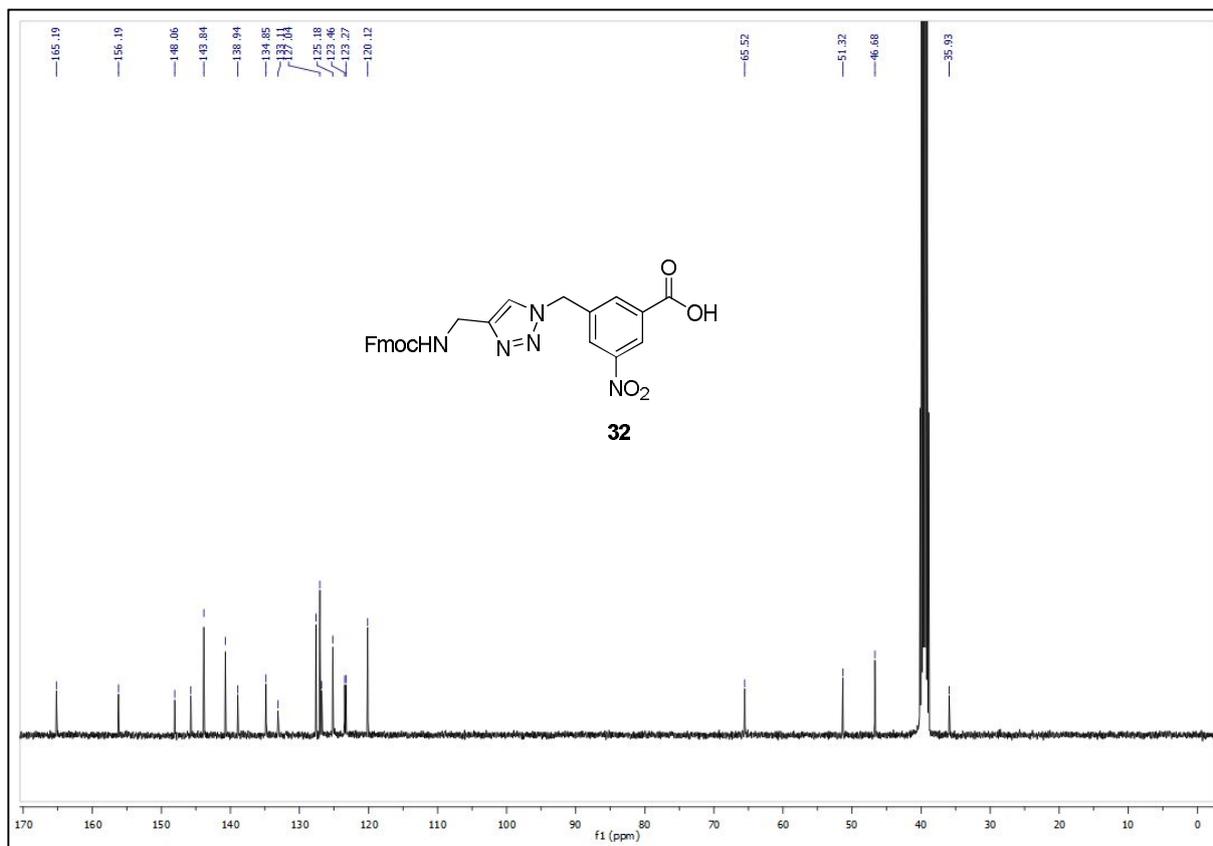
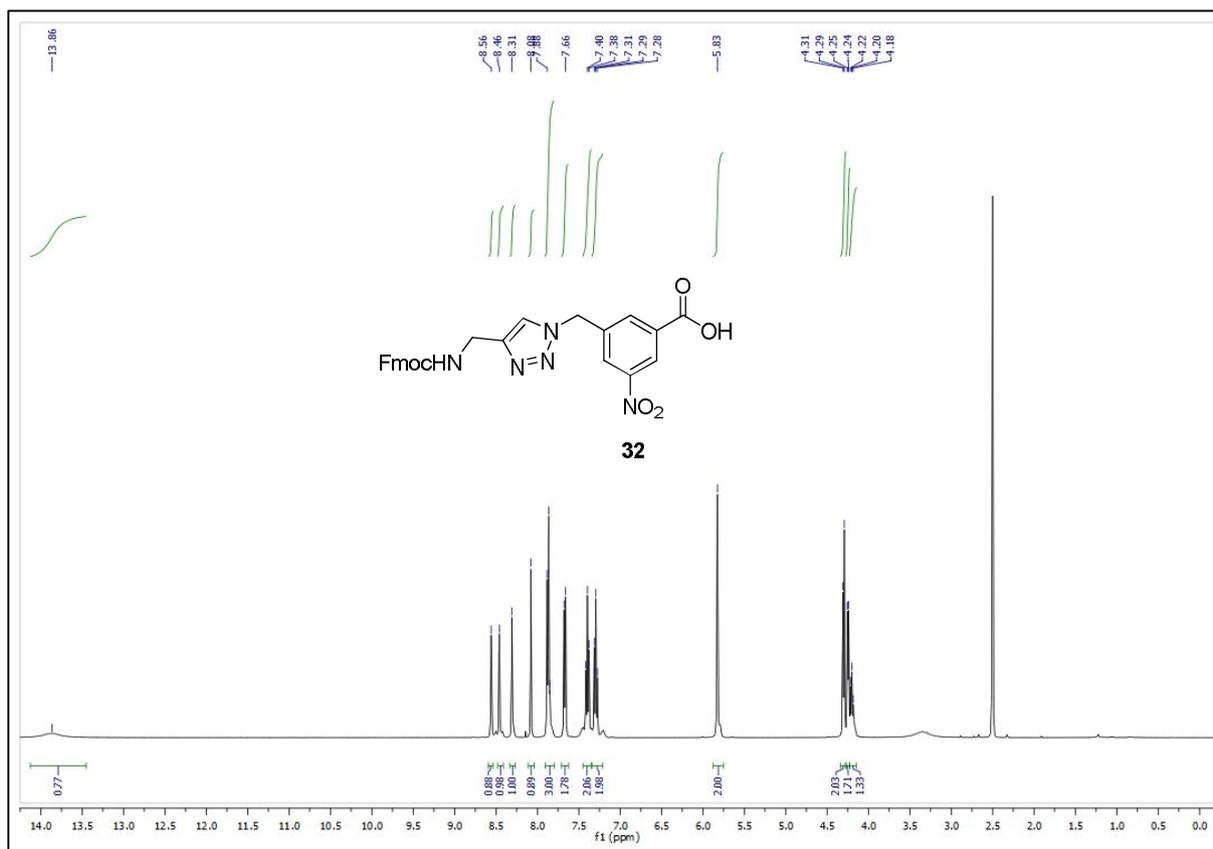


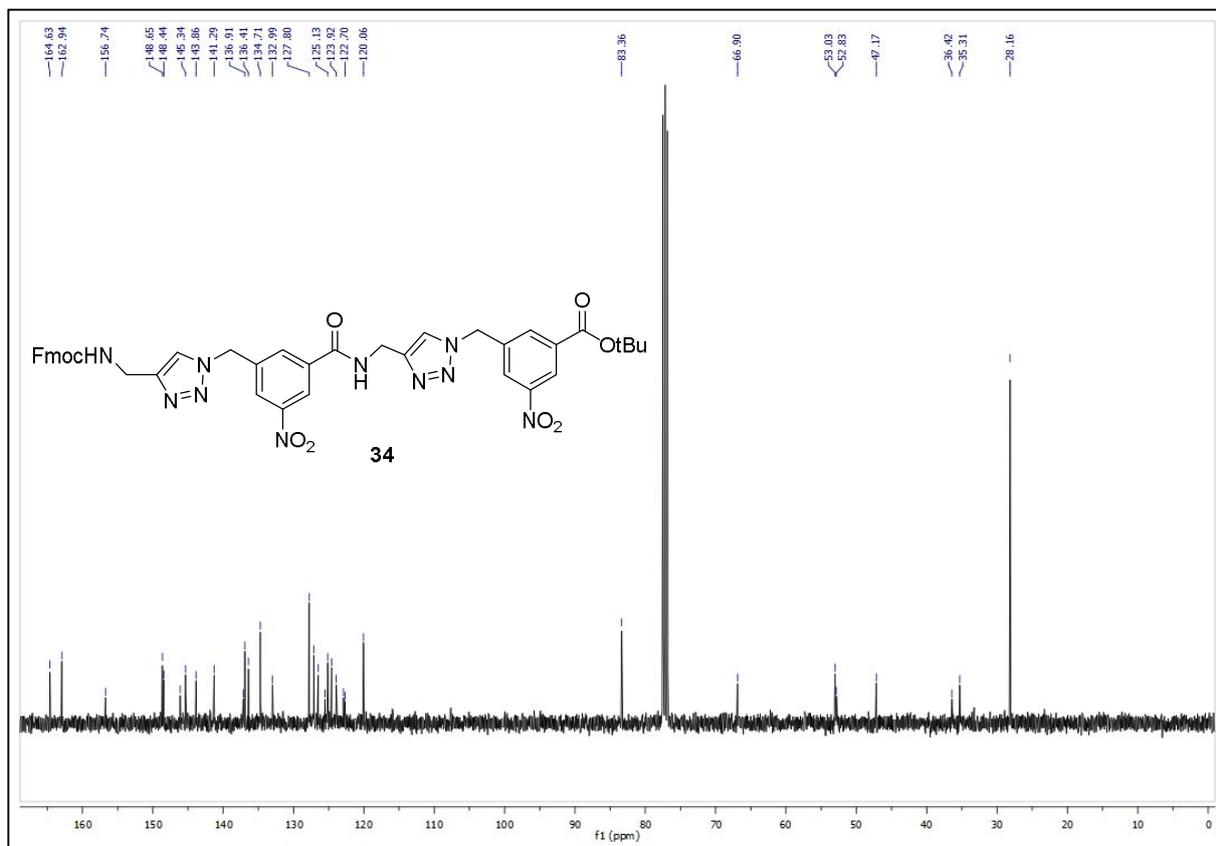
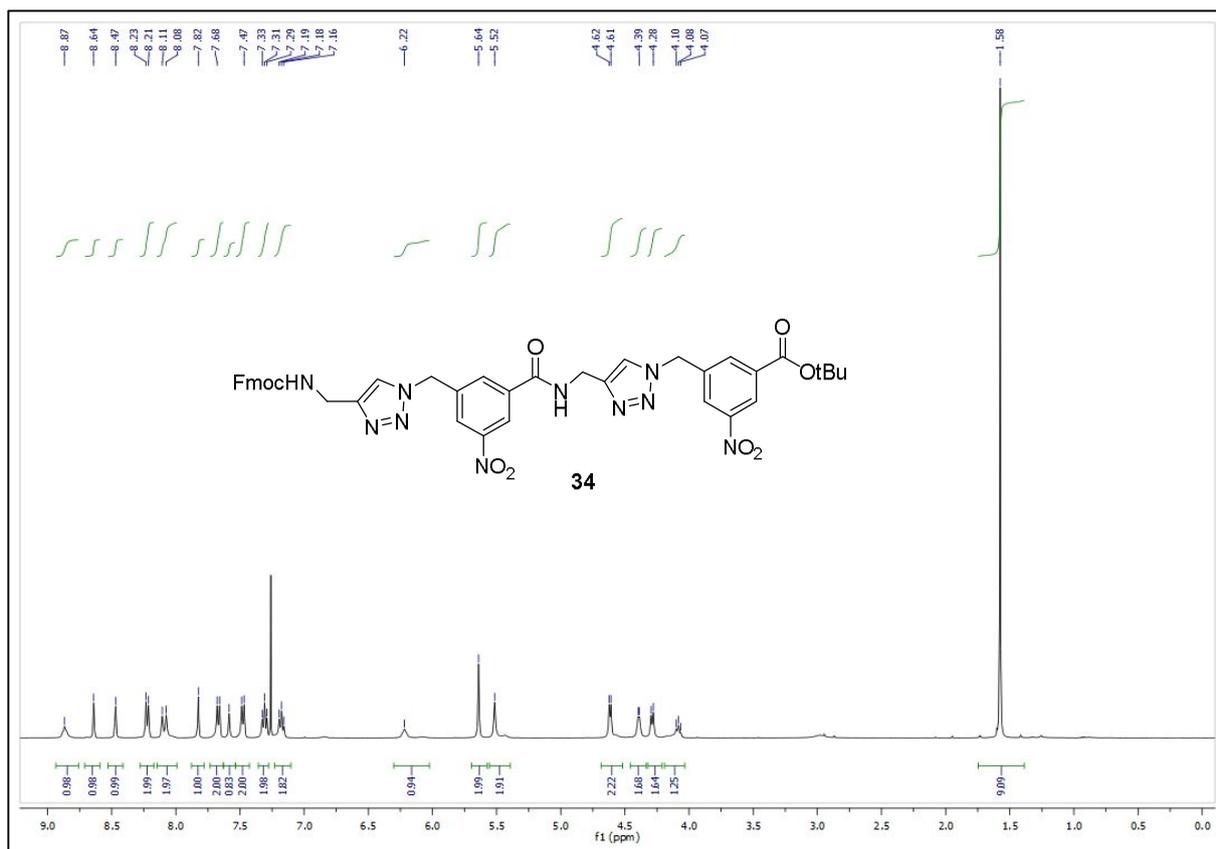


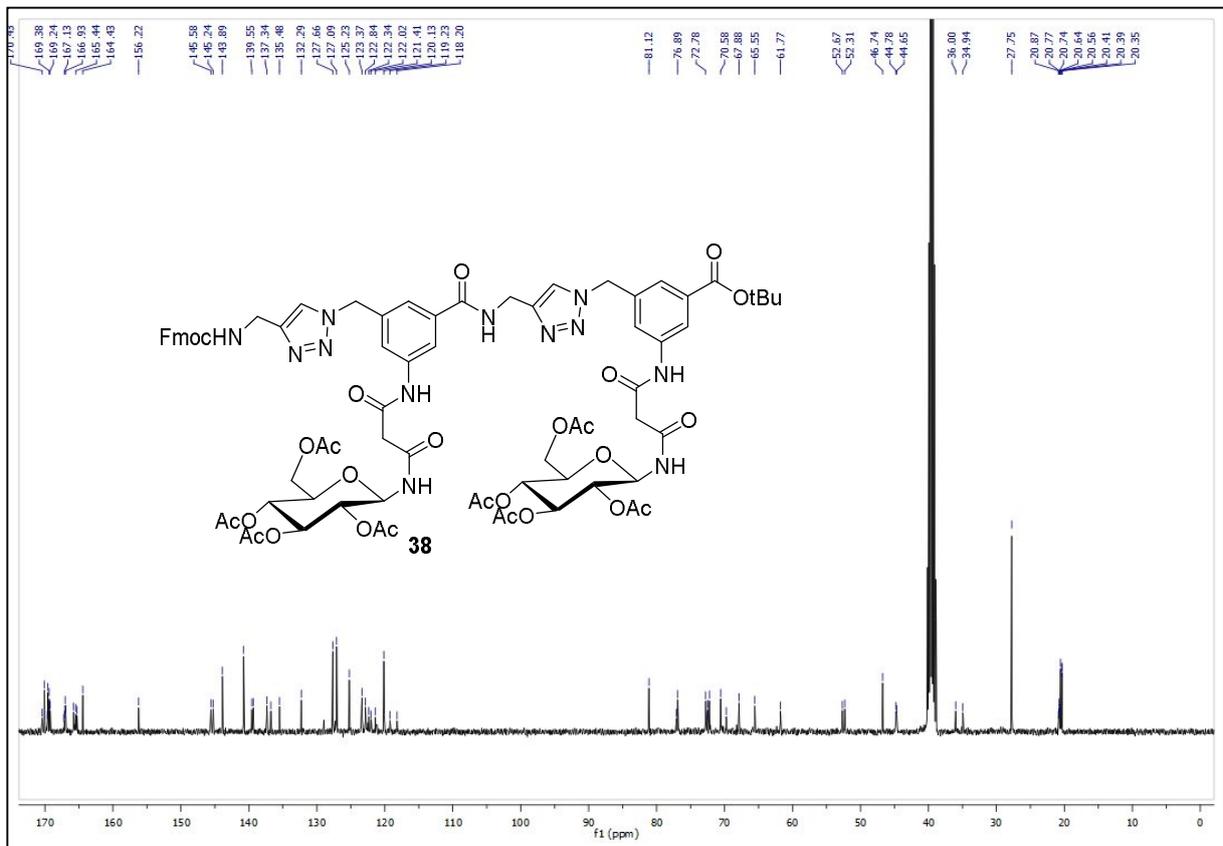
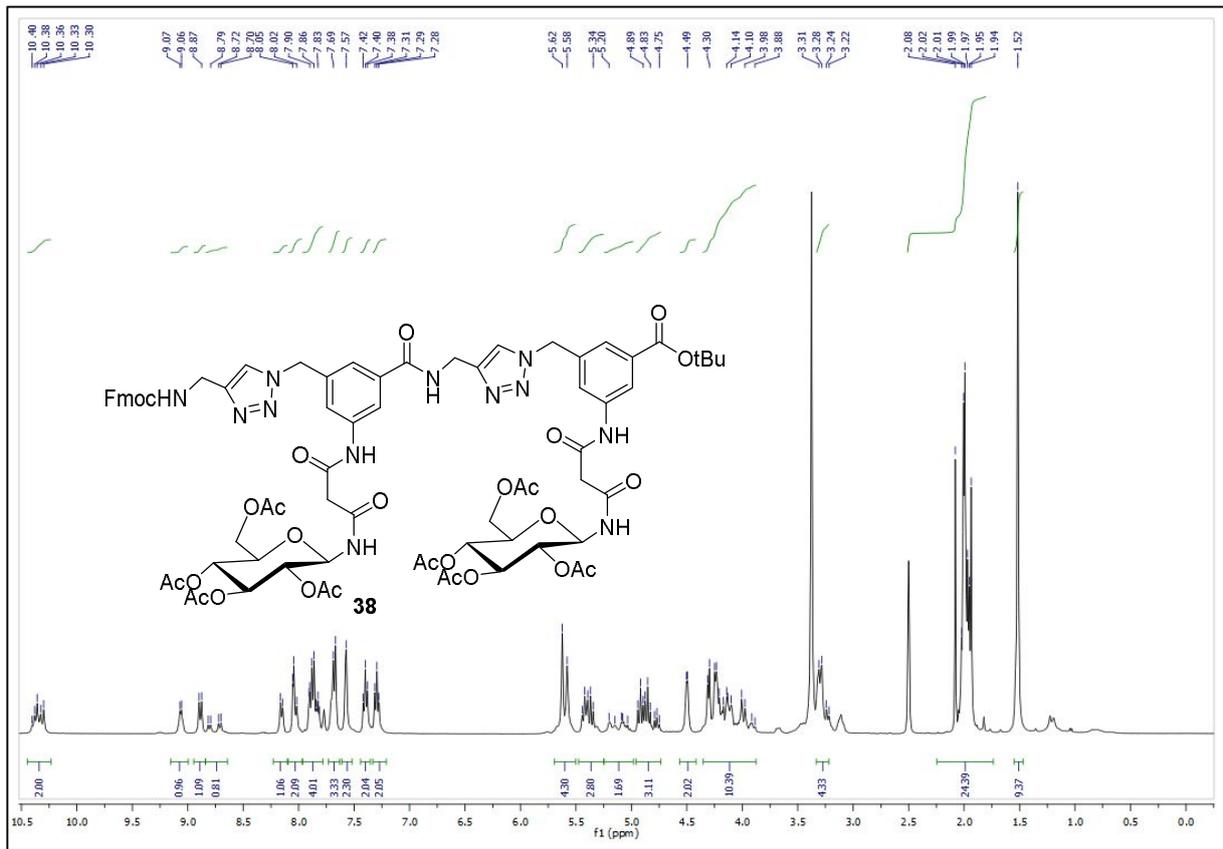


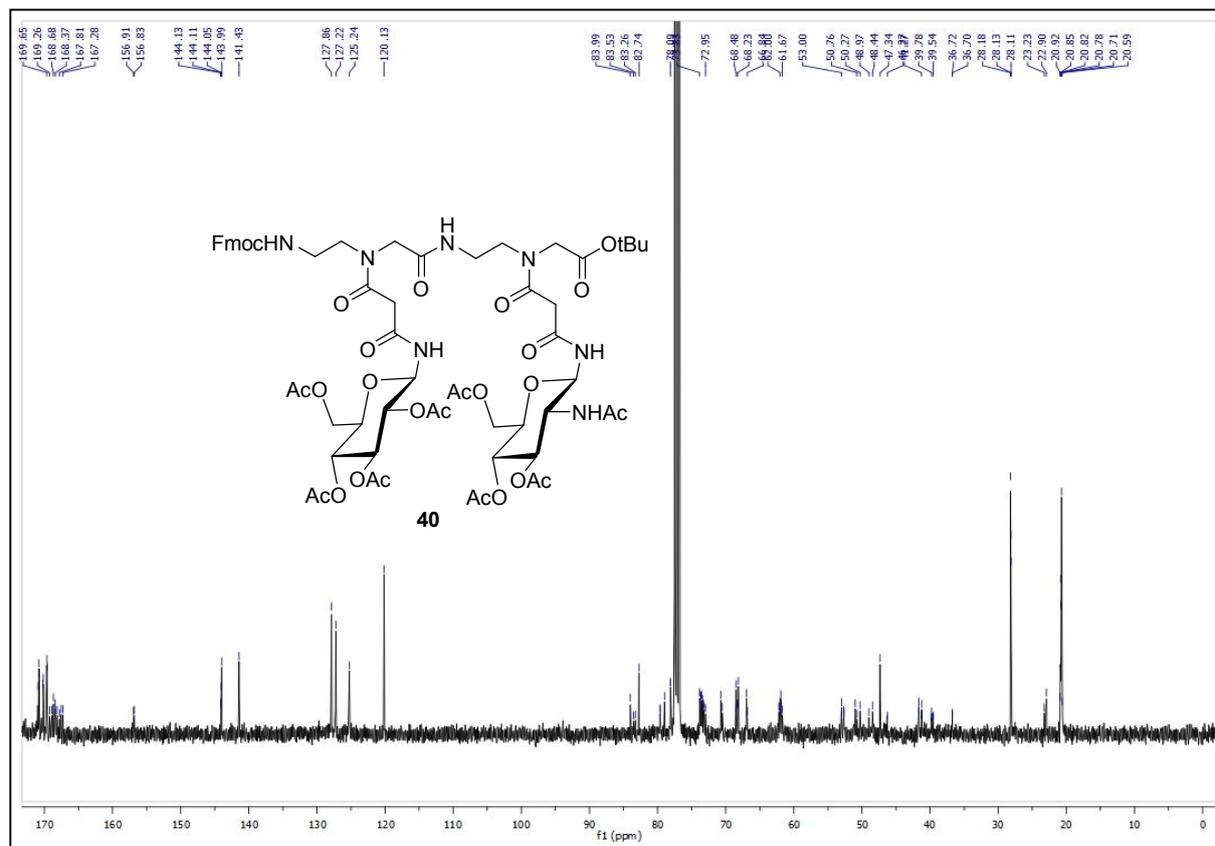
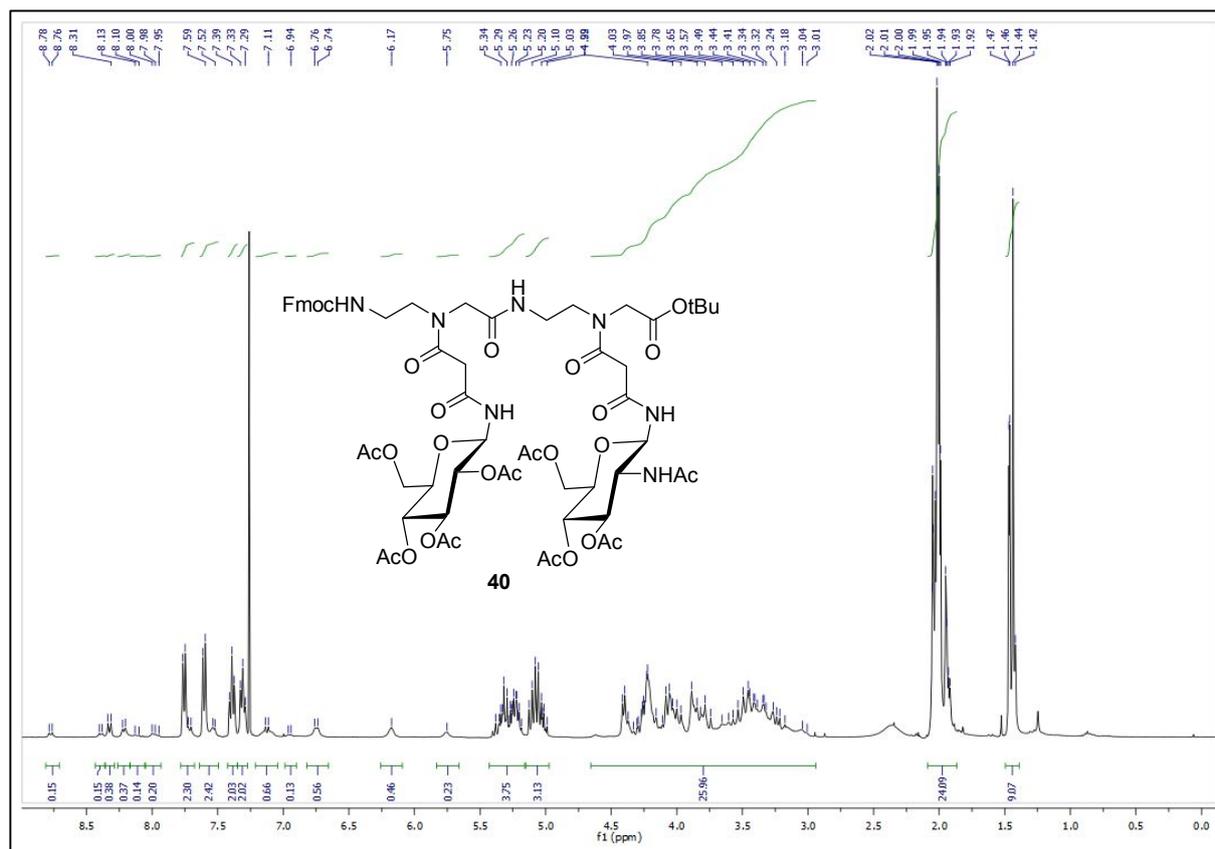




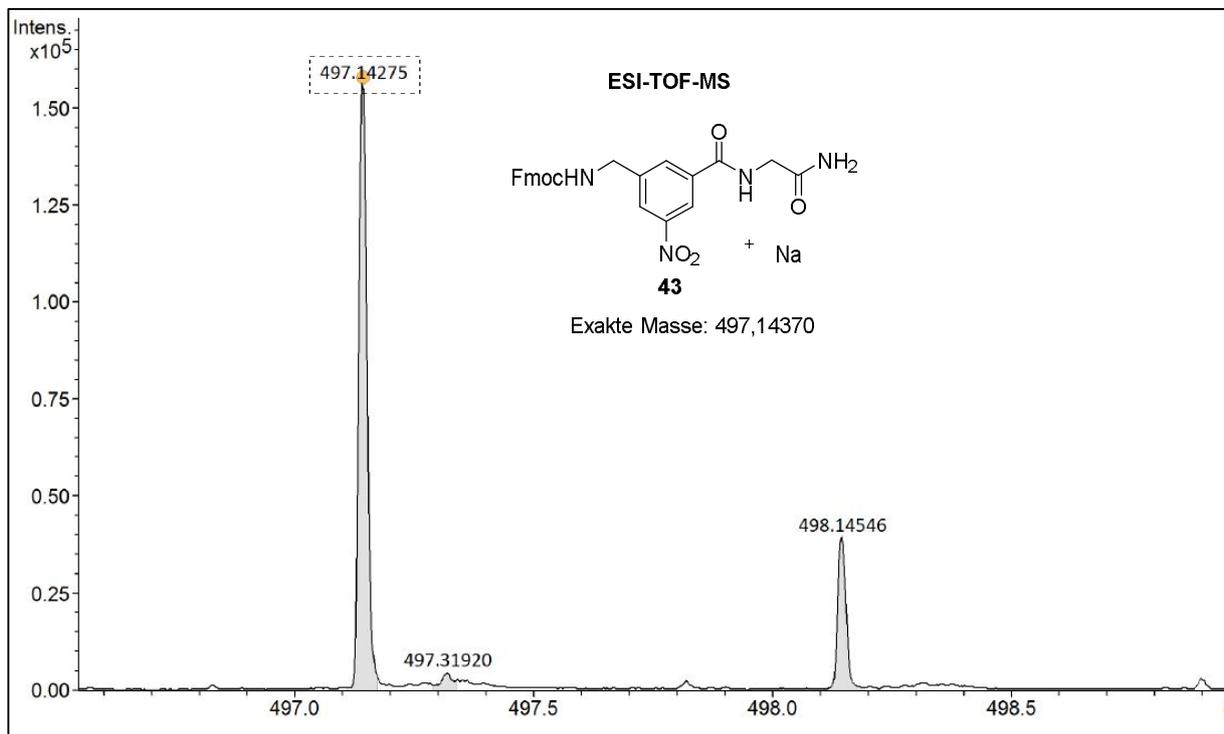
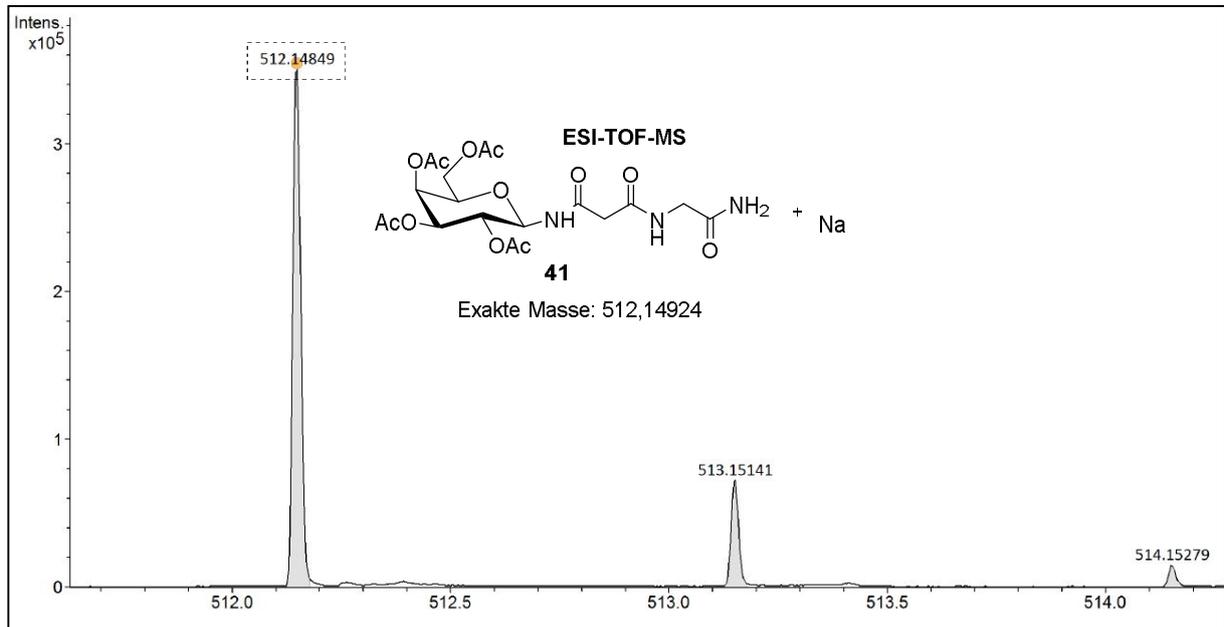


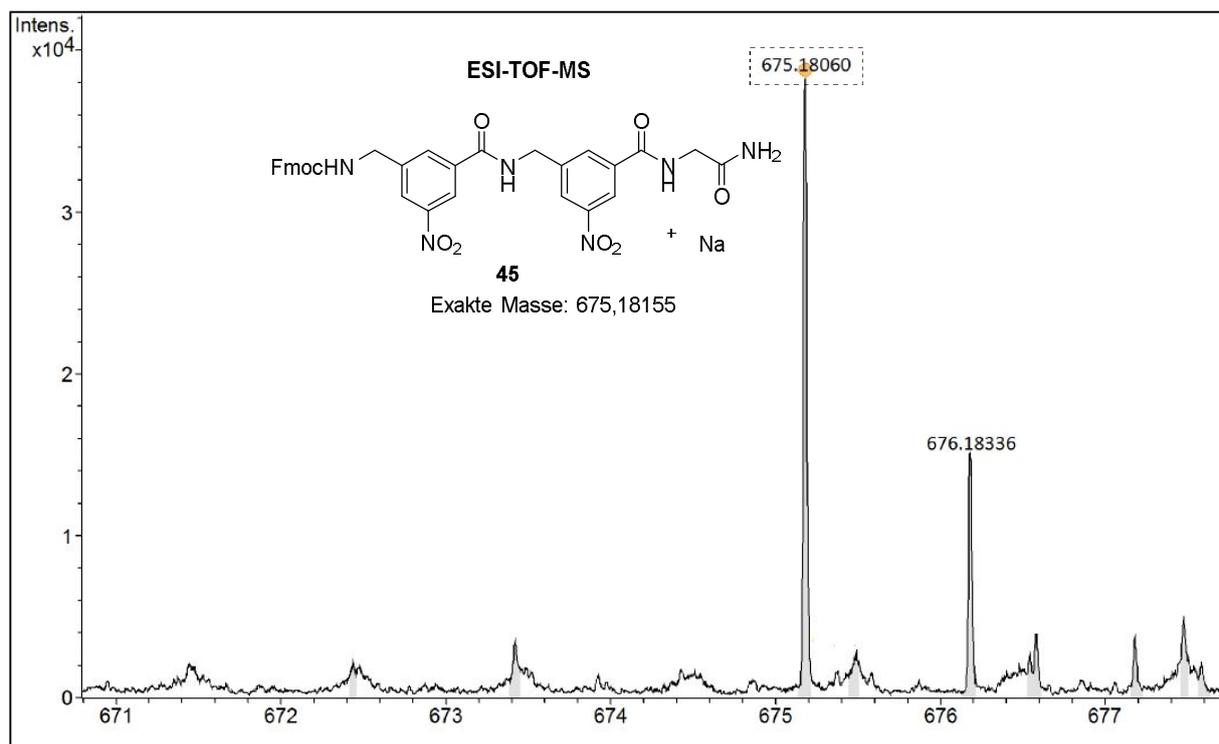
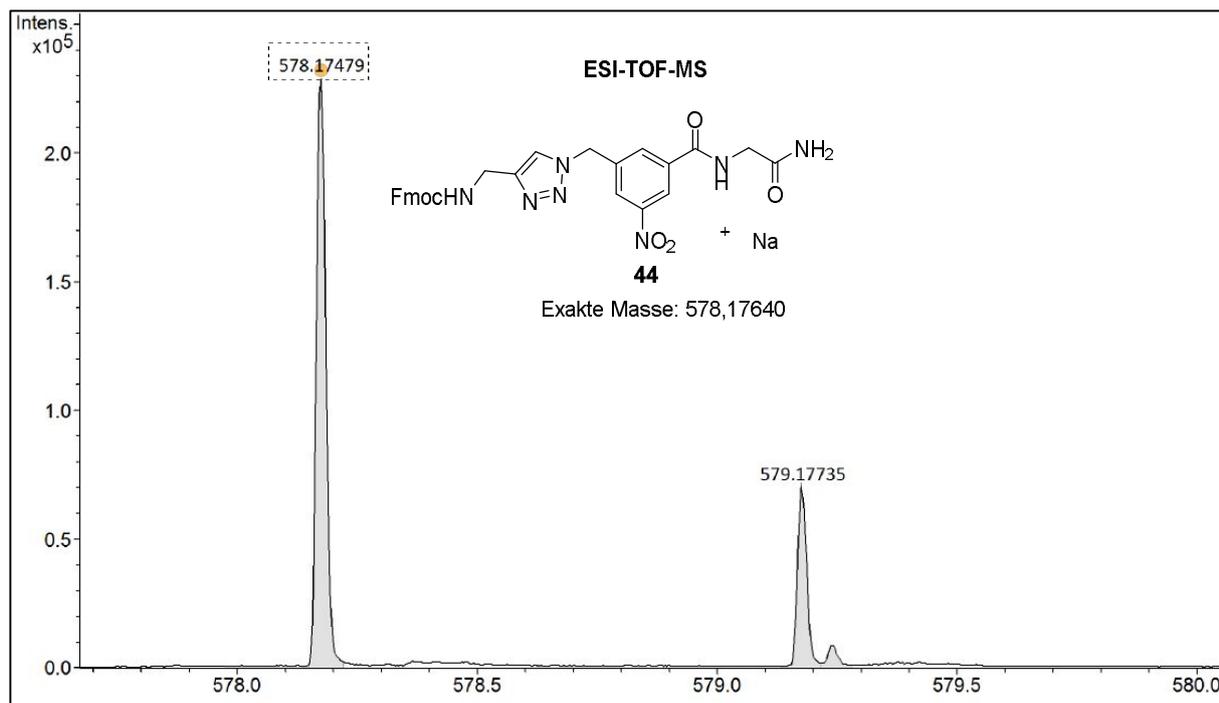


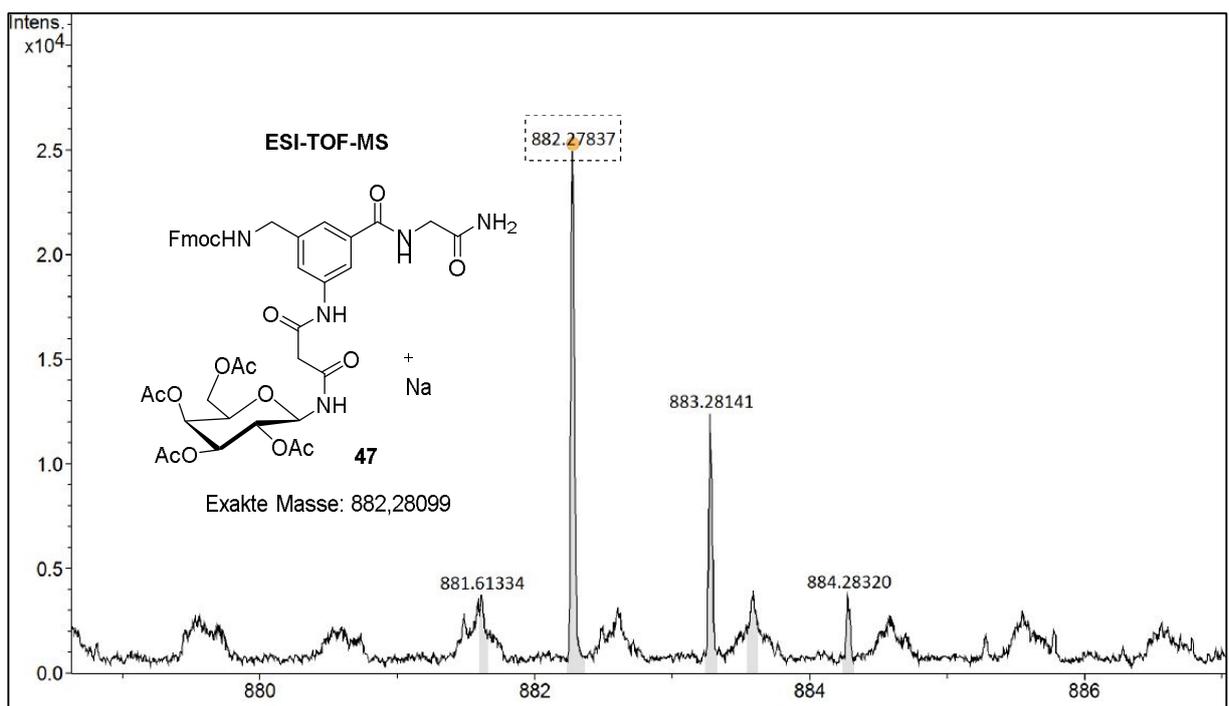
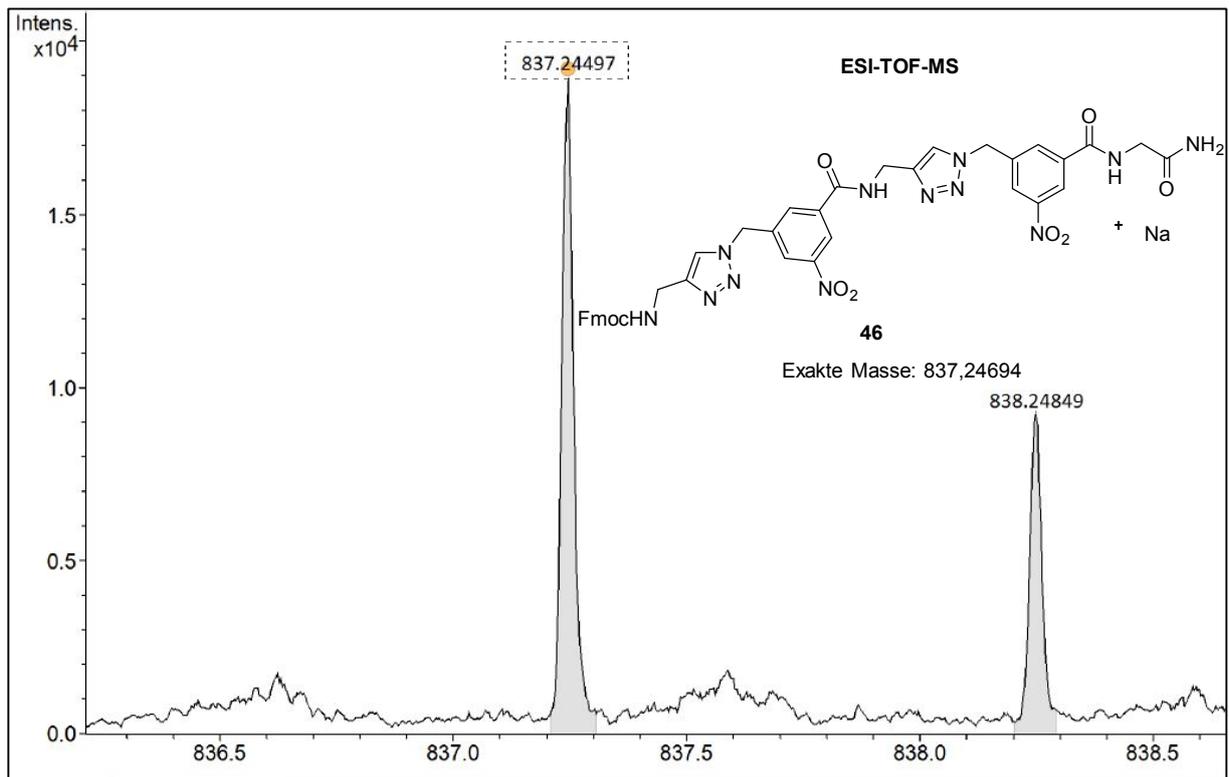


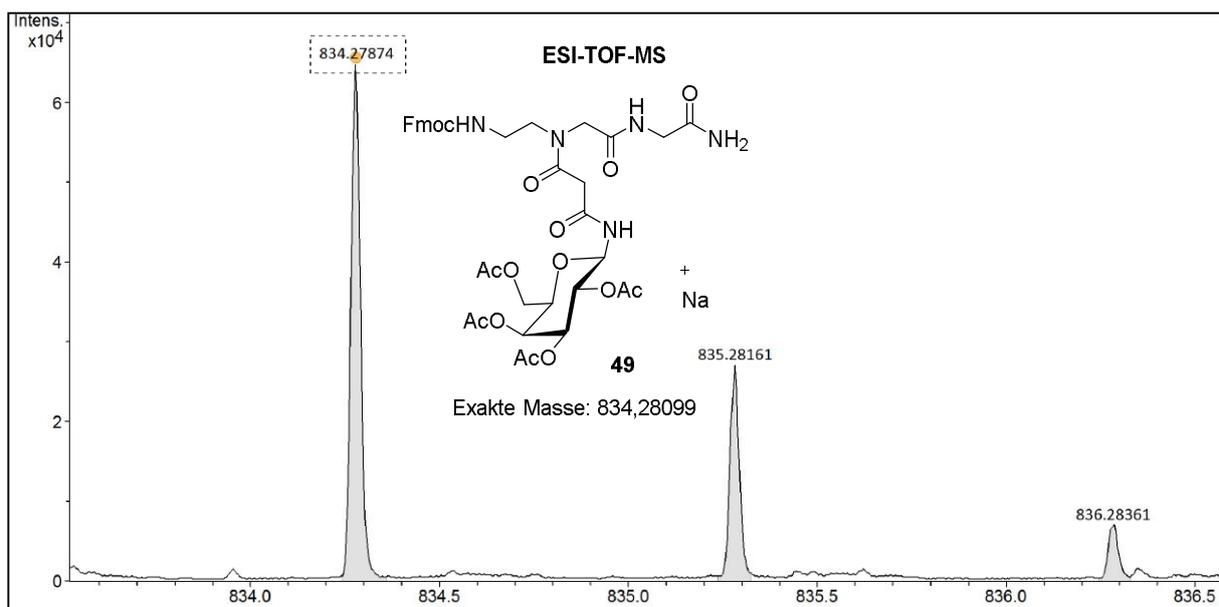
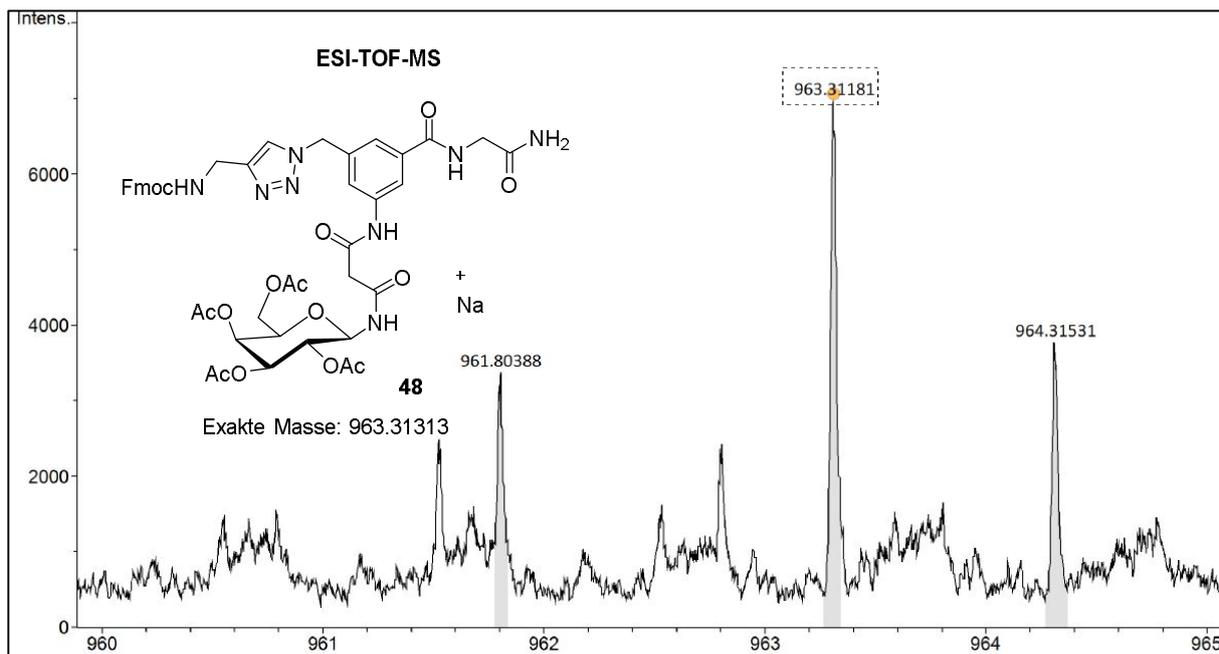


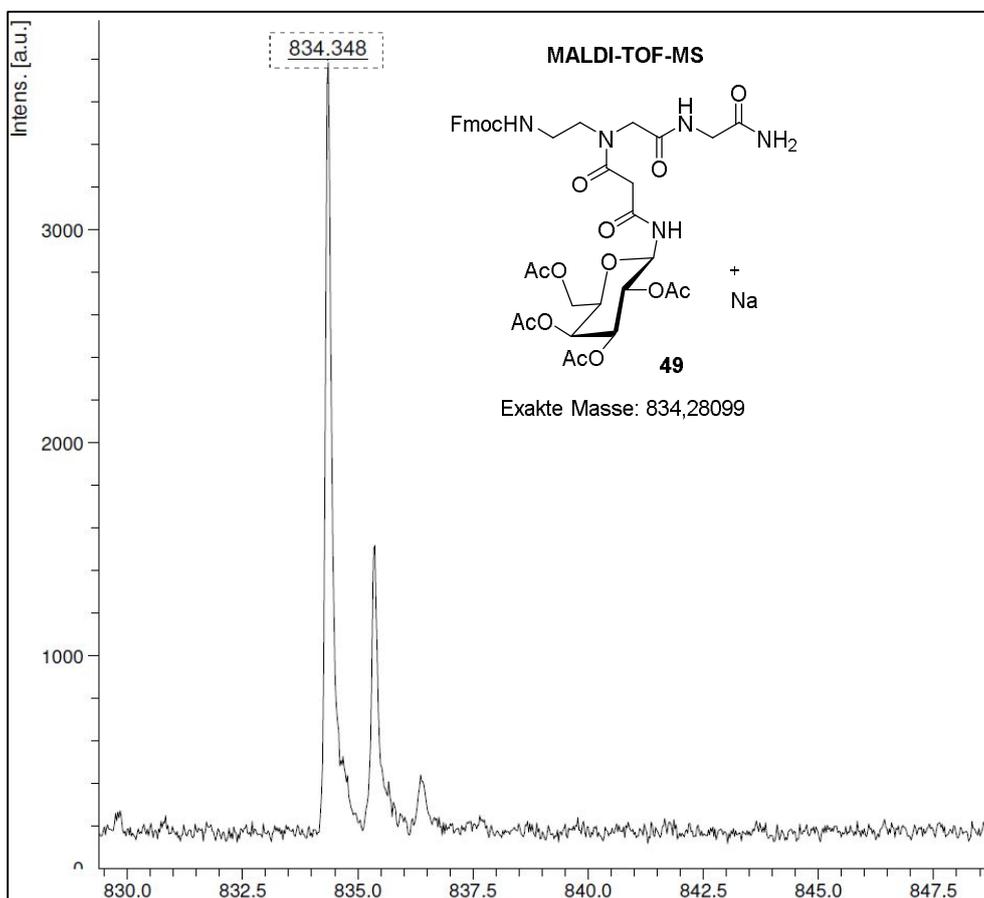
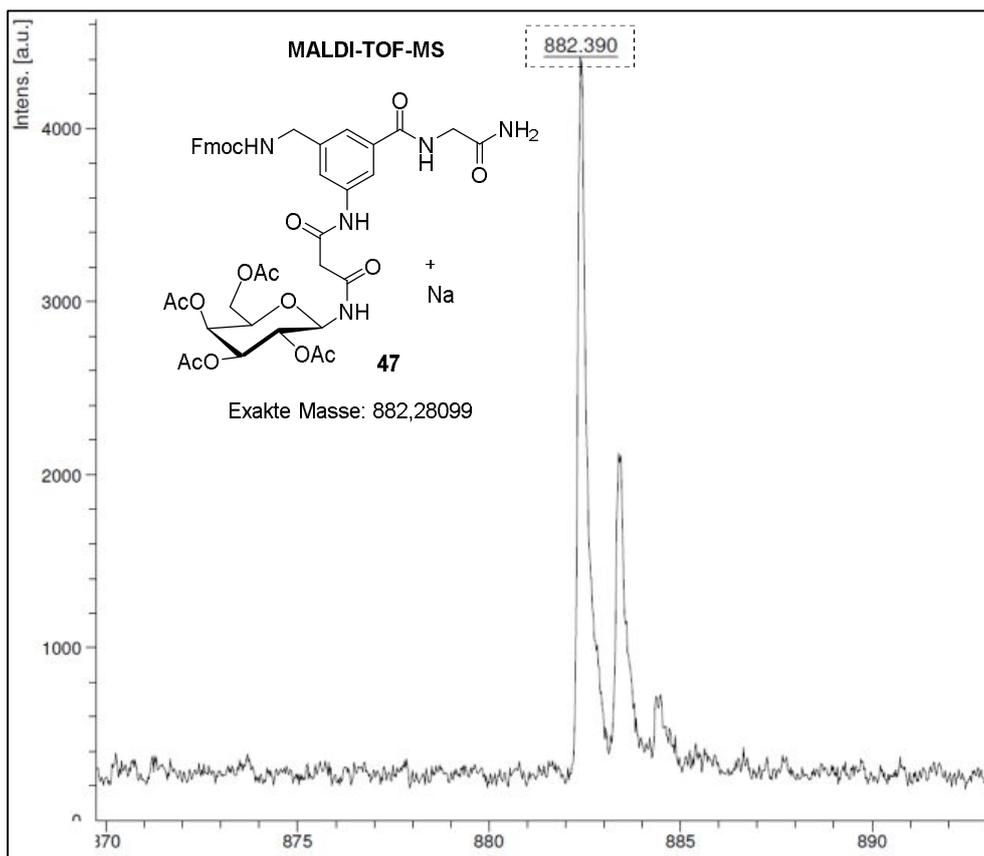
6.4 MASSENSPEKTREN











6.5 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] T. K. Lindhorst, *Chem. unserer Zeit* **2000**, *34*, 38-52.
- [2] R. A. Laine, *Glycobiology* **1994**, *4*, 759-767.
- [3] R. A. Laine in *Glycosciences: Status and Perspectives*, Ed.: H. Gabius, S. Gabius, Chapman & Hall, London, Weinheim **1997**, 1-14.
- [4] S. J. Singer, *Annu. Rev. Biochem.* **1974**, *43*, 805-833.
- [5] N. Sharon, H. Lis, *Science* **1989**, *246*, 227-234.
- [6] K. A. Karlsson, *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, *12*, 265-272.
- [7] M. Robell, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1549-1558.
- [8] M. Robell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1420-1428.
- [9] A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth, *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York **2011**.
- [10] P. H. Seeberger, W. Haase, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4349-4393.
- [11] T. Ziegler, D. Röseling, L. R. Subramanian, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 911-914.
- [12] D. Röseling, *Dissertation*, Universität zu Köln, **2001**.
- [13] C. Schips, T. Ziegler, *J. Carbohydr. Chem.* **2005**, *24*, 773-788.
- [14] T. Ziegler, C. Schips, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1987-1994.
- [15] N. Pietrzik, C. Schips, T. Ziegler, *Synthesis* **2008**, 519-526.
- [16] K. Günther, C. Schips, T. Ziegler, *J. Carbohydr. Chem.* **2008**, *27*, 446-463.
- [17] C. Schips, *Dissertation*, Eberhard Karls Universität Tübingen, **2005**.
- [18] J. Hörzer, *Dissertation*, Eberhard Karls Universität Tübingen, **2007**.
- [19] R. Daiber, T. Ziegler, *ARKIVOC* **2013**, 408-420.

- [20] R. Daiber, *Dissertation*, Eberhard Karls Universität Tübingen, **2008**.
- [21] N. Pietrzik, *Dissertation*, Eberhard Karls Universität Tübingen, **2009**.
- [22] H. Schäfer, *Dissertation*, Eberhard Karls Universität Tübingen, **2011**.
- [23] K. Günther, T. Ziegler, *Synthesis* **2014**, *46*, 2362-2370.
- [24] K. Günther, *Dissertation*, Eberhard Karls Universität Tübingen, **2012**.
- [25] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2007**.
- [26] I. Brockhausen, H. Schachter, P. Stanley in *Essentials of Glycobiology*, Ed.: A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York **2011**, 115-128.
- [27] Y. Hashimoto, W. Pigman, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *93*, 541-554.
- [28] F. Hanisch, C. A. Reis, H. Clausen, H. Paulsen, *Glycobiology* **2001**, *11*, 731-740.
- [29] O. Z. Thomsen, *Immun. Forschung* **1927**, *52*, 85-93.
- [30] E. F. Hounsell, M. J. Davies, D. V. Renouf, *Glycoconj. J.* **1996**, *13*, 19-26.
- [31] L. Franson in *The Polysaccharides*, Ed.: G. O. Aspinall, Academic Press, New York **1985**, 337-415.
- [32] R. G. Spiro, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 4813-4823.
- [33] D. T. A. Lamport, *Nature* **1967**, *216*, 1322-1324.
- [34] W. Tanner, L. Lehle, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *906*, 81-99.
- [35] S. Hase, H. Nishimura, S. Kawabata, S. Iwanaga, T. Ikenaka, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 1858-1861.
- [36] G. W. Hart, G. D. Holt, R. S. Haltiwanger, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *13*, 380-384.
- [37] P. Hallgren, A. Lundblad, S. Svensson, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 5312-5314.
- [38] D. M. Coltart, A. K. Royyuru, L. J. Williams, P. W. Glunz, D. Sames, S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, X. Chen, S. J. Danishefsky, D. H. Live, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9833-9844.

- [39] R. H. Nuenke, L. W. Cunningham, *J. Biol. Chem.* **1961**, 236, 2452-2460.
- [40] P. Stanley, H. Schachter, N. Taniguchi in *Essentials of Glycobiology*, Ed.: A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York **2011**, 101-114.
- [41] L. Landois, *Die Transfusion des Blutes*, Leipzig, **1875**.
- [42] H. Stillmark, *Dissertation*, Kaiserliche Universität zu Dorpat, **1888**.
- [43] K. Landsteiner, H. Raubitschek, *Zentralbl. Bakteriol.* **1907**, 45, 660-667.
- [44] J. B. Sumner, S. F. Howell, *J. Bacteriol.* **1936**, 32, 227-237.
- [45] W. C. Boyd, R. M. Ruguera, *J. Immunol.* **1949**, 62, 333-339.
- [46] W. C. Boyd, E. Shapleigh, *Science* **1954**, 119, 419-420.
- [47] I. J. Goldstein, R. C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa, N. Sharon, *Nature* **1980**, 285, 66-66.
- [48] H. J. Gabius, *The Sugar Code*, Wiley-Blackwell, Weinheim **2009**.
- [49] E. J. M. Van Damme, W. J. Peumans, A. Pusztai, S. Bardocz, *Handbook of Plant Lectins*, Wiley-VCH, Chichester **1998**, 1-445.
- [50] I. J. Goldstein, R. D. Poretz in *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*, Ed.: I. E. Liener, N. Sharon, I. J. Goldstein, Academic Press, Orlando USA **1986**, 33-247.
- [51] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim **2000**, 152.
- [52] S. H. Barondes, V. Castronovo, D. N. W. Cooper, R. D. Cummings, K. Drickamer, T. Feizi, M. A. Gitt, J. Hirabayashi, C. Hughes, *Cell* **1994**, 76, 597-598.
- [53] K. Kasai, J. Hirabayashi, *J. Biochem.* **1996**, 119, 1-8.
- [54] W. I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 441-473.
- [55] R. Adar, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 239, 668-674.
- [56] J. M. Rini, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, 24, 551-577.
- [57] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 555-578.

- [58] D. A. Mann, L. L. Kiessling in *Glycochemistry: Principles, Synthesis, and Applications*, Ed.: P. W. Wang, C. R. Bertozzi, Marcel Dekker, New York **2001**, 221-275.
- [59] L. L. Kiessling, J. K. Pontrello, M. C. Schuster in *Carbohydrate-based Drug Discovery*, Ed.: C. Wong, Wiley-VCH, Weinheim **2003**, 575-608.
- [60] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
- [61] C. Unverzagt, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 1189-1201.
- [62] E. T. Sletten, R. L. Svec, H. M. Nguyen, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 3473-3476.
- [63] J. B. Corbell, J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 95-111.
- [64] T. Lengauer, M. Rarey, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 402-406.
- [65] D. B. Kitchen, H. Decornez, J. R. Furr, J. Bajorath, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 935-949.
- [66] G. Klebe, *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2009**.
- [67] B. G. Davis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 3215-3237.
- [68] P. C. Andrews, D. M. Leonard, W. L. Cody, T. K. Sawyer, *Methods Mol. Biol.* **1994**, *36*, 305-328.
- [69] J. A. Boutin, A. L. Fauchere, *Trends Pharmacol. Sci.* **1996**, *17*, 8-12.
- [70] N. Sewald, H. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim **2002**.
- [71] J. Eichler, *Kombinatorische Chemie: Konzepte und Strategien*, B. G. Teubner Verlag, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden **2003**.
- [72] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [73] R. B. Merrifield, *Recent Prog. Horm. Res.* **1967**, *23*, 451-476.
- [74] J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 19-46.
- [75] J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 17-42.
- [76] J. Jones, *The Chemical Synthesis of Peptides*, Clarendon Press, Oxford **1994**.

- [77] B. F. Lundt, N. L. Johansen, A. Voelund, J. Markussen, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *12*, 258-268.
- [78] D. Pearson, M. Blanchette, M. Baker, C. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739-2742.
- [79] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard, B. J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 537-539.
- [80] E. Atherton, W. Huebscher, R. C. Sheppard, V. Woolley, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1981**, *362*, 833-839.
- [81] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- [82] R. A. More O'Ferrall, F. Larkin, P. Walsh, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1982**, 1573-1579.
- [83] G. A. Bowmaker, Effendy, B. W. Skelton, N. Somers, A. H. White, *Inorg. Chim. Acta* **2005**, *358*, 4307-4326.
- [84] B. Gutte, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 1922-1941.
- [85] R. S. Feinberg, R. B. Merrifield, *Tetrahedron* **1974**, *30*, 3209-3212.
- [86] W. Rapp in *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries: A Handbook*, Ed.: G. Jung, Wiley-VCH, Weinheim **1996**, 425-464.
- [87] E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 117-133.
- [88] E. Bayer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 113-129.
- [89] E. Bayer, W. Rapp, *Chem. Pept. Prot.* **1986**, *3*, 3-8.
- [90] E. Bayer, M. Dengler, B. Hemmasi, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1985**, *25*, 178-186.
- [91] D. Klemm, B. Philipp, T. Heinze, U. Heinze, W. Wagenknecht, *Comprehensive Cellulose Chemistry: Fundamentals and Analytical Methods*, Wiley-VCH, Weinheim **1998**.
- [92] H. Scholze, *Glas: Natur, Struktur und Eigenschaften*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg **1977**.
- [93] H. Köster, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 1527-1530.
- [94] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157.

- [95] A. R. Mitchell, S. B. H. Kent, M. Engelhard, R. B. Merrifield, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2845-2852.
- [96] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790.
- [97] S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [98] K. Barlos, D. Gatos, S. Kaposos, G. Papaphotiu, W. Schaefer, W. Yao, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3947-3950.
- [99] P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2107-2110.
- [100] M. Mergler, R. Nyfeler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4009-4012.
- [101] W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295-1300.
- [102] E. Atherton, C. J. Logan, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Perk. Trans. I* **1981**, 538-546.
- [103] G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc.* **1971**, 636-637.
- [104] C. P. Holmes, D. G. Jones, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2318-2319.
- [105] V. N. R. Pillai, M. Mutter, E. Bayer, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 3409-3412.
- [106] D. S. Kemp, S. W. Chien, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2745-2746.
- [107] A. L. Heard, G. T. Young, *J. Chem. Soc.* **1963**, 5807-5810.
- [108] H. Determann, J. Heuer, P. Pfaender, M. L. Reinartz, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1966**, *694*, 190-199.
- [109] S. Han, Y. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- [110] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- [111] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- [112] J. Izdebski, D. Kuncce, S. Drabarek, *Pol. J. Chem.* **1980**, *54*, 413-418.
- [113] H. M. Johnson, K. Brenner, H. E. Hall, *J. Immunol.* **1966**, *97*, 791-796.
- [114] L. Kisfaludy, I. Schon, T. Szirtes, O. Nyeki, M. Low, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 1785-1786.

- [115] W. König, R. Geiger, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1970**, *103*, 788-798.
- [116] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [117] E. Atherton, L. Cameron, M. Meldal, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 1763-1765.
- [118] L. Carpino, J. Xia, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 54-61.
- [119] L. Carpino, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3561-3564.
- [120] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mugge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 457-461.
- [121] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mugge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 441-445.
- [122] F. Albericio, R. Chinchilla, D. J. Dodsworth, C. Najera, *Org. Prep. Proced. Int.* **2001**, *33*, 203-303.
- [123] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Pept., Proc. Eur. Pept. Symp.* **1976**, 79-84.
- [124] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- [125] R. Paul, G. W. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4596-4600.
- [126] B. R. Stranix, J. P. Gao, R. Barghi, J. Salha, G. D. Darling, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8987-8993.
- [127] B. Yan, C. F. Jewell, Jr., S. W. Myers, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11755-11766.
- [128] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- [129] W. S. Hancock, J. E. Battersby, *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 260-264.
- [130] V. Krchňák, J. Vágner, P. Šafář, M. Lebl, *Coil. Czech. Chern. Comm.* **1988**, 2542-2548.
- [131] D. Maux, C. Enjalbal, J. Martinez, J.-L. Aubagnac, R. Combarieu, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 1099-1105.
- [132] B. J. Egner, G. J. Langley, M. Bradley, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2652-2653.

- [133] H. Sternlicht, G. L. Kenyon, E. L. Packer, J. Sinclair, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 199-208.
- [134] S. L. Manatt, C. F. Amsden, C. A. Bettison, W. T. Frazer, J. T. Gudman, B. E. Lenk, J. F. Lubetich, E. A. McNelly, S. C. Smith, D. J. Templeton, R. P. Pinnell, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1397-1400.
- [135] F. Bardella, R. Eritja, E. Pedroso, E. Giralt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 2793-2796.
- [136] M. J. Shapiro, J. S. Gounarides, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *35*, 153-200.
- [137] R. Riedl, R. Tappe, A. Berkessel, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8994-9000.
- [138] B. Henkel, E. Bayer, *J. Pept. Sci.* **1998**, *4*, 461-470.
- [139] H. Zhuang, E. Yang, X. Xiao, A. W. Czarnik in *Solid-Phase Organic Synthesis*, Ed.: A. W. Czarnik, John Wiley & Sons, USA **2001**, 15-40.
- [140] A. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487-493.
- [141] H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81*, 3998-4002.
- [142] K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchnak, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411-448.
- [143] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82-84.
- [144] F. Sanger, *Biochem. J.* **1945**, *39*, 507-515.
- [145] P. Edman, *Arch. Biochem.* **1949**, *22*, 475-476.
- [146] R. Frank, R. Doering, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6031-6040.
- [147] J. Eichler, M. Beyermann, M. Bienert, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1989**, *54*, 1746-1752.
- [148] R. Frank, *J. Biotechnol.* **1995**, *41*, 259-272.
- [149] R. Frank, S. Hoffmann, M. Kiss, H. Lahmann, W. Tegge, C. Behn, H. Gausephol in *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries: A Handbook*, Ed.: G. Jung, Wiley-VCH, Weinheim **1996**, 363-386.

- [150] R. Frank, *J. Immunol. Methods* **2002**, *267*, 13-26.
- [151] R. Frank, *Online im Internet: URL: http://www.leibniz-fmp.de/fileadmin/user_upload/Chemical_Systems_Biology/Manual_chemical_microarrays_1.pdf*, [Stand 2016].
- [152] A. Dikmans, U. Beutling, E. Schmeisser, S. Thiele, R. Frank, *QSAR Comb. Sci.* **2006**, *25*, 1069-1080.
- [153] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767-773.
- [154] H. Müller, *Der Experimentator: Microarrays*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, München **2004**.
- [155] D. Kim, D. Shin, Y. Lee, *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 625-633.
- [156] J. J. Christensen, R. M. Izatt, L. D. Hansen, J. A. Partridge, *J. Phys. Chem.* **1966**, *70*, 2003-2010.
- [157] M. W. Freyer, E. A. Lewis, *Methods Cell. Biol.* **2007**, *84*, 79-113.
- [158] E. Kretschmann, *Z. Phys.* **1971**, *241*, 313-324.
- [159] X. Guo, *J. Biophotonics* **2012**, *5*, 483-501.
- [160] D. M. Jameson, J. A. Ross, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2685-2708.
- [161] K. Kakehi, Y. Oda, M. Kinoshita, *Anal. Biochem.* **2001**, *297*, 111-116.
- [162] B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 890-918.
- [163] B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 864-890.
- [164] C. A. Bewley, S. Shahzad-ul-Hussan, *Biopolymers* **2013**, *99*, 796-806.
- [165] J. P. McCoy, J. Varani, I. J. Goldstein, *Anal. Biochem.* **1983**, *130*, 437-444.
- [166] J. P. McCoy, J. Varani, I. J. Goldstein, *Exp. Cell Res.* **1984**, *151*, 96-103.
- [167] R. S. Yalow, S. A. Berson, *J. Clin. Invest.* **1960**, *39*, 1157-1175.
- [168] R. M. Lequin, *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 2415-2418.
- [169] P. K. Nakane, *Proc. Microsc. Soc. Can.* **1976**, *3*, 114-115.

- [170] K. Beyzavi, S. Hampton, P. Kwasowski, S. Fickling, V. Marks, R. Clift, *Ann. Clin. Biochem.* **1987**, *24*, 145-152.
- [171] J. L. Guesdon, T. Ternynck, S. Avrameas, *J. Histochem. Cytochem.* **1979**, *27*, 1131-1139.
- [172] T. Ternynck, S. Avrameas, *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 469-481.
- [173] R. Thompson, A. Creavin, M. O'Connell, B. O'Connor, P. Clarke, *Anal. Biochem.* **2011**, *413*, 114-122.
- [174] R. Euzen, J. Reymond, *Mol. BioSyst.* **2011**, *7*, 411-421.
- [175] N. C. Veitch, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 249-259.
- [176] K. G. Welinder, *FEBS Lett.* **1976**, *72*, 19-23.
- [177] J. A. Brand, V. C. W. Tsang, W. Zhou, S. B. Shukla, *BioTechniques* **1990**, *8*, 58-60.
- [178] R. Artuch, I. Ferrer, J. Pineda, J. Moreno, C. Busquets, P. Briones, M. A. Vilaseca, *J. Neurosci. Methods* **2003**, *125*, 167-171.
- [179] K. Koretz, J. Leman, I. Brandt, P. Moeller, *Histochemistry* **1987**, *86*, 471-478.
- [180] R. Kobayashi, Y. Tashima, *Anal. Biochem.* **1989**, *183*, 9-12.
- [181] H. D. K. Drew, F. H. Pearman, *J. Chem. Soc.* **1937**, 26-33.
- [182] J. G. Mohanty, J. S. Jaffe, E. S. Schulman, D. G. Raible, *J. Immunol. Methods* **1997**, *202*, 133-141.
- [183] M. Zhou, Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, *Anal. Biochem.* **1997**, *253*, 162-168.
- [184] E. E. Kim, H. W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 449-464.
- [185] L. Tamas, J. Huttova, I. Mistrik, G. Kogan, *Chem. Pap.* **2002**, *56*, 326-329.
- [186] J. McGadey, *Histochemie* **1970**, *23*, 180-184.
- [187] D. G. Wild, *The Immunoassay Handbook: Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques*, Elsevier, Oxford **2013**.
- [188] E. A. Bayer, M. Wilchek, *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 138-160.

- [189] A. H. Coons, H. J. Creech, R. N. Jones, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1941**, *47*, 200-202.
- [190] J. J. Cebra, G. Goldstein, *J. Immunol.* **1965**, *95*, 230-245.
- [191] P. J. A. Capel, *J. Immunol. Methods* **1974**, *5*, 165-178.
- [192] H. Dohi, Y. Nishida, M. Mizuno, M. Shinkai, T. Kobayashi, T. Takeda, H. Uzawa, K. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2053-2062.
- [193] K. R. Love, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3733-3736.
- [194] K. R. Love, P. H. Seeberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3583-3586.
- [195] L. Stryer, *Science* **1968**, *162*, 526-533.
- [196] L. Brand, J. R. Gohlke, *Annu. Rev. Biochem.* **1972**, *41*, 843-868.
- [197] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142-155.
- [198] R. Sjoebäck, J. Nygren, M. Kubista, *Spectrochim. Acta, Part A* **1995**, *51*, L7-L21.
- [199] N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M. K. Bhargat, P. J. Millard, F. Mao, W.-Y. Leung, R. P. Haugland, *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47*, 1179-1188.
- [200] J. G. Bünzli, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2729-2755.
- [201] J. Yin, A. J. Lin, D. E. Golan, C. T. Walsh, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 280-285.
- [202] ThermoFisherScientific, *Online im Internet: URL:*
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/images/ics-organized/applications/cell-tissue-analysis/data-chart/560-wide.par.40412.image.520.243.1.s001913-emission-spectra-gif.gif>, [Stand 2015].
- [203] S. V. Moradi, P. Varamini, I. Toth, *AAPS J.* **2015**, *17*, 1135-1143.
- [204] P. E. Nielsen, H. Oerum, *Curr. Innovations Mol. Biol.* **1995**, *2*, 73-89.
- [205] G. Fuchs, M. Boll, J. Heider, *Nat. Rev. Micro.* **2011**, *9*, 803-816.
- [206] J. Seo, Y. Keum, Q. X. Li, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2009**, *6*, 278-309.
- [207] A. Tanatani, A. Yokoyama, I. Azumaya, Y. Takakura, C. Mitsui, M. Shiro, M. Uchiyama, A. Muranaka, N. Kobayashi, T. Yokozawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8553-8561.

- [208] H. Matsuo, Y. Kawazoe, M. Sato, M. Ohnishi, T. Tatsuno, *Chem. Pharm. Bull.* **1967**, *15*, 391-398.
- [209] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [210] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2954-2983.
- [211] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2796-2823.
- [212] V. V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchard, S. H. Sonnichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1310-1313.
- [213] T. D. Harris, M. Rajopadhye, P. R. Damphousse, D. Glowacka, K. Yu, J. P. Bourque, J. A. Barrett, D. J. Damphousse, S. J. Heminway, J. Lazewatsky, T. Mazaika, T. R. Carroll, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1741-1746.
- [214] A. Watzke, M. Gutierrez-Rodriguez, M. Köhn, R. Wacker, H. Schroeder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6288-6306.
- [215] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708-2711.
- [216] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [217] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [218] V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 51-68.
- [219] S. Dedola, S. A. Nepogodiev, R. A. Field, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1006-1017.
- [220] J. K. Pokorski, L. M. Miller Jenkins, H. Feng, S. R. Durell, Y. Bai, D. H. Appella, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2381-2383.
- [221] D. Milic, M. Prato, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 476-483.
- [222] S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, C. F. Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6179-6194.
- [223] H. Grugel, T. Minuth, M. M. K. Boysen, *Synthesis* **2010**, 3248-3258.

- [224] R. B. Cohen, K. Tsou, S. H. Rutenburg, A. M. Seligman, *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 239-249.
- [225] M. A. Maier, C. G. Yannopoulos, N. Mohamed, A. Roland, H. Fritz, V. Mohan, G. Just, M. Manoharan, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 18-29.
- [226] F. M. Ibatullin, K. A. Shabalin, *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 2819-2823.
- [227] N. Pravdic, I. Franjic-Mihalic, B. Danilov, *Carbohydr. Res.* **1975**, *45*, 302-306.
- [228] R. T. Lee, T. C. Wong, Y. C. Lee, *J. Carbohydr. Chem.* **1986**, *5*, 343-357.
- [229] J. Neumann, J. Thiem, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 900-908.
- [230] L. Szilagyi, Z. Gyorgydeak, *Carbohydr. Res.* **1985**, *143*, 21-41.
- [231] B. Helferich, A. Mitrowsky, *Chem. Ber.* **1952**, *85*, 1-8.
- [232] I. Toth, J. P. Malkinson, N. S. Flinn, B. Drouillat, A. Horvath, J. Erchegeyi, M. Idei, A. Venetianer, P. Artursson, L. Lazorova, B. Szende, G. Keri, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4010-4013.
- [233] D. Dunstan, L. Hough, *Carbohydr. Res.* **1972**, *25*, 246-248.
- [234] M. Tanaka, I. Yamashina, *Carbohydr. Res.* **1973**, *27*, 175-183.
- [235] M. Hesse, H. Meier, B. Zeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart **2005**.
- [236] S. Höck, R. Marti, R. Riedl, M. Simeunovic, *CHIMIA* **2010**, *64*, 200-202.
- [237] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1970**, *82*, 237-253.
- [238] H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1970**, *9*, 219-235.
- [239] A. Hess, N. Metzler-Nolte, *Chem. Commun.* **1999**, *10*, 885-886.
- [240] T. A. Plöger, *Helv. Chim. Acta* **2011**, *94*, 1952-1980.
- [241] MikroglasChemtechGmbH, *Online im Internet: URL:*
http://images1.hellotrade.com/data2/ND/RS/HTVENDOR-5808645/modules-mod_medien-files-m176-500x500.jpg, [Stand 2016].
- [242] J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, G. Gauglitz, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 473-481.

- [243] N. J. Maughan, F. A. Lewis, V. Smith, *J. Pathol.* **2001**, *195*, 3-6.
- [244] J. A. Olmstead, D. G. Gray, *J. Photochem. Photobiol. A* **1993**, *73*, 59-65.
- [245] K. K. Unger, N. Becker, P. Roumeliotis, *J. Chromatogr.* **1976**, *125*, 115-127.
- [246] P. A. Thiel, T. F. Madey, *Surf. Sci. Rep.* **1987**, *7*, 211-385.
- [247] A. Biswas, P. Kurkute, B. Jana, A. Laskar, S. Ghosh, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 2604-2607.
- [248] F. J. Fourniol, T. Li, P. Bieling, R. D. Mullins, D. A. Fletcher, T. Surrey, *Methods Enzymol.* **2014**, *540*, 339-360.
- [249] R. Tünnemann, *Dissertation*, Eberhard Karls Universität Tübingen, **2000**.
- [250] M. Elbs, *Dissertation*, Eberhard Karls Universität Tübingen, **2004**.
- [251] G. L. Subrebost, *Dissertation*, Carnegie Mellon University Pittsburgh, Pennsylvania, **2005**.
- [252] V. V. Tsukruk, I. Luzinov, D. Julthongpiput, *Langmuir* **1999**, *15*, 3029-3032.
- [253] C. P. Holmes, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2370-2380.
- [254] M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, H. Koster, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4645-4648.
- [255] S. K. Shannon, G. Barany, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4586-4594.
- [256] W. C. Chan, P. D. White in *Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach*, Ed.: W. C. Chan, P. D. White, Oxford University Press, Oxford **2000**, 63.
- [257] S.E. Baldus, Y.O. Park, G.M. Kotlarek, K. Hell, R. Fischer, *Int. J. Oncol.* **1996**, *9*, 43-48.
- [258] H. Lis, F. J. Joubert, N. Sharon, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2803-2809.
- [259] H. Lis, N. Sharon, *Methods Enzymol.* **1987**, *138*, 544-551.
- [260] Y. Itakura, S. Nakamura-Tsuruta, J. Kominami, N. Sharon, K. Kasai, J. Hirabayashi, *J. Biochem.* **2007**, *142*, 459-469.
- [261] G. Uhlenbruck, G. I. Pardoe, G. W. G. Bird, *Z. Immunitaetsforsch., Allerg. Klin. Immunol.* **1969**, *138*, 423-433.

- [262] G. Uhlenbruck, *Immunol. Commun.* **1981**, *10*, 251-264.
- [263] R. Ravishankar, M. Ravindran, K. Suguna, A. Surolia, M. Vijayan, *Curr. Sci.* **1997**, *72*, 855-861.
- [264] *User's Guide "Auto-SPOT- Robot ASP 222" Intavis AG* **2001**.
- [265] ThermoFisherScientific, *Online im Internet: URL:*
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp22188.pdf>, [Stand 2015].
- [266] B. Zhao, F. A. Summers, R. P. Mason, *Free Rad. Biol. Med.* **2012**, *53*, 1080-1087.
- [267] S. Hafner, *Diplomarbeit*, Eberhard Karls Universität Tübingen, **2013**.
- [268] S. Fox, S. Farr-Jones, M. A. Yund, *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4*, 183-186.
- [269] J. W. Armstrong, *Am. Biotechnol. Lab.* **1999**, *17*, 26-28.
- [270] P. Szymanski, M. Markowicz, E. Mikiciuk-Olasik, *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 427-452.

6.6 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name: Markus Nörrlinger
Geburtsdatum und -ort: 10.12.1986, Herrenberg
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Promotion

Seit 05/2012 Promotion am Institut für Organische Chemie der
Eberhard Karls Universität Tübingen

Hochschulbildung

10/2006 – 03/2012 Studium der Chemie, Eberhard Karls Universität Tübingen

Schulbildung

09/1997 – 06/2006 Otto Hahn Gymnasium Böblingen