

Selektiv funktionalisierbare Glycopeptide und Glycodendrimere in biologischen Testsystemen



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Niels Röckendorf

Kiel 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Th. K. Lindhorst
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Herges

Tag der Disputation: 04. 11. 2003

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, keine außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verwendet und die Arbeit nicht an anderer Stelle eingereicht habe. Dies ist mein erster Promotionsversuch

Niels Röckendorf

*“He that will not apply new remedies must accept new evils:
for time is the greatest innovator.”*

Francis Bacon (1561-1626), engl. Staatsmann u. Philosoph

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von Oktober 2000 bis September 2003 im Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Thisbe K. Lindhorst durchgeführt.

Frau Prof. Dr. Thisbe K. Lindhorst danke ich für die interessante Themenstellung, ihre Offenheit für meine eigenen Vorschläge und Ideen, ihre unkomplizierte Art sowie die freundschaftliche und hilfreiche Unterstützung in den letzten Jahren.

Conny und Tom Cedric

Inhaltsverzeichnis

Sicherheitsdaten und Abkürzungen	1
Sicherheitsdaten	1
Abkürzungen.....	3
Nomenklatur 1,3-C-verzweigter Dendrimere.....	6
1. Einleitung	8
1.1 Biologische Funktion von Kohlenhydraten und ihren Mimetika.....	8
1.2 Glycopeptide und Glycopeptidomimetika.....	13
1.3 Dendrimere vom A_nX -Typ	19
1.4 Selbstorganisierende Monoschichten	21
1.5 Elektrolumineszenz.....	24
1.6 Markerstrukturen in Immunoassays	27
2. Problemstellung und Strategie	29
2.1 Elektrolumineszenz-markierte Peptide für Immunoassays	29
2.2 Synthese von selektiv funktionalisierbaren Dendrimern.....	32
3. Synthesen von Glycopeptiden und Glycopeptidomimetika	34
3.1 Synthese von Glycopeptid-Bausteinen durch Glycosylierung.....	34
3.2 Festphasensynthese Elektrolumineszenz-markierter Glycopeptide.....	38
3.3 Carboxyl-funktionalisierte Glycopeptid-Bausteine auf Glucuronsäure- basis	45
4. Synthese 1,3-C-verzweigter Dendrimere und Glycodendrimere	51
4.1 Amidische Dendrimere vom A_nX -Typ.....	51
4.2 Dendron-Funktionalisierung von BPRu-markierten Peptiden.....	56
4.3 Selektiv funktionalisierbare Glycodendrimere	61
5. A_nX-Typ-Glycocluster in selbstorganisierenden Monoschichten	66
5.1 Trivalente Fucosecluster.....	66
5.2 Trivalente Mannosecluster.....	72

6. Zusammenfassung	74
7. Summary	76
8. Isolierung der Derivate	78
8.1 Gelpermeationschromatographie.....	78
8.2 Reversed-Phase-HPLC	80
9. Experimenteller Teil	83
9.1 Allgemeines	83
9.2 Einzelvorschriften	86
Lebenslauf	123
Danksagung	125
10. Literatur	127

Sicherheitsdaten und Abkürzungen

Sicherheitsdaten

Verbindung	Abkürzung	R-Sätze	S-Sätze	Gef.-Sym.
Aceton	-	11	9-16-23.2-33	F
Acetanhydrid	Ac ₂ O	10-34	26-45	C
Acetonitril	ACN	11-23/24/25	16-27-45	F, T
Aluminium-Nickel-Legierung (Raney-Ni)	RaNi	-	36/37-43.12	F, X _i
Ameisensäure	HCOOH	35	26-36/37/39-45	C
O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat	HATU	36/37/38	26-36	X _i
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat	HBTU	36/37/38	26-36	X _i
Bortrifluorid-ethyletherat	BF ₃ ·Et ₂ O	15-34-48/23	26-36/37/39-45	F, T
<i>tert</i> -Butyl-methylether	MTBE	11-66	16-23.2-29-33	F
Cyclohexan	CY	11	9-16-33	F
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en	DBU	22-34-52/53	26-36/37/39-45-61	C
Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat	Boc ₂ O	10-26-36/38-43	28.1-36/37-45	T ⁺
Dichlorethan	C ₂ H ₄ Cl ₂	11-E22-36/37/38	53-45	F, T
Dichlormethan	CH ₂ Cl ₂	40	23.2-24/25-36/37	X _n
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	DCC	22-24-41	24-26-37/39-45	T
Diethylether	-	12-19	9-16-29-33	F ⁺
N,N'-Diisopropylcarbodiimid	DIC	14-17-34-48/20	16-26-29-36/37/39-45	T
4-(Dimethylamino)-pyridin	DMAP	25-36/38	45	T
N,N-Dimethylformamid	DMF	61-E20/21-36	53-45	T
Dimethylsulfoxid	DMSO	36/38	26	X _n
Essigsäure	AcOH	10-35	26-36/37/39-45	C
Ethanol	EtOH	11	7-16	F
Ethylacetat	EE	11	16-23.2-29-33	F

Verbindung	Abkürzung	R-Sätze	S-Sätze	Gef.-Sym.
Diisopropyl-ethylamin	DIPEA	11-36/38	-	F, X _i
9-Fluorenylmethylchlorformiat	Fmoc-Cl	34	26-36/37/39-45	C
<i>n</i> -Hexan	-	11-48/20	9-16-24/25-29-51	F, X _n
1-Hydroxybenzotriazolhydrat	HOBt	-	-	-
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	HOSu	-	-	-
Isopropanol	<i>i</i> -Prop	11	7-16	F
Kaliumcarbonat	-	22-36/37/38	22-26	X _n
Kaliumhydroxid	-	35	26-37/39-45	C
Lithiumhydroxid-Hydrat	-	35	26-36/37/39-45	C
Magnesiumsulfat	MgSO ₄	-	22-24/25	-
Methanol	MeOH	11-23/25	7-16-24-45	F, T
Morpholin	-	10-20/21/22-34	23-36-45	C
Natriumazid	-	28-32	28.1-45	T ⁺
Natriumchlorid	-	-	-	-
Natriumhydrogencarbonat	-	-	-	-
Natriumhydroxid	NaOH	35	26-37/39-45	C
Natriummethanolat	NaOMe	11-14-34	8-16-26-43.6-45	C, F
Palladium/Aktivkohle	Pd/C	-	-	-
Piperidin	-	11-23/24-34	16-26/27-45	F, T
Pyridin	Pyr	11-20/21/22	26-28	F, X _n
Salzsäure	-	36/37/38	26-36/37/39-45	C, X _i
Tetrabutylammoniumfluorid	TBAF	-	-	-
Tetrahydrofuran	THF	11-19-36/37	16-29-33	F, X _i
Toluol	Tol	11-20	16-25-29-33	F, X _n
Trichloracetonitril	CNCCl ₃	23/24/25-51/53	45-61	N, T
Triethylamin	TEA	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45	C, F
Trifluoressigsäure	TFA	20-35	9-26-27-28.1-45	C
Trimethylphosphin	P(Me) ₃	11-20-36/37/38	16-26-33-36/37/39	N, X _n
Wasserstoff	H ₂	12	9-16-33	F ⁺

Abkürzungen

Ac	Acetyl-
β -Ala	β -Alanin = 2-Amino-propansäure
L-Asp	L-Asparaginsäure
AS	Aminosäure
6-ATT	6-Aza-2-thio-thymin
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
Bn	Benzyl-
BPRu	Bis-(2,2'-bipyridyl)-{4-(3-carbonylpropyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridyl}-ruthenium(II)-trifluoracetat-hexahydrat
Bu	<i>n</i> -Butyl-
Bz	Benzoyl-
<i>c</i>	Konzentration
Cbz	Benzyl-oxycarbonyl
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
COSY	Correlated Spectroscopy
d (NMR)	Dublett
d	Tag
DBU	1,8-Diaza-bicyclo[5.4.0]-undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatogramm
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethyl-aminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid
EEDQ	2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin
Eq.	Äquivalent (equivalent)
Fmoc	Fluorenyl-methoxycarbonyl
FT	Fourier-Transformation
Glc	D-Glucose
Glca	D-Glucuronsäure (Glucuronic acid)
L-Glu	L-Glutaminsäure

GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HCCA	α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IR	Infrarot
IUPAC	International Union for Pure and Applied Chemistry
Kat.	Katalysator
Lsm	Lösungsmittel
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
L-Lys	L-Lysin
m (NMR)	Multipllett
m_c	Multipllett zentriert
M	Molmasse
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
Man	D-Mannose
Me	Methyl-
MHS	N-Maleinamidocapryl-Hydroxysuccinimid
min	Minute
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
MS	Massenspektrometrie
Nor	(Norharman) 9H-Pyrido[3,4-b]indol
OEG	Oligo-Ethylenglykol
Ph	Phenyl-
Py	Pyridin
q (NMR)	Quartett
quant.	Quantitativ
Rgz.	Reagenz
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
RZ	Retentionszeit
s (NMR)	Singulett
SAM	Self Assembled Monolayer

sept (NMR)	Septett
L-Ser	L-Serin
SSG	Seitenkettenschutzgruppe
Su	Succinimidyl-
t (NMR)	Triplett
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl-
ToF	Time of Flight
UV	Ultraviolett

Nomenklatur 1,3-C-verzweigter Dendrimere

Für die Benennung der 1,3-C-verzweigten Dendrimere und Glycodendrimere wird auf eine von Newkome et al. für solche Verbindungen vorgeschlagene Nomenklatur zurückgegriffen,^[1] da die gültigen IUPAC-Namen dieser verzweigten Moleküle so lang und unübersichtlich sind, dass eine Ableitung der Struktur anhand des Namens schwer fällt.

Das verwendete Nomenklatorsystem eignet für alle dendritisch aufgebauten Moleküle. Im Falle der in dieser Arbeit synthetisierten A_nX -funktionalisierten Dendrimere wird an den Anfang des Namens die Anzahl (**n**) der terminalen Endgruppen (**A**) des Dendrons gestellt, gefolgt von dem Wort „Cascade“, um

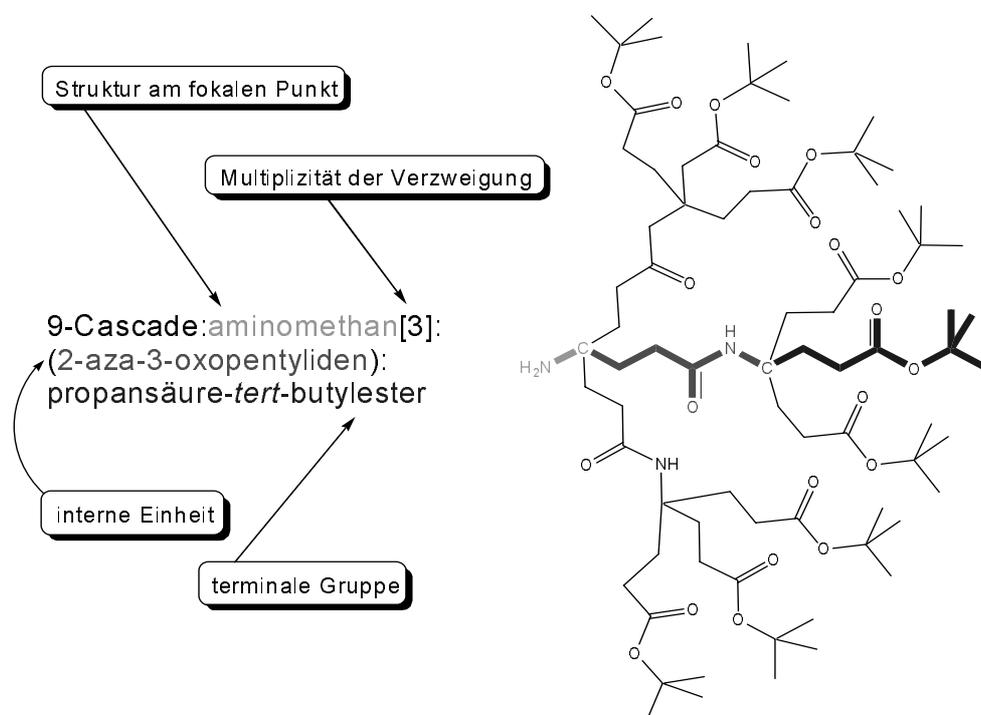


Abb. 1 System zur Benennung der 1,3-C-verzweigten Dendrimere

zu verdeutlichen, dass es sich um ein generationsweise aufgebautes Kaskadenmolekül handelt. Die weiteren Abschnitte des Namens werden durch Doppelpunkte abgegrenzt und benennen die Struktur eines einzelnen Asts des Dendrimers, beginnend mit der Struktur am fokalen Punkt des Dendrons (**X**) gefolgt von den internen Einheiten zwischen den Verzweigungspunkten, bis hin zu den terminalen Endgruppen. Die Multiplizität der Verzweigung an jedem Verzweigungspunkt wird in eckigen Klammern

angegeben. Gibt es mehrere Verzweigungspositionen gleicher Multiplizität wird diese nur am ersten Verzweigungspunkt angegeben.

1. Einleitung

1.1 Biologische Funktion von Kohlenhydraten und ihren Mimetika

Kohlenhydrate sind allgegenwärtige und bedeutende Biomoleküle. Neben ihrer Rolle als Energiespeicher sind sie wichtige Grundbausteine von Zellwänden und Geweben. Glycostrukturen findet man in nahezu sämtlichen menschlichen Plasmaproteinen, Strukturproteine wie Kollagen, Elastin und Fibronectin sind ebenfalls teilweise glycosyliert. Der konkrete Nutzen dieser Glycostrukturen für den Organismus ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Als Bestandteil von Glycoproteinen, Glycolipiden und anderen Konjugaten sind Saccharidstrukturen wichtige Elemente in einer Reihe von biochemischen Prozessen, z. B. der Signaltransduktion, der Zell-Zell-Kommunikation und der molekularen und zellularen Erkennung.^[2] Die komplexen Oligosaccharidstrukturen der an biologischen Systemen beteiligten O- und N-Glycoproteine lassen darauf schließen, dass diese Strukturen eine Vielzahl von biologischen Funktionen erfüllen.^[3] Darauf deutet auch das aufwändige System der an der Biosynthese dieser Konjugate beteiligten Glycosyl-Transferasen und Glycosidasen hin. Eukaryontische Zellmembranen sind stark mit Glycoproteinen durchsetzt. Der Saccharidanteil bildet hier die sogenannte Glycocalix (Abb. 2), deren Oligosaccharidstrukturen auf der Oberfläche der Zellwände durch ihre Ausrichtung zur extrazellulären Seite die Stabilität der Membranen und der Gewebestruktur

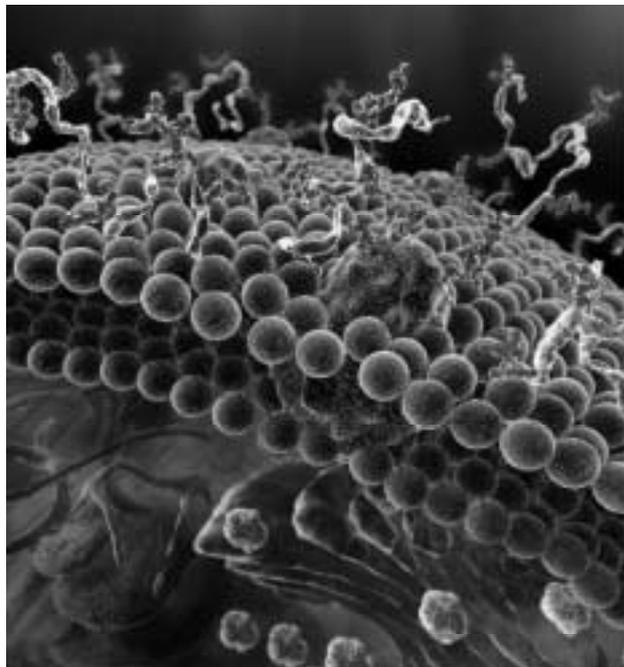


Abb. 2 Oligosaccharidstrukturen (rot) auf einer Zellmembran bilden die Glycocalix.

erhöhen. Die große räumliche Ausdehnung der Saccharidstrukturen gewährleistet zusätzlich einen Schutz vor proteolytischem Abbau oder Erkennung spezifischer Oberflächenproteine durch Antikörper.

Die Glycosylierung von Proteinen ist darüber hinaus ein wesentlicher Faktor für die Induktion der korrekten Faltung von Polypeptiden und Proteinen, dadurch wird ein modulierender Effekt auf die Proteinfunktionen ausgeübt. Neben ihren strukturellen Funktionen wie der Stabilisierung von Proteinkonformationen dienen Kohlenhydrate auch als Informationsträger, sind an Prozessen der biologischen Erkennung beteiligt und können als Rezeptoren oder Antigene wirken.^[4] Dies konnte zum Beispiel durch Untersuchungen von Ashwell gezeigt werden: Die Beobachtung, dass Sialoglycoproteine des Blutplasmas nach enzymatischer Desialylierung mit Neuraminidase eine deutlich herabgesetzte Halbwertszeit im Plasma besitzen, führte zur Identifikation spezieller Rezeptorproteine, der Lektine, die Saccharidstrukturen spezifisch erkennen und binden können.^[5] Lektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen bilden die molekularbiologische Grundlage für zahlreiche weitere molekulare Erkennungsprozesse.^[6] Eine in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren in den Mittelpunkt des Interesses gerückte Funktion von Glycostrukturen ist die Rolle der Kohlenhydrat-Bausteine bei Zelladhäsionsvorgängen.^[7] Eine besondere, viel beachtete Gruppe von Lektinen sind die an Zell-Zell-Erkennungsprozessen beteiligten Selektine. Die auf der Oberfläche von Endothel- und Blutplättchenzellen sowie Lymphozyten exprimierten E-, P- und L-Selektine vermitteln beispielsweise die Anbindung von Leukozyten an beschädigte Gefäße, ein Prozess, der bei der Bekämpfung von Entzündungsherden von großer Bedeutung ist (Abb. 3). Hierbei wird das an der Oberfläche der Leukozytenmembran präsentierte Tetrasaccharid *Sialyl Lewis x* erkannt. Die sich schnell durch die Blutgefäße bewegend Leukozyten werden zunächst abgebremst, was zum sog. „rolling“ führt, und schließlich am Ort der Entzündung gebunden.

Eine große Anzahl von Bakterien besitzt ebenfalls die Fähigkeit, Oberflächen-Lektine zu exprimieren. Gut untersuchte Beispiele hierfür sind die Mannose-spezifischen Lektine von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*, die eine Bindung der Bakterien an Epithelzellen und Leukozyten ermöglichen.^[8]

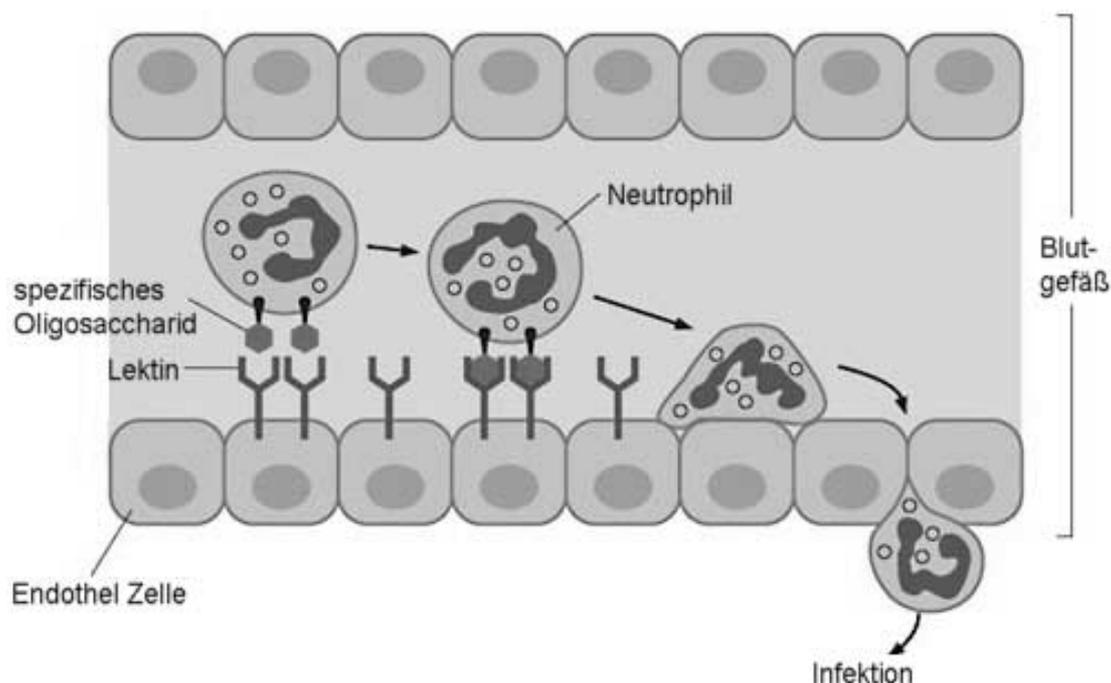


Abb. 3 „Abbremsen“ von Leukozyten in Blutgefäßen in der Umgebung von Infektionsherden durch Selektine.

Die Beteiligung von Glykokonjugaten auf Zelloberflächen an Krankheiten wie AIDS, Krebs, Autoimmunreaktionen und bakteriellen Infektionen^[9] zeigt die Ambivalenz dieser Glycostrukturen. Einerseits sind sie unverzichtbar für die Kommunikation zwischen körpereigenen Zellen, andererseits bieten sie Angriffspunkte für pathogene Keime. Da nahezu alle Zellen Oligosaccharidstrukturen in Form von Glycoproteinen und Glycolipiden an ihrer Oberfläche präsentieren^[10] und diese Glykokonjugate beispielsweise in Tumorzellen charakteristische Modifikationen erfahren,^[11] wurde das Interesse zur Erforschung der biologischen Bedeutung dieser Glycostrukturen geweckt. Die signifikante Änderung von Glycosylierungsmustern bei verschiedenen Krankheitsbildern eröffnet die Möglichkeit, durch Manipulation und Modifikation von Kohlenhydratstrukturen eine Veränderung der Eigenschaften von biologisch relevanten Glykokonjugaten herbeizuführen, um therapeutisch vorteilhafte Effekte zu erzielen.^[12] Obwohl sich zahlreiche Möglichkeiten zur therapeutischen Intervention in pathogene Prozesse ergeben sollten, verläuft die Entwicklung von Pharmazeutika auf Kohlenhydratbasis deutlich langsamer als zunächst erwartet wurde.^[13] Hierfür sind mehrere Faktoren verantwortlich zu machen: zum einen bereitet die Analytik der beteiligten komplexen Oligosaccharidstrukturen große

Probleme,^[14] sie wird z. B. durch die Mikroheterogenität der Glycostrukturen *in vivo* zusätzlich erschwert. Zum anderen ist die chemische Synthese komplexer Kohlenhydrate aufgrund der Polyfunktionalität der Systeme in der Regel schwierig. Es existieren in der Oligosaccharidsynthese keine automatisierten Standard-Synthesemethoden oder universellen Verknüpfungsbedingungen wie beispielsweise in der Peptid- und Oligonukleotid-Synthese. Darüber hinaus besitzen Kohlenhydrate prinzipiell ungünstige pharmakologische Eigenschaften. Die Affinität von Monosacchariden zu Proteinrezeptoren ist in der Regel nur schwach.^[15] Bei oraler Einnahme sind sie inaktiv, da sie, vor allem aufgrund ihrer Labilität gegenüber enzymatischem Abbau durch Glycosidasen, nur sehr begrenzte *in vivo*-Halbwertszeiten besitzen.

Der Entwicklung sog. Glycomimetika, die die Funktionen natürlicher Glycostrukturen imitieren, ohne die erwähnten Nachteile zu besitzen, kommt daher ein stetig wachsendes Interesse zu.^[16] Es werden verschiedene Anforderungen an Mimetika gestellt, die sie, je nach Einsatzgebiet, gegenüber den natürlichen Strukturen auszeichnen sollten. Wünschenswert ist eine verbesserte biologische Aktivität, die man in der Regel durch eine Erhöhung der Affinität zu Proteinen bzw. Proteinrezeptoren zu erreichen versucht. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die erhöhte *in vivo*-Stabilität, z. B. gegenüber Metabolismus durch enzymatischen Abbau. Daneben sollten Glycomimetika eine im Vergleich zu ihren natürlichen Vorbildern vereinfachte molekulare Struktur aufweisen, die eine verbesserte synthetische Zugänglichkeit ermöglicht. Geeignete Mimetika können durch Modulation oder Inhibition spezifischer biologischer Vorgänge dazu beitragen, die oftmals unbekanntes molekulare Grundlagen vieler Oligosaccharid-vermittelter Prozesse aufzuklären.

Die Struktur eines Mimetikums ist von entscheidender Bedeutung für seine Funktion. Zwischen der als Vorbild dienenden Verbindung und dem entsprechendem Mimetikum muss hierbei allerdings nicht notwendigerweise eine große strukturelle Ähnlichkeit bestehen, entscheidend ist vielmehr eine enge Funktionsverwandtschaft.^[16] Als bevorzugter Ansatz hat sich das rationale Design von Mimetika bewährt, ausgehend von einer natürlichen Vorbildstruktur werden durch gezielte Modifikationen und Vereinfachungen

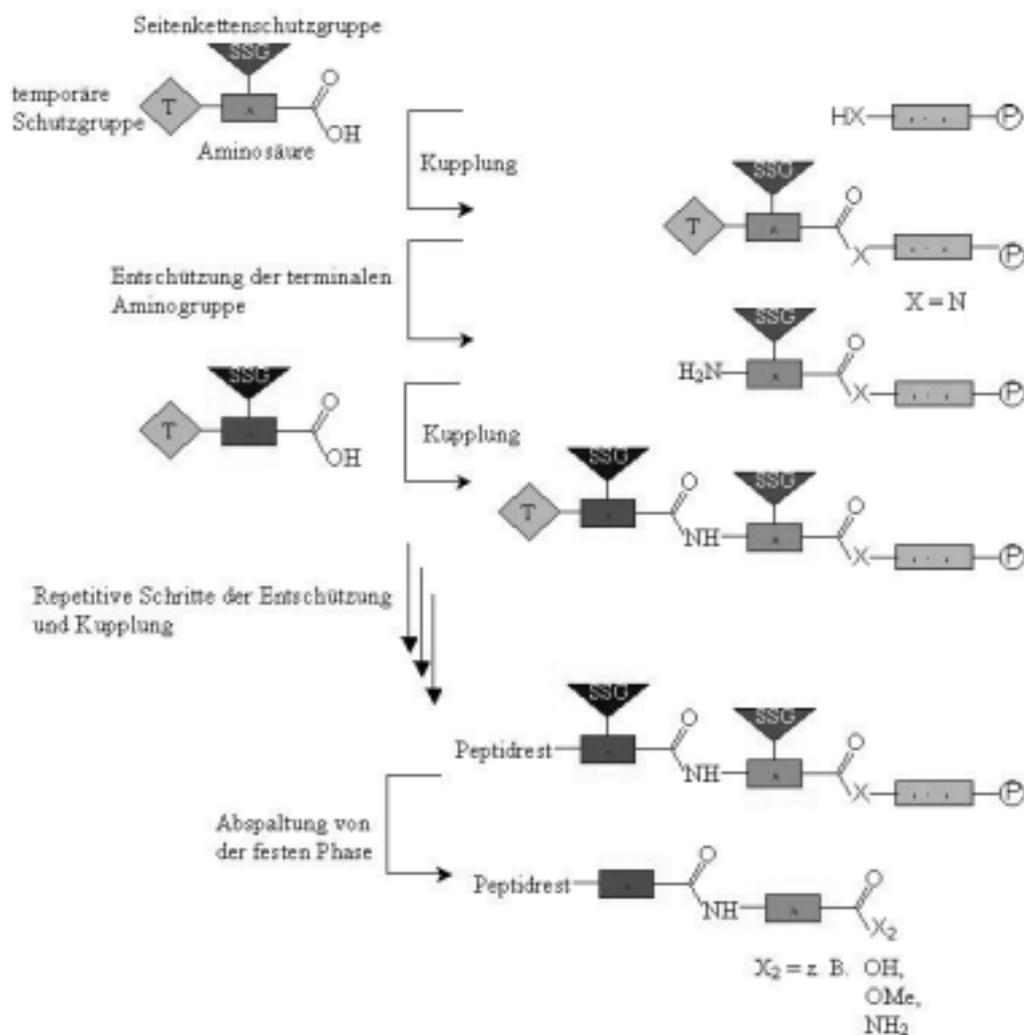
neue Strukturen erhalten und durch geeignete Assays^[17] auf ihre biologische Wirkung hin untersucht. Als Alternative haben sich auch bei der Entwicklung von Glycomimetika kombinatorische Ansätze als sinnvoll erwiesen. Vor allem in Fällen, in denen die Kohlenhydrat-Rezeptor-Wechselwirkungen unklar sind und ein rationales Design folglich schwierig ist, konnten biologisch aktive Glycomimetika durch Entwicklung von Substanzbibliotheken erhalten werden.^[18] Neben diesen *in vitro*-Methoden bei der Suche nach geeigneten Glycomimetika wird auch das *in silico*-Modelling mit empirischen, molekular-mechanischen Methoden^[19] immer wichtiger. Diese Ansätze können jedoch nur im Falle gut untersuchter Kohlenhydrat-Rezeptor-Wechselwirkungen mit Proteinrezeptoren bekannter Struktur angewandt werden.

Glycomimetika lassen sich entsprechend ihres Funktionskonzepts in zwei Gruppen unterteilen. Einerseits werden Mimetika synthetisiert, die Lektin- bzw. Selektin-spezifische Oligosaccharidepitope imitieren und somit eine direkte Intervention in biologische Prozesse durch kompetitive Bindung an spezifische Rezeptoren ermöglichen. Andererseits verfolgt man die Herstellung von Mimetika, die durch Modulation bzw. Inhibition von Enzymen, einen Eingriff in die biologischen Prozesse ermöglichen, die an der Biosynthese von Oligosaccharidstrukturen beteiligt sind. So konnte gezeigt werden, dass die Glycosylierung von peptidischen Wirkstoffen signifikante Verbesserungen in Bezug auf die Aktivität, Stabilität und Metabolisierung bewirken kann.

1.2 Glycopeptide und Glycopeptidomimetika

Eukaryontische Zellen synthetisieren Glycopeptide durch die enzymatische Modifikation ribosomaler Peptide. Ohne Hilfe dieser zellularen „Logistik“ ist die Synthese von Glycopeptiden aufgrund der Polyfunktionalität der Zielmoleküle nach wie vor eine Herausforderung.^[20] Weiter erschwert wird die chemische Synthese dieser biologisch relevanten Verbindungen durch das gleichzeitige Auftreten funktioneller Gruppen mit sehr ähnlicher Reaktivität. Schon ein einfaches Monosaccharid enthält bis zu fünf Hydroxyl-Gruppen mit fast identischen chemischen Eigenschaften.

Eine häufig zu findende Strategie bei der chemischen Glycopeptidsynthese ist der Aufbau glycosylierter Aminosäure-Bausteine mit orthogonalem



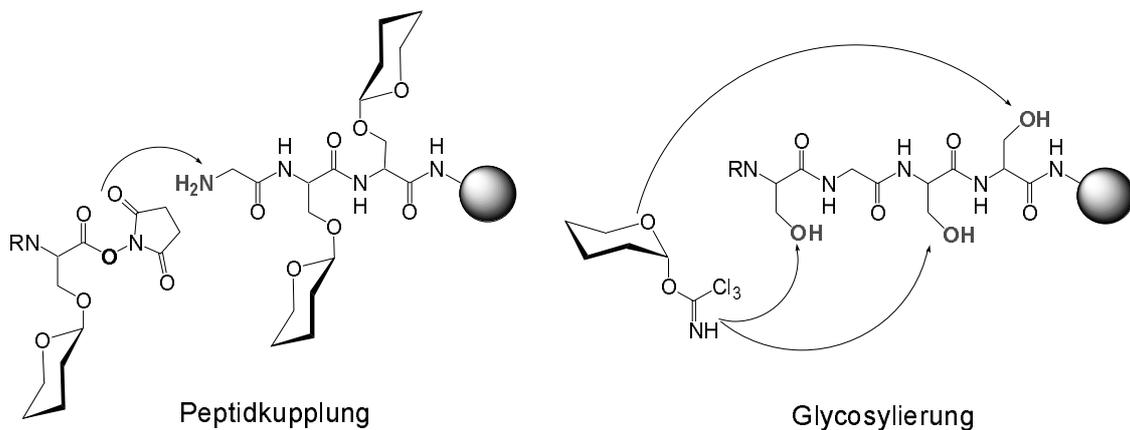
Schema 1 Prinzip der Schutzgruppenstrategie in der Festphasensynthese.

Schutzgruppenmuster, sowohl an den Zucker- als auch an den Aminosäure-Funktionalitäten. Diese Bausteine werden dann unter Verwendung geeigneter Linker und Kupplungsmethoden in die Festphasen-Synthese eingespeist (Schema 1). Trotz der zahlreichen Verfahrensoptimierungen, die diese Synthese-Strategie erfahren hat, erfolgt sie im wesentlichen auch heute noch nach dem von Merrifield^[21] erstmals beschriebenen Prinzip. Die Anbindung der ersten Aminosäure erfolgt nicht direkt am als Festphase dienenden Polymer, sondern an einem Linker, der eine Abspaltung des fertigen Glycopeptids unter definierten Bedingungen ermöglicht. Da die wachsende Peptidkette fortwährend am Harz gebunden vorliegt, kann die nach jeder Kupplung erfolgende Reinigung durch einfaches Waschen der festen Phase ohne Ausbeuteverluste erfolgen, außerdem ist die gute Automatisierbarkeit dieses in repetitiven Standard-Syntheseyklen ablaufenden Verfahrens mit Syntheserobotern vorteilhaft.

Ein solcher Syntheseyklus beinhaltet die Abspaltung der α -Amino-Schutzgruppe von der terminalen Aminosäure, die über ihre α -Carboxylgruppe an das am Harz verankerte Peptid gebunden ist, sowie die Kupplung der nächsten Aminosäure über deren aktivierte α -Carboxylgruppe, entsprechend der zu synthetisierenden Sequenz. Alle an der Reaktion nicht beteiligten Funktionalitäten müssen während des gesamten Synthesevorgangs blockiert vorliegen. Das gilt sowohl für die Hydroxylfunktionen der Saccharide als auch für die Seitenketten Funktionalitäten der nicht glycosylierten Aminosäuren, daher kommt der Auswahl eines geeigneten orthogonalen Schutzgruppensatzes größte Bedeutung zu.^[22] Zur Blockierung der α -Aminofunktionen der eingesetzten Bausteine hat sich in der Glycopeptidsynthese die Verwendung der Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe allgemein durchgesetzt.

Diese Urethanschutzgruppe zeichnet sich durch gute Abspaltbarkeit unter β -Eliminierung bei milden basischen Bedingungen, sowie ihre Racemisierungs-mindernde Funktion aus. Die Seitenkettenfunktionalitäten der Aminosäuren werden hingegen in der Regel mit säurelabilen Schutzgruppen blockiert, die eine hohe Basenstabilität aufweisen, um eine vollständig stabile Blockierung während der Syntheseyklen zu gewährleisten. Die Bedingungen

zur abschließenden Abspaltung des fertigen Glycopeptids können durch die Wahl des Linkers variiert werden. Häufig erfolgt die Spaltung vom polymeren Träger unter stark aciden Bedingungen, durch Verwendung von Trifluoressigsäure. Hierbei kommt es auch zur Abspaltung sämtlicher Seitenkettenschutzgruppen und man erhält das freie, vollständig entschützte Glycopeptid. Einen Sonderfall stellen die Saccharid-Schutzgruppen dar, säurestabile Schutzgruppen wie Acetate müssen in einem zusätzlichen Schritt nach Abspaltung des Glycopeptids vom Polymer deblockiert werden.



Schema 2 Gegenüberstellung zweier Varianten zur Glycopeptidsynthese, auf der linken Seite die sequentielle Synthese durch Peptidkupplung an fester Phase, rechts die nachträgliche Glycosylierung fertiger Peptide.

Seltener wird die Technik der nachträglichen Glycosylierung von Peptidsequenzen in Lösung^[23] oder an der festen Phase angewandt.^[24] Hier fällt die oft mühsame Synthese der Glycopeptid-Bausteine für jeden einzelnen Saccharidrest am Zielpeptid weg, die schlechte Löslichkeit peptidischer Strukturen in organischen Lösungsmitteln reglementiert allerdings stark die nachträgliche Glycosylierung dieser Verbindungen in Lösung. Festphasen-Ansätze scheitern oft an unvollständiger Glycosylierung des am Harz synthetisierten Peptids, da meist mehrere Serin- oder Threonin-Seitenketten gleichzeitig umgesetzt werden sollen (Schema 2). Aus dieser Problematik resultieren oft schwerwiegende Trennprobleme, die zu niedrigen Ausbeuten führen. Deshalb sind diese Methoden nur für relativ kurze Peptidketten mit einfachen Saccharidresten praktikabel.^[25] Handhabbar sind beispielsweise Tripeptide, die mit Monosacchariden glycosyliert werden können.

1. Einleitung

Die Kohlenhydratreste der Saccharidseitenketten natürlich vorkommender Glycopeptide sind in den meisten Fällen über ihr anomeres Zentrum *N*- oder *O*-glycosidisch mit dem Peptidrückrat verknüpft. Die *N*-Glycoproteine zeichnen sich im Gegensatz zu den *O*-Glycoproteinen durch eine sehr viel geringere Strukturdiversität aus. So wird die Verknüpfung zwischen Protein- und Saccharidteil ausschließlich durch eine β -glycosidische Bindung zwischen 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose (GlcNAc) und der Amidgruppe von L-Asparaginsäure realisiert. *N*-Glycoproteine liegen in der Regel in einer als Core C bezeichneten Struktur vor (Abb. 4), in der die GlcNAc-Asparaginsäure-Einheit mit einer weiteren GlcNAc-Einheit β 1,4-glycosidisch verknüpft ist, diese ist wiederum β 1,4-glycosidisch an ein Mannose-trisaccharid geknüpft. An diese Core-Struktur sind weitere Saccharid-

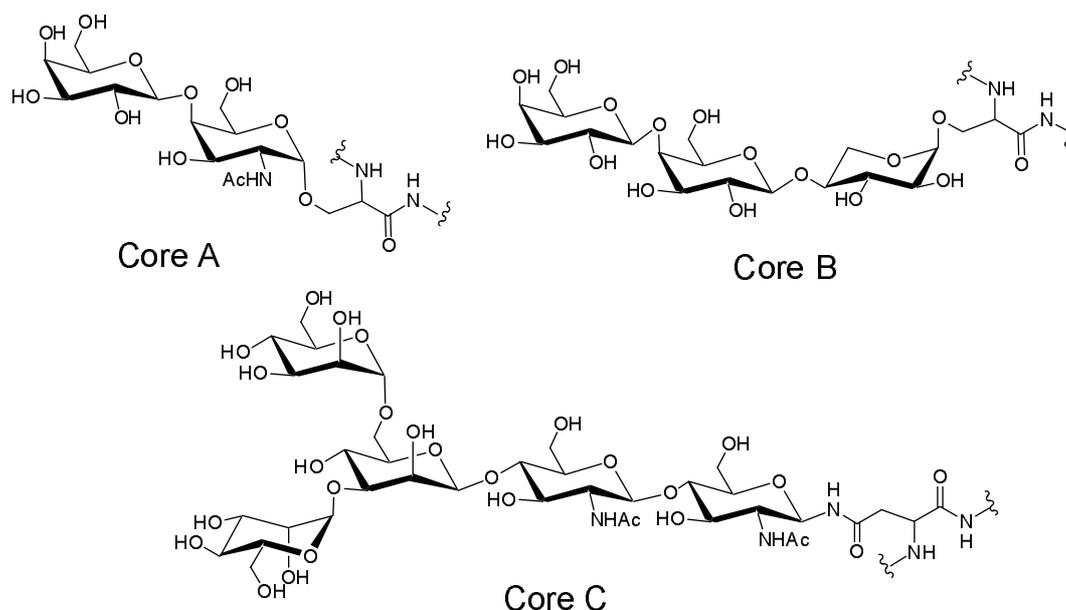


Abb. 4 In Glycoproteinen häufig anzutreffende Kohlenhydrat-Motive; die hier gezeigten Core-Strukturen sind häufig mit weiteren Sacchariden substituiert.

strukturen gebunden, die entsprechend des Substitutionsmusters als „oligomannosidischer“- „komplexer“- und „hybridischer“-Typ bezeichnet werden^[20]. Die Oligosaccharidreste natürlich vorkommender *O*-Glycopeptide sind häufig α -*O*-glycosidisch mit den Hydroxyl-Gruppen von Serin- oder Threonin-Seitenketten verbunden. *O*-glycosylierte Hydroxylaminosäuren treten vor allem in den als Core A und Core B bezeichneten Grundstrukturen auf, in denen sie α -glycosidisch an 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactopyranose

(GalNAc), bzw. β -glycosidisch an D-Xylose gebunden vorliegen. In der Core A-Struktur ist GalNAc β -glycosidisch mit einer weiteren Galactoseeinheit substituiert, die Xylose der Core B Struktur ist ihrerseits mit einem Galactosedimer β -glycosidisch verbunden. Die beschriebenen Grundstrukturen sind ihrerseits in der Regel mit weiteren Saccharidstrukturen substituiert, darüber hinaus sind in den letzten Jahren eine Vielzahl weiterer Core-Strukturen entdeckt worden, in denen O-glycosidische Verknüpfungen zwischen Serin, Threonin und weiteren Kohlenhydraten auftreten.

Einem breiten therapeutischen Einsatz von glycopeptidischen Wirkstoffen steht u. a. der schnelle chemische und enzymatische Abbau der N- und O-glycosidischen Bindungen *in vivo* entgegen. Vielerorts wird deswegen an der Synthese von Glycopeptidomimetika gearbeitet, die gegenüber diesen Einwirkungen unempfindlicher sind. Die chemische Instabilität der O-glycosidischen Bindung rührt vor allem von ihrem Acetalcharakter her, ein bedeutend stabileres Konstrukt wird erhalten, wenn man C-Glycoside herstellt, bei denen das anomere C-Atom mit nur einem Sauerstoffatom substituiert ist.^[26] Bei diesen Verbindungen handelt es sich faktisch um cyclische Ether, die ohne Frage bedeutend stabiler als Acetale sind. Die C-glycosidischen Analoga zeigen häufig ähnliche biologische Eigenschaften wie ihre natürlichen Vorbilder, was sie zu interessanten Kandidaten im Bereich der Glycopeptidomimetika macht. C-glycosidisch verknüpfte Aminosäurederivate für die Glycopeptidsynthese sind über verschiedene Syntheserouten zugänglich^{[27],[28]} problematisch ist dagegen nach wie vor die Synthese von C-verknüpften Oligosacchariden.^[29]

Neben der Verknüpfung des Saccharidteils mit Aminosäureseitenketten über das anomere Zentrum gibt es eine Reihe weiterer Ansätze in der Glycosylaminosäure-Synthese, die alle eine erhöhte *in vivo*-Stabilität der resultierenden Glycopeptidomimetika zum Ziel haben. Verbreitet ist die Verknüpfung von Methylglycosiden über die primäre Hydroxyfunktion in der 6-Position des Kohlenhydrats mit verschiedenen Aminosäurederivaten, um die metabolische Stabilität der Glycostrukturen zu erhöhen^[30]. Der primäre Alkohol in der 6-Position eines Monosaccharids lässt sich relativ leicht von den übrigen Hydroxylfunktionen des Zuckers diskriminieren, daraus ergibt

1. Einleitung

sich eine synthetisch unkompliziertere Möglichkeit zur regioselektiven Bildung von Estern^[31] oder Amiden^[32] am C-6 des Kohlenhydrats.

1.3 Dendrimere vom A_nX -Typ

Dendrimere sind stark verzweigte, generationsweise aufgebaute Makromoleküle die ein definiertes Molekulargewicht besitzen, also monodispers vorliegen. Ihre Herstellung erfolgt durch iteratives Ausführen zweier oder mehrerer Reaktionsschritte. Nach jeder Iteration wird ein Molekül definierter Größe erhalten, das als eine bestimmte Generation bezeichnet wird. Dieses Molekül trägt an seiner Peripherie mehrere gleiche funktionelle Gruppen. Es dient als Edukt bei der folgenden Iteration und wird dabei in ein Dendrimer der nächsten Generation überführt. Generell sind dendritische Moleküle über zwei Synthesestrategien zugänglich, die konvergente und die divergente Route. Bei der konvergenten Synthese werden durch iterativen Aufbau Dendrimer-Segmente, sogenannte Dendrons, synthetisiert, die in einem finalen Schritt mit einem multifunktionellen Core-Molekül zum fertigen Dendrimer umgesetzt werden. Bei der divergenten Synthese wird ein Core Molekül in einer „Kaskaden-Reaktion“ generationsweise von innen nach außen zum Dendrimer aufgebaut.

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten dendritischen, multifunktionellen Moleküle zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, dass eine ihrer Funktionalitäten gegenüber allen anderen diskriminiert ist. Sie sind für die Herstellung selektiv funktionalisierbarer Moleküle vom A_nX -Typ geeignet.^{[33],[34]} Das Kürzel A_nX beschreibt in diesem Zusammenhang die funktionellen Gruppen des Dendrimers. Neben n gleichen Funktionalitäten A liegt eine von diesen diskriminierte Funktionalität X vor. Bei der Synthese multifunktionaler

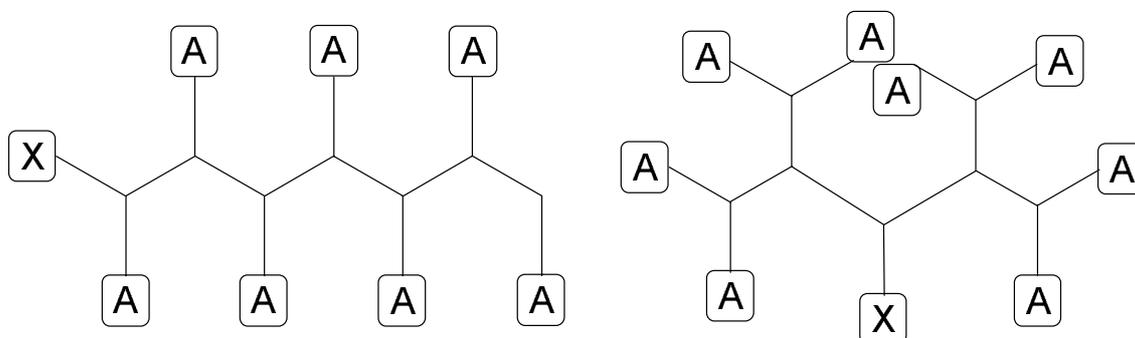


Abb. 5 Zwei verschiedene molekulare Architekturen, die das Substitutionsmuster A_nX ermöglichen, ein linearer, polymerähnlicher Ansatz sowie ein dendritischer Aufbau.

Derivate dieses Typs kommen verschiedene molekulare Architekturen in Frage: zum einen wären beispielsweise lineare, polymerähnliche Moleküle mit einer X-Funktionalität als Endgruppe denkbar, zum anderen dendritisch aufgebaute Strukturen mit der Funktionalität X am fokalen Punkt (Abb. 5).

Da die selektiv funktionalisierbaren Dendrimere nach der Umsetzung der A-Funktionalitäten mit Kohlenhydratstrukturen auch als Oligosaccharidmimetika verwendbar sein sollen, ist der dendritische Ansatz morphologisch besser geeignet für die multivalente^[35] Präsentation von Kohlenhydratepitopen (Abb. 5).

Der Einsatz von monovalenten Glycosiden ist aufgrund der großen Dissoziationskonstanten der entsprechenden Kohlenhydrat-Lektin-Komplexe nicht effektiv. Oligo- oder multifunktionelle Liganden können dagegen erfolgreich als Mimetika komplexer Oligosaccharide wirken.^[36] Dendritische Strukturen besitzen häufig ein ähnliches Bindungsmuster wie Oligosaccharide (vgl. Kapitel 4.3 Abb. 15), weisen aber ansonsten einen viel einfacheren Aufbau auf. Die räumliche Anordnung und der korrekte Abstand der Kohlenhydratepitope zueinander bestimmen Affinität und Selektivität in Bezug auf das angesprochene Lektin. Da häufig nur die terminalen Kohlenhydratreste eines Oligosaccharides essentiell für die molekulare Erkennung sind, gibt es eine Vielzahl von Beispielen für den Einsatz Zuckermantelter Dendrimere als Oligosaccharidmimetika in biologischen Assay-Systemen.^[37]

1.4 Selbstorganisierende Monoschichten

Selbstorganisierende Monoschichten, sog. SAMs (**S**elf **A**ssembled **M**onolayers), sind hoch geordnete molekulare Konstrukte, die durch die regelmäßige Anordnung oberflächenaktiver Substanzen auf Metalloberflächen gebildet werden. Meistens werden als oberflächenaktive Komponenten langkettige Alkylthiole eingesetzt, die auf Goldoberflächen immobilisiert werden, aber auch andere Systeme sind gebräuchlich, wie auf Silber- oder Aluminiumoxid angeordnete Fettsäuren, oder Silane, die auf hydroxylierten Oberflächen gebunden sind^[38]. Die große Affinität von Schwefel und Selen zu Übergangsmetall-Oberflächen, die eine Triebkraft der Bildung der SAMs darstellt, resultiert aus der Fähigkeit dieser Elemente, mehrere Bindungen mit Metall-Clustern auf der Metalloberfläche einzugehen. Goldoberflächen sind besonders geeignet, da sie nur in sehr geringem Umfang von Oxidschichten bedeckt sind und sich gut mechanisch reinigen lassen. Nach der Belegung mit langkettigen Organen resultieren sehr regelmäßige Monoschichten.

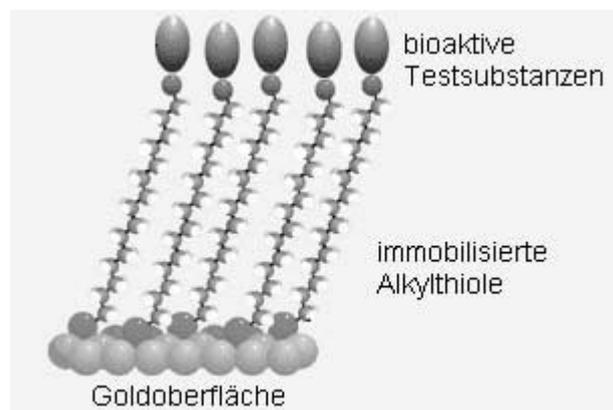


Abb. 6 Schematische Darstellung einer Goldoberfläche, belegt mit langkettigen Alkylthiolen, die mit Ligand-Strukturen funktionalisiert sind.

In derartige SAMs können

Ligand-funktionalisierte Alkylthiole integriert werden. Auf diese Weise können Oberflächen generiert werden, auf denen definierte Mengen biologisch aktiver Testsubstanzen immobilisiert sind. Sie sind geeignet für biosensorische Anwendungen, wie zum Beispiel als Chips zur Analyse biomechanischer Wechselwirkungen mit Hilfe der Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR).^[39]

Die unspezifische Bindung der bioaktiven Moleküle an die Oberfläche in der Umgebung der Ligand-Strukturen muss dabei sorgfältig vermieden werden. Zu diesem Zweck werden Oligo-Ethylenglycol (OEG)-Derivate definierter Länge für den Aufbau der Monoschichten verwendet. Diese reduzieren bekanntermaßen die unspezifische Adhäsion von Zellen und Proteinen, dabei

verhindern längere OEG-Ketten die Adsorption am SAM effektiver als kurze. Terminale OH-Gruppen am OEG sind für diesen Effekt nicht zwingend erforderlich.

Die Adsorption von Proteinen an Polymer- oder in diesem Falle Monoschicht-Oberflächen kann analog zum Sachverhalt der Kolloid-Stabilität betrachtet werden. Dabei interagieren Monoschicht-Oberflächen und Proteine wie hydrophobe Kolloide im erwähnten Modellsystem. Die Widerstandsfähigkeit einer hydrophoben, mit OEG-Derivaten funktionalisierten Oberfläche gegenüber der Adsorption von Proteinen kann durch das Kräftespiel von sterischer Abstoßung durch die OEG-Ketten gegenüber van der Waals- und weitreichender hydrophober Wechselwirkung zwischen Protein und Oberfläche beschrieben werden.^[40] OEG-Ketten sind hydrophil, so dass Wassermoleküle in den OEG-Teil der Monoschicht eingelagert werden und hier dazu führen, dass die repulsiven gegenüber den attraktiven Wechselwirkungen überwiegen.

SAM-basierte Immunoassays weisen gegenüber Hämagglutinations-Inhibitions-Assays in Lösung oder konventionellen Festphasen unterstützten Immunoassays eine Reihe von Vorteilen auf. Erstens sind SAM-basierte Oberflächen denkbar, die biospezifisch mit Zellen oder Proteinen interagieren ohne ein signifikantes Hintergrundsignal zu generieren. Dieses Ziel kann durch den Einsatz sog. gemischter SAMs erreicht werden, die neben Ligand-terminierten Alkylthiolaten aus OEG-terminierten Alkylthiolen oder anderen Derivaten aufgebaut sind, die die unspezifische Adhäsion oder Adsorption an den Oberflächen verhindern. Zweitens ist die Liganddichte auf der Oberfläche dieser SAMs leicht durch das Verhältnis von zwei Alkylthiolen in der zum Aufbau der SAMs verwendeten Lösung steuerbar, wobei auf molekularer Ebene gut definierte Oberflächen resultieren. Drittens sind für SAM-basierte Assay-Systeme nur die zu untersuchenden Bakterien oder Proteine, sowie der auf sein Adhäsionspotenzial zu untersuchende Ligand notwendig. Andere oftmals teure biologische Komponenten wie rote Blutkörperchen, Enzyme oder Antikörper sind nicht notwendig^[41].

Diese Assay-Methodik ist auf die Untersuchung viraler und Säugetier-Zelladhäsion anwendbar. SAMs, die für Proteine spezifische Liganden wie z. B. Biotin präsentieren, können für die Immobilisierung von Proteinen auf den

Oberflächen verwendet werden, um z. B. Protein-Ligand- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen quantifizieren zu können. Darüber hinaus sind SAMs, die verschiedene Zuckerstrukturen in einem definierten Verhältnis präsentieren, als Glycocalix-Mimetika verwendbar. Hier wäre ein definiertes Modellsystem ohne die Mikroheterogenität natürlicher Glycocalix verfügbar, das hervorragende Voraussetzungen für die quantitative Bestimmung von Kohlenhydrat-Lektin-Dissoziationskonstanten bietet.

1.5 Elektrolumineszenz

Unter Lumineszenz versteht man die Emission von Licht durch Gase, Flüssigkeiten und Festkörpern im sichtbaren-, UV- und IR-Spektralbereich nach Energiezufuhr. Die Lumineszenz ist stets auf einen Übergang von einem Elektron aus einem energetisch höheren Zustand in einen unbesetzten, energetisch tieferen Zustand zurückzuführen. Da unbesetzte Elektronenzustände oft als positiv geladene „Löcher“ behandelt werden, lässt sich die Lumineszenz auch als Rekombination eines Elektron-Lochpaares beschreiben, bei dem die frei werdende Energie zumindest teilweise in Form eines Lichtquants abgegeben wird.

Die Lumineszenz-Prozesse lassen sich nach der Art der Energiezufuhr einteilen: Man unterscheidet zwischen Photolumineszenz, bei der das Elektron durch optische Anregung in einen angeregten Zustand gebracht wird, und Elektrolumineszenz, unter der man die Emission von Licht versteht, die durch Anlegen eines elektrischen Feldes an Halbleiter und Isolatoren hervorgerufen wird. Im engeren Sinn sind damit Prozesse gemeint, bei denen ein freier Ladungsträger (ein Elektron oder Loch) im elektrischen Feld so viel Energie aufnimmt, dass er durch Stoßionisation ein Elektron-Lochpaar erzeugen kann, das dann an einer Störstelle, einem sogenannten Lumineszenz-Zentrum, rekombiniert. Die Emissionswellenlänge lässt sich durch Wahl des Wirtsmaterials und des Lumineszenz-Zentrums beeinflussen.

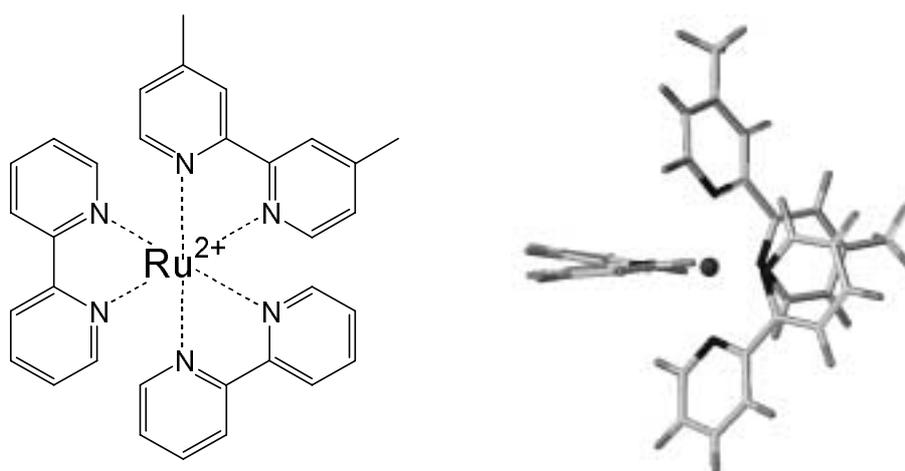
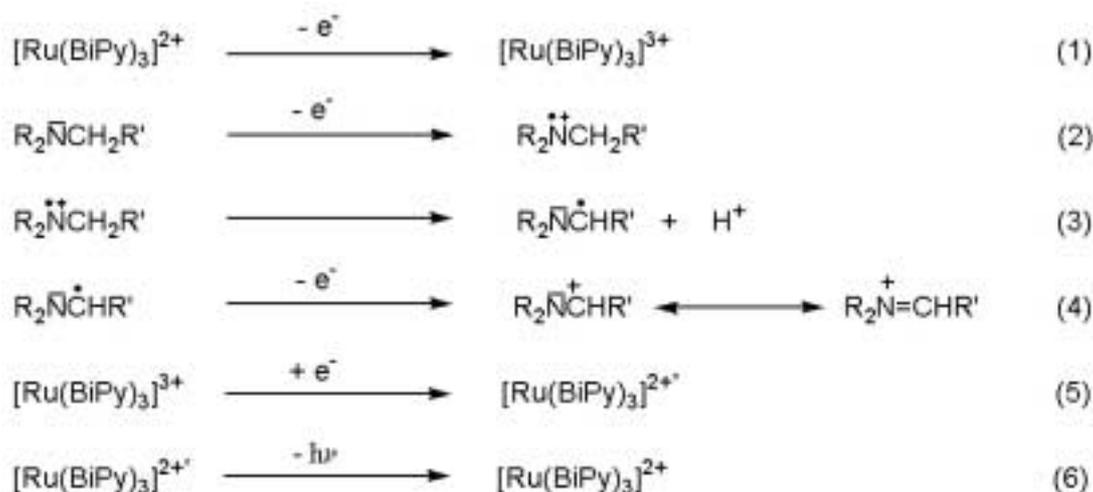


Abb. 7 Strukturformel (links) und molekülmechanisch berechnete, dreidimensionale Struktur (rechts) des Ruthenium-Bipyridyl Luminophors.

Elektrolumineszenz beobachtet man beispielsweise bei der Lichtemission von Lumineszenz- und Laserdioden an der Grenzfläche innerhalb des Halbleitermaterials.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Ruthenium-Bipyridyl-Komplex (Abb. 7) als Luminophor verwendet. Dieser kann Elektro-Chemolumineszenz zeigen, hier wird im Gegensatz zur reinen Elektrolumineszenz ein sogenannter Opferdonor benötigt, der bei einer chemischen Reaktion als Elektronenlieferant fungiert und irreversibel oxidiert wird.^[42] Als Opferdonor können beispielsweise tertiäre Amine verwendet werden (Schema 3), die an einer Platinanode in ihr Radikal-Kation überführt werden (2), dieses kann am α -C-Atom deprotoniert werden (3) und stellt nun ein starkes Reduktionsmittel dar. Der BPRu-Komplex wird anodisch zum $[\text{Ru}(\text{BiPy})_3]^{3+}$ (1) oxidiert, ein



Schema 3 In unmittelbarer Umgebung der Platin-Elektrode ablaufende Reaktionen bei der Elektro-Chemo-Lumineszenz.

Elektron wird vom deprotonierten Amin in ein π^* MO eines Bipyridyl-Liganden injiziert (4). Dabei wird die angeregte Spezies $[\text{Ru}(\text{BiPy})_3]^{2+*}$ (5) gebildet. Der ursprünglich vorliegende $[\text{Ru}(\text{BiPy})_3]^{2+}$ -Komplex wird unter Emission eines Lichtquants der Wellenlänge $\lambda_{\text{max}} \sim 615 \text{ nm}$ (6) regeneriert.

Der angeregte Zustand aus (6) hat eine verhältnismäßig lange Lebensdauer, da aufgrund des Schweratomeffektes des Rutheniums (Spin-Bahn-Kopplung) die Bildung eines Triplett-Zustandes begünstigt wird. Die Schritte (1) bis (6) laufen alle an der Anode bzw. in ihrer unmittelbaren Nähe ab, an der Kathode bildet sich gleichzeitig durch Reduktion der Protonen aus (3) molekularer

1. Einleitung

Wasserstoff. Im Gegensatz zur reinen Elektrolumineszenz laufen bei der Elektro-Chemolumineszenz prinzipiell chemische Reaktionen ab.

Abb. 8 zeigt das Absorptions- (durchgezogene Linie) und das Emissionsverhalten (gepunktete Linie) des $\text{Ru}(\text{BiPy})_3$ -Komplexes im UV-VIS-Spektralbereich. $\text{Ru}(\text{BiPy})_3$ -Komplexe sind durch ihr Emissionsmaximum im sichtbaren Bereich bei 615 nm und die lange Lebensdauer ihres angeregten Zustandes gut geeignet, um die Effekte

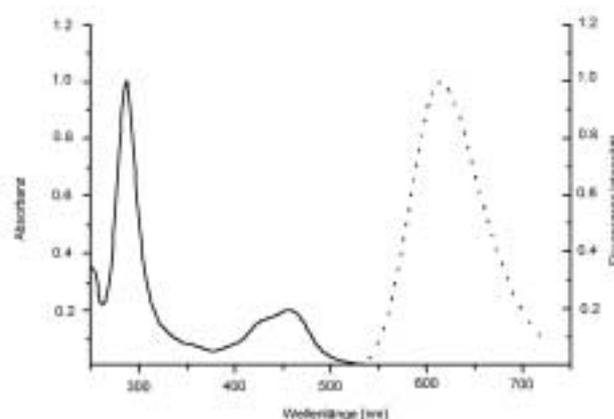


Abb. 8 Absorptions- (durchgezogene Linie) und Emissionsspektrum (gepunktete Linie) des BPRu-Komplexes im Bereich 250 – 750 nm.

unspezifischer Hintergrundsignale, beispielsweise in Assay-Systemen, zu minimieren. Das Ruthenium-Bipyridyl-System kann aufgrund der Existenz des Absorptionsmaximums bei 460 nm, auch mit Hilfe eines Argonlasers, der bei einer Wellenlänge von 488 nm arbeitet, im Sinne der Photolumineszenz angeregt werden. Dadurch eröffnen sich weitere Anwendungsmöglichkeiten der Ruthenium-Komplexe in der Routineanalytik im Immunoassay. Die Detektion der Lumineszenz in Gegenwart des intensiven Laserlichtes ist möglich, da die Emission bei sehr viel größerer Wellenlänge als die Anregung stattfindet. Lumineszenz-Techniken sind deshalb als analytisches Werkzeug in medizinischer und analytischer Chemie von wachsendem Interesse. Das Potenzial dieser Techniken ist in leicht automatisierbarem Monitoring, sowie ihrer hohen Sensitivität und Selektivität begründet^[43].

1.6 Markerstrukturen in Immunoassays

Immunoassays sind wichtige Methoden in analytischer und klinischer Biochemie. Sie sind zum Beispiel aus der Analytik von Biomolekülen, Zellen und Bakterien nicht mehr wegzudenken. Immunoassays können danach eingeteilt werden, ob sie markierungsfrei oder mit markierten Reagenzien arbeiten und ob sie in heterogenem oder homogenem Testformat ausgeführt werden. Zur vollständigen Beschreibung eines Assays ist aber stets eine Kombination aus diesen Kategorien notwendig; so kann beispielsweise ein Assay mit markiertem Reagenz homogen oder heterogen durchgeführt werden.

In jedem Immunoassay geht es letztendlich immer darum, freie und gebundene Analytmoleküle voneinander zu unterscheiden. Bei heterogenen Assays können entweder Antikörper oder Analytderivate auf einer Oberfläche immobilisiert sein und freie Antigene bzw. Antikörper aus der Probenlösung abfangen, während gebundene Antigene bzw. Antikörper mit bereits besetzten Bindungsstellen weggespült werden. Die Vollständigkeit der Bindung an die feste Phase, das Vermeiden unspezifischer Bindung und die Effizienz der Waschvorgänge sind entscheidend für die Leistungsfähigkeit solcher heterogener Immunoassays, die im übrigen sowohl mit markierten als auch unmarkierten Reagenzien durchführbar sind.

Homogene Immunoassays beruhen darauf, dass in der Lösung messbare Effekte auftreten, die im Zusammenhang mit der zu Grunde liegenden Komplexbildung stehen. In der Regel werden homogene Assays mit Fluoreszenzmarkierungen durchgeführt. Aufgrund der Analyt-Antikörper-Reaktion kann sich die Polarisation der Fluoreszenzstrahlung ändern oder es kann eine Verstärkung bzw. eine Löschung des Signals stattfinden. Eine andere Möglichkeit ist die Signaländerung durch Energietransfer, der dann auftritt, wenn Antikörper und Antigen mit einem bestimmten Farbstoffpaar (Donor- und Akzeptorfarbstoff) markiert sind und aneinander binden. Im homogenen Lumineszenz-Immunoassay^{[44],[45],[46]} kann man auf die Abtrennung der markierten Antigene von den nicht-markierten verzichten, dadurch verringert sich der präparative Aufwand beträchtlich.^[47]

Das ELECSYS®-System der Firma Roche Diagnostics arbeitet mit heterogenen Immunoassays. Beim Sandwichprinzip wird hier in der ersten Inkubation die Probe zusammen mit einem biotinylierten monoklonalen Antikörper und einem mit Ruthenium-Komplex markierten monoklonalen Antikörper zu einem Sandwich-Komplex umgesetzt. In einer zweiten Inkubation wird nach Zugabe von Streptavidin beschichteten Mikropartikeln der Komplex über die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an die Festphase gebunden. Das Reaktionsgemisch wird danach in die Messzelle überführt und durch magnetische Wechselwirkungen auf der Oberfläche einer Elektrode fixiert. Danach werden die ungebundenen Substanzen entfernt. Durch Anlegen einer Spannung wird die Chemolumineszenz-Emission induziert und mit einem Photomultiplier gemessen.

Beim Kompetitionsprinzip wird in einer ersten Inkubation ein Immunkomplex aus der Probe und einem spezifischen biotinylierten Antikörper gebildet. In einer zweiten Inkubation werden, nach Zugabe eines mit Ruthenium-Komplex markierten Haptens sowie Streptavidin beschichteter Mikropartikel, unter Bildung eines Antikörper-Hapten-Komplexes die noch freien Bindungsstellen des biotinylierten Antikörpers besetzt. Der Gesamtkomplex wird über die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an die Festphase gebunden und wie oben beschrieben gemessen.

2. Problemstellung und Strategie

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit bildete die Synthese glycosidischer und dendritischer Bausteine zur Beeinflussung der photophysikalischen Eigenschaften von Ruthenium-Bipyridyl-Luminophoren im Rahmen eines Forschungsprojektes mit der Firma Roche Diagnostics. Die dabei gewonnenen Erfahrungen und weiterführenden Ideen führten dann auch zur Herstellung selektiv funktionalisierbarer, dendritischer Oligosaccharidmimetika und Glycocluster im Zusammenhang mit unterschiedlichen Anwendungsgebieten.

2.1 Elektrolumineszenz-markierte Peptide für Immunoassays

Die photophysikalischen Eigenschaften von Fluorophoren und Luminophoren werden durch die Änderung der chemischen Umgebung in der Nähe biologischer Makromoleküle beeinflusst. Beispielsweise wird die Lumineszenz des BPRu-Komplexes bei einer Intercalation in die DNA-Doppelhelix signifikant erhöht.^[48] Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die chemische Umgebung des BPRu-Labels so zu modifizieren, dass die Lebensdauer des angeregten Zustands des Ruthenium-Bipyridyl-Systems verlängert wird. Eine solche Modifikation wird durch die zielgerichtete Funktionalisierung des Peptid-Linkers angestrebt, der den BPRu-Label mit der biologisch aktiven Struktur verbindet.

Der angeregte Zustand des BPRu-Systems kann allgemein durch gelösten Sauerstoff, aber auch durch niedrigen pH Wert nach der Stern-Vollmer-Gleichung gequencht werden. Dabei ist der freie BPRu-Komplex weit empfindlicher gegenüber Quenching als beispielsweise eine Peptid-gebundene Spezies des Komplexes. Die Protonierung einer funktionellen Gruppe in Konjugation mit dem BPRu-Label führt ebenfalls zum Lumineszenz-Quenching. Um diese Effekte zurückzudrängen ist die Verwendung eines Spacers aus mehreren Methylen-Gruppen zwischen Label und Peptidlinker sinnvoll, weil dadurch verhindert wird, dass sich zum Bipyridylrest konjugierte funktionelle Gruppen im Molekül befinden. Weitere wichtige Einflüsse stellen die induktiven Effekte dar, die die Seitenketten zum

2. Problemstellung und Strategie

Label benachbarter Aminosäuren ausüben, da der pK_a -Wert einer entfernten funktionellen Gruppe und der HOMO-LUMO-Abstand des Luminophors linear voneinander abhängen.^[49] Bei pH Werten zwischen 2 und 10, also den gängigen Bedingungen in Assay-Systemen, werden die photophysikalischen Eigenschaften des angeregten Zustandes des BPRu-Komplexes durch negativ geladene, benachbarte Aminosäureseitenketten positiv beeinflusst.

Vor dem Hintergrund dieser Sachlage wurden Peptidlinker für BPRu-Label synthetisiert, die eine Verlängerung der Lebenszeit des angeregten Zustandes des Ruthenium-Komplexes zum Ziel hatten, um so die Nachweisgrenzen der entsprechenden rutheniierten Analytmoleküle herabzusetzen. Zum einen wurden dazu glycopeptidische Linker hergestellt, um allgemein

den Einfluss von Glycosidresten auf die Lebensdauer des angeregten Zustands des Lumineszenz-Zentrums zu evaluieren. Zum anderen wurden Dendrimer-funktionalisierte Peptide synthetisiert, die stark verzweigte Substrukturen mit terminalen Carboxylgruppen enthielten. Diese sog. semikryptischen Peptidlinker (Abb. 9) umschließen teilweise den Luminophor auf molekularer Ebene und verhindern so ein vorzeitiges Lumineszenz-Quenching beispielsweise durch im umgebenden Medium gelösten Sauerstoff.

Die biologisch aktive Komponente für das vorliegende Immunoassay zum Nachweis von HIV-Antikörpern ist ein Peptidepitop aus dem HIV Oberflächenprotein gp32. Bei diesem Peptidepitop handelt es sich um ein Hapten, es ist aufgrund seiner Struktur zur spezifischen Bindung an HIV-

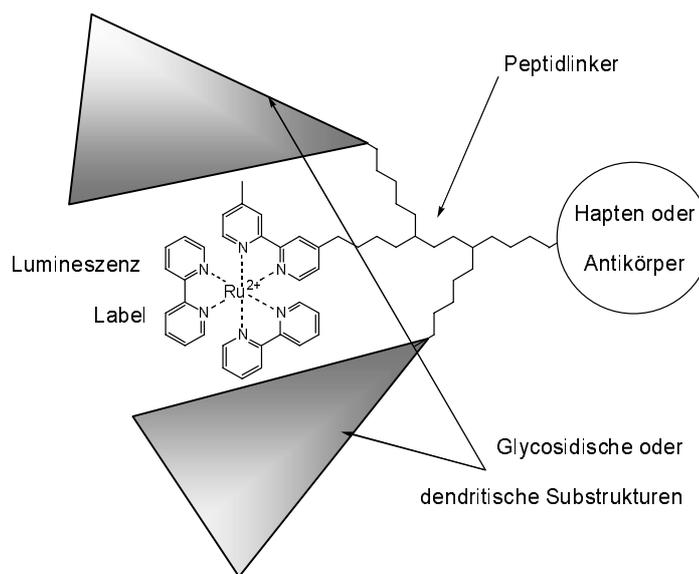


Abb. 9 Schematische Darstellung der Anordnung glycosidischer oder dendritischer Substrukturen zur Beeinflussung der photophysikalischen Eigenschaften des BPRu-Luminophors.

Antikörper fähig, obwohl es kein komplettes Antigen darstellt. Es wird über eine Thiol-Kupplung mit den Peptidlinkern umgesetzt und auf diese Weise Lumineszenz-markiert. Aus patentrechtlichen Gründen wird hier auf detailliertere Ausführungen zum Thema verzichtet.

2.2 Synthese von selektiv funktionalisierbaren Dendrimeren

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Synthese selektiv funktionalisierbarer, dendritischer, multifunktionaler Moleküle, wobei vor allem ihre einfache Verknüpfbarkeit zu größeren Ensembles unter Standard Reaktionsbedingungen im Vordergrund der Entwicklungsarbeit stand. Die Implementierung einer gewissen Flexibilität im Sinne eines „molekularen Lego“ in die Systeme war ebenso wünschenswert wie eine gute Hydrophilie der Derivate.

Wichtige Basismodule für dieses Synthesekonzept stellten ein Aminotriester und eine Nitrotrisäure dar, die als orthogonal geschützte, multifunktionelle Amino-

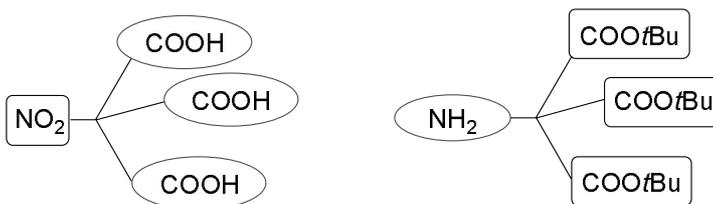


Abb. 10 Orthogonal geschützte „Aminosäure-Derivate“ für die Dendrimer-synthese. Nicht blockierte Funktionalitäten sind rot unterlegt.

säurederivate aufgefasst werden können (Abb. 10). Solche nicht-Kohlenhydrat-Verzweigungsbausteine sollten durch Säureamidbildung als prinzipieller Verknüpfungsmethodik mit einer Vielzahl Kohlenhydrat-funktionalisierter Amine oder Carbonsäurederivate umgesetzt werden. Die leichte Zugänglichkeit dieser nicht-chiralen Aminosäuren im Multigrammmaßstab und die gute Hydrophilie der entschützten Spezies ermöglichten die Synthese maßgeschneiderter Core-Moleküle beispielsweise für die Synthese von Oligosaccharidmimetika.

Die verwendeten Zucker-Bausteine zeichneten sich durch das Vorhandensein freier Amino- oder Carbonsäurefunktionalitäten sowie durch ihre gute Verfügbarkeit aus. Sie ließen sich durch Peptidkupplungsreaktionen in größere Systeme integrieren. Die oft problematische Glycosylierungschemie fand nur in einem sehr frühen Stadium der Reaktionssequenzen statt. O-glycosidische Mannoside und Fucoside als wichtige Motive in der zellulären Erkennung wurden durch Modifikation mit Spacern, die terminale Aminofunktionen enthalten, zu Bausteinen für die multivalente Präsentation dieser Glycoside in Glycoclustern oder Glycodendrimeren umgesetzt.

Die Quintessenz eines derartigen Bausteinkonzeptes ist die vielseitige Kombinierbarkeit gut zugänglicher Grundmodule zu verschiedensten funktionalisierbaren Glycokonjugaten. Die erhaltenen Moleküle konnten in so unterschiedlichen Anwendungsgebieten wie der Darstellung von Saccharidmimetika oder der Zuckerepitop-Synthese für SAMs Verwendung finden.

3. Synthesen von Glycopeptiden und Glycopeptidomimetika

3.1 Synthese von Glycopeptid-Bausteinen durch Glycosylierung

Die Glycosylierung von Kohlenhydratstrukturen mit orthogonal geschützten Aminosäuren wird seit langem durchgeführt und ist in einer Vielzahl von Arbeitsgruppen gut etabliert.^[50] Aus der Vielfalt an verfügbaren Synthesewegen sind für die gegebene Situation solche ausgewählt worden, die sich durch ihre einfache Ausführbarkeit im Multigrammmaßstab auszeichnen.

Die erhaltenen Glycopeptid-Bausteine sollten mit dem FASTMOC[®]-Protokoll für die automatische Festphasensynthese kompatibel sein, d. h. der Aminosäureanteil des Moleküls musste eine Fmoc-geschützte Aminofunktion sowie eine freie Carbonsäure-Funktionalität aufweisen (Abb. 11). Für den Kohlenhydratteil des Moleküls wurde zunächst aufgrund der guten Verfügbarkeit Glucose ausgewählt, um die allgemeine

Synthesizergängigkeit dieser Glycoside zu testen und die Auswirkung von Kohlenhydraten im ELECSYS[®]-Immunoassay allgemein zu evaluieren. Die glycosidische Bindung der Bausteine musste unter den Bedingungen der

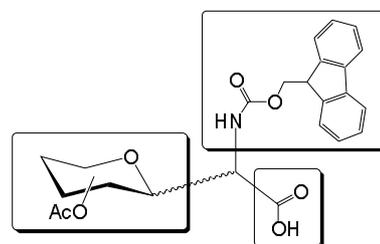
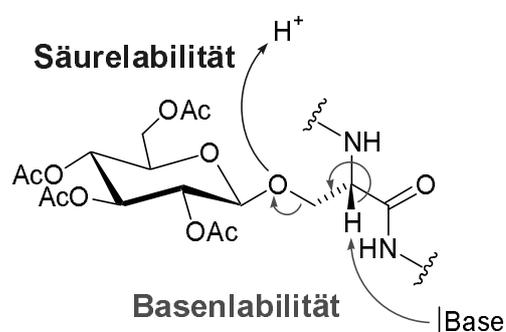


Abb. 11 Schematische Darstellung eines FAST-MOC[®]-kompatiblen Glycopeptid-Bausteins.

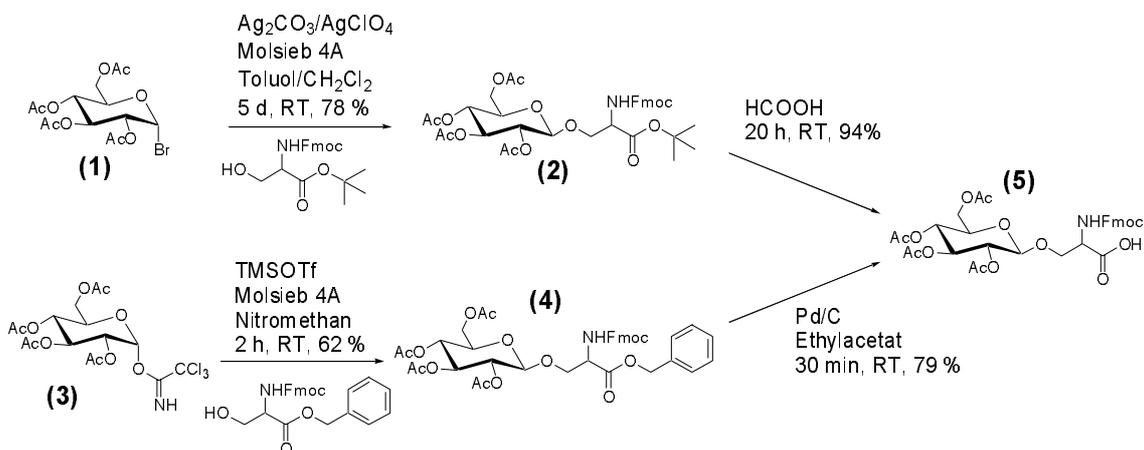


Schema 4 Säure- und Basenlabilität in Glycopeptiden.

Abspaltung der Peptide von der festen Phase, die mit 95 %iger TFA erfolgte, stabil sein. Glycopeptide neigen bei pH Werten über 9 zur β -Eliminierung unter Ausbildung von Dehydroalaninderivaten.^[51] Zu acide Bedingungen können bei Glycopeptiden zur Anomerisierung oder zum Verlust des Zuckerrestes führen (Schema 4).^[52] Es

3. Synthesen von Glycopeptiden und Glycopeptidomimetika

hat sich jedoch gezeigt, dass eine Reihe von *O*- und *N*-Glycosiden von Rink-Amid- oder Wang-Harz unter TFA-sauren Bedingungen problemlos abspaltbar sind.^{[53],[54]} Die OH-Funktionalitäten des Kohlenhydratrestes sollten als Essigsäureester geschützt vorliegen, weil diese nach Abspaltung des Peptids von der festen Phase unter milden Bedingungen wieder deblockierbar sind. Alle diese Voraussetzungen werden von Fmoc-Serin-*O*- oder Fmoc-Asparagin-*N*-Glucosiden erfüllt. Da orthogonal geschützte Serin-Derivate viel preiswerter sind als entsprechende Fmoc-Asparagin-Verbindungen, wurden zunächst Serin-Glucoside synthetisiert. Im Multigrammaßstab ausgeführte Literaturvorschriften gehen oft von Acetobromoglucose (**1**) aus,^[55] die mit Silbersalzen aktiviert wird, oder vom Glucose-Trichloracetimidat (**3**),^[56] das unter TMSOTf-Katalyse mit Fmoc-Serin-Benzylester zum Glycopeptid (**4**)



Schema 5 Literaturbeispiele für Synthesen von Glycopeptid-Bausteinen, ausgehend von aktivierten Glycosyldonoren.

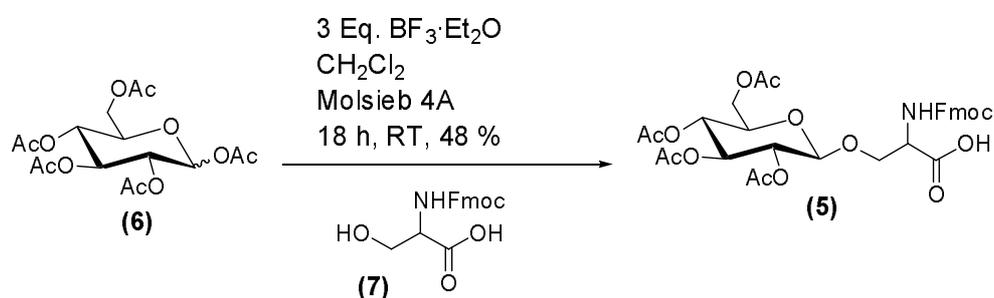
glycosyliert werden kann. Bei Glycosylierungen unter Lewis-Säure-Katalyse eigneten sich Aminosäure-*tert*-Butylester generell schlecht als Aglycon, da es immer zu teilweiser Spaltung des Esters durch die Lewis-Säure kam. Beide in Schema 5 gezeigten Synthesewege führten im kritischen Glycosylierungsschritt, bei dem häufig Anomerengemische entstanden, zu komplett geschützten Derivaten, deren säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel leichter möglich war, als es bei einer freien Carbonsäure oder einem freien Amin der Fall wäre.

Bei der Durchführung der vom Trichloracetimidat (**3**) ausgehenden Syntheseroute mit *N*-Fmoc-Serin-Benzylester konnte zwar das gewünschte Glycosid (**4**) in moderater Ausbeute erhalten werden, die hydrogenolytische

3. Synthesen von Glycopeptiden und Glycopeptidomimetika

Spaltung des Benzylesters zu **(5)**, die mit Pd/C in Ethylacetat^[57] versucht wurde, führte allerdings auch zu teilweiser Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, weswegen nach alternativen Synthesemöglichkeiten gesucht wurde.

Der kürzeste denkbare Syntheseweg ist, ausgehend von Glucosepentaacetat **(6)**, mit an der Säurefunktionalität ungeschütztem Fmoc-Serin **(7)** zu glycosylieren, ohne eine Aktivierung des Glycosyldonors vorzunehmen.^[58] Bei dieser Methode nimmt man eine Acetylfunktion als schlechte Abgangsgruppe am anomeren Zentrum und eine aufwändigere Reinigung zugunsten einer stark verkürzten Reaktionssequenz in Kauf. Die direkte Glycosylierung mit



Schema 6 Synthese eines Glycopeptid-Bausteins aus Glucose-pentaacetat **(6)** und *N*-Fmoc-Serin **(7)** für die Festphasensynthese (vgl. S. 36/37).

Fmoc-Aminosäuren wurde bislang nur im mg-Maßstab mit anschließender RP-HPLC durchgeführt, es gelang jedoch unter Schlenkbedingungen, und durch Verwendung von Molsieb 4 Å, die Ausbeute zu steigern. Das Hinzufügen von 0.1 % TFA zum Chromatographie-Laufmittel erlaubte die Reinigung des Produktes im Multigrammmaßstab an Kieselgel. Nach diesen Optimierungsschritten stand der einfache Glycopeptid-Baustein **(5)** für das FASTMOC[®]-Festphasenprotokoll nach einstufiger Synthese zur Verfügung. Damit wurde die vollautomatische Peptidsynthese in 0.25 mmol-Ansätzen möglich, obwohl hier große Überschüsse der einzelnen Monomere in jedem Kupplungsschritt eingesetzt werden mussten.

Die Einheitlichkeit der erhaltenen Derivate wurde durch analytische HPLC belegt. Mit Hilfe zweidimensionaler NMR-Experimente konnten alle NMR-Signale eindeutig zugeordnet werden. Die NMR-Spektren der Glycopeptid-Bausteine wurden in Aceton-D₆ aufgenommen, da dieses Lösungsmittel auch für die Analytik der fertigen Glycopeptide nach der Festphasensynthese

3. Synthesen von Glycopeptiden und Glycopeptidomimetika

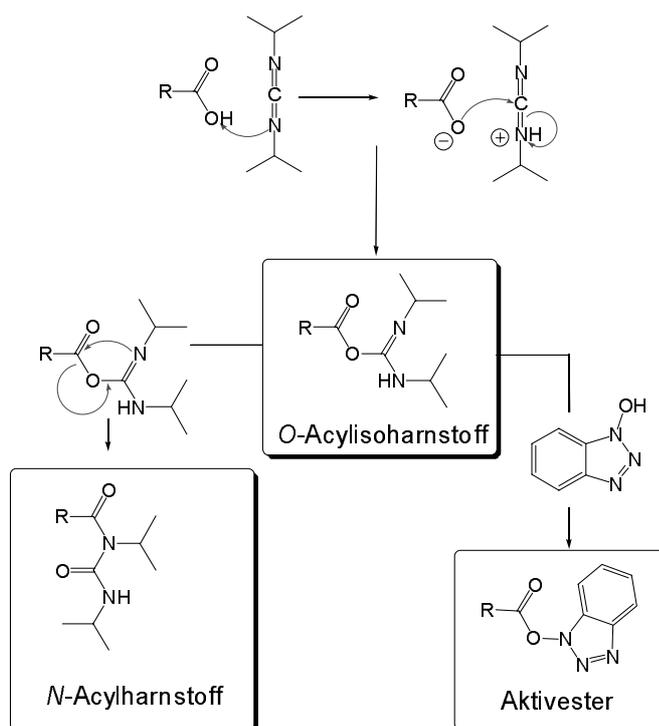
Verwendung fand, die sind in CDCl_3 völlig unlöslich sind. MeOH-D_4 war aufgrund der Signallagen der Lösungsmittelpeaks ungeeignet.

3.2 Festphasensynthese Elektrolumineszenz-markierter Glycopeptide

Zur Peptidsynthese wird heute ein breites Spektrum unterschiedlicher Methoden angewandt. Die Synthese kann dabei entweder in Lösung oder an fester Phase durchgeführt werden. Unabhängig von der Wahl der Kupplungsreagenzien wird die Elektrophilie des Carboxyl-Kohlenstoffs im Allgemeinen dadurch erhöht, dass ein Aktivester generiert wird, der bereitwillig mit der Aminkomponente zum Amid reagiert. Die Aktivierung der Carboxylgruppe erfolgt entweder mit Kupplungsreagenzien wie z. B. 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin (EEDQ) oder als O-Acylharnstoff mittels Carbodiimidreagenzien wie z. B. Diisopropylcarbodiimid (DIC), *N*-(3-Dimethyl-aminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC),^[60] oder als gemischtes Anhydrid.^[59] Die

bei der Reaktion mit Carbodiimiden drohende Bildung von unreaktiven *N*-Acylharnstoffen kann durch den Zusatz von Hilfsnukleophilen wie z. B. 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) oder *N*-Hydroxysuccinimid vermieden werden. Diese reagieren als gute Nucleophile schnell mit den O-Acylisoharnstoffen zu den entsprechenden Aminosäureaktivestern, bevor die Umlagerung zu den *N*-Acylharnstoffen erfolgen

kann. Moderne Kupplungsreagenzien vom Phosphonium- oder Uronium-Typ, wie das im Rahmen der hier beschriebenen Synthesen verwendete HBTU oder HATU führen ebenfalls zu Aktivestern, ohne die Zugabe eines weiteren



Schema 7 Mechanismus der Peptidkupplung unter Verwendung von DIC und HOBt.

Carbodiimids. Die so erzeugten reaktiven Carbonsäurederivate werden dann mit den Aminokomponenten zum erwünschten Peptid umgesetzt.

Im Unterschied zur Peptidsynthese in Lösung ist bei der Darstellung von Peptiden an fester Phase die erste Aminosäure meist mit ihrer Carboxyfunktion über eine selektiv spaltbare Ankergruppe (Linker) an einem polymeren Träger wie z. B. Polystyrolharz gebunden. In dieser Arbeit wurde Sieber-Amidharz als sehr säurelabile Festphase für die Synthese der Peptide mit potenziell säureempfindlichen Schutzgruppen verwendet. Die Abspaltung der Produkte kann mit TFA in sehr kurzen Reaktionszeiten oder mit verdünnter 1 %iger TFA-Lösung erfolgen. Sieber-Harze liefern oft höhere Ausbeuten als Rink-Amidharze aufgrund der geringeren sterischen Hinderung an der Aminogruppe des Linkers.

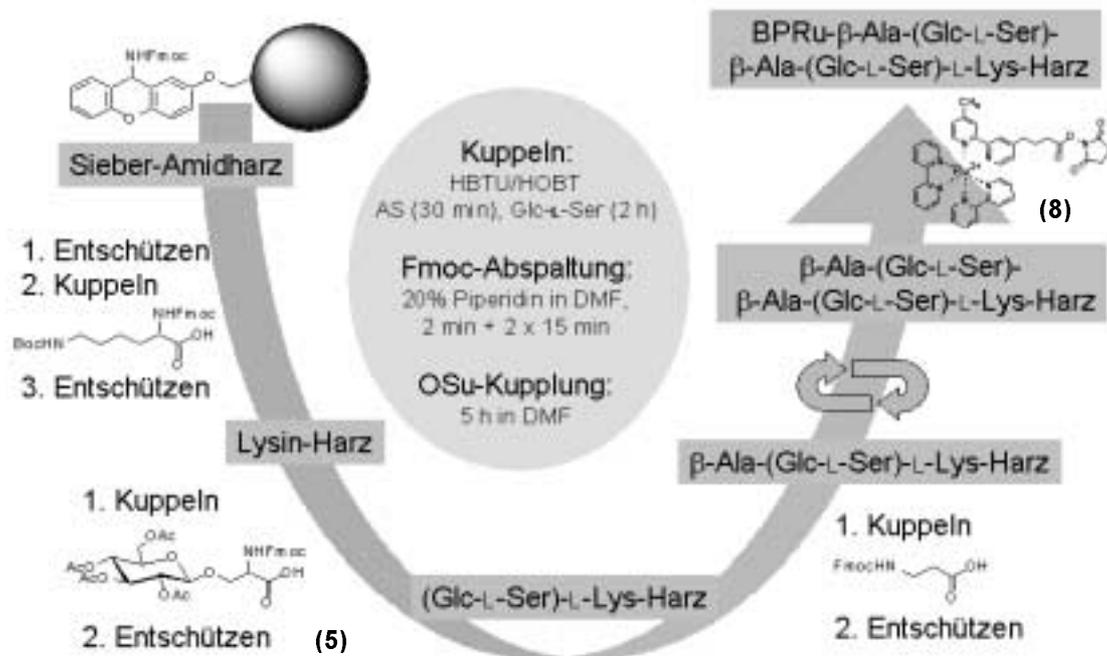
Die Ziel-Peptidsequenz wird dann durch alternierende Kupplungs- und Deblockierungsschritte am *N*-Terminus auf der festen Phase aufgebaut (Schema 8). Nach vollendeter Synthese kann das Zielpeptid durch Spaltung der Ankergruppe des Sieber-Harzes wahlweise im geschützten oder im deblockierten Zustand erhalten werden. Durch die Verankerung am polymeren Träger entfallen die zeitaufwändigen Reinigungsschritte zwischen den einzelnen Reaktionen. Der Überschuss der verwendeten Reagenzien kann durch einfaches Waschen des Harzes entfernt werden. Diese einfachen Syntheseschritte ermöglichen eine weitgehende Automatisierung der Peptidsynthese durch Syntheseroboter. Voraussetzung für die Automatisierung ist, dass alle Reaktionen an fester Phase in nahezu quantitativem Umfang stattfinden, da das bei unvollständigem Umsatz erhaltene Produktgemisch häufig schwer zu reinigen ist.

Für die Synthese von Peptiden an fester Phase haben sich zwei Methoden durchgesetzt. Bei der von Merrifield ursprünglich vorgeschlagenen *tert*-Butyloxycarbonyl/Benzyl (Boc/Bn)-Schutzgruppenstrategie werden die *N*-terminalen Aminogruppen Boc-geschützt, während die Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren von Schutzgruppen des Benzyl-Typs maskiert werden. Entfernt werden die Schutzgruppen in diesem Fall durch eine abgestufte Acidolyse. Die im Rahmen dieser Arbeit angewandte Methode wird als 9-Fluorenylmethoxycarbonyl/*tert*-Butyl (Fmoc/*t*Bu)-Methode bezeichnet.^[61] Dabei wird die Orthogonalität dieser beiden Schutzgruppen ausgenützt.

3. Synthesen von Glycopeptiden und Glycopeptidomimetika

Während die Fmoc-Gruppe von der *N*-terminalen Aminogruppe unter leicht basischen Bedingungen entfernt werden kann, werden die Seitenkettenfunktionalitäten durch säurelabile Schutzgruppen des *t*Bu- oder des Triphenylmethyl-Typs blockiert.

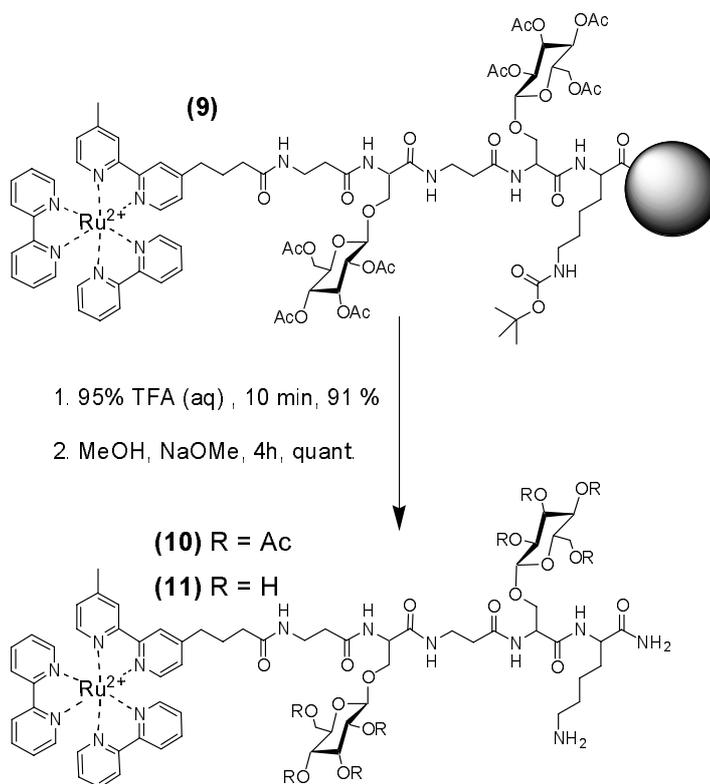
Die Peptidsynthese wurde automatisiert am ABI 433A-Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll „FASTMOC® 0.25 mmol chemistry“ durchgeführt.^[62] Dabei wurden die Peptidverknüpfungen mit einem 4-fachen Überschuss an anzuknüpfender Aminosäure und einem 3.6-fachen Überschuss an Kupplungsreagenzien (HBTU/HOBt) nach 3 min Voraktivierung in DMF durchgeführt. Der große Überschuss der Reaktanden gegenüber dem Harz half, Defektsequenzen zu vermeiden. Die Kupplungsdauer betrug 45 Minuten, bei glycosylierten Aminosäuren 2 h. Die Fmoc-Deblockierung wurde einmal 5 min und zweimal 20 min mit einer 20 %igen Lösung von Piperidin in DMF durchgeführt. Die Reaktionskontrolle der Fmoc-Deblockierung wurde über die photometrische Detektion des Piperidin-Fulven-Adduktes durchgeführt.^[63] Vollautomatisch synthetisiert wurde ein an zwei Positionen glycosyliertes Peptid der Sequenz β -Ala – Glc(OAc)-L-Ser – β -Ala – Glc(OAc)-L-Ser – L-Lys(Boc).



Schema 8 Sequentielle automatisierte Festphasensynthese des Glycopeptids (9).

Das erhaltene Peptid **(9)** wurde nachträglich auf dem Harz manuell mit dem Succinimidylester des Lumineszenzlabels **(8)** gekuppelt. Die Abspaltung vom Harz wurde mit 95 %iger TFA in 10 min realisiert, wobei die Boc-Schutzgruppe an der Lysin-Seitenkette ebenfalls entfernt wurde. Sieber-Amidharz würde auch eine Abspaltung bei viel mildereren Bedingungen unter Erhalt der Boc-Blockierung erlauben, da jedoch an der freien Aminogruppe weiter funktionalisiert werden sollte, waren die stark aciden Bedingungen in diesem Falle sinnvoll. Es wurde zunächst eine Probeabspaltung mit wenigen Harzkügelchen versucht,

um zu überprüfen, ob die Glycosidreste unter diesen Bedingungen stabil sind. Die HPLC/MS-Analytik des Probe-Abspaltproduktes zeigte einen Hauptpeak der Masse des gewünschten Peptids **(10)**. Damit konnte von einer Stabilität der Saccharidreste in TFA-saurem Medium ausgegangen werden und die Abspaltung der Hauptmenge der Substanz unter obigen Bedingungen vorgenommen werden.



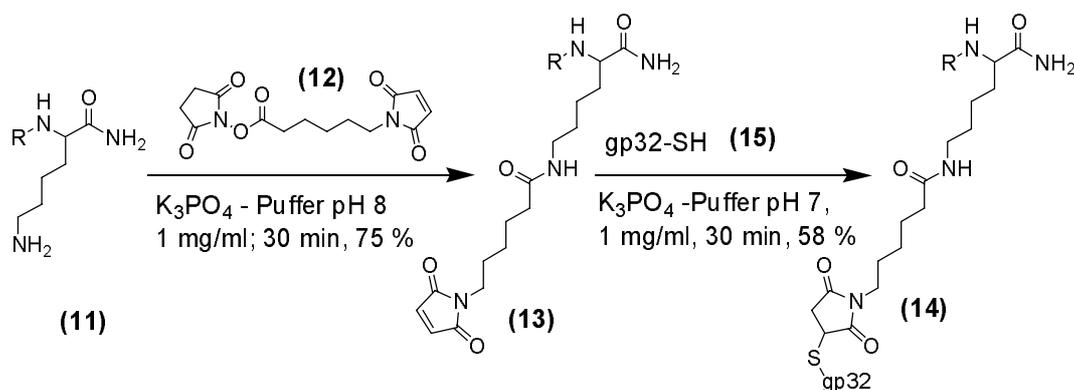
Schema 9 Abspaltung des Glycopeptids **(9)** vom Harz und anschließende Deblockierung der Hydroxylfunktionen am Zucker.

Aus der TFA-sauren Lösung konnte das leuchtend rote Peptid **(10)** durch die Zugabe von MTBE ausgefällt werden. Die präparative RP-HPLC des Produktes musste in Laufmitteln erfolgen, die 0.1 % TFA enthielten, da die rutheniierten Peptide ohne diesen Zusatz nicht zur Elution gebracht werden konnten. Die Peaks im Chromatogramm der präparativen HPLC wiesen häufig Schultern auf, weil das Rutheniumion unterschiedliche Gegenionen

3. Synthesen von Glycopeptiden und Glycopeptidomimetika

binden kann, was die Retentionszeit beeinflusste. Aufgrund des zweifach positiv geladenen Rutheniumions traten außerdem die Molekülpeaks im ESI-MS bei der halben Molekülmasse auf. Die Elementaranalyse der Ruthenium-Bipyridylkomplexe wurde dadurch erschwert, dass die Zusammensetzung der Gegenionen am Ruthenium nicht genau definiert war und die Verbindung zudem als Hydrat vorlag.

Die Deblockierung der Hydroxylfunktionen der Zuckerreste erfolgte unter Zemplén-Bedingungen mit 0.1 Eq. NaOMe in trockenem Methanol, zur Reaktionskontrolle wurden analytische HPLC-Läufe nach 2h, 3h und 4h vorgenommen. Nach 4h war das Produkt (**11**) in der HPLC einheitlich, so dass vor der weiteren Umsetzung keine Reinigung notwendig war. Das Methanolat durfte in diesem Fall nicht mit stark saurem Ionentauscher neutralisiert werden, da unter diesen Bedingungen nicht nur die Natrium- sondern auch die Ruthenium-Kationen ausgetauscht würden. Stattdessen wurde zur Aufarbeitung mit Essigsäure versetzt und mehrfach mit Toluol codestilliert. Wird eine zu konzentrierte Natriummethanolatlösung für die Entschützung verwendet, kommt es zu einer basischen Abspaltung der Zuckerreste; die Konzentration des Methanolats sollte unter 0.01 mol l^{-1} liegen um eine β -Eliminierung am Serinrest zum Dehydroalanin-Derivat zu verhindern.



Schema 10 Funktionalisierung der Lysin-Seitenkette des Glycopeptids (**11**), zunächst mit dem Maleimid-Linker (**12**), anschließend mit gp32 (**15**); (R: entsprechend Schema 9).

In der Literatur existiert eine Fülle von Varianten für die kovalente Verknüpfung von Biomolekülen mit optisch aktiven Markerstrukturen. Häufig realisiert man die Kupplung über die freie Aminofunktion von Lysin-Seitenketten des Biomoleküls mittels Isothiocyanat-, α -Bromacetamid- oder Aktivesterreagenzien.^[64] Eine weitere Variante ist die Funktionalisierung über

freie Thiol-Gruppen von Cystein-Seitenketten, die über α -Bromacetamid-, Vinylpyridin oder Maleinimid erfolgen kann. Unter diesen Gesichtspunkten fanden die weiteren Modifikationen des vorliegenden Lumineszenz-markierten Peptids (**11**) an der Seitenkette des *N*-terminalen Lysins statt, die für die Verknüpfung mit einem Thiol einer Cystein-Seitenkette aktiviert wurde (Schema 10). Zu diesem Zweck wurde ein Maleinimidylrest an einem Spacer mittels des Succinimidyl-Aktivesters der Maleinimidocaprinsäure (**12**) ans freie Amin der *N*-terminalen Lysin-Seitenkette gekuppelt. Diese Reaktion fand in 0.5 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8) statt, so dass aus der vorangegangenen Zemplén-Deacetylierung verbliebene Natriumsalze nicht störten. Überschüssiges Maleinimid-Reagenz wurde in einer präp. HPLC abgetrennt, wobei das aktivierte Peptid (**13**) in hoher Reinheit erhalten werden konnte.

Maleinimid ist in der Lage, Alkylierungsreaktionen mit freien Thiolgruppen auf der Oberfläche von Peptiden unter Bildung stabiler Thioether-Strukturen einzugehen.^[65] Das Peptid HIV gp32-SH (Boehringer Mannheim GmbH, Id. Nr. 1866192, Charge: 84487300-06) (**15**) stellt ein Peptidepitop aus dem HIV II-Virus dar, wobei gp32 für ein 32 kD-Glycoprotein steht, das neuerdings auch mit gp36 bezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um ein HIV II

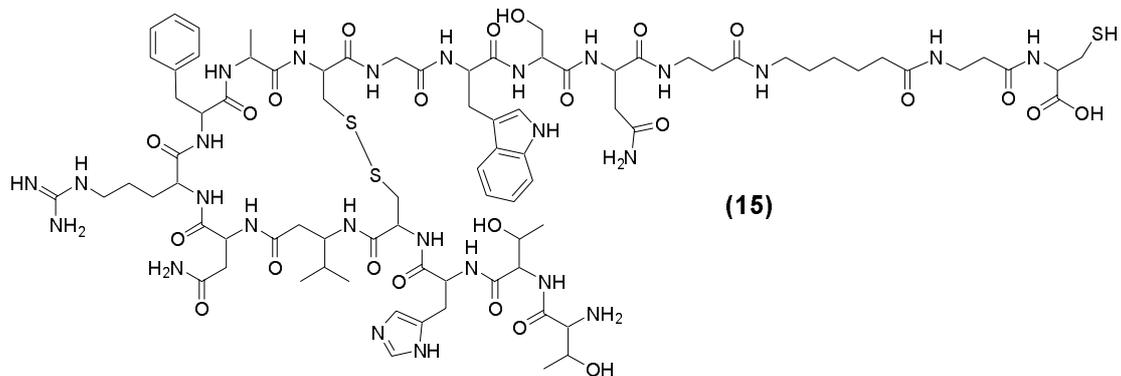


Abb. 12 Struktur von gp32-SH, einem Hapten, das in der HIV-Diagnostik eingesetzt wird.

Transmembranprotein, das daraus erstellte Epitop (**15**) (Abb. 12) wird von der Firma Roche Diagnostics als bioaktive Komponente im **Elektro-Chemo-Lumineszenz-Immuno-Assay** „ECLIA“ im Roche Immunoassay Analyseautomaten ELECSYS[®] in der AIDS-Diagnostik verwendet und mit dem hergestellten Lumineszenz-markierten Baustein (**13**) verknüpft.^{[66],[67]} HIV gp32-SH besteht aus 18 Aminosäuren und bildet eine intramolekulare

3. Synthesen von Glycopeptiden und Glycopeptidomimetika

Disulfidbrücke aus. Über einen weiteren terminalen Cysteinrest wird es mit dem Maleinimidylrest des ruthenylierten Glycopeptids **(13)** gekuppelt. Bei dieser Kupplungsreaktion war die Einhaltung eines pH Wertes um 7 von entscheidender Wichtigkeit, da die Gefahr bestand, dass das freie Thiol zum Disulfid dimerisiert. Das Epitop gp32-SH löste sich allerdings nicht in Phosphatpuffer pH 7, und musste deshalb zunächst in 1 %iger Essigsäure aufgenommen und dann schnell mit dem in Puffer gelösten BPRu-Peptid vermischt werden. Anschließend wurde der pH Wert wieder auf 7 eingestellt, dabei fiel das Peptidepitop aus und musste mit Hilfe von DMSO in Lösung gebracht werden. Nach erneuter präp. HPLC stand das Konjugat **(14)** für die Bewertung im ELECSYS[®] zur Verfügung (Schema 10).

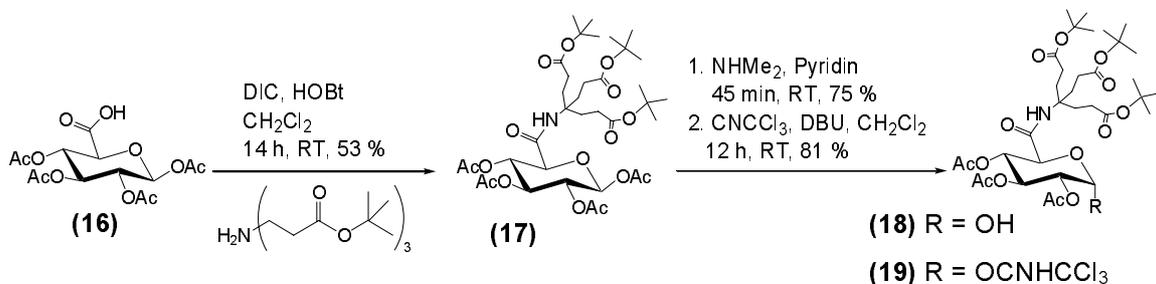
Die Struktur der erhaltenen Glycopeptide konnte NMR-spektroskopisch belegt werden. Die Spektren der Derivate **(10)** und **(11)** konnten mit Hilfe zweidimensionaler NMR-Methoden (¹H-¹H COSY, HSQC, HMBC) vollständig ausgewertet werden. Die Testergebnisse mit dem über ein Glycopeptid an gp32 gebundenen Elektrolumineszenzlabel **(14)** im ELECSYS[®] waren nicht zufriedenstellend. Die Saccharidreste bewirkten keine Verbesserung für das vorliegende Testsystem. Die Weiterführung dieser Arbeiten hängt maßgeblich von der Projektstrategie der Firma Roche Diagnostics ab.

3.3 Carboxyl-funktionalisierte Glycopeptid-Bausteine auf Glucuronsäurebasis

Nachdem kein Durchbruch bei der Verbesserung des Testsystems mit Glucose-modifizierten Peptidlinkern erreicht werden konnte, wurden Kohlenhydratstrukturen mit Carboxylresten für die Peptidmodifikation ins Auge gefasst, da diese einen nachweislich positiven Einfluss auf die Signaldynamik im BPRu-System ausüben.

Dabei kommen Aldon-, Aldar- und Uronsäuren in Frage, die sich von den Aldosen ableiten. Bei den Aldonsäuren ist die Aldehydgruppe am C-1 zur Carboxylgruppe oxidiert, bei den Aldarsäuren sowohl die Aldehydgruppe am C-1 als auch die Hydroxylgruppe am C-6, bei den Uronsäuren ist nur die Hydroxylgruppe am C-6 zum Carboxylat oxidiert. Bei den Ketaldonsäuren handelt es sich um Verbindungen, bei denen wie bei den Uronsäuren die Hydroxylgruppe am C-6 zur Carboxylgruppe oxidiert wurde. Sie leiten sich allerdings von den Ketosen ab, tragen also neben der Carboxylgruppe eine Ketogruppe als weitere reaktive funktionelle Gruppe. Neben diesen oxidierten Monosacchariden gibt es eine Reihe anderer Zucker, die Carboxylgruppen enthalten. Dazu gehören auch Sialin- und Neuraminsäuren, die jedoch aufgrund ihrer schlechten Verfügbarkeit keine Alternative zu den Oxidationsprodukten der Aldosen darstellten.

Für den Aufbau von Carboxyl-funktionalisierten Glycopeptidomimetika wurde von Glucuronsäure ausgegangen, die nach der Acetylierung der Hydroxylfunktionen die Säure **(16)** lieferte. Anschließend wurde versucht, einerseits am anomeren Zentrum über ein O- oder N-Glycosid eine Fmoc-geschützte Aminofunktion für die spätere Kupplung mit einem Peptid zu



Schema 11 Herstellung eines Glycosyldonors auf Glucuronsäurebasis für die O-Glycosidsynthese.

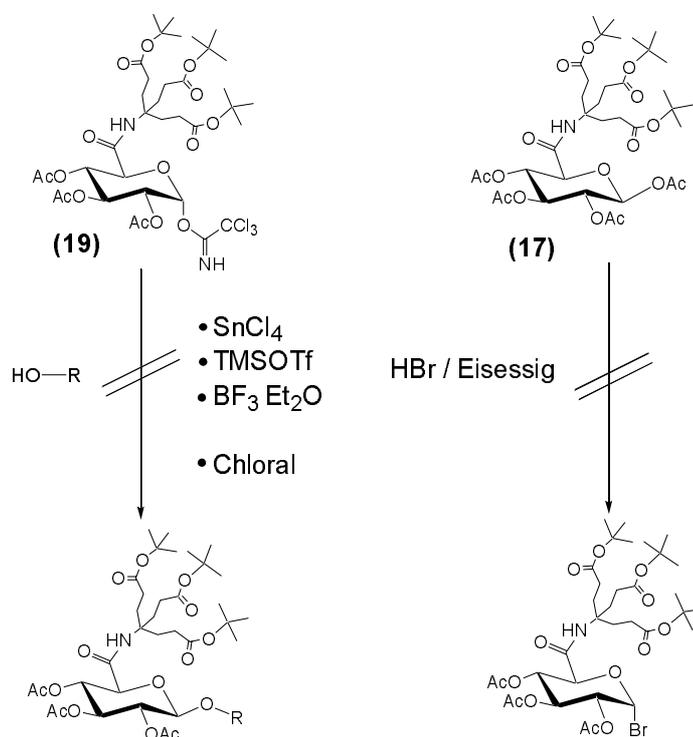
3. Synthesen von Glycopeptiden und Glycopeptidomimetika

etablieren und andererseits an der Carbonsäurefunktion Peptidchemie zu betreiben um eine Struktur mit mehreren *t*Bu-Funktionen zu erhalten. Diese sind zu den Acetylschutzgruppen orthogonal und nach der Peptidsynthese im Rahmen der Abspaltprozedur vom Harz sauer deblockierbar.

Tetraacetyl-Glucuronsäure (**16**) wurde dazu mit einem zuerst von Newkome et al.^[68] beschriebenen Amin verknüpft, das drei als *tert*-Butylester vorliegende Carboxifunktionen enthält. Die Peptidkupplung zum gewünschten Säureamid (**17**) gelang mit Hilfe gängiger Carbodiimidreagenzien. Die anschließende Aktivierung als Trichloracetimidat (**19**) für die O-Glycosidsynthese wurde durch selektive Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppe am anomeren Zentrum mit Dimethylamin in Pyridin und anschließende DBU katalysierte Umsetzung mit Trichloracetonitril^[69] realisiert (Schema 11).

Die Glycosidierung dieses Trichloracetimidates mit verschiedenen Fmoc-geschützten Aglyconen schlug jedoch vollkommen fehl, da auf der einen Seite mit Katalysatoren wie Chloral^[70] das Trichloracetimidat (**19**) nicht zur Reaktion gebracht werden konnte, andererseits die *tert*-Butylester bei der Glycosylierung unter

Lewissäure-Katalyse nicht stabil waren. Sowohl bei der Verwendung von SnCl₄ als auch von TMSOTf konnten bei der MALDI-ToF-Analytik der Reaktionsmischung intensive Signale der freien Mono- und Disäure beobachtet werden. Die genannten Lewis-sauren Reagenzien werden auch zur Entschützung von *tert*-Butylestern verwendet.^{[71],[72]} Auch bei einem BF₃·Et₂O-katalysierten Gly-

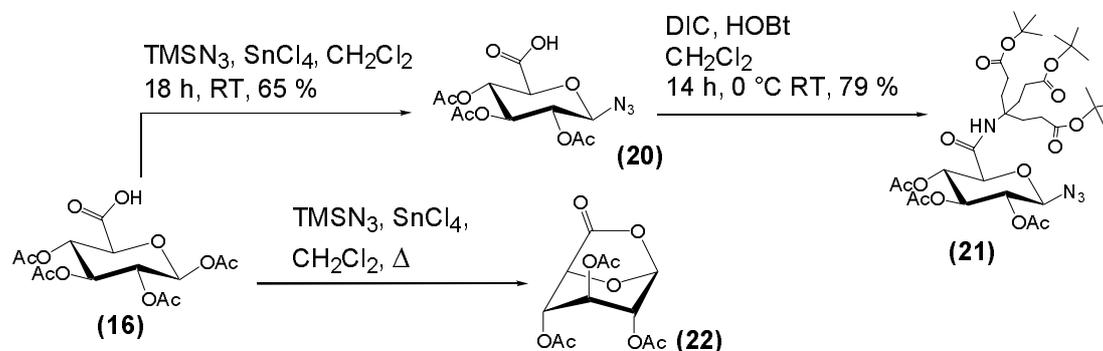


Schema 12 Glycosylierungsversuche mit dem Trichloracetimidat (**19**) und Versuch der Synthese eines Glycosylbromids.

3. Synthesen von Glycopeptiden und Glycopeptidomimetika

cosylierungsversuch wurde eine Spaltung der *t*Bu-Funktionen beobachtet, woraufhin auf weitere Versuche, *O*-Glycoside zu erhalten, verzichtet wurde. Auch bei einer Aktivierung des Glycosyldonors als Glycosylbromid, wie in Schema 12 gezeigt, kann nicht auf stark saure Bedingungen wie zum Beispiel HBr/Eisessig verzichtet werden, von denen man ebenfalls nicht erwarten kann, dass sie mit den *t*Bu-Estern kompatibel sind.

Bessere Vereinbarkeit mit *t*Bu-Funktionen wiesen die Methoden zur Herstellung von *N*-Glycosiden auf, diese können aus Glycosylaminen oder Glycosylaziden gewonnen werden. Glycosylamine können aus ungeschützten reduzierenden Zuckern hergestellt werden.^[73] Sie sind jedoch instabil, dimerisieren leicht zu Diglycopyranosylaminen^[74] und bilden leicht Anomeren-gemische.^{[75][76]} Glycosylazide sind stabile Precursor der Glycosylamine und werden aus Glycosylbromiden^[77] mit NaN₃ oder aus peracetylierten Sacchariden^[78] mit TMS-N₃ hergestellt. Da sie unter den Bedingungen einer Peptidkupplungs-Reaktion stabil sind, konnte die peracetylierte Glucuronsäure (**16**) zum korrespondierenden Glycosylazid (**20**) umgesetzt werden, bevor die Peptidkupplung zum Triester (**21**) stattfand. Bei der



Schema 13 Synthese des Glycosylazids (**20**) und Peptidkupplung zur Herstellung des Bausteins (**21**) für die *N*-Glycosidsynthese.

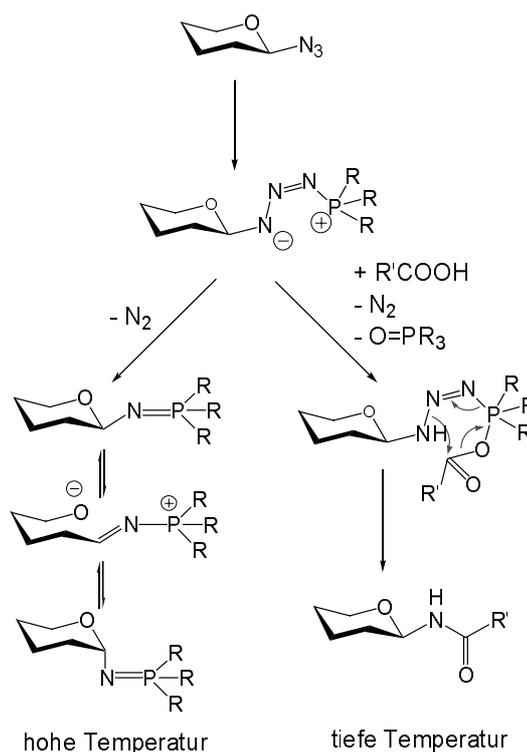
Umsetzung zum Azid sollte abweichend von der Literaturvorschrift^[78] das SnCl₄ langsam zugegeben oder unter Eiskühlung zugegeben werden, da sich die Reaktionsmischung sonst stark erwärmt und statt der Substitution zum Azid eine intramolekulare Cyclisierung zum Lacton (**22**) stattfand. Die Azidvariante hatte den Vorteil, dass die säurelabilen *t*Bu-Funktionen erst in der vorletzten Stufe der Reaktionssequenz ins Molekül eingebracht wurden. Die Umsetzung zum Glycosylamid kann entweder über das Glycosylamin

3. Synthesen von Glycopeptiden und Glycopeptidomimetika

nach hydrogenolytischer Reduktion des Azids oder in einer modifizierten Staudinger-Reaktion erfolgen, wobei direkt das Amid gebildet wird.

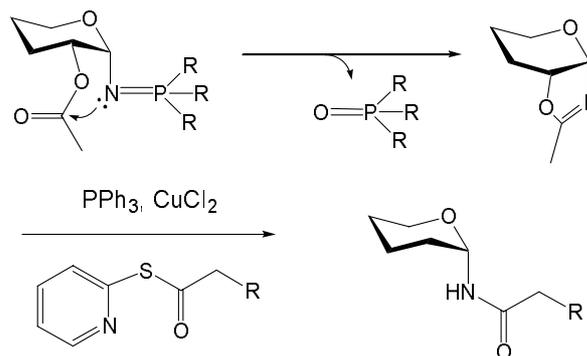
Die Staudinger-Reaktion^{[79],[80]} ist die Umsetzung einer Carbonsäure mit einem Azid in Gegenwart eines Trialkyl- oder Triarylphosphines zu einem Amid. In modifizierten Staudinger-Reaktionen werden aktivierte Carbonsäurederivate wie Säurechloride^[81] oder Aktivester^[78] eingesetzt. Als Mechanismus wird ein konzertierter intramolekularer Ablauf mit simultaner Eliminierung von Stickstoff und Bildung des Amids vorgeschlagen.^[82] Als Nebenprodukt

entsteht unter Abspaltung von Stickstoff stets auch ein Glycosylphosphazen-Derivat, das über eine offenkettige Struktur anomerisieren kann (Schema 14). Um die Bildung dieses Nebenproduktes zu minimieren, muss das Phosphin zuletzt zur Reaktionsmischung zugegeben und die Reaktion bei möglichst niedriger Temperatur durchgeführt werden. Die in der Literatur^[82] vorgeschlagenen Bedingungen ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ für CH_2Cl_2 und $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ für ACN) führten allerdings mit tri-*n*-Butylphosphin und freier Carbonsäure oder Säurechlorid nicht zum gewünschten Produkt. Auch das Arbeiten bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Verwendung von Aktivestern als Carbonylkomponenten führte mit tri-*n*-Butylphosphin in THF nicht zur Bildung des erwarteten Amids. Nur das hochreaktive und sterisch anspruchslose Trimethylphosphin führte bei RT zur Umsetzung des Azids zum erwarteten β -*N*-Glycosid. Diese Erkenntnis steht im Widerspruch zur Literatur.^[78] Dort wird bei der Verwendung von Trimethylphosphin ausschließlich die Bildung des Trimethyliminophosphazens beschrieben, was hier nicht reproduziert werden konnte.



Schema 14 Mechanismus der Staudinger-Reaktion mit Trialkylphosphin an Glycosylaziden.

Statt des oben beschriebenen intramolekularen, konzertierten Mechanismus wird für den Ablauf der Reaktion in der Wärme (85 °C) unter Ausschluss von Wasser auch ein anderer, über ein Glucopyranosyl-Isoxazolin verlaufender Mechanismus diskutiert.^[83] Nach der Bildung des Glycosylphosphaziden-Derivats mit Triphenylphosphin

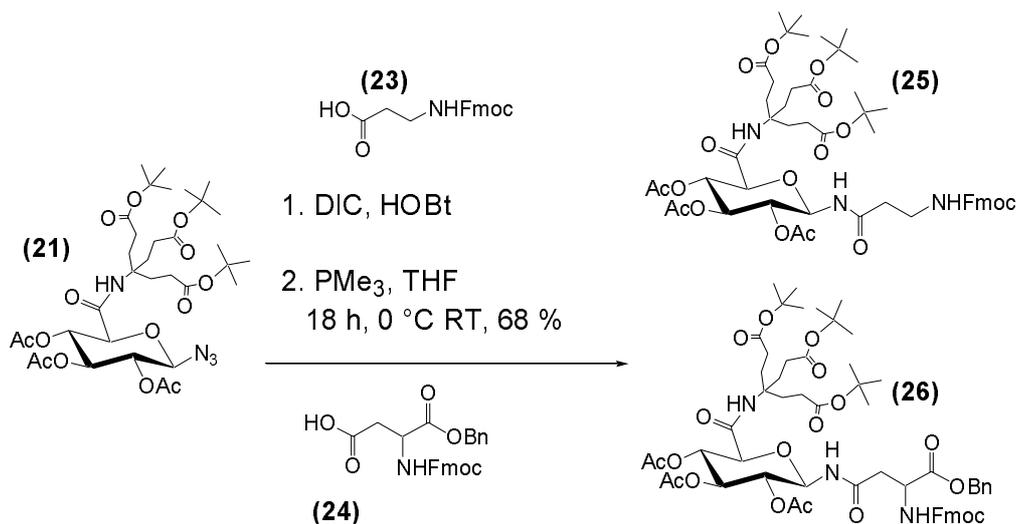


Schema 15 Mechanismus der Staudinger-Reaktion an Glycosylaziden bei Temperaturen um 85 °C unter Katalyse von CuCl₂.

reagiert das α -Anomer mit der Acetylgruppe am C-2 unter Bildung eines Isoxazolins (Schema 15), welches von verschiedenen reaktiven Carbonsäurederivaten, wie Chloriden oder Aktivestern, allerdings unter Bildung des α -Addukts, acyliert werden kann. Zur Erhöhung der α -Selektivität wird CuCl₂ als Additiv eingesetzt. Die besten Selektivitäten können mit den Thiopyridylestern der Carbonsäuren erreicht werden.

Zur Synthese eines Glycopeptido-Mimetikums mit mehreren Carboxyl-Funktionalitäten mussten neue Reaktionsbedingungen gefunden werden, da keine der bekannten Vorschriften mit den sperrigen *tert*-Butylestern realisierbar war. Mit dem sterisch wenig anspruchsvollen Trimethylphosphin und der als HOBt-Ester aktivierten Carbonsäure konnte sowohl mit Fmoc-geschütztem β -Alanin (**23**) als auch mit dem orthogonal geschützten Asparaginsäure-Derivat (**24**) ein *N*-Glycosid erhalten werden (Schema 16). In einer Eintopf-Synthese wurde zuerst die Carbonsäure in Anwesenheit des Azids mit DIC und HOBt bei 0 °C zum Aktivester umgesetzt, und anschließend bei 0 °C ein Überschuss einer 1 M Trimethylphosphin-Lösung in trockenem THF zugesetzt. Daraufhin wurde die Kühlung entfernt und über Nacht bei RT gerührt. Die Produkte (**25**) und (**26**) hatten im DC trotz ihrer unpolaren *tert*-Butyl- und Fmoc-Reste erstaunlich niedrige R_F-Werte (ca. 0.2 in EE/CY 1:1). Sie waren gut in Methanol löslich und konnten damit sowohl gelpermeationschromatographisch an Sephadex LH-20 als auch säulenchromatographisch an Kieselgel oder RP-Kieselgel gereinigt werden.

3. Synthesen von Glycopeptiden und Glycopeptidomimetika



Schema 16 *N*-Glycosidsynthese via modifizierter Staudinger-Reaktion zur Herstellung von Glycopeptid-Bausteinen.

Die Auftrennung der Reaktionsgemische an Kieselgel ist aufgrund des eingesetzten Überschusses an Aminosäure-Derivat nicht trivial, meist ist ein zweiter Reinigungsschritt an Sephadex-Medien erforderlich.

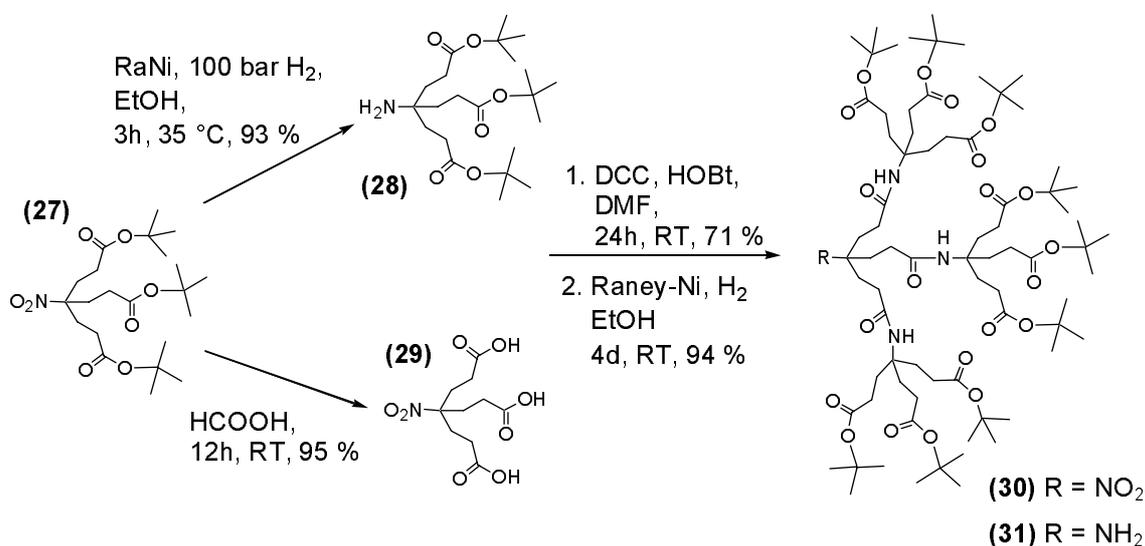
Die Staudinger-Reaktion eröffnete den Zugang zu Glycopeptidomimetika-Bausteinen wie **(26)**, die orthogonal *tert*-Butylester-geschützte Carboxylfunktionen in ihrer „Seitenkette“ aufweisen und somit zum FASTMOC[®]-Festphasenprotokoll kompatibel sind. In Form des Fmoc-geschützten Derivates **(25)** steht ein weiterer Baustein beispielsweise für die nachträgliche Funktionalisierung von Peptiden mit freien Glutaminsäure oder Asparaginsäure Seitenketten zur Verfügung.

4. Synthese 1,3-C-verzweigter Dendrimere und Glycodendrimere

Die Synthese von Dendrimern eröffnet den Zugang zu Core-Molekülen, die für die Darstellung multivalenter Glycocluster und Glycodendrimere geeignet sind. Die hier beschriebenen A_nX -Typ-Dendrimere können darüber hinaus nach einer Biotin-Funktionalisierung bei der Modifikation von Oberflächen eingesetzt werden. Ihre Verknüpfung mit Elektrolumineszenz-markierten Peptidlinkern macht sie für Anwendungen im Immunoassay interessant.

4.1 Amidische Dendrimere vom A_nX -Typ

Die Synthese dendritischer, hoch verzweigter Kaskadenmoleküle, aufgebaut durch amidische Verknüpfung verzweigter Aminotrisäuren, wurde zuerst von Newkome Anfang der 90er Jahre durchgeführt.^[84] Bei diesen Synthesen wurde von dem Nitrotriester **(27)**^[68] ausgegangen. Dieser wurde einerseits mit 95 %iger Ameisensäure zur Tricarbonsäure **(29)** gespalten,^[85] andererseits wurde die Nitrogruppe in einer heterogenen katalytischen Hydrierung mit



Schema 17 Orthogonal geschützte, A_nX -funktionalisierte, dendritische Bausteine.

Raney-Nickel zum Amin **(28)** reduziert^[68]. Bei dieser Umsetzung sind die sperrigen *tert*-Butylgruppen unerlässlich, da sie die intramolekulare Cyclisierung des entstehenden Amins zum Lactam bei Temperaturen unter 60 °C verhindern. Abweichend von der Literatur^[68] wurde die Hydrierung nicht bei einer Temperatur von 55 °C sondern bei stark erhöhtem Wasserstoffdruck

4. Synthese 1,3-C-verzweigter Dendrimere und Glycodendrimere

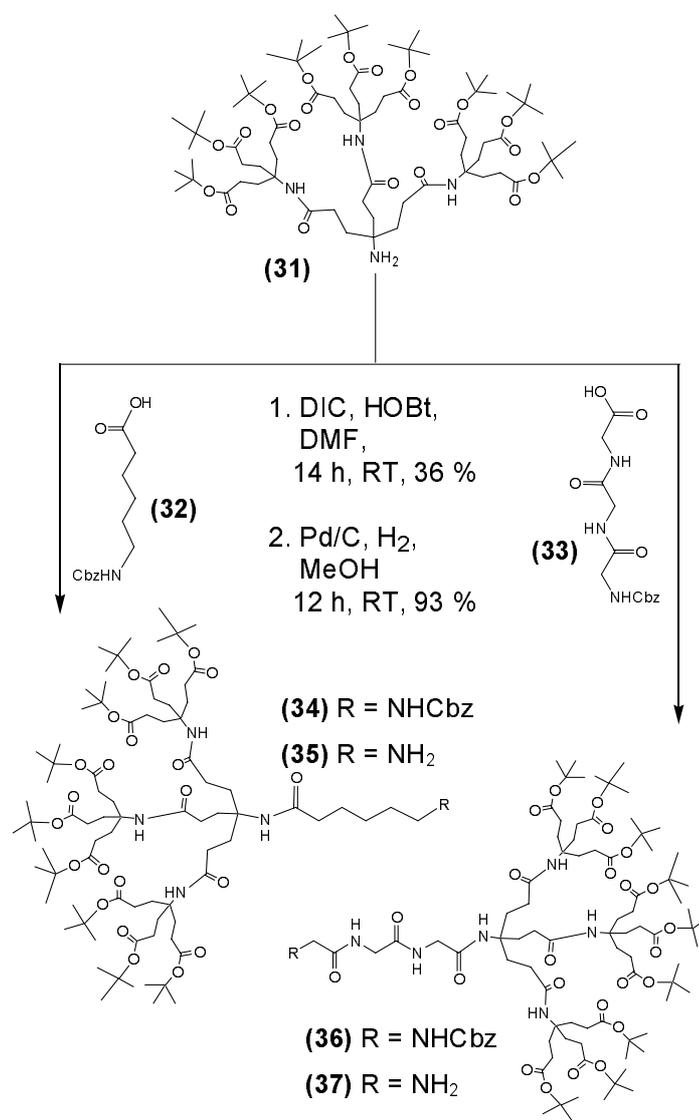
durchgeführt (Schema 17), wobei Drücke von 100 bar lediglich zur Erwärmung der Reaktionsmischung auf 35 °C führten. Unter den beschriebenen Bedingungen war keine Cyclisierung des Produktes feststellbar und die Ausbeute war nahezu quantitativ. Diese Reduktion musste in Ethanol erfolgen, da in Methanol das Edukt, die Nitroverbindung (**27**), für eine Reaktion zu schlecht löslich ist.

Die 1,3-C-verzweigten Polyamid-Dendrimere der 2. Generation zeichnen sich durch ihre Wasserlöslichkeit und ihren amphiphilen Charakter aus. Sie wurden in einer konvergenten Synthese aus Tricarbonsäure (**29**) und Aminotriester (**28**) in

einer Standard-Peptidkuppplungs-Reaktion mit DCC und HOBT in DMF hergestellt.^[86] Bei der

Überführung der Nitroverbindung (**30**) ins Amin (**31**) stellte sich die Nitrogruppe am fokalen Punkt als reaktionsträge heraus. Hier waren bei

einer Hydrierung mit frisch hergestelltem Raney-Nickel als Katalysator Reaktionszeiten von 4 bis 7 Tagen oder erhöhter Wasserstoff-Druck erforderlich. Ein Dendron-Aufbau aus relativ großen Unter-einheiten ist vorteilhaft, weil so die Abtrennung von Defektstrukturen



Schema 18 Spacer-Modifizierung der Aminofunktion am fokalen Punkt des Dendrons (**31**) zur Verbesserung der Reaktivität.

4. Synthese 1,3-C-verzweigter Dendrimere und Glycodendrimere

recht einfach mit Hilfe einer Chromatographie an Kieselgel möglich ist. So konnten wirklich monodisperse Produkte mit geringem präparativem Aufwand erhalten werden.

Die Aminogruppe am fokalen Punkt des Dendrons (**31**) erwies sich als relativ unreaktiv, was möglicherweise an sterischer Hinderung liegt. Deshalb wurden verschiedene Spacer am fokalen Punkt des Dendrons etabliert, um für die Kupplung des Dendrimers mit Peptiden oder Markerstrukturen reaktivere Aminofunktionalitäten verfügbar zu haben (Schema 18). Einerseits wurde ein flexibler Capryl-Spacer (**32**), andererseits ein rigiderer Triglycyl-Spacer (**33**)^[86] für die Funktionalisierung der fokalen Aminofunktion in (**31**) ausprobiert. Beide Spacer tragen jeweils eine *N*-Cbz-Gruppe, die eine zu den *tert*-Butylgruppen des Dendrons orthogonale Schutzgruppe ist. Die Ausbeuten bei den Umsetzungen zu Spacer-funktionalisierten Derivaten (**34**) und (**36**) waren, wie erwähnt, eher moderat. Auf eine Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde jedoch verzichtet, da das Dendron im Grammmaßstab verfügbar und die Spacer kommerziell erhältlich sind. Die Cbz-Schutzgruppen konnten mit guten Ausbeuten hydrogenolytisch abgespalten werden, die so erhaltenen Amine (**35**) und (**37**) wiesen im Vergleich mit (**31**) stark erhöhte Reaktivitäten der Aminogruppe auf.

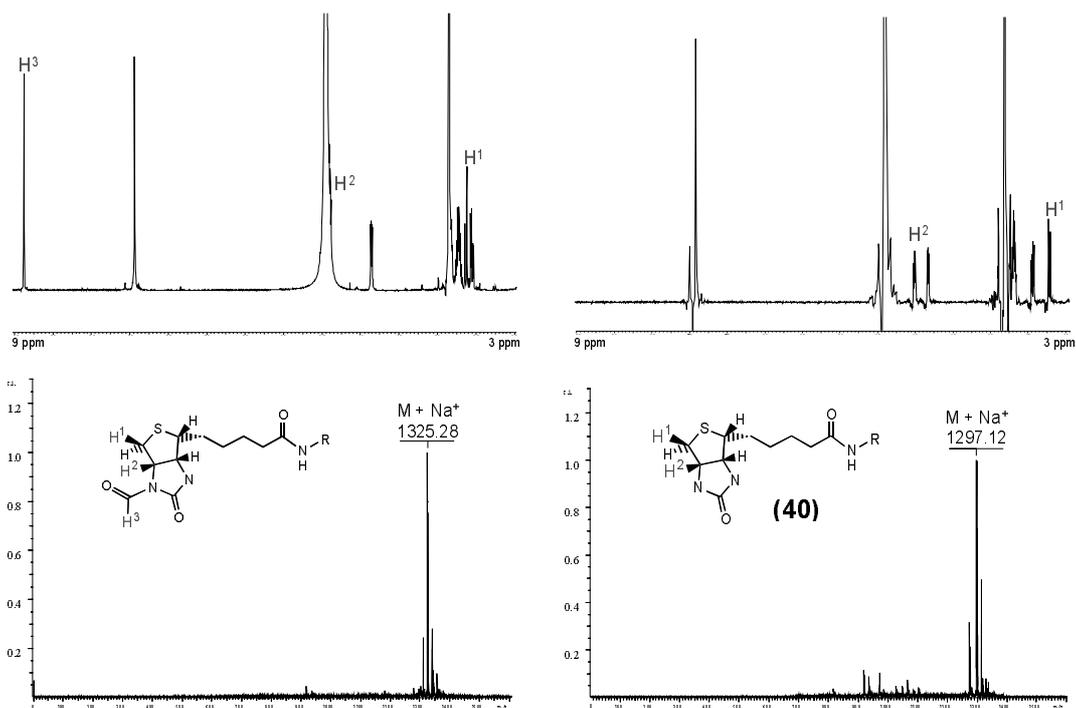
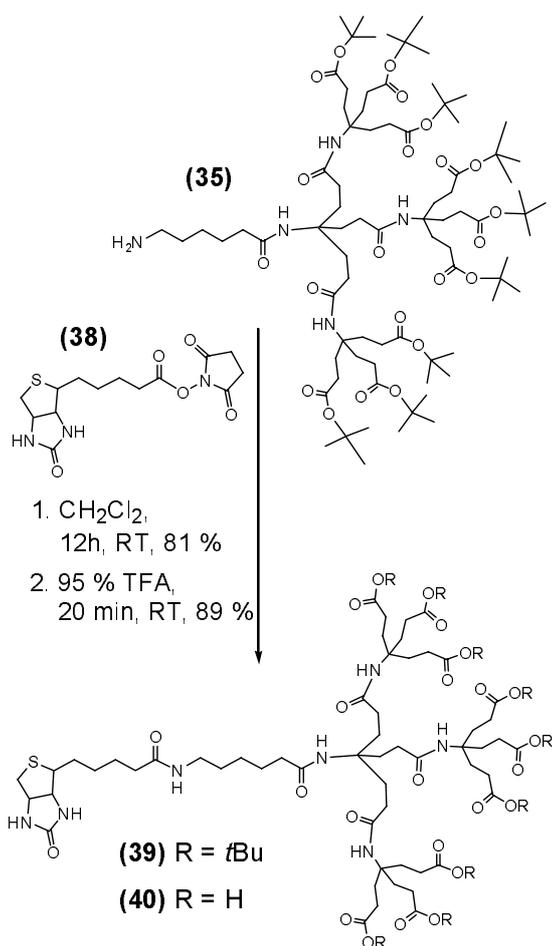


Abb. 13 NMR- und MALDI-ToF-Spektren des formylierten (links) und des nicht formylierten Biotin-Derivats (**40**) (rechts) nach der Deblockierung der *tert*-Butylester.

4. Synthese 1,3-C-verzweigter Dendrimere und Glycodendrimere

Die terminale Aminofunktionalität des Capryl-Spacers wurde für eine Biotin-Funktionalisierung des Dendrons **(35)** ausgenutzt. Diese Biotinylierung wurde auf zwei verschiedenen Wegen versucht; zum einen mit Carbodiimid-Kupplungschemie unter Verwendung von DIC/HOBt als Reagenzien, zum anderen unter Verwendung des Biotinsuccinimidylesters **(38)** als Biotinylierungs-Agens. Die zweite Variante erwies sich als deutlich effektiver. Der Einsatz eines leichten Überschusses des Aktivesters führte in CH_2Cl_2 zur vollständigen Umsetzung zum Kupplungsprodukt, während die Carbodiimid-Kupplung selbst mit größeren Überschüssen der Säurekomponente zu einem Substanzgemisch führte, das in der GPC schlecht zu reinigen war und eine Reihe von Mischfraktionen lieferte. Somit wurde der Einsatz des teuren Succinimidylesters durch die deutlich höhere Ausbeute gerechtfertigt (Schema 19).

Bei der abschließenden Entschützung der *tert*-Butylester am Dendron **(39)** konnte man bei den biotinylierten Derivaten nicht auf 95 %ige Ameisensäure als Deblockierungsreagenz zurückgreifen, da es hierbei zu einer *N*-Formylierung des Biotins an der Harnstoff-Substruktur kam. Bei der Reinigung des entstehenden Substanzgemisches in der HPLC wurde überwiegend das Monoformylprodukt isoliert, das nicht formylierte Biotin-Derivat **(40)** wurde nur als Nebenprodukt erhalten. Dies wurde anhand der NMR- und MALDI-ToF-Spektren deutlich (Abb. 13). Im NMR des formylierten Derivates sieht man das Formyl-H bei einer Verschiebung von 9 ppm



Schema 19 Peptidkupplung unter Verwendung eines Succinimidylesters und anschließende Spaltung der *tert*-Butylester zur Gewinnung des Biotin-Derivates **(40)**.

sowie einen deutlichen Tieffeld-Shift der im Bicyclus benachbarten Wasserstoffe. Die im MALDI-ToF-MS gemessene Massendifferenz von 28 entspricht genau der Formylgruppe.

Bei der Verwendung von 95 %iger TFA als Esterspaltungsreagenz wurde dagegen fast ausschließlich das gewünschte Produkt (**40**) erhalten (Schema 19). Dieses kann für die Modifikation von Oberflächen in der Biosensorik eingesetzt werden. Biotin zeigt eine äußerst starke Bindung an Avidin, einem tetrameren Protein, das aus vier fest assoziierten Untereinheiten (zu je 17000 g mol^{-1}) besteht. Jede dieser Untereinheiten bindet ein Biotin-Molekül mit einer K_D von 10^{-15} M , bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und pH 7 entspricht das einer Dissoziationshalbwertszeit von 200 Tagen.

4.2 Dendron-Funktionalisierung von BPRu-markierten Peptiden

Es ist eine Vielzahl dendritischer Makromoleküle bekannt, die Ruthenium-Bipyridyl-Komplexe als Substruktur enthalten.^[87] In diesen Beispielen dienen die Metallzentren allerdings meist zum Aufbau supramolekularer Netzwerke, zur Verknüpfung von Dendronen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip^[88] oder zur Synthese heterogener Photokatalysatoren zur Zersetzung von Wasser durch Sonnenlicht.^[89] Die Auswirkungen von Dendrimern auf die photophysikalischen Eigenschaften von Ruthenium-Komplexen wurden erstmals von Vögtle et al. betrachtet.^[90] Dabei wurde im Falle eines Frechet-Typ-Dendrimer-Ru(BiPy)₃-Komplexes^[91] eine intensivere Emission und eine verlängerte Lebensdauer des angeregten Zustandes des Metallzentrums beobachtet. Dieser Einfluss tritt auch bei BPRu-Komplexen auf, die an dendritisch verzweigte Peptide wie **(41)** gebunden sind.^[92] Die Verzweigung wird hier an Glutaminsäureseitenketten erreicht, die an fester Phase mit weiteren Carbonsäurederivaten umgesetzt werden. Man erhält so peptidische Derivate mit mehreren terminalen Carboxylgruppen, die eine zusätzliche positive

Auswirkung auf die Lebensdauer des angeregten Zustandes des Rutheniumions zeigen (Abb. 14).

Aufgrund dieser vielversprechenden Vorergebnisse wurde versucht, ruthenylierte Peptide mit dendritischen Strukturen zu verknüpfen, die terminale Carboxyl-

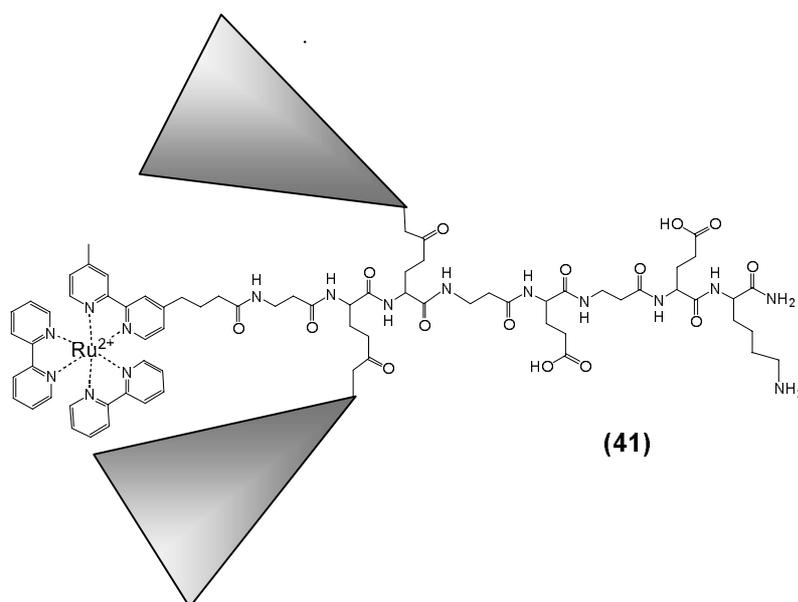
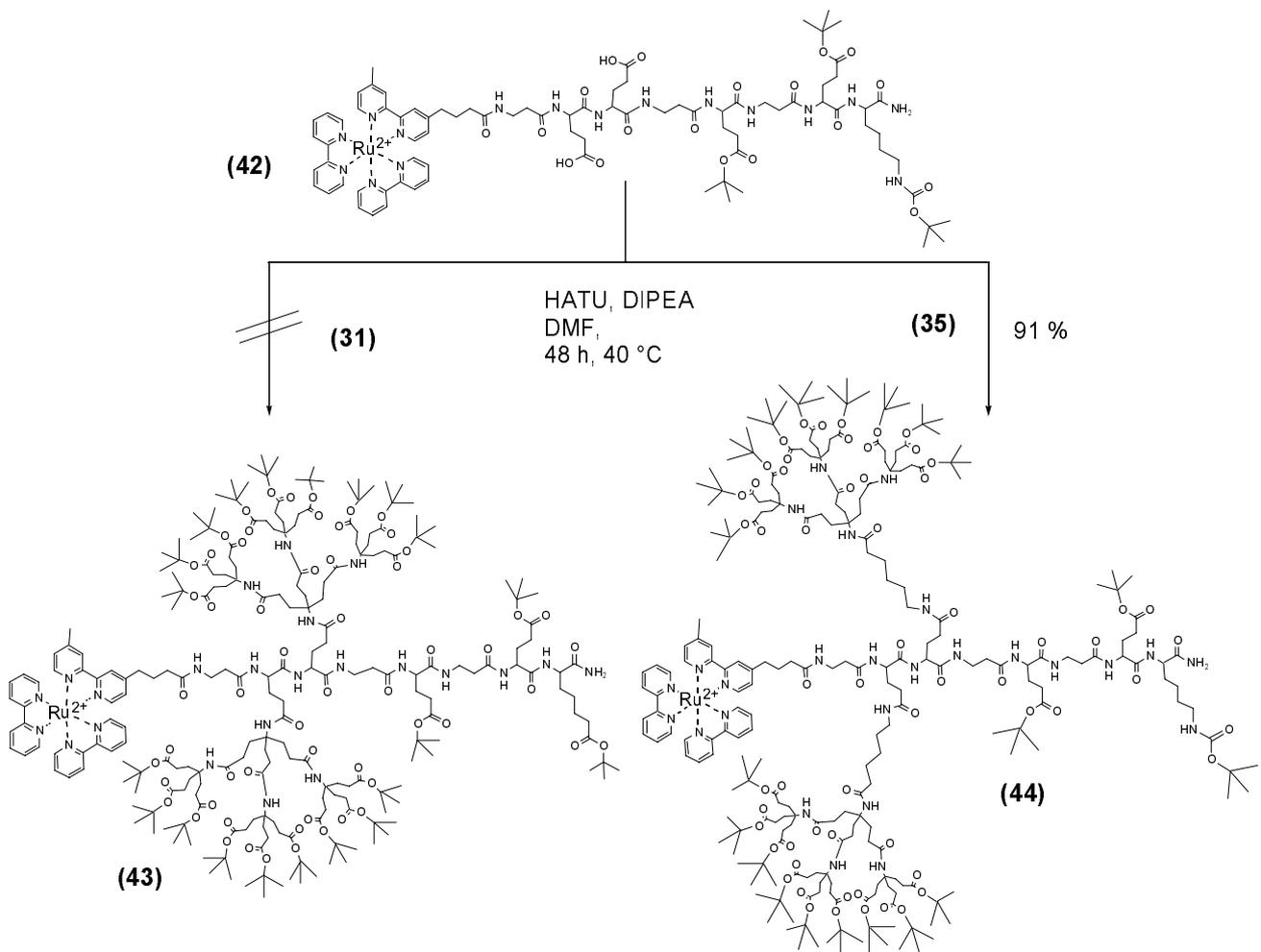


Abb. 14 Schematische Darstellung eines zur Verlängerung der Lebensdauer des angeregten Zustandes des BPRu-Systems von Roche Diagnostics eingesetztes Linker-Peptid. Die graphischen Platzhalter stehen für carboxyl-funktionalisierte Substrukturen

4. Synthese 1,3-C-verzweigter Dendrimere und Glycodendrimere

gruppen tragen. So wurde eine weitere Verlängerung der Lebensdauer des angeregten Zustandes des Ruthenium-Bipyridyl-Komplexes angestrebt. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, derartige Dendron-funktionalisierte Peptide zu erhalten. Einerseits kann man Dendrone mit orthogonal geschützten Aminosäurederivaten am fokalen Punkt in die Festphasen-Peptidsynthese einspeisen, andererseits können ruthenylierte Peptide vor oder nach der Abspaltung vom Harz mit Dendronen funktionalisiert werden. Da es in der Literatur bisher keine Beispiele für Festphasensynthesen mit ähnlichen dendritischen Bausteinen gibt und damit umfangreiche Untersuchungen zur Wahl eines geeigneten Harzes und der Kupplungsbedingungen nötig wären, wurde die Konjugation eines BPRu-Peptids mit den Dendronen in Lösung realisiert.

In einer automatisierten Festphasensynthese wurde dazu zunächst das



Schema 20 Nachträgliche Dendron-Funktionalisierung eines BPRu-Peptids aus der Festphasensynthese.

ruthenylierte Peptid (**42**) dargestellt, das neben einer Boc-geschützten Lysin-Seitenkette zwei als *tert*-Butylester vorliegende Glutaminsäure- sowie zwei freie Glutaminsäure-Seitenketten enthielt. Diese Carboxylgruppen sollten in einer Peptidkupplungsreaktion in Lösung mit den dendritischen Aminen (**31**) und (**35**) gekuppelt werden. Daraufhin sollte an der Lysin-Seitenkette das gp32-Peptidepitop etabliert werden, um eine im ELECSYS®-Testsystem zu bewertende Substanz zu erhalten.

Die Umsetzung des BPRu-Peptids mit dem Amin (**31**) in DMF unter Verwendung von HATU als Peptidkupplungsreagenz gestaltete sich recht schwierig. Zwar reagierte eine der freien Glutaminsäurefunktionen zum Teil mit einem Dendron, danach war jedoch die zweite Carboxylfunktion offenbar sterisch so stark abgeschirmt, dass die Reaktion mit der ohnehin unreaktiven fokalen Aminogruppe eines weiteren dendritischen Amins (**31**) nur in sehr geringem Umfang stattfand.

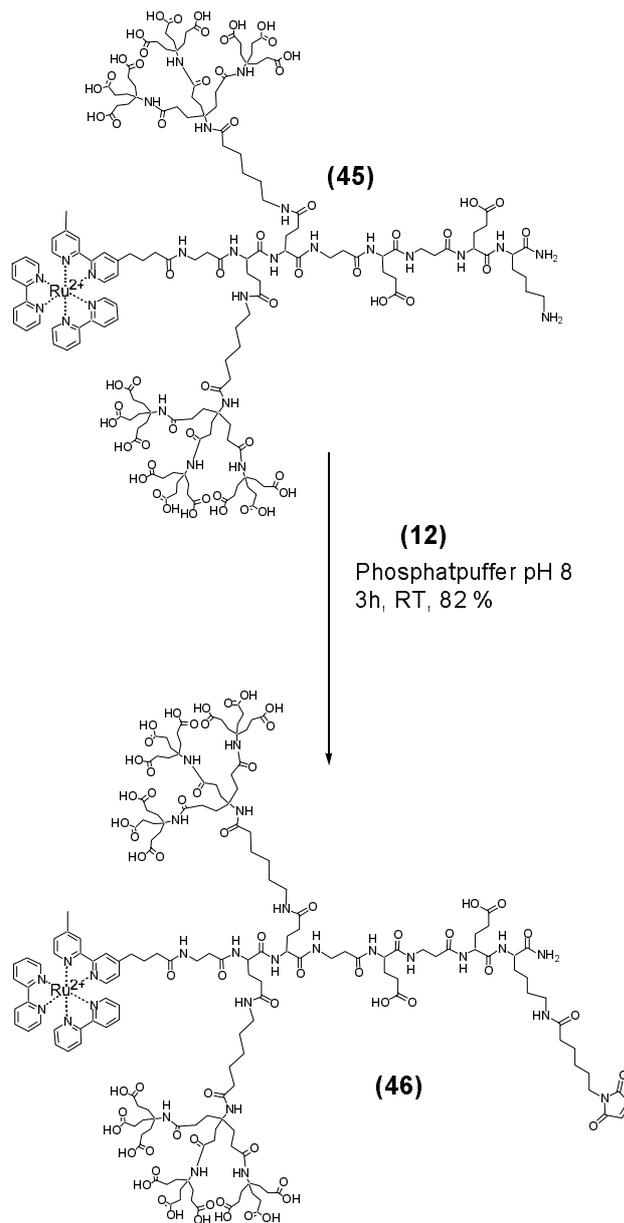
Die Isolierung solcher Derivate war nur mit Hilfe der GPC an Sephadex-Medien möglich, während eine Chromatographie an Kieselgel sehr polare Solventien wie MeOH/CH₂Cl₂-Gemische erforderte, und nicht zu einer Trennung der verschiedenen ruthenylierten Fraktionen führte. Reversed-Phase-Kieselgel zeigte so starke Wechselwirkungen mit den über 20 *tert*-Butylestergruppen des Moleküls, dass mittels ACN keine Elution von RP-18 oder RP-8 Medien erreichbar war. Aufgrund des Verhaltens der ruthenylierten Peptide an Kieselgel war auch eine Verfolgung des Reaktionsverlaufes via DC nur sehr eingeschränkt möglich, die Reaktionsverfolgung per MALDI-ToF war nur bei Verwendung der recht ungebräuchlichen Matrix 6-ATT realisierbar, wobei zu beachten ist, dass quantitative Aussagen auf der Grundlage von MALDI-ToF Spektren generell problematisch sind.

Aufgrund der unzureichenden Reaktivität des Amins (**31**) wurde die Kupplung mit dem sterisch weniger gehinderten und daher reaktiveren Amin (**35**) versucht, das mit einem Capryl-Spacer ausgestattet war. Mit diesem Baustein verlief die Reaktion in sehr guter Ausbeute bis zum di-funktionalisierten Produkt, das durch GPC an Sephadex LH-60 mit Methanol als Eluent gereinigt wurde (Schema 20). Die Analytik des *tert*-Butylesters (**44**) wurde massenspektrometrisch via MALDI-ToF durchgeführt. NMR-spektroskopische

4. Synthese 1,3-C-verzweigter Dendrimere und Glycodendrimere

Messungen waren nur bedingt aussagekräftig, da, anders als im Falle des Glycopeptids (**10**), durch das Vorhandensein einer Vielzahl von chemisch sehr ähnlichen CH₂-Gruppen keine eindeutige Zuordnung der Signale möglich war. Die Reinheit des erhaltenen Produktes (**44**) wurde erst nach der Abspaltung der *tert*-Butylester zu (**45**) per analytischer HPLC überprüft. Ein analytisches HPLC-Chromatogramm des komplett blockierten Produktes konnte dagegen nicht erhalten werden. Ein Reinheitsbeweis per Elementaranalyse gelang aufgrund der nicht bekannten Gegenionen am Ruthenium nicht, die gefundenen C-, H- und N-Werte lagen weit unter den erwarteten Werten.

Die *tert*-Butylgruppen aus (**44**) wurden mit 95 %iger Ameisensäure abgespalten, wobei man in nahezu quantitativer Ausbeute ein weitgehend einheitliches Produkt (**45**) erhielt, das sich problemlos per präparativer RP-HPLC reinigen ließ. Nach analytischer HPLC lag die Reinheit dieses Konjugates bei 97 %. Die weiteren Umsetzungen fanden an der Aminofunktion der Lysin-Seitenkette statt (Schema 10). Wie im Falle des Glycopeptids (**11**) wurde zunächst ein Maleinimidocapryl-Spacer eingeführt, der anschließend mit gp32-SH funktionalisiert wurde.



Schema 21 Funktionalisierung der Lysin-Seitenkette des Peptids (**45**) mit Maleinimid-Linker (**12**).

4. Synthese 1,3-C-verzweigter Dendrimere und Glycodendrimere

Bei der Umsetzung der Aminofunktion an der Lysin- Seitenkette von **(45)** mit dem Succinimidylester des Capronsäure-*N*-Maleinimids **(12)** in gepufferter Lösung war vor dem Reinigungsschritt in der präparativen HPLC die Einstellung eines sauren pH Wertes unerlässlich. Im Kalium-Hydrogenphosphat-Puffer (pH 8), in dem die Funktionalisierung des Lysins von **(45)** stattfand, lagen die 20 freien Carboxylfunktionen des BPRu-Peptids **(46)** in Form ihrer Kaliumsalze vor, diese eluierten von RP-8-Kieselgel mit 100 % Wasser nach der Totzeit der Säule, weshalb keine Trennwirkung erreicht werden konnte (vgl. Kapitel 8.2 Abb. 17 oben). Die nach Einstellen der Lösung auf pH 4 vorliegenden protonierten Carbonsäurefunktionalitäten des BPRu-Peptids **(46)** ermöglichten dagegen dessen reibungslose chromatographische Reinigung (Abb. 17 unten).

Die Kupplung des gp32-Thiols **(15)** mit der Doppelbindung des Maleinimids schlug fehl, da bei dieser Umsetzung eine exakte Kontrolle des pH Wertes in der Reaktionslösung unverzichtbar ist. Die Reaktion sollte bei einem pH von 7.2 in Phosphatpuffer gelingen, das freie Thiol des Peptidepitops gp32 war unter diesen Bedingungen jedoch unlöslich. Es wurde in wenig 1 %iger wässriger Essigsäure aufgenommen und mit dem in Phosphatpuffer pH 7 gelösten BPRu-Peptid **(45)** gemischt. Danach sollte der pH Wert auf 7.2 eingestellt werden um eine Dimerisierung von gp32-SH zu unterdrücken. Bei diesem pH Wert fiel jedoch das gp32 aus und wurde mit wenig DMSO wieder in Lösung gebracht. Da nur sehr geringe Mengen gp32-SH zur Verfügung standen, musste in Lösungsmittelvolumina unter 0.5 ml gearbeitet werden. Bei dieser Ansatzgröße war, aufgrund des Fehlens einer pH-Mikroelektrode, keine exakte Einstellung des pH Wertes möglich. Die Zielmasse konnte in der Pufferlösung der Reaktionsmischung nicht detektiert werden. Auch nach der präp. HPLC konnte in keiner der BPRu-haltigen Fraktionen die Masse des gp32-Konjugates nachgewiesen werden.

4.3 Selektiv funktionalisierbare Glycodendrimere

Die Funktionalisierung der Peripherie dendritischer Makromoleküle mit Zuckerstrukturen ist für eine Vielzahl von Anwendungen im Bereich der bioorganischen Chemie interessant.^[37] Diese „Zuckerummantelung“ von nicht-Kohlenhydratstrukturen wird vor allem zur Mimikrierung komplexer Oligosaccharidstrukturen und multiantennärer Glykokonjugate angewandt. Das Konzept hinter diesem Ansatz geht davon aus, dass bei der molekularen Erkennung komplexer Kohlenhydratstrukturen durch Lektine vor allem die Zuckerstrukturen an der Peripherie von Glykokonjugaten relevant sind und bei einem Ersatz des komplexen Saccharidgerüsts im Inneren dieser Kohlenhydrat-Strukturen durch Dendrimere die biologische Aktivität erhalten bleibt. A_nX -Typ-Dendrimere bieten neben ihrer verzweigten Struktur, die sich

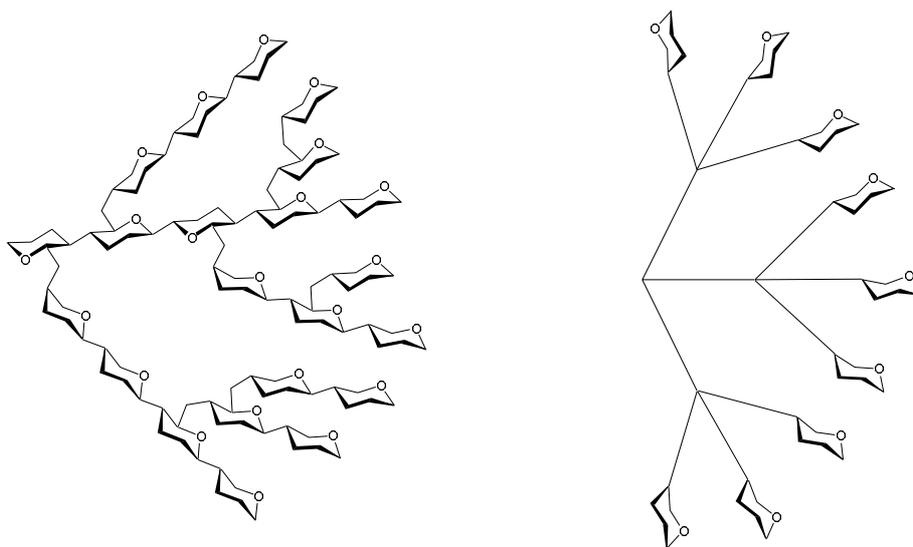


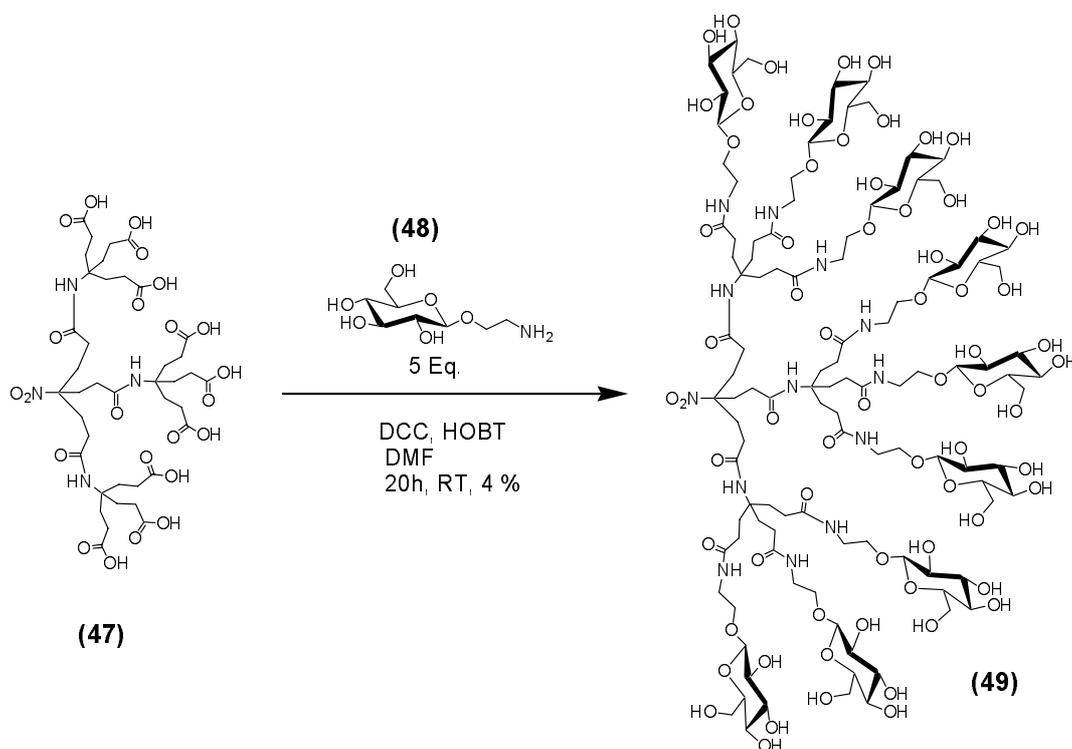
Abb. 15 Schematische Gegenüberstellung eines Oligosaccharids (links) und eines dendritischen Oligosaccharid-Mimetikums (rechts).

für die multivalente Präsentation von n bestimmten Kohlenhydrat-Epitopen eignet, auch den Vorteil einer unterscheidbaren funktionellen Gruppe X , die z. B. für die Umsetzung mit Markerstrukturen oder die Einbindung einzelner Dendrimere in größere molekulare Verbände zur Verfügung steht.

Die Saccharid-Funktionalisierung größerer dendritischer Moleküle und ihre Analytik ist nicht trivial. Um die Erfahrungen, die in dieser Arbeit mit 1,3-C-verzweigten A_nX -Typ-Dendrimern gesammelt wurden, im Zusammenhang mit der Synthese von Glycodendrimern zu nutzen, wurde in Analogie zu

4. Synthese 1,3-C-verzweigter Dendrimere und Glycodendrimere

früheren Arbeiten^{[94],[95]} versucht, Dendrimere höherer Generation mit Zuckern zu ummanteln. Dazu wurde der *tert*-Butylester (**30**) durch 95 %ige Ameisensäure in die Nonacarbonsäure (**47**) überführt^[85], die anschließend einerseits mit Aminoethyl-glucopyranosid (**48**) und dem entsprechenden Mannosid (**51**)^[96] in einer Peptidkupplungsreaktion umgesetzt wurde (Schema 22). Da das Aminoethylglucosid im Multigrammaßstab zur Verfügung stand, wurde die Kupplung mit einem großen Überschuss an Aminokomponente mit den klassischen Carbodiimidreagenzien und HOBT als Hilfsnucleophil versucht. Bei der Verfolgung des Reaktionsverlaufes im MALDI-ToF wurden trotz der Variation der Reaktionsbedingungen im Hinblick auf Dauer, Temperatur und Aminüberschuss immer Defektstrukturen detektiert, bei denen die Peptidkupplung an nur 7 oder 8 Säurefunktionen stattgefunden



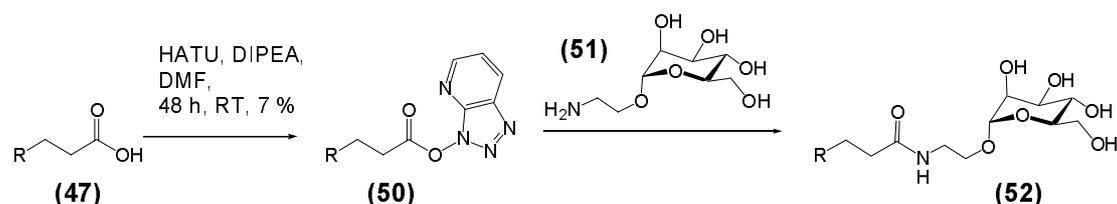
Schema 22 „Zuckerummantelung“ der Nonacarbonsäure (**47**) in einer Peptidkupplungsreaktion mit Aminoethyl-glucosid.

hatte. Überschüssiges Glucosid (**48**) wurde mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie abgetrennt. Bei den Defektstrukturen, die eine Massendifferenz von nur 204, bzw. 408 zum strukturperfekten Produkt (**49**) aufwiesen, war dagegen mit dieser Methode keine Trennung zu erzielen, so

dass hier ein zusätzlicher Reinigungsschritt mit Hilfe der präp. HPLC notwendig war.

Die Ausbeute an isoliertem Produkt lag bei dieser Reaktion vor allem aufgrund der aufwändigen Reinigung bei nur 4%, da ausschließlich die ersten Produktfraktionen aus der GPC, in denen das Nonaglycosid (**49**) am stärksten angereichert vorlag, für die abschließende HPLC-Reinigung verwendet wurden.

Das mannosylierte Analogon zum Glycodendrimer (**49**) wurde dann in einer Peptidkupplungsreaktion mit Nonasäure (**47**) und Aminoethyl-mannosid (**51**) unter Verwendung von HATU als Kupplungsreagenz synthetisiert. Trotz des Einsatzes des hochreaktiven Azabenzotriazol-Esters (**50**) wurden, wie schon beim Gluco-Derivat, Defektstrukturen detektiert, bei denen bis zu drei Zuckerreste fehlten. Deshalb war wiederum die schon für das glycosylierte Dendrimer beschriebene zweistufige Reinigung aus GPC und HPLC erforderlich, was erneut zu sehr geringer Ausbeute führte.



Schema 23 Schematische Darstellung der Peptidkupplungsreaktion der Nonasäure (**47**) unter Verwendung von HATU zur Gewinnung des mannosylierten Glycodendrimers (**52**). Die Reaktion wird exemplarisch an einem Ast des Dendrimers (**47**) gezeigt.

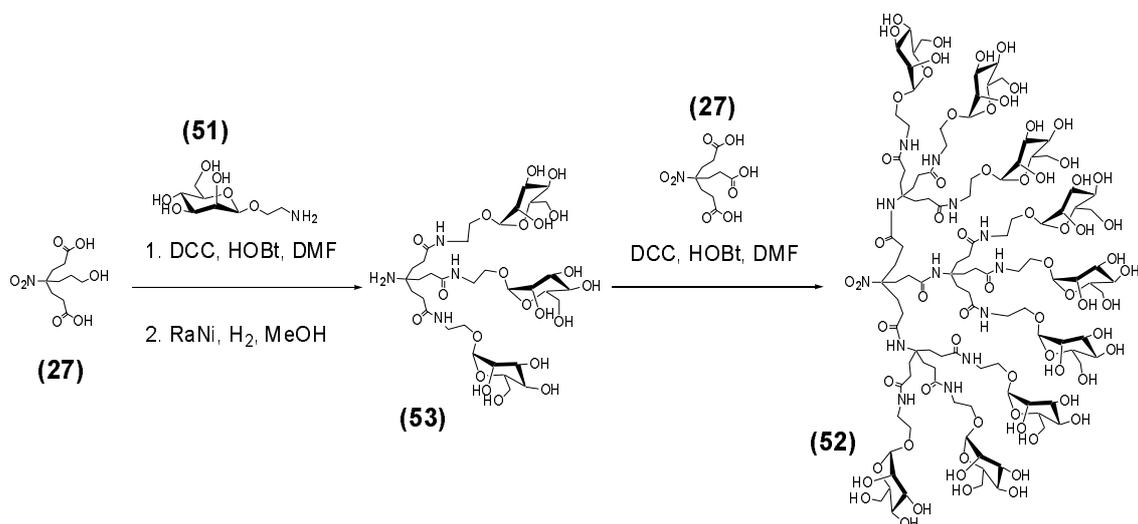
Diese Ansätze dokumentieren, dass zuckerummantelte Dendrimere über Peptidkupplungsreaktionen mit einer divergenten Synthesestrategie nicht gut zugänglich sind. Die Reaktivität der eingesetzten Amine und Aktivester reichte nicht aus, um eine vollständige Umsetzung zum gewünschten Nona-Amid zu erreichen. Die Abtrennung der chemisch sehr ähnlichen Defektstrukturen erwies sich als kompliziert, so dass nur kleine Substanzmengen auf diesem Wege zugänglich waren (vgl. Kapitel 8.2, Abb. 18).

Für die Herstellung von Glycodendrimern in größeren Mengen wird häufig auf die konvergente Synthesestrategie ausgewichen.^{[97],[98]} Für das vorliegende System hieße das, zunächst die Nitrotrisäure (**27**) mit Aminoethylglycosiden zu funktionalisieren, anschließend die Nitrogruppe zum Amin (**53**)

4. Synthese 1,3-C-verzweigter Dendrimere und Glycodendrimere

zu reduzieren und dieses mit Nitrotrisäure (**27**) zum Zielmolekül zu koppeln (Schema 24). Der Vorteil bei dieser konvergenten Variante wäre zum einen, dass an jedem Reaktionsschritt nur 4 Reaktionspartner beteiligt sind und das Produkt somit aus einer überschaubaren Anzahl verhältnismäßig großer Segmente aufgebaut wird. Zum anderen sind mögliche Defektstrukturen leichter separierbar, da sie sich chemisch deutlich vom strukturperfekten Produkt unterscheiden.

Da für Charakterisierung und biologische Testung der Glycodendrimere nur geringe Substanzmengen erforderlich waren, wurde zu Gunsten anderer Arbeiten auf die Optimierung der Synthesesequenz verzichtet. Die NMR-spektroskopische Analytik dieser Verbindungen war mit geringen Substanzmengen möglich. Da die Dendrimere C_3 -Symmetrie aufweisen, liegt für alle Kohlenhydratreste nur ein Signalsatz vor. Mit Hilfe zweidimensionaler Methoden wie COSY und HSQC gelang die eindeutige Zuordnung aller ^1H - und ^{13}C -Signale, massenspektrometrische Untersuchungen im MALDI-ToF belegen die Identität der Verbindungen. Reinheitsbeweise in Form von Elementaranalysen konnten nicht erhalten werden, so dass die Reinheit mit Hilfe der analytischen HPLC untersucht wurde; hier konnten Werte von über 95 % erreicht werden.



Schema 24 Mögliche konvergente Syntheseroute zur Herstellung glycosylierter 1,3-C-verzweigter Dendrimere.

Das Glycodendrimer (**52**) wurde sowohl im ELISA als auch im Hämagglutinations-Hemmtest auf sein Inhibitionspotenzial bezüglich der Typ-

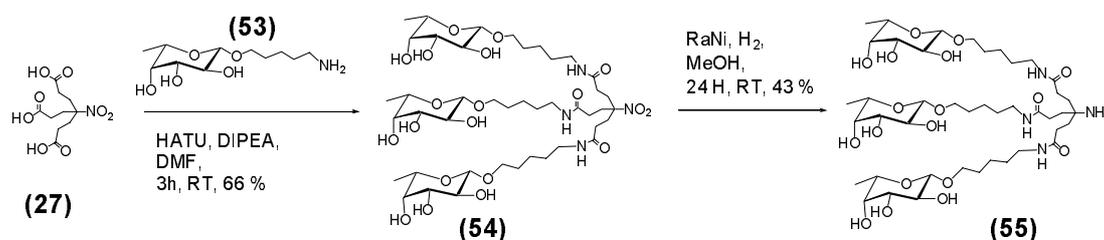
1-fimbrialen Adhäsion von *E. coli* an Mannanoberflächen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Wechselwirkung des Mannoseliganden im Falle des FimH Lektins durch Multivalenzeffekte nicht – oder nur in sehr geringem Ausmaß – verstärkt wird. Diese Beobachtung steht im Einklang mit früheren Ergebnissen und wird auch durch Kristallstruktur-Daten vom FimH gestützt. Diese Strukturdaten belegen, dass das FimH-Protein ein Monosaccharid binden kann^[99] und außerdem noch eine weitere Bindungstasche vorliegt, die vermutlich mit einem Trisaccharid wechselwirken kann.^[100] Diese beiden CRDs sind aber räumlich so angeordnet, dass die hier synthetisierten Glycodendrimere durch ihre strukturelle Beschaffenheit nicht mit beiden Bindungstaschen gleichzeitig interagieren können.

5. A_nX-Typ-Glycocluster in selbstorganisierenden Monoschichten

5.1 Trivalente Fucosecluster

Die Inhibition bakterieller Adhäsion durch Kohlenhydratliganden lässt sich, außer durch Hämagglutinations-Hemmtests oder im ELISA, auch mit Hilfe der Immobilisierung von Testliganden auf Goldoberflächen untersuchen. Dabei eignen sich A_nX-Typ-Dendrimere in besonderer Weise für den Aufbau immobilisierbarer Glycoliganden, da die n gleichen Funktionalitäten A eines Dendrons mit geeigneten Kohlenhydratepitopen ausgestattet werden können, während die Funktionalität X anschließend für die Umsetzung mit einem Alkan-thioacetat-Linker zur Verfügung steht, der die Immobilisierung des Glycoclusters auf der Goldoberfläche ermöglicht.

Im Zusammenhang mit verschiedenen Fragestellungen der Glycobiologie war, neben der Synthese entsprechender Mannosylverbindungen, auch die Bereitstellung von L-Fucoseclustern interessant. Für die Synthese eines Fucosetriclusters wurde die Nitrotrisäure **(27)** in einer Peptidkupplungsreaktion mit 5-Aminopentyl-fucopyranosid^[101] umgesetzt. Diese Reaktion verlief unter Einsatz eines leichten Überschusses des Fucosids **(53)** in guter Ausbeute zum gewünschten Tricluster **(54)**. Die Kupplung wurde in DMF mit HATU/DIPEA als Kupplungsreagenzien durchgeführt. Da es sich bei dem Fucosederivat **(53)** um eine schwer zugängliche und teure Verbindung handelt, wurde versucht, beim Kupplungsschritt mit einem möglichst kleinen Überschuss an Fucosid die Ausbeute an Tricluster zu maximieren. Mit den weniger reaktiven

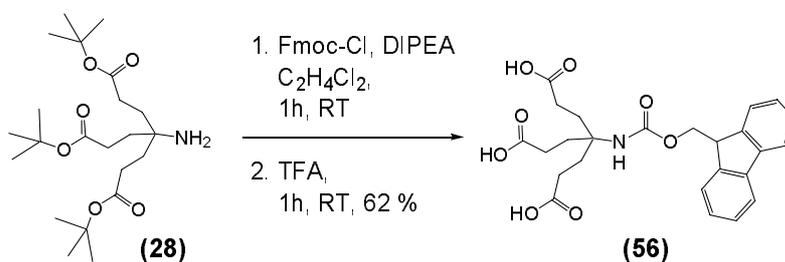


Schema 25 Synthese der trivalenten Fucosecluster **(54)** und **(55)** wobei die Nitrogruppe zunächst die Aminofunktion am fokalen Punkt maskiert.

Carbodiimid-Kupplungsreagenzien erhielt man komplexe Produktgemische, die schwer aufzutrennen waren. Die Reaktionsmischung der HATU-Kupplung lieferte dagegen nach einer Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20 ein im NMR einheitliches Produkt. Die Spektren dieser Verbindungen waren durch die C₃-Symmetrie der Moleküle vollständig interpretierbar, für die drei Kohlenhydratreste lag nur ein Signalsatz vor.

Die Reduktion der fokalen Nitrogruppe des Trifucosids zum Amin (**55**) mit Raney-Nickel lief bei Raumtemperatur und 1 bar Wasserstoffdruck sehr langsam ab (Schema 25). Die quantitative Analyse des Produktgemisches in der analytischen HPLC zeigte nach 24 h, dass weniger als die Hälfte des Edukts zum Amin (**55**) umgesetzt war. Nachdem nach 2 Tagen ein weiterer Reaktionsfortschritt kaum erkennbar war, wurde die Reduktion abgebrochen. Die Auftrennung des resultierenden Produktgemisches wurde in der präp. HPLC vorgenommen. Dabei werden dem Laufmittel 0.1 % TFA zugesetzt, um das Amin in Form seines TFA-Salzes zu eluieren und den Polaritätsunterschied von Nitroverbindung (**54**) und Amin (**55**) zu vergrößern. Allerdings wurde die glycosidische Bindung der Fucosylreste, die als besonders säurelabil bekannt ist, bereits unter diesen schwach TFA-sauren Bedingungen der oben beschriebenen HPLC-Trennung teilweise gebrochen. Während sich im Fall desamins, das bereits nach 12 min eluierte, im MALDI-ToF-MS keine Spaltprodukte zeigten, wurden bei der Nitroverbindung (**54**), die erst nach 35 min als stark verbreiteter Peak eluierte, im MALDI-ToF-MS Peaks bei m/z = (M-146) sowie m/z = (M-292) detektiert. Dies entsprach Strukturen, bei denen ein bzw. zwei der Fucosylreste fehlten.

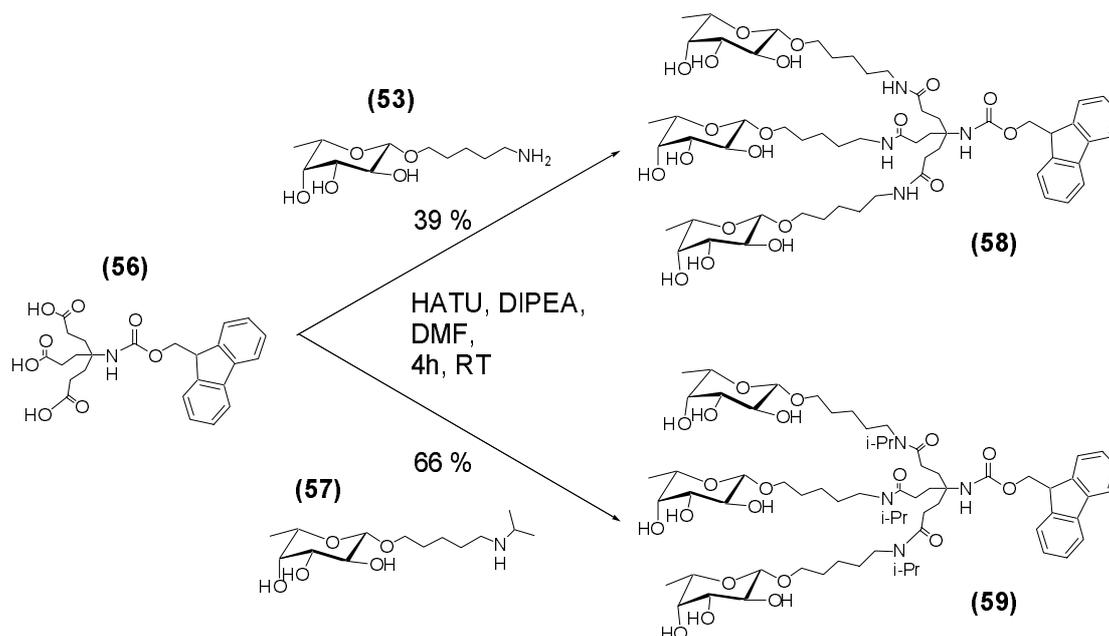
Da sich die nicht umgesetzte Nitroverbindung (**54**) nach der katalytischen Reduktion nicht ohne weiteres zurückgewinnen ließ, wurde eine



Schema 26 Herstellung der *N*-Fmoc-geschützten Aminotrisäure (**56**) für die Glycoclustersynthese.

andere Synthesestrategie für die Herstellung des Glycoclusters (**55**) gesucht. Dazu wurde die Fmoc-Gruppe als Schutzgruppe für die Aminofunktion

vorgesehen. Sie ist zu den Reaktionsbedingungen der Peptidkupplung kompatibel und lässt sich unter milden basischen Bedingungen abspalten. So wurde vom Aminotriester (**28**) ausgegangen, der mit Fmoc-Cl in C₂H₄Cl₂ ins Fluorenyl-Derivat (**56**) überführt wurde. Bei dieser Reaktion entsteht HCl, das mit DIPEA neutralisiert wurde (Schema 26). DIPEA ist eine sterisch so stark gehinderte Stickstoffbase, dass sie nicht zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe führt. Nach vollendeter Blockierungs-Reaktion wurde ohne vorherige Aufarbeitung TFA zur Reaktionslösung zugesetzt, um die *tert*-Butylestergruppen sauer zu spalten. In einem Schritt wurde so die Trisäure (**56**) mit blockierter Aminofunktion erhalten. Die Reinigung dieses Bausteins erfolgte mit Hilfe von Lobar[®]-Fertigsäulen an RP-18-Kieselgel unter Verwendung von 55 % ACN in Wasser als mobiler Phase. So wurde sichergestellt, dass das Coremolekül für die Synthese der Fucosecluster (**58**) und (**59**) in hoher Reinheit vorlag und die Trennprobleme nach der Kupplung mit dem Fucosid lösbar blieben.



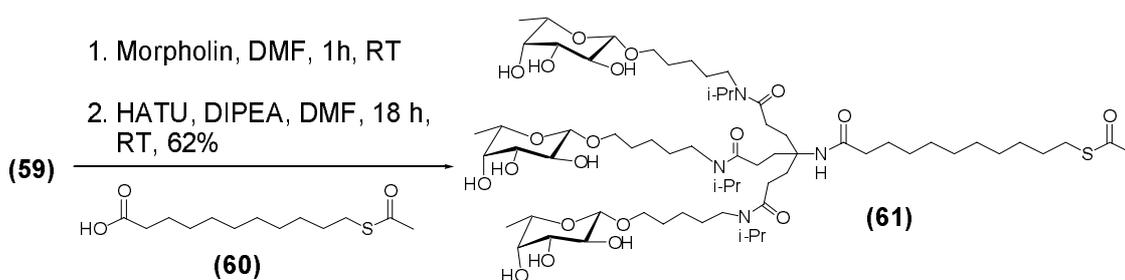
Schema 27 Synthese der trivalenten Fucosecluster (**58**) und (**59**) mit Fmoc-geschützter fokaler Aminofunktion.

Die Umsetzung des Fmoc-geschützten Core-Moleküls mit dem Aminopentylfucopyranosid (**53**) wurde wie für das Nitroderivat (**54**) beschrieben durchgeführt. Die Reinigung an Sephadex LH-20 war etwas aufwändiger als beim Glycocluster (**54**), da die aromatischen Partialstrukturen der Verbindung

Wechselwirkungen mit dem Gel zeigten. Das Fmoc-Trifucosid (**58**) wurde dadurch später eluiert als (**54**), so dass es nur als Gemisch mit Defektstrukturen erhalten werden konnte.

Eher zufällig fiel im Laufe der Experimente auch das *N*-Isopropyl-modifizierte Fucosid (**57**) an, welches ebenfalls mit der Trisäure (**56**) zur Reaktion gebracht wurde (Schema 27). Wie erhofft führte das gegenüber (**58**) erhöhte Molekulargewicht des Clusterfucosids (**59**) zur früheren Elution in der GPC, so dass das Produkt ohne weiteres sauber erhalten wurde. Das sekundäre Isopropylamin (**57**) zeigte bei der Peptidkupplung keine verminderte Reaktivität. Problematisch beim Umgang mit den *N*-Isopropylderivaten von Glycoclustern wie (**58**) waren die NMR-Spektren. Die sperrigen Isopropyl-Gruppen führten zur ausgeprägten Bildung von *cis/trans*-Isomeren im Bereich der Säureamid-Bindung. Die peptidische Bindung ist aufgrund ihres Doppelbindungscharakters nicht frei drehbar, so dass auch bei erhöhter Temperatur keine scharfen Signale im ¹H-NMR erreicht werden konnten. Das Verhältnis der Isomeren konnte anhand der Signale der Methylprotonen der Isopropylgruppen als ca. 4:5 bestimmt werden.

Für die Immobilisierung der Glycocluster auf Goldoberflächen werden langkettige Thiole benötigt, die nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe an der Aminofunktion des Clusters via Peptidkupplung etabliert werden können. Da freie Thiole sehr reaktiv sind und zudem leicht dimerisieren, wurden stattdessen Thioacetate für die Peptidkupplungsreaktionen verwendet. Zunächst wurde käufliche 11-Thioacetyl-undecansäure (**60**) mit der fokalen Aminogruppe des Glycoclusters (**59**) umgesetzt. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde zuvor mit 20 %iger Morpholinlösung abgespalten, das Lösungsmittel entfernt und ohne weitere Aufarbeitung die



Schema 27 Synthese des auf Goldoberflächen immobilisierbaren trivalenten Fucosids.

OEG-funktionalisierte Clusterfucosid (**63**) in 5 %iger Ausbeute erhalten und mit Hilfe NMR-spektroskopischer und massenspektrometrischer Methoden charakterisiert werden.

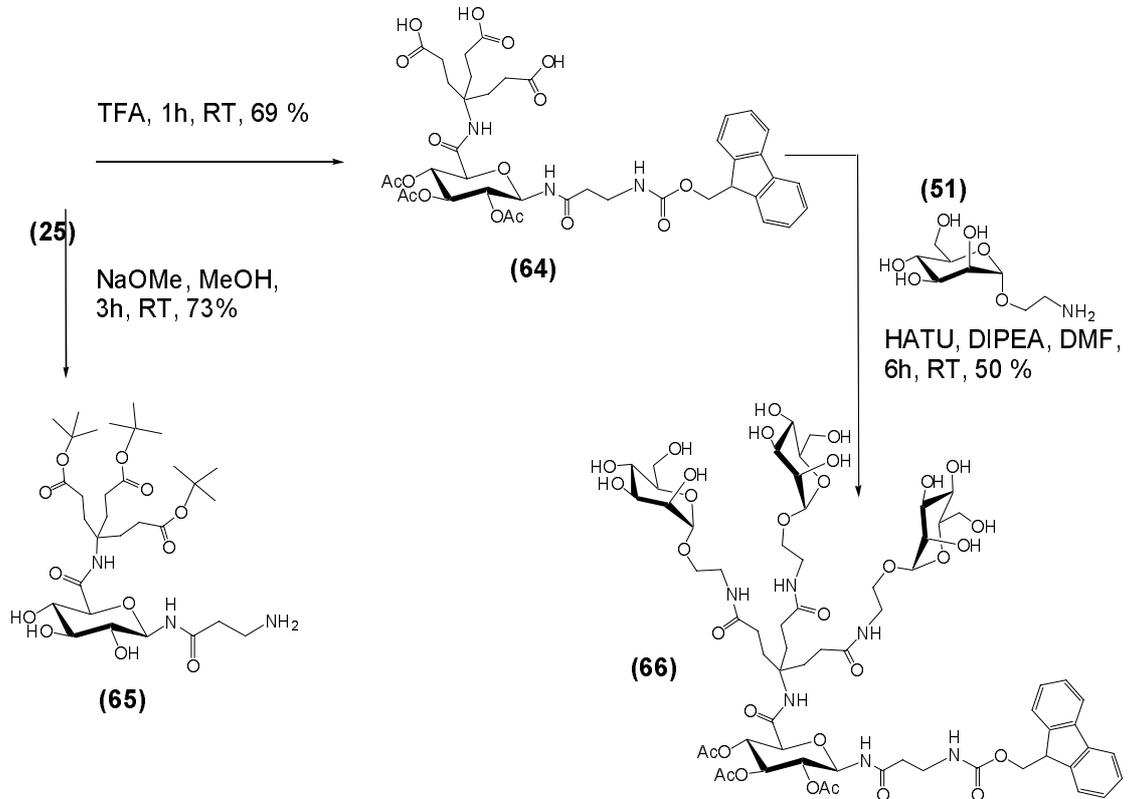
5.2 Trivalente Mannosecluster

Nachdem die Synthese von Fucosecluster-OEG-Alkanthioacetaten gezeigt werden konnte, war es reizvoll, neuartige Zucker-Dendrons auf der Basis des Glucuronsäurederivats **(25)** aufzubauen. Derartige Verbindungen könnten sich dann ebenfalls in SAM-geeignete Bausteine umwandeln lassen. Als biorelevantes Zuckerepitop wurde in diesem Falle D-Mannose gewählt. Ausgehend von dem *t*Bu-Triester **(25)** wurde durch saure Spaltung der Esterschutzgruppen mit TFA zunächst die Trisäure **(64)** erhalten. Bei dieser Reaktion kam es allerdings zur teilweisen Zersetzung des Produkts, so dass die Ausbeute nur bei 69 % lag. Dieses Ergebnis ist für eine einfache Entschützungsreaktion nicht zufriedenstellend. Möglicherweise wäre es sinnvoller, in C₂H₄Cl₂ zu arbeiten und dem Lösungsmittel 10 % TFA zuzusetzen. Unter diesen mildereren Bedingungen sollten die *t*Bu-Ester ebenfalls problemlos spaltbar sein, wobei Zersetzung evl. vermieden werden könnte. Dies wurde an dieser Stelle nicht versucht, hat sich jedoch bei einer ähnlichen Reaktion bewährt (vgl. Kapitel. 5.1, Schema 26). Für die Reinigung des bei der TFA-sauren Behandlung von **(25)** entstandenen Produktgemisches wurde eine präp. HPLC durchgeführt, da sich nur so die Nebenprodukte vollständig abtrennen ließen. Danach ließ sich die Trisäure **(64)** in einer Peptidkupplungsreaktion mit dem Aminoethyl-mannosid **(51)** in das Trimannosid-Mimetikum **(66)** überführen. Diese Kupplungsreaktion wurde mit Hilfe von HATU/DIPEA in DMF realisiert, die Reinigung der Reaktionsmischung erwies sich allerdings als schwierig. Das in der GPC an Sephadex LH-20 vorgereinigte Produkt konnte mit Hilfe präp. HPLC isoliert werden. Die zweistufige Reinigung führte zu Ausbeuteverlusten, so dass **(66)** rein nur zu 50 % erhalten werden konnte.

Das orthogonale Schutzgruppenmuster des Glucuronsäure-Derivates **(25)** ließ aber auch die gleichzeitige Deblockierung der Aminofunktion und der Hydroxyl-Gruppen am Zuckerring unter Zemplén-Bedingungen zu. Sowohl die Fmoc- als auch die Acetylschutzgruppen werden basisch abgespalten, die *tert*-Butylester-Schutzgruppen dabei jedoch nicht tangiert. So wurde der Aminoalkohol **(65)** in guter Ausbeute erhalten, der laut analytischer HPLC nahezu einheitlich war, während man im NMR deutlich eine Verunreinigung

der Probe mit Dibenzofulven erkannte. Dieses entsteht bei der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Natriummethanolat und kann im Falle der Entschützung kein Addukt bilden, wie beispielsweise bei der Verwendung von Morpholin. Die Reinigung des freienamins (**65**) (Schema 30) ist dann allerdings mit Hilfe der GPC an Sephadex LH-20 leicht möglich.

Mit Verbindung (**65**) steht ein weiteres Derivat für die Umsetzung mit einem OEG-Thioacetat-Baustein wie (**62**) (Schema 29) zur Verfügung, was dann wiederum im Zusammenhang mit der Modifikation von Goldoberflächen von Interesse ist.



Schema 30 Orthogonale Deblockierung und anschließende Mannosylierung des A₃X-Bausteins (**25**).

6. Zusammenfassung

Glykokonjugate spielen eine wichtige Rolle beim Informationsaustausch in biologischen Systemen. Um die Details dieses Wechselspiels untersuchen zu können, kommt der Synthese von Glycopeptiden und Oligosacchariden sowie deren Mimetika eine erhebliche Bedeutung zu. Diese Arbeit ist der Herstellung von Glycopeptidmimetika sowie dendritischen Strukturen im Zusammenhang mit unterschiedlichsten biologischen set-ups gewidmet.

Es wurden Glycopeptid-Bausteine synthetisiert, die sich für die automatisierte Festphasensynthese eignen. Durch Glycosylierung von Glucose-pentaacetat (**6**) mit Fmoc-Serin (**7**) konnte ein denkbar kurzer Syntheseweg zum Glycopeptid-Baustein (**5**) gefunden und für den Multigrammmaßstab optimiert werden. Der zum Standard-Festphasenverfahren FASTMOC[®] kompatible Baustein (**5**) wurde dann in Zusammenarbeit mit der Firma Roche Diagnostics erfolgreich im automatischen Peptidsynthesizer zur Darstellung Lumineszenzmarkierter Glycopeptide eingesetzt. Andererseits wurden neuartige Dendron-funktionalisierte *N*-glycosidische Glycopeptid-Bausteine eingeführt, die ausgehend vom Glycosylazid (**21**), mit Hilfe einer modifizierten Variante der Staudinger-Reaktion zugänglich wurden. Dabei konnten Derivate wie (**25**) erhalten werden, die beispielsweise für die nachträgliche Modifizierung von Oligopeptiden prädestiniert sind. Dendron modifizierte Glycopeptide wie (**26**) können dagegen direkt in der Festphasensynthese für den Einbau in Glycopeptidmimetika verwendet werden.

Die Synthese der verschiedenen Glycopeptidmimetika stand, eingebettet in ein Forschungsprojekt mit der Firma Roche Diagnostics, im Zusammenhang mit der Zielsetzung, die photophysikalischen Eigenschaften Lumineszenzmarkierter Peptidlinker zu optimieren, die an das HIV-Hapten gp32 gebunden wurden. Die gp32 markierten Glycopeptide konnten hergestellt und im ELECSYS[®]-System getestet werden. Im gleichen Zusammenhang war auch die Herstellung selektiv funktionalisierbarer Glycodendrimere vom A_nX-Typ ein wichtiges Ziel dieser Arbeit. Dazu wurde auf das 1,3-C-verzweigte Dendron (**27**) als Grundbaustein zurückgegriffen. Die gute Verfügbarkeit des daraus aufgebauten Amino-Nonaesters (**31**) führte durch Umsetzung der fokalen Aminogruppe mit Carbonsäurederivaten in Peptidkupplungsreaktionen

im Sinne eines „molekularen Lego“ zu einer Vielfalt neuartiger dendritischer Bausteine. So konnte das biotinylierte Derivat **(40)** für die Modifikation Streptavidin-funktionalisierter Oberflächen dargestellt werden. Die nachträgliche Dendron-Funktionalisierung an zwei Positionen des Lumineszenz-markierten Peptids **(42)** in Lösung gelang mit Hilfe des Amins **(35)**. Dabei konnte das komplexe Molekül **(44)** hergestellt und zu **(45)** entschützt werden. Die anschließende Konjugation mit gp32 war aufgrund von Schwierigkeiten bei der Handhabung der sehr kleinen Substanzmengen nur schlecht möglich, wobei genaue Aussagen über den Erfolg der Reaktion nicht zu treffen sind.

Darüber hinaus können Dendrimere vom A_nX -Typ auch in den Zusammenhang von Glycocluster- und Glycodendrimersynthesen gestellt werden. So ermöglichte die Abspaltung der *tert*-Butylestergruppen an der Peripherie des Dendrons **(30)** den Zugang zur Nonacarbonsäure **(47)**, die unter Verwendung der gut zugänglichen Kohlenhydrat-Bausteine **(48)** und **(51)** in die Glycodendrimere **(49)** und **(52)** überführt werden konnte.

Die Flexibilität, die das vorgestellte Synthesekonzept für die Herstellung verschiedenartiger dendritischer Oligosaccharidmimetika bietet, wurde auch mit der Synthese des Trifucosids **(58)** deutlich. Der Grundbaustein **(28)** für die Dendrimersynthese konnte mit Hilfe einfacher Schutzgruppenchemie in einer Eintopf-Reaktion in das Core-Molekül für die Herstellung des Glycoclusters **(56)** überführt werden. Dieser Baustein stellte den Ausgangspunkt bei der Synthese des OEG-funktionalisierten Fucosids **(63)** für den Aufbau von selbstorganisierenden Monoschichten (SAMs) dar, die als Glyco-Mikroarrays aufgefasst werden können. Für eine Anwendung in diesem Kontext konnte auch das Derivat **(25)** genutzt werden, das mit seinem orthogonalen Schutzgruppenmuster die nötigen Optionen bietet und zum oligovalenten Zuckerderivat **(66)** umgesetzt werden konnte. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die vorliegende Arbeit mit der Herstellung von Glycopeptidderivaten und dendritischen Verbindungen auf ein weites Feld von Applikationen abzielt, wobei Anwendungen in den Bereichen Diagnostik und Glycobiologie zur Sprache kommen.

7. Summary

Glycoconjugates play an important role for the exchange of information in biological systems. In order to understand the details of the involved interactions the synthesis of glycopeptides and oligosaccharides and their mimics can be helpful. The preparation of glycopeptide mimics as well as dendritic structures in the context of different biological set-ups is the aim of this PhD thesis.

With this in mind glycopeptide building blocks for automated solid-phase-synthesis were generated. By glycosylating Fmoc-serine (**7**) with glucose-pentaacetate (**6**) an extraordinarily short synthetic pathway to building block (**5**) could be established and optimized for multigram scale. Derivative (**5**), which is compatible to the standard solid phase peptide synthesis protocol FASTMOC[®], could be utilized for the buildup of luminescence-labeled glycopeptides in an automated peptide synthesizer. This was achieved in cooperation with Roche Diagnostics. Novel dendron-functionalized *N*-glycosidic compounds were generated, using a variation of the Staudinger reaction. Azide (**21**) was utilized to synthesize derivatives as (**25**), suitable for subsequent modification of oligopeptides with saccharides. Dendron modified glycopeptide mimics like (**26**) can be used directly in solid phase peptide synthesis.

The objectives in the assembly of different glycopetidomimetics were embedded in a research project in cooperation with Roche Diagnostics. The photophysical properties of luminescence labeled peptide-linkers were to be improved in this regard. These linkers were connected to the HIV hapten gp32. The labeled haptens could be successfully synthesized and were tested in the ELECSYS[®] system. In the same context the creation of selectively functionalized A_nX type glycodendrimers was an important synthetic target of this thesis. For that purpose the 1,3-*C*-branched dendron (**27**) was used as a scaffold. The good accessibility of amino-nonaester (**31**) fashioned from this starting compound leads to a variety of novel dendritic building blocks. This could be attained by the reaction of its focal amino function with different acid derivatives in terms of a “molecular Lego”. The biotinylated compound (**40**) for example can be employed for modification of

streptavidin functionalized surfaces. After solid phase synthesis of peptide **(42)**, dendron functionalisation in two positions in solution was successful with amine **(35)**. In doing so, the complex molecule **(44)** could be generated, which could be afterwards deprotected to yield **(45)**. Subsequent conjugation with gp32 was not possible according to difficulties connected with the handling of very small substance quantities, whereas detailed statements on the success of this reaction couldn't be made.

Moreover A_nX -type dendrimers were associated with glycocluster and glycodendrimer chemistry. The cleavage of the *tert*-butyl groups in the periphery of dendron **(30)** led to nonacid **(47)**. This compound was equipped with sugar residues using the easily available carbohydrate derivatives **(48)** and **(51)** in order to get glycodendrimers **(49)** and **(52)**.

The flexibility of the introduced synthetic concept in the composition of different dendritic oligosaccharide mimics could readily be shown in the synthesis of trifucoside **(58)**. Building block **(28)**, often employed in dendrimer chemistry, could easily be converted into core molecule **(56)** for glycocluster assembly, using simple protecting group chemistry in a one-pot synthesis. Derivative **(56)** acted as a starting material in the synthesis of the OEG-functionalized trifucoside **(63)**. This compound was destined for the generation of self assembled monolayers (SAMs), which can be seen as glyco micro-arrays. For an application in this context, derivative **(25)** could be used. It is orthogonally protected and could be converted into the oligovalent sugar derivative **(66)**. To cut the matter short the present thesis on glycopeptide and dendritic derivative synthesis is aimed at a wide range of applications in diagnostical and glycobiological environments.

8. Isolierung der Derivate

Der Isolierung der in dieser Arbeit erhaltenen Substanzen wurde ein eigenes Kapitel gewidmet, denn obwohl Standard-Techniken bei der Reinigung der Reaktionsmischungen Anwendung fanden, hängt die Reproduzierbarkeit der Trennerfolge entscheidend von der Ausführung dieser Techniken ab.

8.1 Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) ist für die Isolierung der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Derivate mit einem Molekulargewicht über 800 g/mol ein unverzichtbares Werkzeug. Dabei kommen ausschließlich Sephadex LH-20- und LH-60-Medien zum Einsatz. Diese haben den Vorteil,

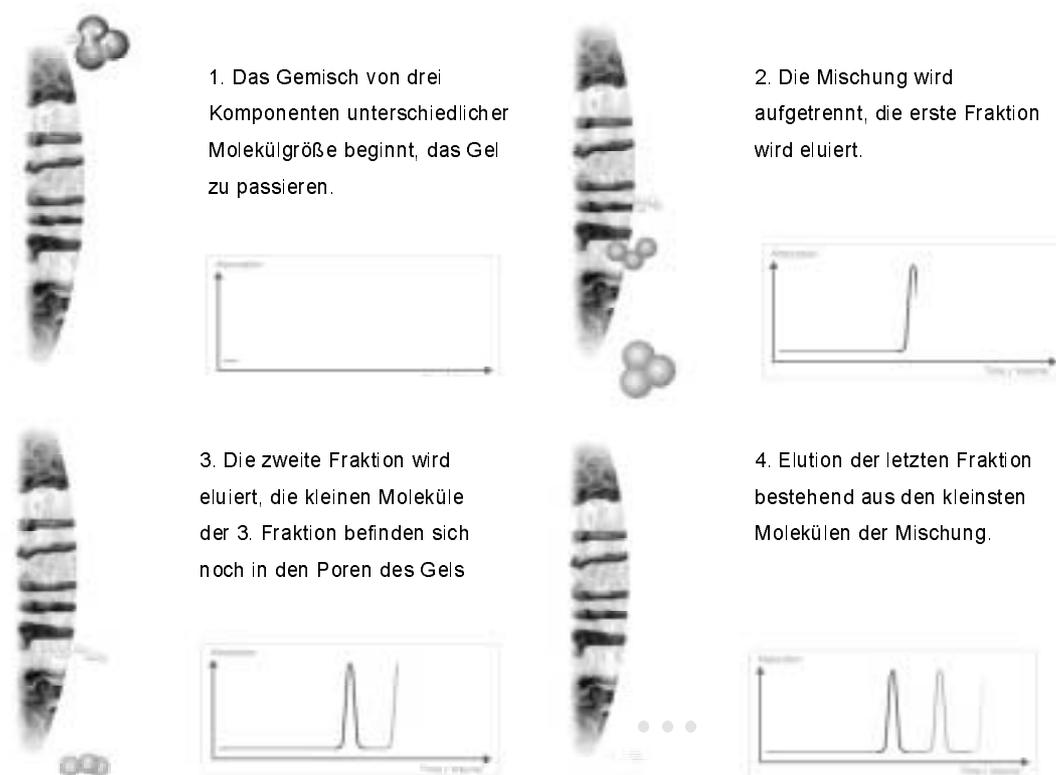


Abb. 16 Schematische Darstellung einer Gelpermeations-Chromatographie: Ein 3-Komponentengemisch passiert einen in grau gezeigten Gelpartikel. Die kleinen Moleküle können in die Poren des Gels eindringen, dabei verlangsamt sich ihre Wanderungsgeschwindigkeit und sie werden später eluiert als größere Moleküle.

dass sie auch in organischen Lösungsmitteln einsetzbar sind und somit auch geschützte Zwischenprodukte gereinigt werden können.

Bei diesen Gelen handelt es sich um quervernetzte, hydropropylierte Dextrane, die durch die Hydropropylierung der Glucosereste sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften besitzen. Die Medien quellen sowohl in Wasser als auch in einer Reihe organischer Lösungsmittel. Die Partikelgröße und die Größenausschlussgrenze variieren in Abhängigkeit vom Solvens.^[105] Besonders stark quellen die Gele in Wasser (4 – 4.4 ml/g) oder Methanol (3.9 – 4.3 ml/g), weniger stark in Dichlormethan (3.6 – 3.9 ml/g) oder Aceton (2.4 – 2.6 ml/g) und nur ganz schwach in Essigester (1.6 – 1.8 ml/g) oder Toluol (1.5 – 1.6 ml/g). Die Lösungsmittel mit schwachen Quelleigenschaften eignen sich entsprechend für die Trennung kleinerer Moleküle; an Sephadex LH-20 in Aceton sollen sich laut Hersteller^[106] beispielsweise 2- und 4-Acetamidobenzoesäure voneinander trennen lassen. Alle Trennungen im Rahmen dieser Arbeit wurden in Methanol durchgeführt. Hier quillt das Gel sehr stark und der Trennbereich liegt in der Größenordnung von 800 – 2000 g/mol. Für die Trennungen wurden lange schlanke Säulen verwendet, die am unteren Ende ein möglichst geringes Totvolumen besitzen, um eine Vermischung durch Diffusion nach der Elution zu verhindern. Die Stoffgemische wurden vor dem Auftragen in so wenig Methanol wie möglich gelöst, um ein Tailing zu vermeiden. Das Volumenverhältnis von Probe in Methanol zu Sephadex-Gel in Methanol betrug dabei mindestens 1:100. Gute Ergebnisse wurden mit sehr geringen Flussraten von 10 – 15 ml/h bei Säulendurchmessern von 2 – 4 cm erhalten. Der entscheidende Parameter ist die Flussgeschwindigkeit des Lösungsmittels in der Säule; je größer der Säulendurchmesser, umso höher kann die Flussrate eingestellt werden. Die erhaltenen Produktfraktionen waren hoch konzentriert und erforderten eine genaue Analytik des Eluats, beispielsweise mit Hilfe der MALDI-ToF-Spektrometrie, um Mischfraktionen eindeutig identifizieren und abtrennen zu können.

8.2 Reversed-Phase-HPLC

Ein wichtiges Verfahren bei der Reinigung von polaren Glykokonjugaten ist die RP-HPLC mit alkylierten Kieselgelen. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten LiChrosorb® RP-18- und RP-8-Medien mit einer Korngröße von 7 μm sind als gut etablierte stationäre Phasen auch für die Auftrennung komplexer Glycosid- und Glykokonjugat-Gemische verwendbar. Um über die gesamte Zeit eines HPLC-Laufes scharfe Fraktionspeaks zu erhalten, wird mit

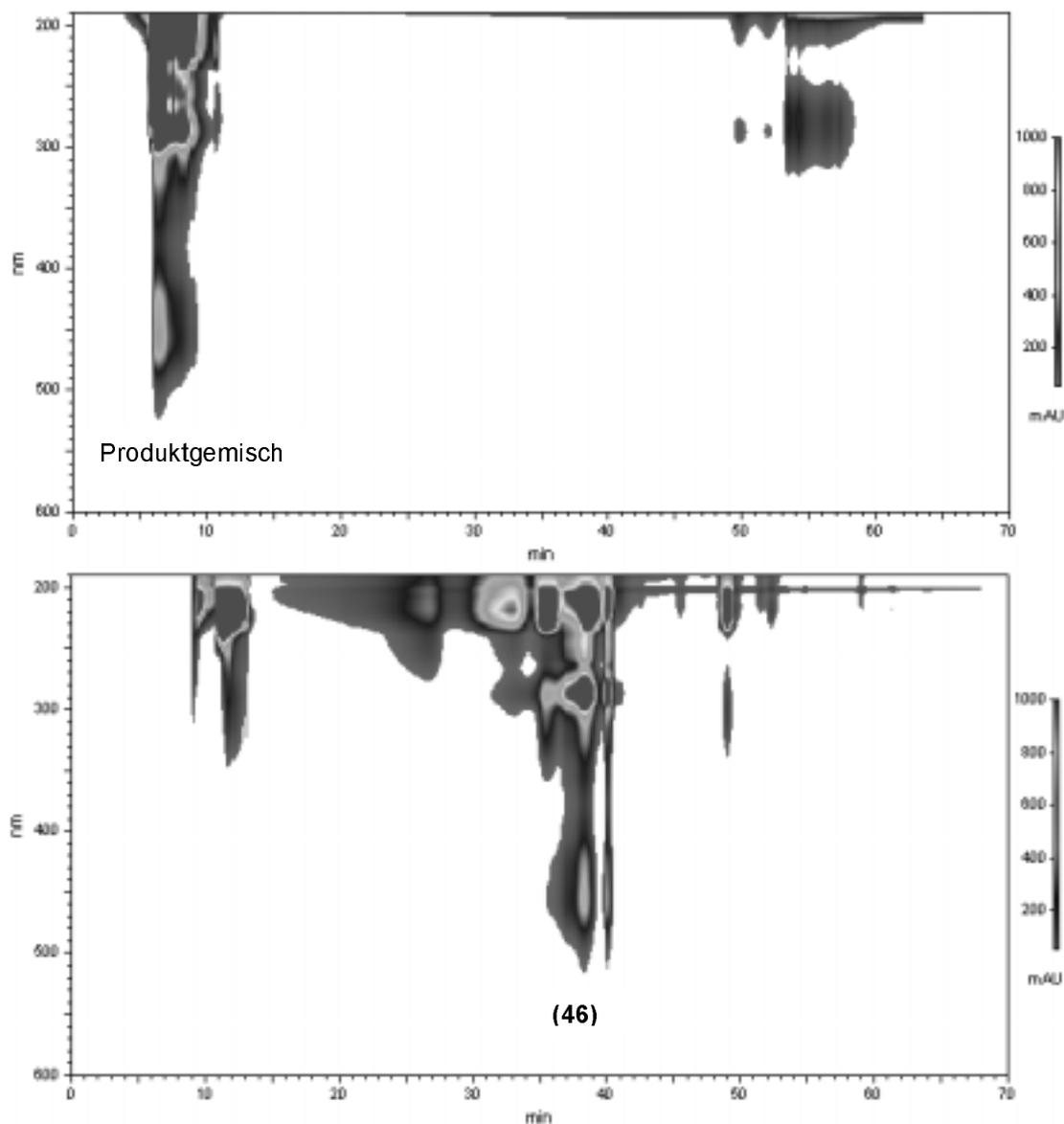


Abb. 17 Zwei DAD-Chromatogramme desselben Substanzgemisches, oben in Phosphatpuffer pH 8, darunter in TFA-saurer Lösung (pH 4) eingespritzt. Es handelt sich um das Chromatogramm von **(46)**. Dieses Derivat enthält 18 freie Carbonsäure-Funktionalitäten, die im ersten Fall als Carboxylate vorliegen.

binären Lösungsmittelgradienten aus Wasser und ACN gearbeitet, teilweise unter Zusatz von 0.1 % TFA als mobiler Phase. Das teure und giftige ACN kann bei der Reinigung freier Carbonsäuren nicht durch das unproblematischere MeOH ersetzt werden, da es hierbei unter TFA-Katalyse zu Methyl esterbildung kommt.

Typische Gradienten in Methoden für die Reinigung von ruthenylierten Glyco- oder Dendron-funktionalisierten Peptiden starteten mit 5 % ACN in Wasser. In 80 min wurde der Anteil an ACN auf 50 % gesteigert, abschließend wurde die

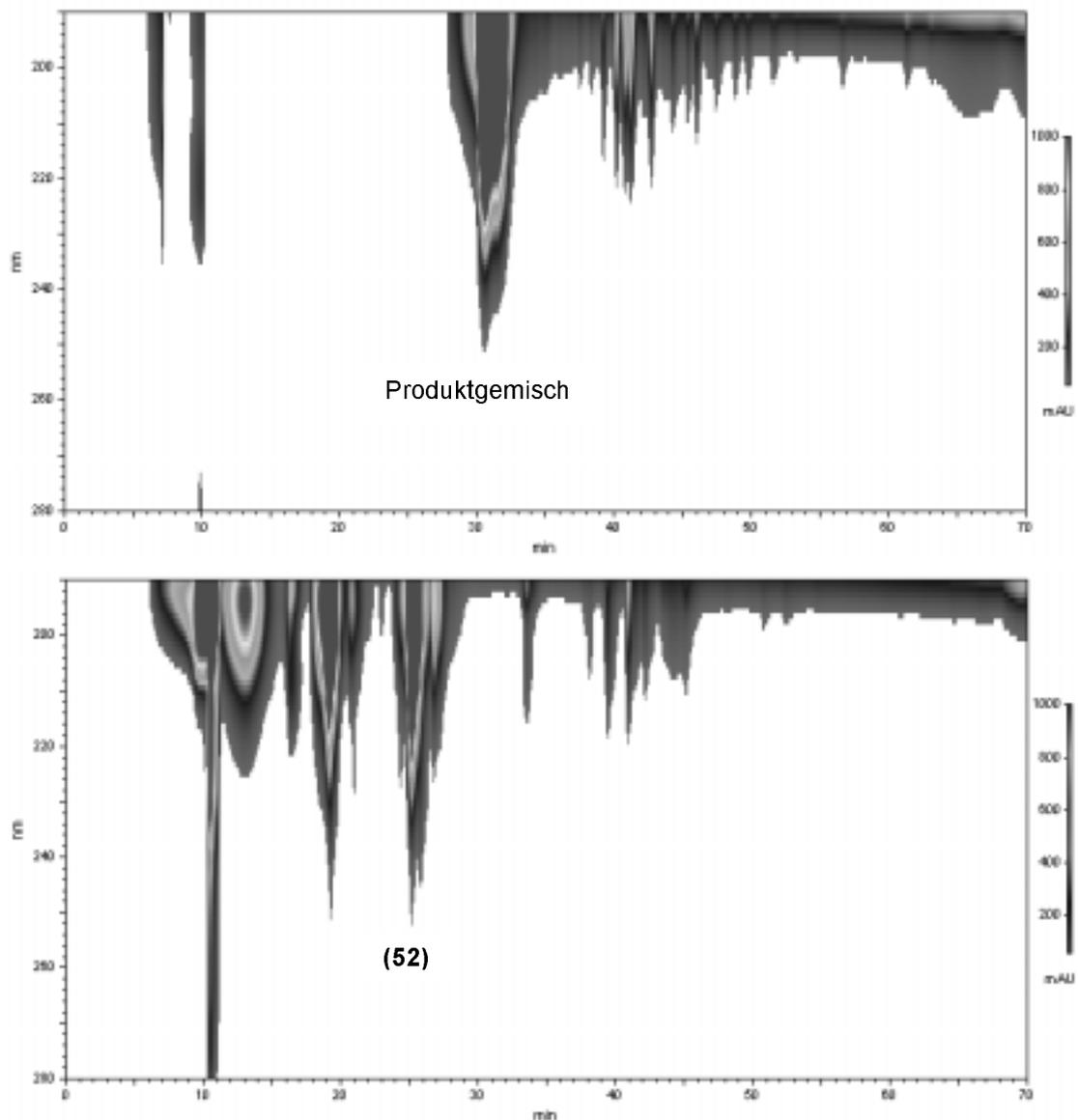


Abb. 18 Zwei DAD-Chromatogramme des Glycodendrimer (52). Im oberen Diagramm wurde in Wasser, im unteren in Phosphatpuffer (pH 8) eingespritzt. Defektstrukturen, die noch freie Carbonsäure-Funktionalitäten enthalten, werden in die Carboxylate überführt und daher deutlich früher eluiert als das Nona-Glycosid.

Säule ca. 20 min mit reinem ACN gespült. Säulen mit einem Innendurchmesser von 2.5 cm wurden dabei mit einer Flussrate von 10 ml/min betrieben. Die BPRu-Derivate eluierten nur unter Zusatz von 0.1 % TFA zum Lösungsmittel. In einem Lauf konnten je nach Trennproblem Substanzmengen von bis zu 50 mg isoliert werden. Reaktionsmischungen aus wässrigen Puffersystemen mussten vor dem Einspritzen in die präp. HPLC mit TFA auf pH Werte < 6 eingestellt werden, vor allem, wenn es sich bei den Produktmolekülen um freie Säuren handelte. Lagen diese in Form ihrer Salze vor, wurden sie von RP-Medien direkt nach der Totzeit der Säule eluiert, eine Trennung konnte in diesem Falle nicht erreicht werden (Abb. 17 oben). Die freien Carbonsäuren waren bei weitem unpolarer als ihre Salze und zeigten drastisch verlängerte Retentionszeiten (Abb. 17 unten). Dies wird mit den in Abb. 17 gezeigten Dioden-Array-Detektor-Daten veranschaulicht. Widergegeben ist eine Darstellung der Extinktion des Eluats in einem Wellenlängenbereich von 190 – 600 nm während des HPLC-Laufs. Die roten Bereiche stellen Absorptionsmaxima der eluierten Substanzen dar.

Das gleiche Phänomen ließ sich bei der Abtrennung der Defektstrukturen in der Synthese der Glycodendrimere **(49)** und **(52)** ausnutzen. Hier bestand das Trennproblem darin, die Defektstrukturen in Form freier Carbonsäuren von den strukturperfekten Glycodendrimern, die keine freien Carboxylgruppen enthalten, abzutrennen. Dazu wurde die Reaktionsmischung nach der Peptidkupplung in Phosphatpuffer pH 8 aufgenommen und in diesem Puffer in die HPLC eingespritzt. Die entstandenen Carbonsäure-Salze der Defektstrukturen sind daraufhin deutlich polarer als die „kompletten“ Glycodendrimere und wurden in der RP-HPLC deutlich früher eluiert (Abb. 18). Bei diesem Verfahren wurde dem Laufmittelgemisch keine TFA zugesetzt um die Carboxylgruppen nicht zu reprotonieren. Die weiteren Parameter sind gegenüber den oben beschriebenen unverändert.

9. Experimenteller Teil

9.1 Allgemeines

Alle Reaktionen wurden, soweit nicht anders angegeben, unter normaler Laboratmosphäre durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Trockene Lösungsmittel wurden durch Destillation unter Argonatmosphäre über folgenden Trocknungsmitteln erhalten:

Dichlormethan	Calciumhydrid
Methanol	Magnesiumspäne
THF	NaOH, Natrium-Kalium-Legierung
Toluol	Natrium
Essigsäureethylester	K ₂ CO ₃
Cyclohexan	NaOH
Aceton	Phosphorpentoxid

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (230-400 mesh, Korngröße 0.04-0.063 mm) sowie LiChroprep[®] RP-18 (25 – 40 µm) Reversed Phase Kieselgel der Firma Merck verwendet. Die Stofftrennungen wurden mit Hilfe einer Mitteldruck-Flüssigkeits-Chromatographie-Anlage der Firma Büchi, zum Teil mit Hilfe von Lobar[®]-Fertigsäulen, durchgeführt.

Dünnschichtchromatogramme wurden auf Kieselgelfolie (GF₂₅₄, RP-18 F₂₅₄ s, Merck) angefertigt. Die Visualisierung erfolgte in Abhängigkeit von der zu detektierenden Substanz mit Hilfe von UV-Licht oder durch Eintauchen in 10 %ige ethanolische Schwefelsäurelösung und anschließende Wärmebehandlung.

Für die GPC wurde Sephadex LH-20 sowie LH-60 Gel der Firma Amersham-Pharmazia-Biotech, wie unter Kapitel 8.1 beschrieben, verwendet. Die Fraktionen wurden mit Hilfe eines Differential-Refraktometers K 2400 (Knauer) oder eines Single Path Monitors UV-1 (Pharmacia) detektiert.

Analytische HPLC-Chromatogramme wurden mit einer HPLC-Anlage der Firma Merck-Hitachi aufgenommen, bestehend aus der Pumpe L-7100, des Interfaces D-7000, des Autosamplers L-7200, des Säulenofens L-7350, des Dioden-Array-Detektors L-7455, sowie des RI-Detektors L-7490. Es wurden

Säulen der Firma Merck verwendet. Für Methodenentwicklung und Reinheitsüberprüfungen wurde eine LiChroCART® 250-4 mm-Hülse verwendet, gepackt mit LiChrosorb® RP-8 7 µm Packungsmaterial. Für Kontrollen des Reaktionsfortschrittes wurde eine Chromolith® Performance RP-18e 100-4.6 mm-Säule benutzt. Auf der Softwareseite kam die D-7000 Chromatography Data Station Software Version 4.1 zum Einsatz.

Für die präparativen HPLC-Stofftrennungen wurde eine Shimadzu HPLC-Anlage, wie unter 8.2 beschrieben, verwendet, bestehend aus SCL-10A System Controller, Degasser DGU-14A, 2 LC-8A Pumpen mit nachgelagertem Gradientenmischer, RID-10A R_f Index Detektor und SPD-M10A Dioden-Array-Detektor. Auch hier wurden Säulen der Firma Merck eingesetzt, für Substanzmengen von 10 – 100 mg wurde eine Hibar® RT 250-25 mm Säule, gepackt mit LiChrosorb® RP-8 7 µm Material, verwendet, Substanzmengen von weniger als 10 mg wurden mit Hilfe einer Hibar® RT 250-10 mm Säule, gepackt mit LiChrosorb® RP-18 7 µm Kieselgel, aufgetrennt. Die Steuerung der Anlage erfolgte mit Hilfe der Shimadzu Class VP Software Version 6.12 SP2.

Die HPLC-Applikationen, die bei der Firma Roche Diagnostics ausgeführt wurden, griffen auf Applied-Biosystems-Geräte zurück sowie auf Säulen, die mit VYDAC RP-18 Medien ausgestattet waren. Softwareseitig kam hier die Chromeleon Gynkotheek Software Version 6.01 Build 447 zum Einsatz.

NMR-Spektren wurden an den Brukergeräten ARX 300 (75.47 MHz bei ¹³C) und DRX 500 (125.77 MHz bei ¹³C) aufgenommen. Die Zuordnung der Signale wurde in einigen Fällen durch zweidimensionale Methoden (¹H-¹H-COSY und ¹H-¹³C-HSQC) vorgenommen. Als Lösungsmittel wurden Deuteriochloroform, perdeuteriertes Aceton, perdeuterierter Methylalkohol sowie Deuteriumoxid verwendet. Entweder wurde mit TMS als internem Standard (0.00 bzw. 0.0 ppm) gearbeitet oder auf die charakteristischen Signale der verwendeten Lösungsmittel (Aceton-D₆: 2.04 bzw. 29.3; CDCl₃: 7.25 bzw. 77.0; DMSO-D₆: 2.49 bzw. 39.7; MeOH-D₄: 3.35 bzw. 49.3 ppm) geeicht.

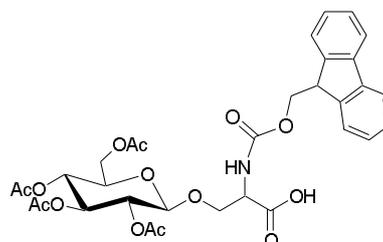
MALDI-ToF-Massenspektren wurden an einem Biflex-III-Gerät der Firma Bruker mit 19 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen. Als Matrices

wurden, wenn nicht anders angegeben, Norharman (9H-Pyrido[3,4-b]indol), sonst HCCA (α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure) oder 6-ATT (6-Aza-2-thiothymin) verwendet. Ionisierung erfolgte mit einem Stickstofflaser bei 337 nm.

9.2 Einzelvorschriften

***N*-(9-Fluorenyl-methoxycarbonyl)-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-L-serin (**5**)**

5.07 g (13.03 mmol) Glucosepentaacetat (**6**), 1 g gepulvertes, getrocknetes Molsieb 4 Å und 5.15 g (15.61 mmol) *N*-Fmoc-L-Serin (**7**) wurden unter Argon in 80 ml trockenem CH₂Cl₂ gelöst, dann wurde bei 0 °C 3 ml BF₃·Et₂O zugetropft und



18 h bei RT gerührt. Es wurden 400 ml CH₂Cl₂ zugegeben, mit 100 ml 1M HCl, anschließend mit 100 ml Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rückstandes an Kieselgel (1. EE / CY 1:1 / 0.1 % TFA, 2. CH₂Cl₂ / EtOH 20:1 → 10:1) lieferte einen farblosen Schaum.

Ausbeute: 4.16 g (6.33 mmol, $M = 657.62 \text{ g mol}^{-1}$) 48 %;

HPLC: RZ = 38.74 min [250/4 LiChrosorp 7 μ m C8, A = Wasser, B = ACN, 0 % B → 70 % B 60 min, 1 ml/min];

¹H-NMR (300 MHz, Aceton-D₆): δ 7.77, 7.59, 7.33 (je m_c, 8H, Aryl-H), 5.72 (br. d, 1H, NH), 5.19 (dd \approx t, 1H, $J_{3,4} = 9.2 \text{ Hz}$, H-3), 5.07 (dd \approx t, 1H, $J_{4,5} = 9.4 \text{ Hz}$, H-4), 4.96 (dd \approx t, 1H, $J_{2,3} = 8.9 \text{ Hz}$, H-2), 4.51 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.6 \text{ Hz}$, H-1), 4.44 (m_c, 2H, Ser-OCHH, Ser-H- α), 3.91 (dd, 1H, $J_{6,6'} = 10.8 \text{ Hz}$, H-6), 4.19 (m_c, 4H, Ser-OCHH, Fmoc-CH₂CH), 3.91 (dd \approx t, 1H, $J_{5,6} = 7.3 \text{ Hz}$, H-6'), 3.67 (m, 1H, H-5), 2.08, 2.05, 2.02, 1.99 (je s, je 3H, 4 CH₃COO) ppm;

¹³C-NMR (75.47 MHz, CDCl₃): δ 171.13, 170.27, 169.69, 169.48 (CO), 156.06 (NHCOO), 143.71, 143.6, 141.29, 127.76, 127.09, 125.02, 120.01 (Aryl-C), 101.09 (C-1), 72.54, 71.81, 71.09, 68.23 (C-2, C-3, C-4, C-5), 69.73 (Ser-

9. Experimenteller Teil

HPLC: RZ = 23.67 min [250/4 Vydac 100-5 C18, A = Wasser + 0.1% TFA, B = ACN + 0.1 % TFA, 0 % B → 50 % B, 1 ml/min, 50 min];

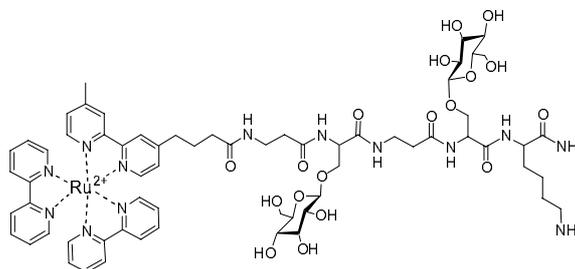
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Aceton- D_6) δ 8.71 (m, 6H, Aryl-H), 8.21 (m, 4H, Aryl-H), 8.05 (m, 4H, Aryl-H), 7.85 (m, 2H, Aryl-H), 7.65 (m, 4H, Aryl-H), 7.41 (m, 2H, Aryl-H), 5.27 (m, 2H, 2 H-3), 5.03 (m, 2H, 2 H-4), 4.89 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, H-1), 4.84 (m, 2H, 2 H-2), 4.77 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.1$ Hz, H-1), 4.58 (m, 2H, 2 Ser-H α), 4.44 (m, 1H, Lys-H α), 4.29 (m, 2H, 2 H-6), 4.12 (m, 2H, 2 H-6'), 3.97 (m_c, 6H, 2 H-5, 2 Ser-CH $_2$), 3.78 (m, 2H, Lys-CH $_2\text{NH}_2$), 3.4 (m_c, 4H, 2 β -Ala-CH $_2$), 2.85 (m \approx t, 2H, Aryl-CH $_2$), 2.58 (s, 3H, Aryl-CH $_3$), 2.5 (m_c, 4H, 2 β -Ala-CH $_2$), 2.29 (m, 2H, Aryl-CH $_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.05 (m, 2H, Aryl-CH $_2\text{CH}_2$), 1.79 (m, 4H, 2 Lys-CH $_2$), 1.55 (m, 2H, Lys-CH $_2$) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.47 MHz, Aceton- D_6) δ 175.01, 173.11, 172.97, 172.81, 172.45, 172.1, 170.96, 170.89, 170.86, 170.24, 170.18, 170.09, 170.05, 170.03 (CO), 160.65, 160.36, 159.81, 158.4, 158.19, 158.16, 158.12, 158.06, 157.64, 155.14, 152.59, 152.58, 152.53, 152.49, 151.79, 151.58, 151.29, 138.67, 129.34, 128.84, 128.81, 128.73, 128.62, 128.56, 126.17, 125.47, 125.26, 125.2 (Aryl-C), 101.6, 101.26 (2 C-1), 73.7, 73.33 (2 C-3), 72.72, 72.44 (2 C-5), 71.99, 71.6 (2 C-2), 69.98, 69.61 (2 Ser-OCH $_2$), 69.24, 69.06 (2 C-4), 62.9, 62.65 (2 C-6), 55.13, 54.21 (2 Ser-C α), 53.25 (Lys-C α), 47.83 (Lys-CH $_2\text{N}$), 36.59, 36.53, 36.43, 36.26 (4 β -Ala-CH $_2$), 35.11 (Aryl-CH $_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 27.24 (Lys-CH $_2$), 25.35 (Aryl-CH $_2\text{CH}_2$), 21.16 (Aryl-CH $_3$), 20.78, 20.75, 20.73, 20.68, 20.55, 20.49, 20.26 (CH $_3\text{COO}$) ppm;

ESI-MS: m/z 886.03 [M] $^{2+}$ (M = 1773.60 berechnet für $\text{C}_{81}\text{H}_{101}\text{N}_{13}\text{O}_{26}\text{Ru}^{2+}$).

BPRu- β -ala-O-(β -D-glucopyranosyl)-L-ser- β -ala-O-(β -D-glucopyranosyl)-L-ser-L-lys-NH₂ (11)

75 mg (42 μ mol) des acetylierten Peptids (**10**) wurden in 5 ml trockenem MeOH gelöst und mit 2 mg (37 μ mol) NaOMe versetzt. Nach jeweils 60 min Reak-



tionsdauer wurde der Reaktionsfortschritt per HPLC kontrolliert, nach 4 h war die Reaktion beendet. Es wurde mit 50 %iger Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in Toluol aufgenommen und das Lösungsmittel erneut *in vacuo* entfernt, um ein in der HPLC einheitliches rotes Öl zu liefern.

Ausbeute: 59 mg (41 μ mol, $M = 1437.52 \text{ g mol}^{-1}$) quant;

HPLC: RZ = 19.34 min [250/4 Vydac 100-5 C18, A = Wasser + 0.1% TFA, B = ACN + 0.1 % TFA, 0 % B \rightarrow 50 % B, 1 ml/min, 50 min];

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 8.42 (m, 4H, Aryl-H), 8.26 (m, 2H, Aryl-H), 7.93 (m, 4H, Aryl-H), 7.71 (m, 4H, Aryl-H), 7.53 (m, 2H, Aryl-H), 7.25 (m, 4H, Aryl-H), 7.12 (m, 2H, Aryl-H), 4.46 (m, 1H, Ser-H α), 4.36 (m_c, 3H, 2 H-1, Ser-H α), 4.21 (dd, 1H, $J = 5.1, 9.1 \text{ Hz}$, Lys-H α), 4.13 (dd, 1H, $J = 5.1, 10.6 \text{ Hz}$, Ser-OCHH), 4.02 (dd, 1H, $J = 5.8, 10.6 \text{ Hz}$, Ser-OCHH), 3.81 (m_c, 4H, 2 H-6, 2 Ser-OCHH), 3.59 (m, 2H, 2 H-6'), 3.31 (m_c, 8H, 2 H-3, 2 H-5, β -Ala-CH₂, 2 H-4), 3.16 (m_c, 4H, 2 H-2, β -Ala-CH₂), 2.89 (m \approx t, 2H, Lys-CH₂NH₂), 2.7 (m \approx t, 2H, Aryl-CH₂), 2.41 (s, 3H, Aryl-CH₃), 2.39 (m, 4H, 2 β -Ala-CH₂), 2.19 (m \approx t, 2H, Aryl-CH₂CH₂CH₂), 1.88 (m \approx q, 2H, Aryl-CH₂CH₂), 1.71 (m_c, 2H, Lys-CHCH₂), 1.58 (m, 2H, Lys-CH₂), 1.34 (m_c, 2H, Lys-CH₂) ppm;

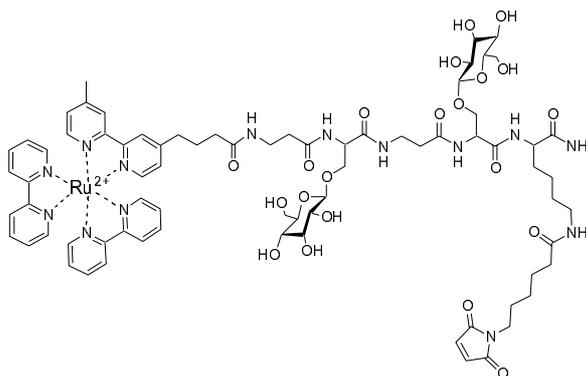
¹³C-NMR (125.47 MHz, D₂O) δ 176.43, 175.87, 174.05, 171.65, 171.19 (CO), 163.08, 162.8, 157.11, 156.78, 156.36, 153.04, 151.43, 151.37, 151.26, 151.17, 150.75, 150.52, 150.23, 137.34, 127.98, 127.22, 127.05, 124.69,

123.89 (Aryl-**C**), 102.26, 102.08 (2 **C-1**), 75.98 (2 **C-3**), 75.62 (2 **C-5**), 73.13, 73.02 (2 **C-2**), 69.69, 69.61 (2 **C-4**), 68.74, 68.5 (2 Ser-OCH₂), 60.74, 60.7 (2 **C-6**), 53.81 (2 Ser-**C**_α), 53.47 (Lys C_α), 39.18 (Lys-CH₂NH₂), 35.79, 53.5 (2 β-Ala-CH₂), 35.05 (Aryl-CH₂CH₂CH₂), 34.91, 34.73 (2 β-Ala-CH₂), 33.87 (Aryl-CH₂), 30.22 (Lys-CHCH₂), 26.19 (Lys-CH₂), 25.5 (Aryl-CH₂CH₂), 22.08 (Lys-CH₂), 20.39 (Aryl-CH₃) ppm;

ESI-MS: m/z 718.49 [M]²⁺ (M = 1437.52 berechnet für C₆₅H₈₅N₁₃O₁₈Ru²⁺).

BPRu-β-ala-O-(β-D-glucopyranosyl)-L-ser-β-ala-O-(β-D-glucopyranosyl)-L-ser-L-[N-(5-maleinamido-pentoxycarbonyl)]-lys-NH₂ (13)

55 mg (38 μmol) des Peptids (**11**) wurden in 5.5 ml 0.5 M Phosphat-Puffer pH 8.0 gelöst, 32 mg (1.1 mmol) Kupplungs-Reagenz (**12**) (Kuppl.-Rgz. MHS Roche Id.Nr. 0733875-001) wurden in wenig DMSO gelöst zugegeben. HPLC-



Analyse nach 30 min zeigte kompletten Umsatz an. Nach Filtration der Reaktionsmischung lieferte die präparative HPLC Chromatographie des Filtrats an RP-18 Kieselgel (A = Wasser 0.1% TFA, B = 80 % ACN in Wasser 0.1 % TFA, 20 % B → 70 % B, 20 ml/min, 90 min, RZ 41 min) ein orangerotes Lyophyllisat.

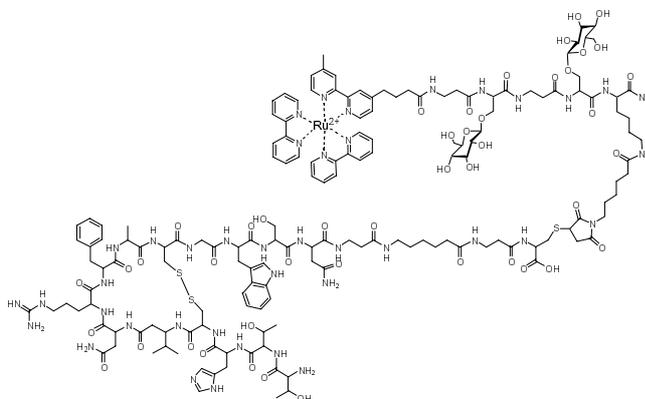
Ausbeute: 51 mg (31 μmol, M = 1630.72 g mol⁻¹) 75%;

HPLC: RZ = 23.82 min [250/4 Vydac 100-5 C18, A = Wasser + 0.1% TFA, B = ACN + 0.1 % TFA, 0 % B → 50 % B, 1 ml/min, 50 min];

ESI-MS: m/z 815.94 [M]²⁺ (M = 1630.59 berechnet für C₇₅H₉₆N₁₄O₂₁Ru²⁺).

BPRu- β -ala-O-(β -D-glucopyranosyl)-L-ser- β -ala-O-(β -D-glucopyranosyl)-L-ser-L-[N-(5-(2-thio-gp32-malonamido)-pentoxycarbonyl)]-lys-NH₂ (14)

32 mg (20 μ mol) des aktivierten Peptids (13) wurden in 3 ml 0.1 M K₂HPO₄ Puffer pH 7 gelöst. 77 mg (39 μ mol) gp32-SH (15) wurden in wenig 1 %iger Essigsäure gelöst und schnell mit dem Puffer gemischt. Der pH Wert



wurde mit 0.01 M NaOH wieder auf 7 eingestellt. Dabei fiel das gp32-Peptid aus und wurde mit Hilfe von DMSO wieder in Lösung gebracht. Nach 3 h wurde der Ansatz filtriert und die verbleibende Lösung *in vacuo* eingengt. Die präparative HPLC Chromatographie des Rückstandes an RP-18 Kieselgel (A = Wasser 0.1% TFA, B = 80 % ACN in Wasser 0.1 % TFA, 20 % B \rightarrow 70 % B, 20 ml/min, 90 min, RZ 46 min) lieferte ein orangerotes Lyophilisat.

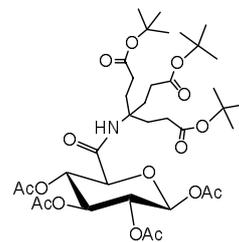
Ausbeute: 41 mg (11 μ mol, M = 3596.95 g mol) 58 %;

HPLC: RZ = 27.43 min [250/4 Vydac 100-5 C18, A = Wasser + 0.1% TFA, B = ACN + 0.1 % TFA, 0 % B \rightarrow 50 % B, 1 ml/min, 50 min];

ESI-MS: m/z 1199.77 [M]³⁺ (M = 3595.44 berechnet für C₁₅₈H₂₂₀N₄₀O₄₅S₃Ru²⁺).

1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-6-{3-cascade:amidomethan[3]:propansäure-tert-butylester}- β -D-glucuronsäure (17)

9.08 g (25.08 mmol) Tetraacetyl-Glucuronsäure (**16**) wurde mit 10.42 g (25.08 mmol) des Amins (**28**) versetzt, es wurden 3.59 g (26.61 mmol) HOBt zugesetzt und die Mischung 1h *in vacuo* getrocknet. Es wurden 150 ml



trockenes CH_2Cl_2 unter Argon zugegeben und zur entstandenen Suspension bei 0 °C 5.01 ml (32.17 mmol) DIC zugesetzt. Es wurde über Nacht gerührt, die Lösung *in vacuo* teilweise eingeeengt und entstandener Feststoff abfiltriert. Die Säulenchromatographie an Kieselgel (A = Cyclohexan, B = Essigester, 30 % B 10 min. \rightarrow 30 % B \rightarrow 40 % B 60 min., 20 ml/min) lieferte einen farblosen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 10.14 g (13.3 mmol, $M = 759.83 \text{ g mol}^{-1}$) 53 %;

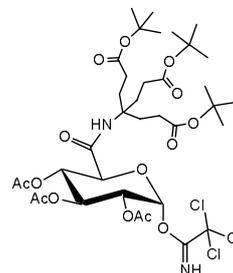
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 6.25 (br. s, 1H, NH), 5.75 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.1 \text{ Hz}$, H-1), 5.26 (dd \approx t, 1H, $J_{2,3} = 9.2 \text{ Hz}$, H-3), 5.15 (dd \approx t, 1H, $J_{4,5} = 9.7 \text{ Hz}$, H-4), 5.12 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9.2 \text{ Hz}$ $J_{1,2} = 8.1 \text{ Hz}$, H-2), 3.92 (d, 1H, $J_{4,5} = 9.7 \text{ Hz}$, H-5), 2.2 (m_c , 9H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$, CH_3COO), 2.05, 2.04, 2.01 (s, je 3H, 3 CH_3COO), 1.93 (m_c , 6H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.45 (s, 27H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.47 MHz, CDCl_3): δ 172.63, 172.57, 169.84, 169.28, 168.69, (CO), 164.89 (CONH), 91.21 (C-1), 80.69 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 73.48, 72.02, 70.22, 69.01 (C-2, C-3, C-4, C-5), 57.67 ($\text{NHC}(\text{CH}_2)_3$), 29.51, 29.41 (CCH_2CH_2), 28.05 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 20.84, 20.64, 20.56, 20.45 (CH_3) ppm;

MALDI-ToF-MS: m/z 782 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($M = 759.37$ berechnet für $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{NO}_{16}$).

2,3,4-Tri-O-acetyl-6-{3-cascade:amidomethan[3]:propansäure-tert-butylester}- α -D-glucuronyl-trichloracetimidat (19)

1.51 g (2.11 mmol) des Glucuronsäure-Derivats (**18**) wurden in 30 ml CH_2Cl_2 gelöst, mit 2.5 ml (25.22 mmol) Trichloracetonitril und 0.1 ml DBU versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde *in vacuo* eingeeengt und säulenchromatographisch an Kieselgel (A = Cyclohexan, B = Essigester, 25 % B, 20 ml/min, 60 min) gereinigt, um einen farblosen amorphen Feststoff zu liefern.



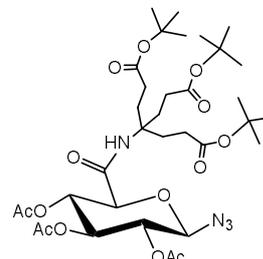
Ausbeute: 1.47 g (1.71 mmol, $M = 862.18 \text{ g mol}^{-1}$) 81%;

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.75 (s, 1H, NHCCCl_3), 6.6 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.6 \text{ Hz}$, **H-1**), 6.58 (br. s, 1H, **NH**), 5.58 (dd \approx t, 1H, $J_{2,3} = 9.9 \text{ Hz}$, **H-3**), 5.23 (dd, 1H, $J_{4,5} = 9.9 \text{ Hz}$, **H-4**), 5.12 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9.9 \text{ Hz}$ $J_{1,2} = 3.6 \text{ Hz}$, **H-2**), 4.29 (d, 1H, $J_{4,5} = 9.9 \text{ Hz}$, **H-5**), 2.2 (m_c , 6H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.06, 2.04, 2.03 (s, je 3H, 3 CH_3COO), 1.95 (m_c , 6H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.44 (s, 27H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.47 MHz, CDCl_3): δ 172.6, 169.86, 169.6 (**CO**), 165.44 (**CONH**), 160.74 (NHCCCl_3), 92.23 (**C-1**), 90.39 (CCl_3), 80.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 71.29, 69.45, 68.96 (**C-2**, **C-3**, **C-4**, **C-5**), 57.59 ($\text{NHC}(\text{CH}_2)_3$), 29.66, 29.52 (CCH_2CH_2), 28.04 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 20.64, 20.58, 20.42 (CH_3) ppm;

1-Azido-1-desoxy-2,3,4-tri-O-acetyl-6-{3-cascade:amidomethan[3]:propansäure-*tert*-butylester}- β -D-glucuronsäure (21)

1.88 g (5.4 mmol) 1-Azido-1-desoxy-2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-glucuronsäure (**20**) wurde mit 2.25 g (5.45 mmol) Amin (**28**) und 0.75 g (5.5 mmol) HOBt versetzt und 1 h *in vacuo* getrocknet. Es wurden unter Argon 50 ml CH₂Cl₂ zugegeben, anschließend wurden bei 0 °C 0.86 ml (5.5 mmol) DIC zugesetzt und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde *in vacuo* teilweise eingengt und entstandener Feststoff abfiltriert. Säulenchromatographie an Kieselgel (A = Cyclohexan, B = Essigester, 30 % B, 20 ml/min, 60 min) liefert einen farblosen amorphen Feststoff.



Ausbeute: 3.19 g (4.3 mmol, M = 742.81 g mol) 79 %;

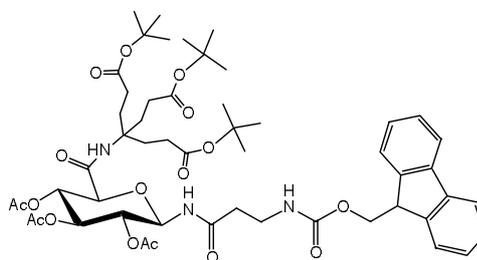
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.64 (br s, 1H, NH), 5.25 (dd \approx t, 1H, J_{2,3} = 9.4 Hz, H-3), 5.13 (dd \approx t, 1H, J_{4,5} = 9.6 Hz, H-4), 4.96 (dd, 1H, J_{2,3} = 9.3 Hz J_{1,2} = 8.9 Hz, H-2), 4.72 (d, 1H, J_{1,2} = 8.9 Hz, H-1), 3.88 (d, 1H, J_{4,5} = 9.8 Hz, H-5), 2.23 (m_c, 6H, CCH₂CH₂CO), 2.09, 2.03, 2.01 (s, je 3H, 3 CH₃COO), 1.95 (m_c, 6H, CCH₂CH₂CO), 1.45 (s, 27H, C(CH₃)₃) ppm;

¹³C-NMR (75.47 MHz, CDCl₃): δ 172.65, 172.63, 172.62, 169.85, 169.21 (CO), 164.91 (CONH), 87.74 (C-1), 80.64 (C(CH₃)₃), 75.07, 71.82, 70.51, 69.03 (C-2, C-3, C-4, C-5), 57.69 (NHC(CH₂)₃), 29.66, 29.51 (CCH₂CH₂), 28.03 (C(CH₃)₃), 20.54, 20.51, 20.49 (CH₃COO) ppm;

MALDI-ToF-MS: m/z 765.6 [M + Na]⁺ (M = 742.36 berechnet für C₃₄H₅₄N₄O₁₄).

1-N-[[9-Fluorenyl-methoxycarbonyl]- β -alanyl]-1-desoxy-2,3,4-tri-O-acetyl-6-{3-cascade:amidomethan[3]:propansäure-*tert*-butylester}- β -D-glucuronsäure (25)

120 mg (0.16 mmol) des Azids (**22**) wurden mit 93 mg (0.3 mmol) *N*-Fmoc- β -alanin (**23**) sowie 40 mg (0.3 mmol) HOBt versetzt und 1 h *in vacuo* getrocknet. Die Mischung wurde unter Argon in 20 ml trockenem THF gelöst und bei 0 °C mit 46.7 μ l (0.3 mmol) DIC 10 min gerührt.



Es wurden 200 μ l einer 1M Lösung von Trimethylphosphin in THF (2 mmol) zugegeben und 1 h bei 0 °C, anschließend über Nacht bei RT gerührt. 50 ml Wasser wurden zugegeben, die Lösung dreimal mit 50 ml Essigester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 50 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde zunächst einer GPC an Sephadex LH-20 (MeOH) unterzogen. Die anschließende Säulenchromatographie an Kieselgel (A = Cyclohexan, B = Essigester, 33 % B, 20 ml/min, 60 min) liefert ein farbloses Glas.

Ausbeute: 110 mg (0.11 mmol, $M = 1010.13 \text{ g mol}^{-1}$) 68%;

HPLC: RZ = 22.35 min [250/4 LiChrosorp 7 μ m C8, A = Wasser, B = ACN, 0 % B \rightarrow 100 % B 30 min, 1 ml/min];

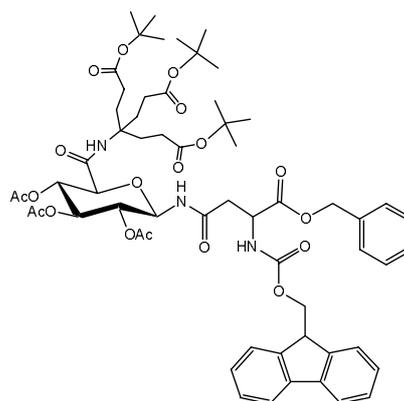
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.75, 7.55, 7.36, 7.29 (je m_c , 8H, Aryl-H), 6.47 (br. d, 1H, C-1 NH), 6.38 (br s, 1H, $\text{NHC}(\text{CH}_2)_3$), 5.48 (br. s, 1H, Fmoc-NH), 5.33 (dd \approx t, 1H, H-3), 5.29 (dd \approx t, 1H, H-1), 5.09 (dd \approx t, 1H, H-4), 4.91 (dd \approx t, 1H, H-2), 4.38 (m_c , 2H, Fmoc- CH_2CH), 4.21 (m_c , 1H, Fmoc- CH_2CH), 3.91 (d, 1H, $J_{4,5} = 9.9 \text{ Hz}$, H-5), 3.49 (m_c , 2H, β -Ala- COCH_2), 2.49 (m_c , 2H, β -Ala- CH_2NH), 2.17 (m_c , 6H, CCH_2CH_2), 2.07, 2.02, 1.99 (je s, je 3H, 3 CH_3COO), 1.92 (m_c , 6H, CCH_2CH_2), 1.43 (s, 27H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm;

^{13}C -NMR (125.47 MHz, CDCl_3): δ 172.69, 171.69, 170.99, 169.59, (CO), 169.35, 165.29 (CONH), 156.44 (NHCOO), 143.89, 141.29, 127.69, 127.03, 125.06, 125, 119.97 (Aryl-C), 80.64 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 77,83 (C-1), 74.69, 71.92, 70.62, 69.53, (C-2, C-3, C-4, C-5), 66.79 (Fmoc- CH_2CH) 57.66 ($\text{NHC}(\text{CH}_2)_3$), 47.19 (Fmoc- CH_2CH), 36.58, 36.08 (β -Ala- CH_2CH_2) 29.67, 29.56 (CCH_2CH_2), 28.06 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 20.57, 20.53, 20.49 (CH_3COO) ppm;

MALDI-ToF-MS: m/z 1032 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($\text{M} = 1009.48$ berechnet für $\text{C}_{52}\text{H}_{71}\text{N}_3\text{O}_{17}$).

1-N-[(9-Fluorenyl-methoxycarbonyl)-L-benzyl-asparagyl]-1-desoxy-2,3,4-tri-O-acetyl-6-{3-cascade:amidomethan[3]:propansäure-tert-butylester}- β -D-glucuronsäure (26)

250 mg (0.56 mmol) des Azids (**22**) wurden mit 300 mg (0.41 mmol) *N*-Fmoc-Benzyl-L-asparaginsäure (**24**) sowie 81 mg (0.6 mmol) HOBt versetzt und 1 h *in vacuo* getrocknet. Die Mischung wurde unter Argon in 50 ml trockenem THF gelöst und bei 0 °C mit 90 μl (0.6 mmol) DIC 10 min gerührt. Es wurden 600 μl einer 1 M Lösung von Trimethylphosphin in



THF zugegeben und 1 h bei 0 °C, anschließend über Nacht bei RT gerührt. 100 ml Wasser wurden zugegeben, die Lösung dreimal mit 100 ml Essigester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 100 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde zunächst einer Säulenchromatographie an Kieselgel (A = Cyclohexan, B = Essigester, 40 % B, 20 ml/min, 60 min) unterzogen, anschließende GPC an Sephadex LH-20 (MeOH) lieferte ein farbloses Glas.

Ausbeute: 277 mg (0.24 mmol, $\text{M} = 1144.26 \text{ g mol}^{-1}$) 59 %;

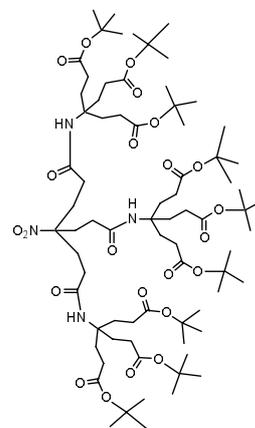
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.73, 7.55, 7.36, 7.28 (je m_c , 13H, Aryl-H), 6.56 (br d, 1H, NH), 6.41 (br s, 1H, NH), 6.14 (br d, 1H, NH), 5.33 (dd \approx t, 1H, $J_{2,3} = 9.6$ Hz, H-3), 5.27 (dd \approx t, 1H, $J_{1,2} = 9.2$ Hz, H-1), 5.17 (m_c , 2H, Aryl- CH_2), 5.08 (dd \approx t, 1H, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, H-4), 4.88 (dd \approx t, 1H, H-2), 4.69 (m_c , 1H, Asp-H α), 4.45 – 4.25 (m, 2H, Fmoc- CH_2CH), 4.17 (m_c , 1H, Fmoc- CH_2CH), 3.88 (d, 1H, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, H-5), 2.91 (dd, 1H, $J = 4.2, 16.2$ Hz, Asp-CHH), 2.79 (dd, 1H, $J = 3.3, 16.1$ Hz, Asp-CHH), 2.19 (m_c , 6H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.01, 2.00, 1.99 (je s, je 3H, 3 CH_3COO), 1.89 (m_c , 6H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.41 (s, 27H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.47 MHz, CDCl_3) δ 172.67 (COOH), 172.50, 169.57, 169.33, 165.22 (CO), 156.21 (NHCOO), 143.83, 143.69, 141.23, 135.2, 128.56, 128.35, 128.16, 127.88, 127.68, 127.06, 125.11, 119.93 (Aryl-C), 80.62 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 77.79 (C-1), 74.77 (C-5), 71.80 (C-3), 70.45 (C-2), 69.51 (C-4), 67.44, 67.38 (Aryl- CH_2 , Fmoc- CH_2CH), 57.67 ($\text{C}(\text{CH}_2)_3$), 50.7 (Asp-C α), 47.05 (Fmoc- CH_2CH), 37.71 (Asp- CH_2), 29.89, 29.72, 29.55 ($\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 28.04 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 20.56, 20.51, 20.44 (CH_3COO) ppm;

MALDI-ToF-MS: m/z 1167 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($\text{M} = 1143.52$ berechnet für $\text{C}_{60}\text{H}_{77}\text{N}_3\text{O}_{19}$).

9-Cascade:nitromethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure-*tert*-butylester (30)

160 mg (0.58 mmol) 4-Nitro-4-[2-(carboxyethyl)]-heptandisäure (29) und 800 mg (1.93 mmol) 4-Amino-4-[2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethyl)]heptandisäure-*tert*-butylester (28), 234 mg (1.73 mmol) HOBt und 157 mg (1.73 mmol) DCC wurden in 20 ml trockenem DMF gelöst und 48 h bei RT gerührt. Der Ansatz wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in 50 ml Essigester aufgenommen und mit 10 % iger HCl, Wasser und ges. Natriumbicarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase



9. Experimenteller Teil

wurde über MgSO_4 getrocknet, filtriert und eingeeengt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rückstandes an Kieselgel (A = Cyclohexan, B = Essigester, 33 % B 60 min, 20 ml/min) lieferte das Produkt als weißen Schaum.

Ausbeute: 605 mg (0.41 mmol, $M = 1469.87 \text{ g mol}^{-1}$) 71 %;

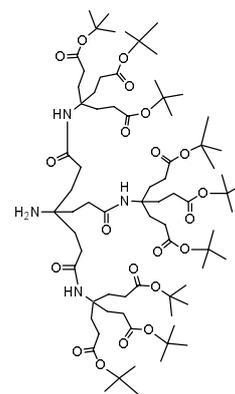
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 6.15 (br. s, 3H, NH), 2.23 ($m_c \approx t$, 18H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 2.11 (m_c , 12H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.94 ($m_c \approx t$, 18H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 1.45 (s, 81H, $\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.47 MHz, CDCl_3): δ 172.74 (CH_2COO), 170.38 (CH_2CONH), 92.56 (O_2NC), 80.64 ($\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 57.54 ($\text{CONHC}(\text{CH}_2)_3$), 31.24, 31.19, 29.81, 29.71 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHR}$) 28.03 ($\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$) ppm;

MALDI-ToF-MS m/z 1492 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($M = 1468.93$ berechnet für $\text{C}_{76}\text{H}_{132}\text{N}_4\text{O}_{23}$).

9-Cascade:aminomethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure-*tert*-butylester (31)

Zu einer Lösung aus 160 mg (0.11 mmol) Nitroverbindung (**30**) in 15 ml trockenem Methanol wurden 150 mg frisch hergestelltes Raney-Nickel zugegeben und 5 d unter Wasserstoff-Atmosphäre bei RT hydriert. Die Lösung wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rückstandes an Kieselgel (CY/EE 1:2 \rightarrow CY/EE/MeOH 1:2:1) lieferte das Produkt als weißen Schaum.



Ausbeute: 149 mg (0.1 mmol, $M = 1439.89 \text{ g mol}^{-1}$) 94 %;

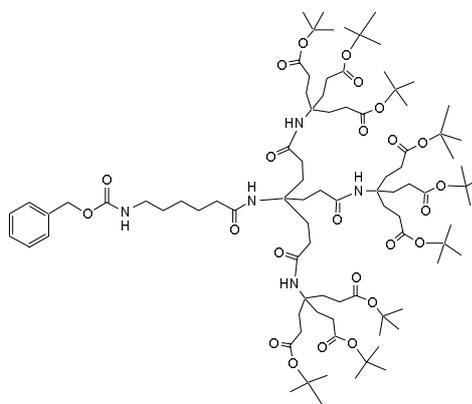
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 6.15 (br. s, 3H, NH), 2.24 (m_c , 24H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.91 (m_c , 18H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 1.62 (m_c , 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.45 (s, 81H, $\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.47 MHz, CDCl_3): δ 172.64 ($\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 172.35 (CH_2CONR), 80.42 ($\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 57.31 (H_2NC), 52.61 ($\text{CONHC}(\text{CH}_2)_3$), 34.97, 31.39, 29.82, 29.73 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONR}$), 27.96 ($\text{CH}_2\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$) ppm;

MALDI-ToF-MS m/z 1440.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ ($\text{M} = 1438.95$ berechnet für $\text{C}_{76}\text{H}_{134}\text{N}_4\text{O}_{21}$).

9-Cascade:6-*N*-carbobenzyloxy-aminocaprone:amidomethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure-*tert*-butylester (34)

1.79 g (1.2 mmol) des Amins (**31**) wurden in 50 ml trockenem CH_2Cl_2 gelöst und mit 512 mg (2.0 mmol) 6-*N*-Cbz-Aminocaprone (**32**) und 270 mg (2.0 mmol) HOBt versetzt. Bei 0 °C wurden 252 mg (2.0 mmol) DIC zugetropft und das Reaktionsgemisch anschließend 12 h bei RT gerührt. Entstandener Feststoff wurde



abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in wenig MeOH aufgenommen, anschließende GPC an Sephadex LH-20 (MeOH) lieferte das Produkt als weißen Schaum.

Ausbeute: 731 mg (0.44 mmol, $\text{M} = 1687.18$ g mol) 36 %;

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.7 (br. s, 1H, $\text{CONHC}(\text{CH}_2)_3$), 7.35 (m_c , 5H, Aryl-H), 6.15 (br. s, 3H, $\text{CONHC}(\text{CH}_2)_3$), 5.27 (br. t, 1H, OCONHCH_2), 5.1 (s, 2H, Aryl- CH_2), 3.2 (q, 2H, OCONHCH_2), 2.15 (m_c , 26H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$),

9. Experimenteller Teil

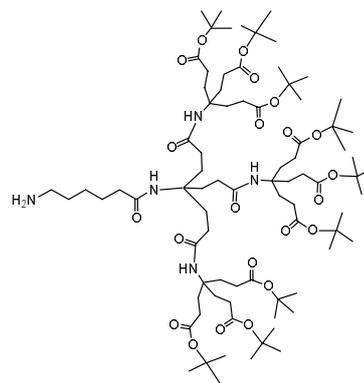
1.95 (m_c, 24H, CCH₂CH₂CONH), 1.5 (m_c, 8H, CH₂), 1.43 (s, 81H, COOC(CH₃)₃) ppm;

¹³C-NMR (75.47 MHz, CDCl₃): δ 173.36, 172.93 (CO), 172.73 (COOC(CH₃)₃), 156.52 (OCON), 136.8, 128.43, 128.08, 127.94, (Aryl-C), 80.61 (COOC(CH₃)₃), 66.43 (CH₂-Aryl) 57.46, 57.39 (NHC(CH₂)₃), 40.87, 37.07 (CH₂), 31.94, 31.73, 29.76, 29.66, 29.57 (CCH₂CH₂CONH), 28.08 (COOC(CH₃)₃), 26.26, 25.25 (CH₂) ppm;

MALDI-ToF-MS m/z 1709 [M + Na]⁺ (M = 1686.07 berechnet für C₉₀H₁₅₁N₅O₂₄).

9-Cascade:6-aminocapronsäure:amidomethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure-*tert*-butylester (35)

731 mg (0.44 mmol) des *N*-Cbz-geschützten Amins (**34**) wurden in 20 ml trockenem Methanol gelöst, mit 20 mg Pd/C versetzt und unter Wasserstoff-Atmosphäre 12 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel eingeeengt. Der Rückstand wurde in wenig MEOH aufgenommen, anschließende GPC an Sephadex LH-20 (MeOH) lieferte das Produkt als weißen Schaum.



Ausbeute: 629 mg (0.41 mmol, M = 1553.05 g mol) 93 %;

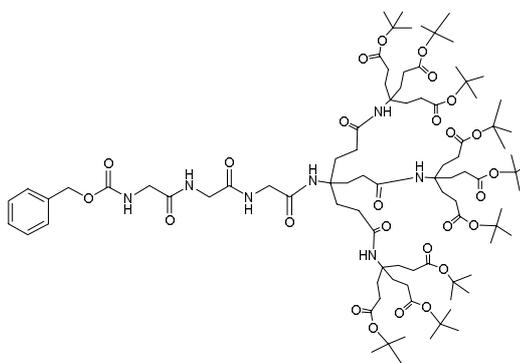
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.65 (br. s, 1H, NH), 6.15 (br. s, 3H, NH), 2.72 (t, 2H, CH₂NH₂), 2.2 (m_c, 26H, CH₂, CCH₂CH₂CONH), 1.95 (m_c, 24H, CCH₂CH₂CONH), 1.64 (m_c, 4H, CH₂), 1.44 (s, 83H, CH₂, COOC(CH₃)₃) ppm;

^{13}C -NMR (75.47 MHz, CDCl_3): δ 173.38, 172.86 (**CONH**), 172.65 (**COOC(CH₃)₃**), 80.54 (**COOC(CH₃)₃**), 57.4, 57.35 (**NHC(CH₂)₃**), 41.82, 37.11 (**CH₂**), 33.43 (**CH₂NH₂**), 31.89, 31.69, 29.73 (**CCH₂CH₂CONH**), 28.04 (**COOC(CH₃)₃**), 26.28, 25.2 (**CH₂**) ppm;

MALDI-ToF-MS: m/z 1552 $[\text{M} + \text{H}]^+$ ($\text{M} = 1552.04$ berechnet für $\text{C}_{82}\text{H}_{145}\text{N}_5\text{O}_{22}$).

9-Cascade:*N*-carbobenzyloxy-triglycinyl:amidomethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure-*tert*-butylester (**36**)

300 mg (0.21 mmol) des Amins (**31**) wurden mit 70 mg (0.21 mmol) *N*-Cbz-Triglycin (**33**) sowie 30 mg (0.22 mmol) HOBt versetzt und in 30 ml trockenem aminfreien DMF gelöst. 45 mg (0.22 mmol) DCC wurden zugesetzt, 51 mg DIPEA zugegeben und der



Ansatz bei RT über Nacht gerührt. Es wurde eingeeengt, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in wenig Methanol aufgenommen, und der GPC an Sephadex LH-20 (MeOH) unterworfen, die das Produkt als weißen Schaum lieferte.

Ausbeute: 330 mg (0.19 mmol, $\text{M} = 1745.18$ g mol) 90 %;

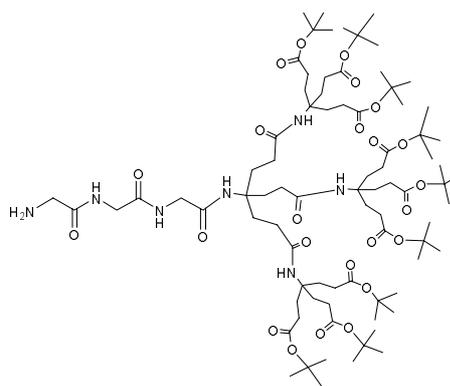
^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.85 (br. t, 1H, **NH**), 7.65 (br. t, 1H, **NH**), 7.5 (br. s, 1H, **NH**), 7.3 (m_c , 5H, **Aryl-H**), 6.45 (br. t, 1H, **NH**), 6.35 (br. s, 3H, **NH**), 5.1 (s, 2H, **CH₂-Aryl**) 4.15 (d, 2H, **CH₂NH**), 3.95 (d, 2H, **CH₂NH**), 3.85 (d, 2H, **CH₂NH**), 2.15 (m_c , 24H, **CH₂CH₂COR**), 1.95 (m_c , 24H, **CH₂CH₂COR**), 1.45 (s, 81H, **COOC(CH₃)₃**) ppm;

^{13}C -NMR (75.47 MHz, CDCl_3): δ 173.21, 172.99, 172.79, 172.6, 170.67, 168.96, (CO), 136.19, 128.51, 128.15, 127.99, (Aryl-C), 80.78, 80.62 ($\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), (CONHCCH_2), 67.03 (Aryl- CH_2), 58.43, 57.39 ($\text{NHC}(\text{CH}_2)_3$), 44.58, 44.42, 43.02 (CONHCH_2), 31.42, 30.91 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 29.87, 29.79 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 28.07 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm;

MALDI-ToF-MS m/z 1768 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($\text{M} = 1744.06$ berechnet für $\text{C}_{90}\text{H}_{149}\text{N}_7\text{O}_{26}$).

9-Cascade:triglycin:amidomethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure-*tert*-butylester (37)

300 mg (0.17 mmol) des *N*-Cbz-geschützten Amins (**36**) wurden in 30 ml trockenem Methanol gelöst, mit 20 mg Pd/C versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre 12 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und die Lösung eingengt. Der Rückstand wurde in wenig Methanol aufgenommen, anschließende GPC an Sephadex LH-20 (MeOH) lieferte das Produkt als weißen Schaum.



Ausbeute: 265 mg (0.16 mmol, $\text{M} = 1611.05 \text{ g mol}^{-1}$) 94 %;

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.91 (br. t, 1H, NH), 7.62 (br. s, 1H, NH), 6.41 (br. t, 1H, NH), 6.33 (br. s, 3H, NH), 4.21 (d, 2H, NHCH_2CO), 3.72 (m_c , 4H NHCH_2CO), 2.22 (m_c , 18H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.05 (m_c , 18H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.43 (s, 81H, $\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$) ppm;

^{13}C -NMR (75.47 MHz, CDCl_3) δ 173.13, 172.92, 172.87, 170.54, 168.81, (CO), 80.64, 80.61, 80.54 ($\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), (CONHCCH_2), 62.89 ($\text{NCOCH}_2\text{NH}_2$), 58.24, 57.64, 57.32 ($\text{NHC}(\text{CH}_2)_3$), 44.23, 42.64 (CONHCH_2),

31.42, 30.97 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 29.93, 29.84 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 28.07 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm;

MALDI-ToF-MS m/z 1646 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($M = 1610.02$ berechnet für $\text{C}_{82}\text{H}_{143}\text{N}_7\text{O}_{24}$).

9-Cascade:6-amidobiotinyl-capronsäure:amidomethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure-*tert*-butylester (39)

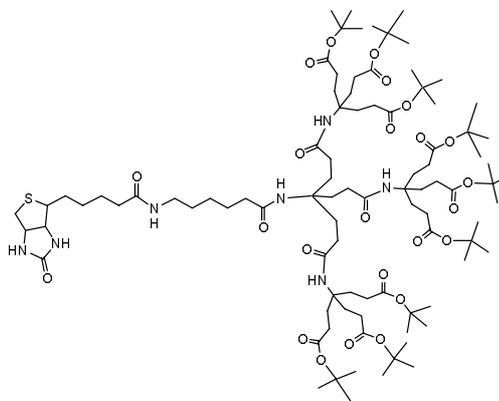
150 mg (96 μmol) des Amins (**35**)

wurden in 10 ml trockenem CH_2Cl_2 gelöst, 37 mg (0.11 mmol) des

aktivierten Biotin Derivates (**38**) wurden zugegeben und die Lösung bei RT gerührt bis das Edukt nicht mehr nachweisbar war (MALDI). Das

Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in wenig Methanol

aufgenommen und mit Hilfe der GPC an Sephadex LH-20 (MeOH) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer Schaum isoliert.



Ausbeute: 148 mg (83 μmol , $M = 1779.35 \text{ g mol}^{-1}$) 81 %;

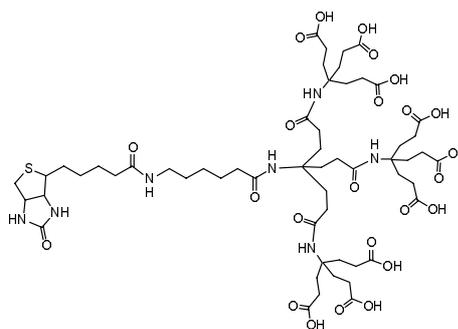
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.22 (br. t, 1H, CONHCH_2), 6.95 (br. s, 1H, CONHC), 6.65 (br. s, 3H, CONHC), 6.48 (br. s, 1H, CONHC), 5.55 (br. s, 1H, CONHC), 4.52 (m_c , 1H, SCH_2CH), 4.34 (m_c , 1H, SCHRCH), 3.18 (m_c , 1H, SCHR), 2.85 (dd, 1H, $\text{SCH}_2\text{-exo}$), 2.74 ($m \approx d$, 1H, $\text{SCH}_2\text{-endo}$), 2.18 (m_c , 28H, CH_2 , $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.92 (m_c , 24H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.83 (m_c , 2H, CH_2), 1.65 (m_c , 6H, CH_2), 1.51 (m_c , 4H, CH_2), 1.44 (s, 83H, CH_2 , $\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$) ppm;

^{13}C -NMR (125.47 MHz, CDCl_3): 173.59, 173.33 (CONH), 172.89 (COOC(CH₃)₃), 163.92 (NCON), 80.54 (COOC(CH₃)₃), 60.94, 60.34 (SCH₂CH, SCHRCH), 57.82, 57.20 (NHC(CH₂)₃), 55.49 (SCHR), 40.01, 38.56, 36.39 (CH₂), 31.69, 31.51 29.81 29.77 (CCH₂CH₂CONH), 28.49 (CH₂), 28.06 (COOC(CH₃)₃), 27.78, 27.64, 25.81, 25.27, 24.86 (CH₂) ppm;

MALDI-ToF-MS: m/z 1802 [M + Na]⁺ (M = 1778.12 berechnet für C₉₂H₁₅₉N₇O₂₄S).

9-Cascade:6-amidobiotinyl-capronsäure:amidomethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure (40)

148 mg (83 μmol) des *t*Bu-Esters (39) wurden in 10 ml Trifluoressigsäure gelöst und 10 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde daraufhin *in vacuo* bei RT entfernt. Die präparative HPLC des Rückstandes an RP-8 Kieselgel (A = Wasser, B = ACN, 10 % B → 60 % B, 10 ml/min, 70 min, RZ 32 min) lieferte ein weißes Lyophilisat.



Ausbeute: 94 mg (73 μmol, M = 1274.39 g mol⁻¹) 89 %;

^1H -NMR (500 MHz, MeOH-D₄): δ 4.51 (m_c, 1H, SCH₂CH), 4.34 (m_c, 1H, SCHRCH), 3.15 (m, 1H, SCHR), 2.89 (dd, 1H, SCH₂-exo), 2.71 (m ≈ d, 1H, SCH₂-endo), 2.25 (m_c, 18H, CH₂COOC(CH₃)₃), 2.18 (m_c, 10H, CH₂, CCH₂CH₂CONH), 2.05 (m_c, 18H, CCH₂CH₂CONH), 1.92 (m_c, 8H, CCH₂CH₂CONH), 1.75 (m_c, 2H, CH₂), 1.65 (m_c, 2H, CH₂), 1.55 (m_c, 2H, CH₂), 1.47 (m_c, 2H, CH₂), 1.36 (m_c, 2H, CH₂) ppm;

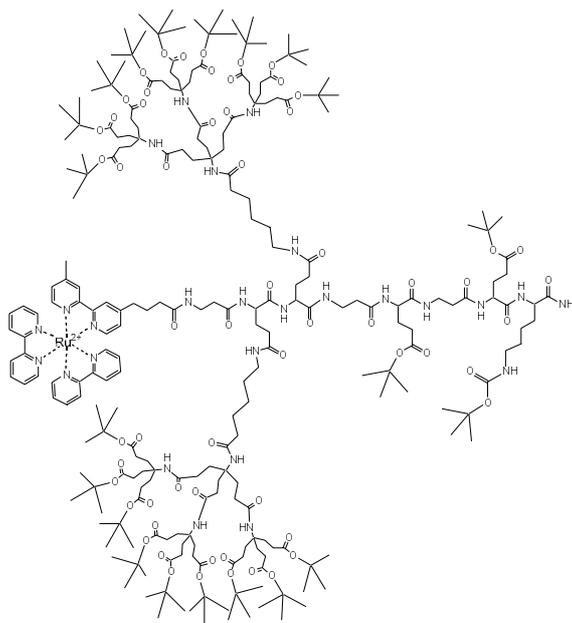
^{13}C -NMR (125.47 MHz, MeOH-D₄): δ 177.12 (COOH), 176.11, 175.58 (CONH), 63.29, 61.67 (SCH₂CH, SCHRCH), 58.59 (NHC(CH₂)₃), 56.92

(SCHR), 41.06, 40.21, 36.89 (CH₂), 31.93, 30.44 (CCH₂CH₂CONH), 30.19, 29.65, 29.43 (CH₂), 29.25 (COOC(CH₃)₃), 27.54, 26.95, 26.63 (CH₂) ppm;

MALDI-ToF-MS: 1297 m/z [M + Na]⁺ (M = 1273.55 berechnet für C₅₆H₈₇N₇O₂₄S).

BPRu-β-ala-L-asp-(9-cascade:6-aminocaprinsäure:amidomethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure-*tert*-butylester)-L-asp-(9-cascade:6-aminocaprinsäure:amidomethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure-*tert*-butylester)-β-ala-L-asp(O-*t*Bu)-β-ala-L-asp(O-*t*Bu)-L-lys(N-Boc) (44)

40 mg (23 μmol) des BPRu-Peptids (**42**) und 155 mg (102 μmol) des Amins (**35**) wurden unter Argon im Braunglaskolben in 10 ml trockenem aminfreiem DMF gelöst. Bei 0 °C wurden 26 mg (69 μmol) HATU zugegeben, der Ansatz langsam auf 40 °C erwärmt und 34 μl (200 μmol) DIPEA zugesetzt. Es wurde 56 h bei 40 °C gerührt, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen und mit Hilfe der GPC an Sephadex LH 60 (MeOH) gereinigt. Man erhielt das Produkt als roten, amorphen Feststoff.



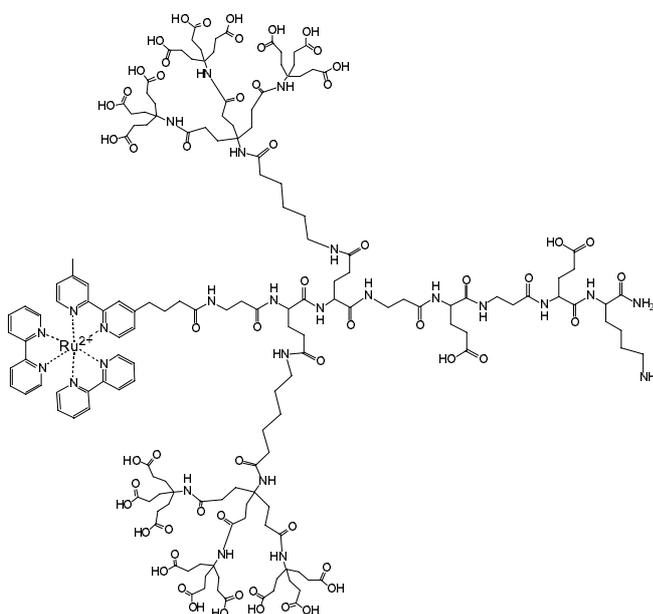
Ausbeute: 101 mg (21 μmol, M = 4809.01 g mol⁻¹) 91%;

ESI-MS: m/z 2403.54 [M]²⁺ (M = 4806.79 berechnet für C₂₄₇H₃₉₈N₂₆O₆₁Ru²⁺);

MALDI-ToF-MS (6-ATT): m/z 4800 $[M + Na]^+$ ($M = 4806.79$ berechnet für $C_{247}H_{398}N_{26}O_{61}Ru^{2+}$).

BPRu- β -ala-L-asp-(9-cascade:6-aminocaprinsäure:amidomethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure)-L-asp-(9-cascade:6-aminocaprinsäure:amidomethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure)- β -ala-L-asp- β -ala-L-asp-L-lys (45)

60 mg (12 μ mol) des *t*Bu-Esters (**44**) wurden in 5 ml 95 %iger Ameisensäure gelöst und 12 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit 50 ml Toluol versetzt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Präparative HPLC des Rückstandes an RP-8 Kieselgel (A = Wasser 0.1 % TFA, B = ACN 0.1 % TFA, 5 % B \rightarrow 70 % B, 10 ml/min, 80 min, RZ 61 min) lieferte ein orangerotes Lyophilisat.



Ausbeute: 39 mg (11 μ mol, $M = 3586.77$ g mol $^{-1}$) 91%;

HPLC: RZ = 45.59 min [250/4 LiChrosorp 7 μ m C8, A = Wasser 0.1 % TFA, B = ACN 0.1 % TFA, 0 % B 10 min \rightarrow 0 % B \rightarrow 40 % B 60 min, 1 ml/min];

MALDI-ToF-MS (HCCA): m/z 3585 $[M + H]^+$ ($M = 3585.48$ berechnet für $C_{162}H_{230}N_{26}O_{59}Ru^{2+}$).

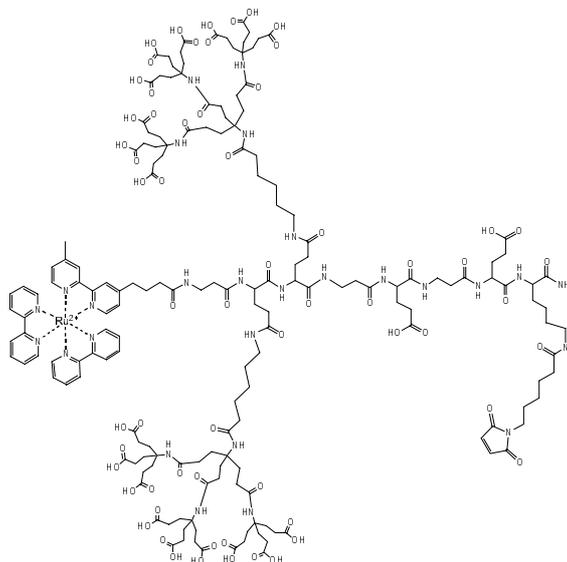
BPRu- β -ala-L-asp-(9-Cascade:6-aminocaprinsäure:amidomethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure)-L-asp-(9-cascade:6-aminocaprinsäure:amidomethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure)- β -ala-L-asp- β -ala-L-asp-L-lys(*N*-maleinamidocapryl) (46)

39 mg (11 μ mol) des Amins (**45**)

wurden in 40 ml Phosphatpuffer (0.5 M, pH 8) gelöst und mit 20 mg (65 μ mol) MHS-Kupplungsreagenz (**12**) in wenig DMSO versetzt. Der

Ansatz wurde bei RT gerührt, bis das Edukt nicht mehr nachweisbar war (MALDI), anschließend wurde mit TFA auf pH 4 eingestellt. Die Präparative HPLC des Rückstandes an RP-8 Kieselgel (A = Wasser 0.1

% TFA, B = ACN 0.1 % TFA, 10 % B \rightarrow 65 % B, 10 ml/min, 60 min, RZ 41 min) lieferte ein orangerotes Lyophyllisat.



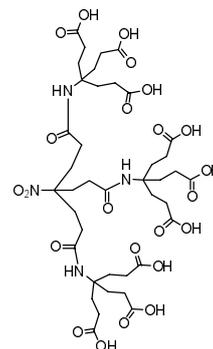
Ausbeute: 35 mg (9 μ mol, $M = 3779.97 \text{ g mol}^{-1}$) 82%;

HPLC: RZ = 53.71 min [250/4 LiChrosorp 7 μ m C8, A = Wasser 0.1 % TFA, B = ACN 0.1 % TFA, 0 % B 10 min \rightarrow 0 % B \rightarrow 40 % B 60 min, 1 ml/min];

MALDI-ToF-MS (HCCA): m/z 3782 $[M]^+$ ($M = 3778.56$ berechnet für $C_{172}H_{241}N_{27}O_{62}Ru^{2+}$).

9-Cascade:nitromethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propansäure (47)

400 mg (0.28 mmol) des *t*Bu-Esters (**30**) wurden in 10 ml 96 %iger Ameisensäure gelöst und 12 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde dreimal mit je 20 ml Toluol codestilliert. Der Rückstand wurde in warmem Aceton aufgenommen, über Celite filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in 10 %iger NaOH gelöst und mit konz. HCl angesäuert, um einen weißen Feststoff zu erhalten.



Ausbeute: 241 mg (0.25 mmol, $M = 964.92 \text{ g mol}^{-1}$) 89 %;

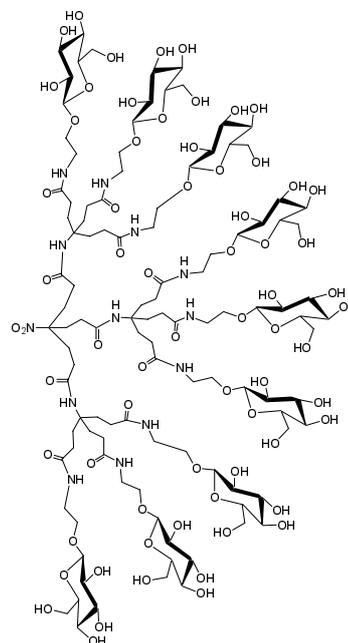
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, MeOH-D_4): δ 2.35 (m \approx t, 18H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 2.25 (m_c , 12H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CONHR}$), 2.05 (m \approx t, 18H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.47 MHz, DMSO-D_6): δ 174.56 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 170.53 (CONHR), 93.39 (O_2NC), 56.49 ($\text{CONHC}(\text{CH}_2)_3$), 31.21, 30.16, 29.08, 28.13 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCCH}_3$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONR}$);

MALDI-ToF-MS (HCCA): m/z 987 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($M = 964.36$ berechnet für $\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_{23}$).

9-Cascade:nitromethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propan-(1-amidoethyl- β -D-glucopyranosid) (**49**)

2.453 g (11.2 mmol) des (2-Aminoethyl)- β -D-glucopyranosids (**48**), 365 mg (2.8 mmol) HOBt und 261 mg (0.27 mmol) der Nonasäure (**47**) wurden in 40 ml trockenem DMF gelöst. Es wurden 578 mg (2.8 mmol) DCC zugegeben und der Ansatz 12 h bei RT gerührt. Es wurde filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und mit Hilfe der GPC an Sephadex LH-20 gereinigt. Die ersten Produktfraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Präparative HPLC des Rückstandes an RP-18 Kieselgel (A = Wasser, B = ACN, 5 % B \rightarrow 55 % B, 10 ml/min, 80 min, RZ 23 min) lieferte ein farbloses Lyophyllisat.



Ausbeute: 35 mg (12 μ mol, $M = 2811.79 \text{ g mol}^{-1}$) 4 %;

HPLC: RZ = 15.13 min [250/4 LiChrosorp 7 μ m C8, A = Wasser, B = ACN, 0 % B 10 min \rightarrow 0 % B \rightarrow 40 % B 60 min, 1 ml/min];

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ 4.59 (d, 9H, $J_{1,2} = 8 \text{ Hz}$, 9 **H-1**), 4.09 (m_c , 9H, CH_2CHHO), 4.04 (dd, 9H, $J_{5,6} = 2.2 \text{ Hz}$, $J_{6,6'} = 12.4 \text{ Hz}$, 9 **H-6**), 3.89 (m_c , 9H, CH_2CHHO), 3.84 (dd, 9H, $J_{5,6'} = 6 \text{ Hz}$, $J_{6,6'} = 12.4 \text{ Hz}$, 9 **H-6'**), 3.63 (dd \approx t, 9H, $J_{2,3} = 9.1 \text{ Hz}$, 9 **H-3**), 3.58 (m_c , 9H, 9 **H-5**), 3.55, (m_c , 18H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.51 (dd, 9H, $J_{4,5} = 9.9 \text{ Hz}$, $J_{4,3} = 9 \text{ Hz}$, 9 **H-4**), 3.42 (dd, 9H, $J_{2,3} = 9.3 \text{ Hz}$, $J_{2,1} = 7.9 \text{ Hz}$, 9 **H-6**), 2.36 (m_c , 30H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.1 (m_c , 18H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$) ppm;

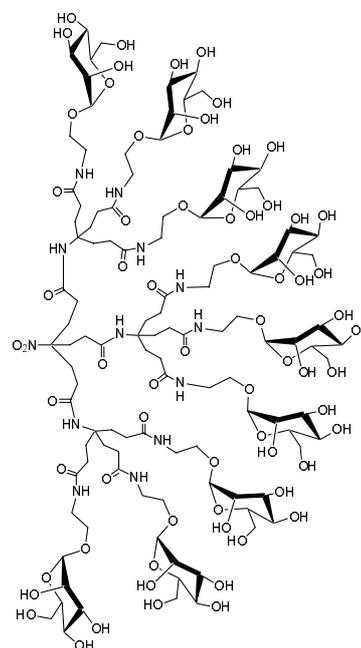
$^{13}\text{C-NMR}$ (125.47 MHz, D_2O): δ 178.6 ($\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 176.43 ($\text{CONHC}(\text{CH}_2)_3$), 105.06 (**C-1**), 78.64 (**C-5**), 78.37 (**C-3**), 75.8 (**C-2**), 72.35 (**C-**

4), 71.06 (CONHCH₂CH₂O), 63.47 (C-6), 60.81 (NHC(CH₂)₃), 42.07 (CONHCH₂CH₂O), 32.56, 32.34 (CCH₂CH₂CO) ppm;

MALDI-ToF-MS (HCCA) m/z 2787 [M-NO₂+Na]⁺ (M = 2810.22 berechnet für C₁₁₂H₁₉₅N₁₃O₆₈).

9-Cascade:nitromethan[3]:(2-aza-3-oxopentyliden):propan-(1-amidoethyl)-β-D-mannopyranosid) (**52**)

500 mg (2.24 mmol) des (2-Aminoethyl)-β-D-mannopyranosids (**51**), 540 mg (3 mmol) HATU und 160 mg (0.17 mmol) der Nonasäure (**47**) wurden 1 h *in vacuo* getrocknet und anschließend in 20 ml trockenem DMF gelöst. 530 μl DIPEA wurden zugesetzt und der Ansatz 12 h bei RT gerührt. Es wurde filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und mit Hilfe der GPC an Sephadex LH-20 gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand wurde in 0.5 M Phosphatpuffer (pH



8) aufgenommen. Präparative HPLC an RP-8 Kieselgel (A = Wasser, B = ACN, 0 % B → 50 % B, 10 ml/min, 60 min, RZ 28 min) lieferte ein farbloses Lyophyllisat.

Ausbeute: 32 mg (11 μmol, M = 2811.79 g mol⁻¹) 7 %;

HPLC: RZ = 15.27 min [250/4 LiChrosorp 7μm C8, A = Wasser, B = ACN, 0 % B 10 min → 0 % B → 40 % B 60 min, 1 ml/min];

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ 4.85 (m, 9H, 9 H-1), 3.92 (dd, 9H, J_{1,2} = 2.1 Hz, J_{2,3} = 3.3 Hz, 9 H-2), 3.86 (dd, 9H, J_{5,6} = 1.9 Hz, J_{6,6'} = 12.3 Hz, 9 H-6), 3.78

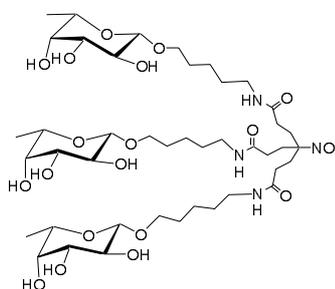
(dd, 9H, $J_{2,3} = 3.3$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz, 9 H-3), 3.77 (m_c, 9H, NHCH₂CHHO), 3.74 (dd, 9H, $J_{6,6'} = 11.9$ Hz $J_{5,6'} = 5.9$ Hz, 9 H-6'), 3.63 (dd ≈ t, 9H, $J_{3,4} = 9.1$ Hz, 9 H-4), 3.57 (m_c, 9H, NHCH₂CHHO), 3.55 (m_c, 9H, 9 H-5), 3.45, (m_c, 9H, NHCH₂CHHO), 3.37, (m_c, 9H, NHCH₂CHHO), 2.34 (m_c, 30H, CCH₂CH₂CO), 1.95 (m_c, 18H, CCH₂CH₂CO) ppm;

¹³C-NMR (125.47 MHz, D₂O): δ 178.47 (CONHCH₂CH₂O), 176.07 (CONHC(CH₂)₃), 102.21 (C-1), 75.43 (C-5), 73.08 (C-3), 72.6 (C-2), 69.28 (C-4), 68.36 (CONHCH₂CH₂O), 63.5 (C-6), 60.56 (NHC(CH₂)₃), 41.58 (CONHCH₂CH₂O), 32.54 (CCH₂CH₂CO), 32.41 (CONHCH₂CH₂O) ppm;

MALDI-ToF-MS (HCCA) m/z 2787 [M-NO₂+Na]⁺ (M = 2810.22 berechnet für C₁₁₂H₁₉₅N₁₃O₆₈).

3-Cascade:nitromethan[3]:propan-(1-amidopentyl-β-L-fucopyranosid) (54)

50 mg (0.2 mmol) des Aminofucosids (**53**) wurden mit 15 mg (0.06 mmol) der Trisäure (**27**) und 84 mg (0.22 mmol) HATU versetzt und in 2 ml trockenem DMF gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt, 37 μl (0.22 mmol) DIPEA zugegeben und der Ansatz 6 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel



wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und mit Hilfe der GPC an Sephadex LH-20 gereinigt. Man erhielt das Produkt als farblosen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 40 mg (41 μmol, M = 971.09 g mol⁻¹) 66 %;

HPLC: RZ = 25.03 min [250/4 LiChrosorp 7μm C8, A = Wasser, B = ACN, 5 % B → 60 % B 70 min, 1 ml/min];

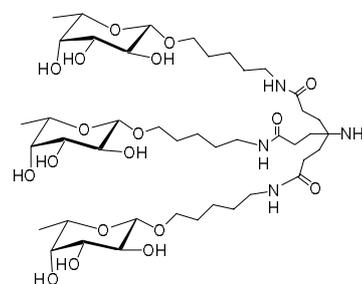
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH- D_4): δ 4.18 (m \approx d, 3H, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, 3 **H-1**), 3.85 (m_c, 3H, OCHH), 3.61 (m_c, 6H, 3 **H-5**, 3 **H-4**), 3.52 (m_c, 3H, OCHH), 3.46 (m_c, 6H, 3 **H-2**, 3 **H-3**), 3.16 (m_c, 6H, NHCH₂), 2.24 (m_c, 6H, CCH₂CH₂CONH), 2.17 (m_c, 6H, CCH₂CH₂CONH), 1.63 (m_c, 6H, OCHHCH₂), 1.52 (m_c, 6H, CH₂CH₂CH₂), 1.41 (m_c, 6H, CH₂CH₂NH), 1.26 (d, 9H, $J = 6.5$ Hz, 6-CH₃) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.47 MHz, MeOH- D_4): δ 173.94 (**C**ONH), 104.78 (**C-1**), 75.15 (**C-2**), 73.02 (**C-4**), 72.32 (**C-3**), 71.83 (**C-5**), 70.44 (OCHH), 40.42 (NHCH₂), 32.16, 31.18 (CCH₂CH₂CO), 30.37 (OCHHCH₂), 30.00 (CH₂CH₂CH₂), 24.42 (CH₂CH₂NH), 16.79 (6-CH₃) ppm;

MALDI-ToF-MS: m/z 947 $[\text{M-NO}_2+\text{Na}]^+$ ($M = 970.52$ berechnet für $\text{C}_{43}\text{H}_{78}\text{N}_4\text{O}_{20}$).

3-Cascade:aminomethan[3]:propan-(1-amidopentyl- β -L-fucopyranosid) (**55**)

40 mg (41 μmol) der Nitroverbindung (**54**) wurden in 20 ml trockenem Methanol gelöst und mit 1 g Raney-Nickel versetzt. Die Mischung wurde 7 d bei RT hydriert, über Celite filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Präparative HPLC des Rückstandes an RP-8 Kieselgel (A = Wasser



0.1 % TFA, B = ACN 0.1 % TFA, 5 % B \rightarrow 55 % B, 10 ml/min, 80 min, RZ 14 min) lieferte ein farbloses Lyophilisat.

Ausbeute: 28 mg (29 μmol , $M = 941.11$ g mol⁻¹) 72 %;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH- D_4): δ 4.27 (d, 3H, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 3 **H-1**), 3.81 (m_c, 3H, 3 OCHH), 3.69 (m \approx q, 3H, 3 **H-5**), 3.65 (m \approx d, 3H, 3 **H-4**), 3.54 (m_c, 3H, 3 OCHH), 3.48 (dd, $J_{3,4} = 3.5$ Hz, $J_{3,2} = 9.9$ Hz, 3 **H-3**), 3.37 (dd, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, 3H, 3 **H-2**), 3.11 (m_c, 6H, 3 NHCH₂), 2.27 (m_c, 6H, 3 CCH₂CH₂CONH), 1.89

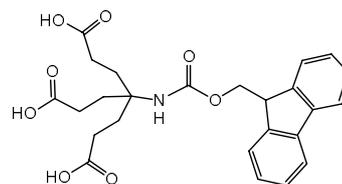
(m_c, 6H, 3 CCH₂CH₂CONH), 1.56 (m_c, 6H, 3 OCHHCH₂), 1.44 (m_c, 6H, 3 CH₂CH₂CH₂), 1.31 (m_c, 6H, 3 CH₂CH₂NH), 1.19 (d, 9H, J = 6.6 Hz, 3 6-CH₃) ppm;

¹³C-NMR (125.47 MHz, MeOH-D₄): δ 176.46 (CONH), 104.96 (C-1), 75.28 (C-2), 73.65 (C-4), 73.19 (C-3), 72.81 (C-5), 72.61 (OCHH), 60.13 (C(CH₂)₃), 41.71 (NHCH₂), 33.21, 31.57 (CCH₂CH₂CO), 30.71 (OCHHCH₂), 30.27 (CH₂CH₂CH₂), 24.77 (CH₂CH₂NH), 17.71 (6-CH₃) ppm;

MALDI-ToF-MS: m/z 963 [M + Na]⁺ (M = 940.55 berechnet für C₄₃H₈₀N₄O₁₈).

4-(2-Carboxyethyl)-4-(9-fluorenylmethoxycarbonyl-aminoheptan)-1,7-disäure (**56**)

1.21 g (4.64 mmol) Fmoc-Chlorid wurden mit 1.93 g (4.64 mmol) des Aminotriesters (**28**) in 30 ml C₂H₄Cl₂ gelöst, 1 ml DIPEA wurde zugesetzt und das Reaktionsgemisch 3 h bei RT gerührt.



Anschließend wurden 10 ml TFA zugesetzt, nach 3 h wurde mit 50 ml C₂H₄Cl₂ verdünnt und das Lösungsmittel *in vacuo* bei RT entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rückstands an RP-18 Kieselgel (Lobar® Gr. C, A = Wasser B = ACN, 55 % B, 15 ml/min, 2 Läufe) lieferte ein farbloses Lyophilisat.

Ausbeute: 1.82 g (3.89 mmol, M = 469.35 g mol⁻¹) 83 %;

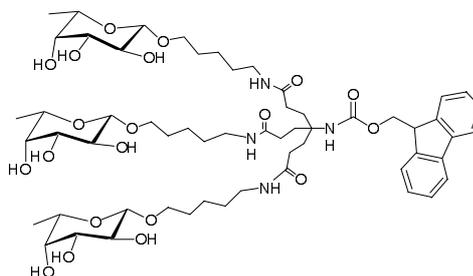
HPLC: RZ = 24.38 min [250/4 LiChrosorp 7 μm C8, A = Wasser, B = ACN, 10 % B → 80 % B 60 min, 1 ml/min];

¹H-NMR (300 MHz, MeOH-D₄): δ 7.84 (d, 2H, Aryl-H), 7.7 (d, 2H, Aryl-H), 7.39 (m_c, 4H, Aryl-H), 4.42 (d, 2H, Fmoc-CHCH₂), 4.23 (t, 1H, Fmoc-CHCH₂), 2.27 (m_c, 6H, CCH₂CH₂CO), 1.97 (m_c, 6H, CCH₂CH₂CO) ppm;

^{13}C -NMR (75.47 MHz, MeOH- D_4): δ 177.12 (COOH), 157.45 (OCONH), 145.39, 142.64, 128.75, 128.18, 120.89 (Aryl-C), 66.81 (Fmoc-CHCH $_2$), 57.44 (NHC(CH $_2$) $_3$), 30.56, 29.12 (CH $_2$ CH $_2$ CO) ppm.

3-Cascade:9-fluorenyl-methoxycarbonyl-aminomethan[3]:propan-(1-amidopentyl- β -L-fucopyranosid) (**58**)

105 mg (0.42 mmol) des Aminofucosids (**53**) wurden mit 66 mg (0.14 mmol) der Trisäure (**56**) und 171 mg (0.45 mmol) HATU versetzt. Diese Mischung wurde in 2 ml trockenem DMF gelöst. Anschließend



wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt, 92 μl (0.54 mmol) DIPEA wurden zugegeben und der Ansatz 6 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen und mit Hilfe der GPC an Sephadex LH-20 gereinigt. Das Produkt wurde in Form eines farblosen amorphen Feststoffes erhalten

Ausbeute: 64 mg (55 μmol , $M = 1163.35 \text{ g mol}^{-1}$) 39 %;

HPLC: RZ = 39.41 min [250/4 LiChrosorp 7 μm C8, A = Wasser, B = ACN, 0 % B \rightarrow 70 % B, 60 min, 1 ml/min];

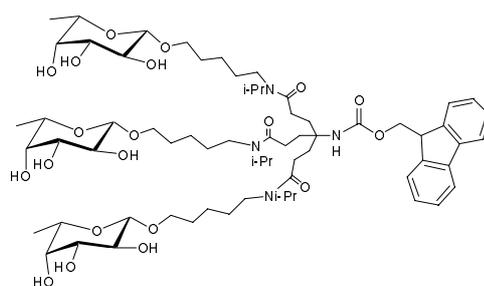
^1H -NMR (500 MHz, MeOH- D_4): δ 7.85 (d, 2H, Aryl-H), 7.73 (d, 2H, Aryl-H), 7.44 (m $_c$, 2H, Aryl-H), 7.35 (m $_c$, 2H, Aryl-H), 4.36 (m \approx d, 2H, Fmoc-CHCH $_2$), 4.25 (m \approx t, 1H, Fmoc-CHCH $_2$), 4.19 (m \approx d, 3H, 3 H-1), 3.87 (m $_c$, 3H, 3 OCHH), 3.67 (m $_c$, 6H, 3 H-5, 3 H-4), 3.54 (m $_c$, 9H, 3 OCHH, 3 H-2, 3 H-3), 3.18 (m \approx t, 6H, 3 CH $_2$ NH), 2.21 (m $_c$, 6H, 3 CCH $_2$ CH $_2$ CONH), 1.97 (m $_c$, 6H, 3 CCH $_2$ CH $_2$ CONH), 1.66 (m $_c$, 6H, 3 OCHHCH $_2$), 1.55 (m $_c$, 6H, 3 CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$), 1.45 (m $_c$, 6H, 3 CH $_2$ CH $_2$ NH), 1.28 (d, 9H, J = 6.4 Hz, 3 6-CH $_3$) ppm;

^{13}C -NMR (125.47 MHz, MeOH- D_4): δ 175.69, 175.58 (CONH), 145.44, 142.61, 128.78, 128.19, 126.31, 120.95 (Aryl-C), 104.79 (C-1), 75.16 (C-2), 73.04 (C-4), 72.33, (C-3), 71.84 (C-5), 70.64 (OCHH), 67.11 (Fmoc-CHCH₂), 57.89 (NHC(CH₂)₃), 40.42 (NHCH₂), 30.39, 30.08 (CCH₂CH₂CO), 30.71 (OCHHCH₂), (CH₂CH₂CH₂), 24.44 (CH₂CH₂NH), 16.81 (6-CH₃) ppm;

MALDI-ToF-MS: m/z 1186 [M + Na]⁺ (M = 1162.61 berechnet für C₅₈H₉₀N₄O₂₀).

3-Cascade:9-fluorenyl-methoxycarbonyl-aminomethan[3]:propan-(1-N-isopropyl-amidopentyl- β -L-fucopyranosid) (**59**)

123 mg (0.42 mmol) des Aminofucosids (**57**) wurden mit 66 mg (0.14 mmol) der Trisäure (**56**) und 171 mg (0.45 mmol) HATU versetzt und in 5 ml trockenem DMF gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt, 92 μl (0.54



mmol) DIPEA wurden zugegeben und der Ansatz 6 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und mit Hilfe der GPC an Sephadex LH-20 gereinigt. Man erhielt das Produkt als farblosen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 120 mg (93 μmol , M = 1289.59 g mol⁻¹) 66 %;

^1H -NMR (500 MHz, MeOH- D_4): δ 7.81 (m_c, 2H, Aryl-H), 7.69 (m_c, 2H, Aryl-H), 7.39 (m_c, 2H, Aryl-H), 7.32 (m_c, 2H, Aryl-H), 4.31 (m_c, 2H, Fmoc-CHCH₂), 4.21 (m_c, 1H, Fmoc-CHCH₂), 4.15 (m_c, 3H, 3 H-1), 3.79 (m_c, 3H, 3 OCHH), 3.58 (m_c, 6H, 3 H-5, 3 H-4), 3.51 (m_c, 3H, 3 OCHH), 3.44 (m_c, 6H, 3 H-2, 3 H-3), 3.16 (m_c, 6H, 3 CH₂NH), 2.36 (m_c, 6H, 3 CCH₂CH₂CONH), 1.97 (m_c, 6H, 3 CCH₂CH₂CONH), 1.63 (m_c, 6H, 3 OCHHCH₂), 1.56 (m_c, 6H, 3 CH₂CH₂CH₂),

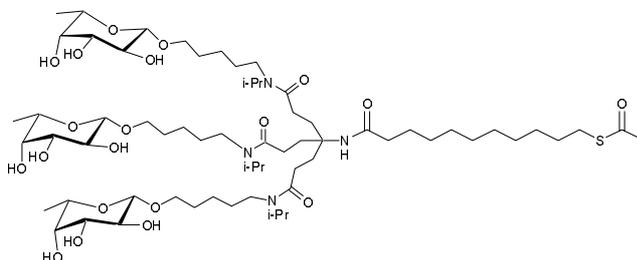
1.36 (m_c, 6H, 3 CH₂CH₂NH), 1.25 (m_c, 9H, 3 OCHCH₃), 1.15 (m_c, 18H, 3 NCH(CH₃)₂) ppm;

¹³C-NMR (125.47 MHz, MeOH-D₄): δ 174.79, 174.21 (CON), 156.96 (NCOO), 145.33, 142.64, 128.88, 128.26, 126.26, 121.06 (Aryl-C), 104.84, 104.81 (C-1), 75.19 (C-2), 73.06, 73.02 (C-4), 72.33, (C-3), 71.84 (C-5), 70.55, 70.35 (OCHH), 67.32 (Fmoc-CHCH₂), 58.11 (NC(CH₂)₃), 50.01, 49.85 (NCH(CH₃)₂), 47.83, 45.04, 42.32 (NCH₂), 32.14, 31.48, 30.51 (CCH₂CH₂CO), 30.39, 30.29, 24.84, 24.62 (CH₂), 21.53, 20.65 16.82, 16.79 (6-CH₃) ppm;

MALDI-ToF-MS: m/z 1313 [M + Na]⁺ (M = 1288.76 berechnet für C₆₇H₁₀₈N₄O₂₀).

3-Cascade:11-thioacetyl-undecyl-carbamoyl-aminomethan[3]:propan-(1-N-isopropyl-amidopentyl-β-L-fucopyranosid) (61)

120 mg (93 μmol) des Fmoc-geschützten Fucosids (**59**) wurden in 4 ml trockenem DMF gelöst, es wurde 1 ml Morpholin zugegeben und 1 h



bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, zum Rückstand wurden 30 mg (0.12 mmol) 11-Thioacetyl-undecansäure (**60**) und 46 mg (0.12 mmol) HATU zugegeben und das Gemisch 1 h *in vacuo* getrocknet. Die Reaktionsmischung wurde unter Argon in 5 ml trockenem DMF gelöst, mit 25 μl (0.15 mmol) DIPEA versetzt und 18 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und mit Hilfe der GPC an Sephadex LH-20 gereinigt, um das Produkt in Form eines farblosen amorphen Feststoffes zu erhalten.

Ausbeute: 76 mg (58 μmol, M = 1309.73 g mol⁻¹) 62 %;

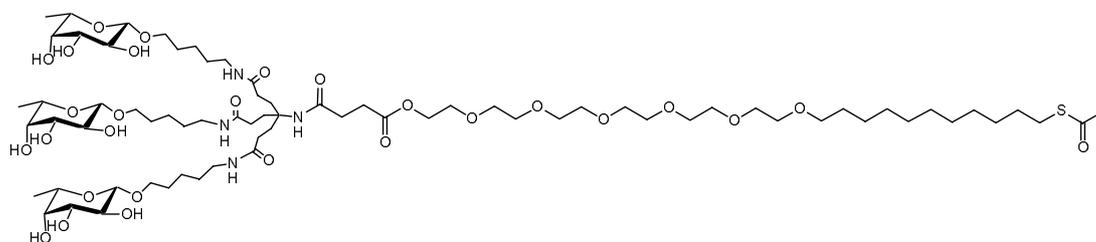
HPLC: RZ = 24.75 min [250/4 LiChrosorp 7 μ m C8, A = Wasser, B = ACN, 20 % B \rightarrow 90 % B 60 min, 1 ml/min];

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 4.53 (br. sept, $\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$), 4.19 (m_c , 3H, 3 H-1), 4.06 (br. sept, $\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$), 3.91 (m_c , 3H, C-1, OCHH), 3.72 (m_c , 3H, H-4), 3.59 (m_c , 9H, 3 H-2, 3 H-5, 3 H-3), 3.49 (m_c , 3H, C-1, OCHH), 3.13 (m_c , 4H, 2 CH_2), 2.83 (br. t, 2H, CH_2), 2.33 (m_c , 8H, 4 CH_2), 2.31 (br. s, 3H, CH_3COS), 2.15 (m_c , 8H, 4 CH_2), 1.61 (m_c , 16H, 8 CH_2), 1.3547 (m_c , 13H, 2 CH_2 , 3 6- CH_3), 1.18, 1.12 (je d, 18H, 3 $\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.47 MHz, CDCl_3): δ 196.07 (**COS**), 173.46, 173.3, 172.83 (**CO**), 103.19, 103.02 (**C-1**), 74.33, 74.29, 73.96, 71.62, 71.57, 71.3, 71.17, 70.47 (**C-4**, **C-3**, **C-2**, **C-5**), 69.57, 68.89 (C-1, OCHH), 57.47 (**C**(CH_2)₃), 48.51, 46.03 ($\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$), 43.72, 40.97, 37.48, 30.96 (CH_2), 30.63 (CH_3COS), 29.48, 29.12, 28.92, 28.81, 28.42, 28.23, 26.15, 26.03, 23.99, 23.52 (CH_2), 21.36, 20.50 ($\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$), 16.42 (6- CH_3) ppm;

MALDI-ToF-MS: m/z 1332 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺ ($\text{M} = 1308.82$ berechnet für $\text{C}_{65}\text{H}_{120}\text{N}_4\text{O}_{20}\text{S}$).

3-Cascade:11-thioacetyl-undecyl-hexaethylenglycolyl-carbonylethyl-carbamoyl-aminomethan[3]:propan-(1-amidopentyl- β -L-fucopyranosid) (63)



60 mg (0.37 mmol) des Fmoc-geschützten Fucosids (**58**) wurden in 4ml trockenem DMF gelöst, es wurde 1 ml Morpholin zugegeben und das Gemisch 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, zum Rückstand wurden 271 mg (0.44 mmol) des OEG-Alkylthioacetats (**62**) und

9. Experimenteller Teil

171 mg (0.45 mmol) HATU zugegeben. Es wurde 1 h *in vacuo* getrocknet, die Reaktionsmischung unter Argon in 5 ml trockenem DMF gelöst, mit 85 μ l (0.5 mmol) DIPEA versetzt und der Ansatz 48 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und mit Hilfe der GPC an Sephadex LH-20 gereinigt. Präparative HPLC des Rückstandes an RP-8 Kieselgel (A = Wasser, B = ACN, 5 % B \rightarrow 80 % B, 10 ml/min, 60 min, RZ 52 min) lieferte ein farbloses Öl.

Ausbeute: 24 mg (15 μ mol, $M = 1533.89 \text{ g mol}^{-1}$) 5 %;

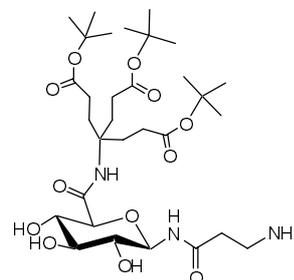
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH- D_4): δ 4.27 (m_c , 2H, COOCH_2), 4.21 (m_c , 3H, 3 H-1), 3.89 (m_c , 3H, OCHH), 3.75 (m_c , 2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2$), 3.68 (m_c , 18H, 9 CH_2 OEG), 3.66 (m_c , 3H, 3 H-5), 3.63 (m_c , 3H, 3 H-4), 3.62 (m_c , 2H, CH_2 -OEG), 3.57 (m_c , 3H, OCHH), 3.49 (m_c , 8H, 3 H-2, 3 H-3, CH_2 -OEG), 3.21 (dt, 6H, NHCH_2), 2.91 (t, 2H, CH_2S), 2.69 ($m \approx t$, 2H, COCH_2), 2.54 ($m \approx t$, 2H, COCH_2), 2.34 (s, 3H, CH_3COS), 2.22 (m_c , 6H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.01 (m_c , 6H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.68 (m_c , 6H, OCHH CH_2), 1.56 (m_c , 10H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, 2 CH_2), 1.48 (m_c , 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.35 (m_c , 14 H, 6 CH_2 -Alkyl), 1.31 (d, 9H, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 6- CH_3) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.47 MHz, MeOH- D_4): δ 175.77, 174.89 (CO), 104.83 (C-1), 75.21 (C-2), 73.06 (C-4), 72.37 (C-3), 71.86 (C-5), 71.58, 71.17 (CH_2 -OEG), 70.46 (OCHH), 70.08 (COOCH_2), 64.99 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_2$), 59.04 (C(CH_2) $_3$), 40.42 (NHCH_2), 31.75 (CH_2COO), 31.31, 30.74 ($\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 30.74, 30.69, 30.57, 30.42, 30.19, 30.13, 29.86, (CH_2), 29.79 (CH_2S), 24.77 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 16.81 (6- CH_3) ppm;

MALDI-ToF-MS: m/z 1557 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($M = 1532.87$ berechnet für $\text{C}_{72}\text{H}_{132}\text{N}_4\text{O}_{28}\text{S}$).

1-N-β-Alanyl-1-desoxy-6-(3-cascade:amidomethan[3]:propansäure-tert-butylester)-β-D-glucuronsäure (64)

310 mg (0.31 mmol) des Fmoc-Derivats (**25**) wurden in 20 ml trockenem Methanol gelöst, es wurden 5 mg Natrium zugesetzt und der Ansatz 3 h bei RT gerührt. Ionentauscher Amberlite IR 120 wurde bis zur neutralen Reaktion zugegeben, abfiltriert und mehrfach mit Methanol gespült. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und mit Hilfe der GPC an Sephadex LH-20 (MeOH) gereinigt. Man erhielt das Produkt in Form eines farblosen amorphen Feststoffes.



Ausbeute: 151 mg (0.23 mmol, $M = 661.78 \text{ g mol}^{-1}$) 73 %;

HPLC: RZ = 3.54 min [100/4 Chromolith RP 18e, A = Wasser, B = ACN, 0 % B → 100 % B, 5 min, 6 ml/min];

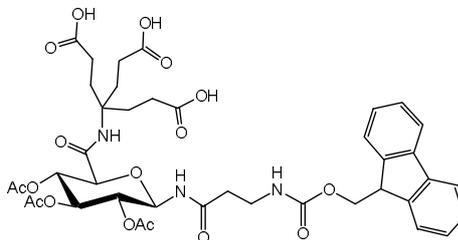
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH- D_4) δ 4.82 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.2 \text{ Hz}$, **H-1**), 3.66 (d, 1H, $J_{4,5} = 9.7 \text{ Hz}$, **H-5**), 3.39 (dd \approx t, 1H, **H-4**), 3.31 (dd \approx t, 1H, **H-3**), 3.17 (dd \approx t, 1H, **H-2**), 2.82 (m_c , 2H, NHCOCH_2), 2.32 (m_c , 2H, CH_2NH_2), 2.11 (m_c , 6H, CCH_2CH_2), 1.83 (m_c , 6H, CCH_2CH_2), 1.34 (s, 27H, $\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.47 MHz, MeOH- D_4) δ 175.68 (**C**ONH), 174.49 (**COO**tBu), 170.55 (**C**ONH), 81.69 (**C**(CH_3) $_3$), 81.24, 78.65, 78.32, 73.44, 72.67 (**C-1**, **C-2**, **C-3**, **C-4**, **C-5**), 59.01 (**NHC**(CH_2) $_3$), 39.46, 38.66 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 30.56, 30.51 (**C**(CH_2CH_2) $_3$), 28.36 (**C**(CH_3) $_3$);

MALDI-ToF-MS: m/z 684 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ ($M = 661.38$ berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_{12}$).

1-N-[(9-Fluorenyl-methoxycarbonyl)- β -alanyl]-1-desoxy-2,3,4-tri-O-acetyl-6-{3-cascade:amidomethan[3]:propancarbonsäure}- β -D-glucuronsäure (65)

308 mg (0.3 mmol) des *tert*-Butylesters (25), wurden in 20 ml 95 %iger TFA gelöst und 1h bei RT gerührt. Es wurden 50 ml Toluol zugegeben und das Lösungsmittel bei RT *in vacuo* entfernt. Präparative HPLC



des Rückstandes an RP-8 Kieselgel (A = Wasser, B = ACN, 20 % B \rightarrow 70 % B, 10 ml/min, 70 min, RZ 39 min) lieferte ein farbloses Lyophilisat.

Ausbeute: 177 mg (0.21 mmol, $M = 841.81 \text{ g mol}^{-1}$) 69 %;

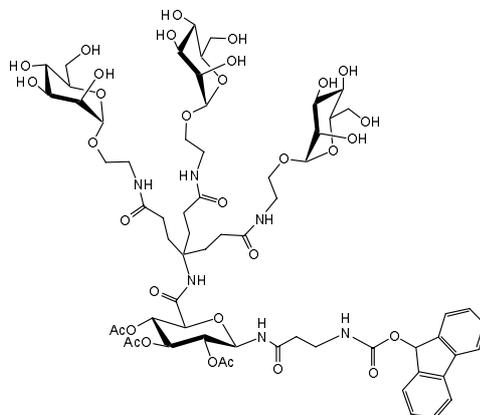
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, MeOH- D_4): δ 7.84, 7.67, 7.42, 7.34 (je m_c , 8H, Aryl-H), 5.36 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.3 \text{ Hz}$, H-1), 5.35 (dd \approx t, 1H, H-3), 5.26 (dd \approx t, 1H, H-4), 5.08 (dd \approx t, 1H, H-2), 4.38 (m_c , 2H, Fmoc- CH_2CH), 4.23 (m_c , 1H, Fmoc- CH_2CH), 4.15 (d, 1H, $J_{4,5} = 9.7 \text{ Hz}$, H-5), 3.41 (m_c , 2H, β -Ala- COCH_2), 2.48 (m_c , 2H, β -Ala- CH_2NH), 2.28 (m_c , 6H, CCH_2CH_2), 2.06 (m_c , 6H, CCH_2CH_2), 2.05, 2.01, 1.99 (je s, je 3H, 3 CH_3COO), ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.47 MHz, MeOH- D_4): δ 178.28 (COOH), 174.46 (CONH), 171.55, 171.28, 171.01, (CO), 167.97 (CONH), 158.7 (NHCOO), 145.3, 142.58, 128.78, 128.17, 126.18, 120.92 (Aryl-C), 79.05 (C-1), 76.67 (C-5), 74.63 (C-3), 71.68 (C-2), 70.75 (C-4), 67.73 ($\text{CH}_2\text{CH-Fmoc}$) 59.29 ($\text{NHC}(\text{CH}_2)_3$), 48.39 ($\text{CH}_2\text{CH-Fmoc}$), 37.91, (β -Ala- COCH_2), 36.98 (β -Ala- CH_2NH) 31.15, (CCH_2CH_2), 30.2 (CCH_2CH_2), 20.69, 20.62, 20.55 (CH_3COO) ppm;

MALDI-ToF-MS (HCCA): m/z 864 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ ($M = 841.29$ berechnet für $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_{17}$).

1-N-[(9-Fluorenyl-methoxycarbonyl)- β -alanyl]-1-desoxy-2,3,4-tri-O-acetyl-6-{3-Cascade:amidomethan[3]:propan-(1-amidoethyl- β -D-mannopyranosid)}- β -D-glucuronsäure (66)

45 mg des Amins (**51**) (0.2 mmol), 76 mg (0.2 mmol) HATU und 50 mg (0.06 mmol) der Trisäure (**64**) wurden 1 h *in vacuo* getrocknet und anschließend in 10 ml trockenem DMF gelöst. 68 μ l DIPEA wurden zugesetzt und der Ansatz 6 h bei RT gerührt. Es wurde filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der



Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und mit Hilfe der GPC an Sephadex LH-20 gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, präparative HPLC Chromatographie an RP-8 Kieselgel (ACN/Wasser, 5 % \rightarrow 60 %, 60 min, RZ 52 min) lieferte ein farbloses Lyophilisat.

Ausbeute: 43 mg (29 μ mol, $M = 1457.44 \text{ g mol}^{-1}$) 50%;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH-D_4) δ 7.83, 7.68, 7.43, 7.34 (je m_c , 8H, Aryl-H), 5.02 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.9 \text{ Hz}$, Glca-H-1), 4.74 (m, 3H, 3 Man-H-1), 4.37 (d, 2H, Fmoc- CH_2CH), 4.24 (t, 1H, Fmoc- CH_2CH), 3.88 (m_c , 6H, 3 Man-H-6, 3 Man-H-2), 3.85 (d, 1H, $J_{4,5} = 9.8 \text{ Hz}$, Glca-H-5), 3.79 (m_c , 3H, 3 OCHH), 3.76 (m_c , 6H, 3 Man-H-3, 3 Man-H-6'), 3.65 ($m \approx t$, 3H, 3 Man-H-4), 3.57 (m_c , 7H, 3 Man-H-5, Glca-H-4, 3 OCHH), 3.49 (m_c , 1H, Glca-H-3), 3.44 (m_c , 8H, β -Ala- COCH_2 , 3 OCHH CH_2), 3.37 (m_c , 1H, Glca-H-2), 2.54 (m_c , 2H, β -Ala- CH_2NH), 2.25 (m_c , 6H, CCH_2CH_2), 2.05 (s, 9H, 3 CH_3COO), 2.02 (m_c , 6H, CCH_2CH_2) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.47 MHz, MeOH-D_4) δ 176.01, 174.97, 173.4, 170.59 (CO), 158.8 (NHCOO), 145.32, 142.59, 128.79, 128.19, 126.21, 120.93 (Aryl-C),

9. Experimenteller Teil

101.67 (Man-**C**-1), 81.23 (GlcA-**C**-1), 78.8 (GlcA-**C**-5), 78.5 (GlcA-**C**-3), 74.81 (Man-**C**-5), 73.47 (GlcA-**C**-2), 72.91 (GlcA-**C**-4), 72.49 (Man-**C**-3), 72.07 (Man-**C**-2), 68.76 (Man-**C**-4), 67.82 (Fmoc-**CH**₂), 67.19 (O**CHH**), 62.99 (Man-**C**-6), 59.69 (**C**(CH₂)₃), 48.66 (Fmoc-**CH**), 40.37 (O**CHHCH**₂), 38.04 (β-Ala-**CH**₂CH₂NH), 37.21 (β-Ala-**CH**₂NH), 31.84 (C**CH**₂**CH**₂CO), 31.28 (C**CH**₂CH₂CO), 20.48 (**CH**₃COO) ppm;

MALDI-ToF-MS (HCCA): m/z 1480 [M + Na]⁺ (M = 1456.58 berechnet für C₆₄H₉₂N₆O₃₂).

Lebenslauf

Niels Röckendorf geboren am 28. 07.1972 in Rendsburg
verheiratet, ein Kind
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

07/1979 - 06/1982 Grundschule Rotenhof, Rendsburg.
08/1982 - 06/1993 Gymnasium Kronwerk, Rendsburg
21. 6.1993 Abitur in Rendsburg

Wehrdienst

06/1993 – 06/1994 Grundwehrdienst in München

Studium

WS 1994 Immatrikulation im Fach Chemie (Diplom) an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
WS 1997 Diplomvorprüfung an der CAU in Kiel
WS 1999 Diplomhauptprüfung an der CAU in Kiel
12/1999 - 9/2000 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Kiel im Arbeitskreis von Prof. Dr. T. K. Lindhorst, mit dem Thema: "Synthese und biologische Testung von Clustermannosiden mit aromatischer Partialstruktur"
10. 10. 2000 Chemie-Diplom an der CAU in Kiel
10/2000 Beginn der Promotion bei Frau Prof. Dr. T. K. Lindhorst über "Selektiv funktionalisierte Glycopeptide und Glycodendrimere in biologischen Testsystemen"

Anhang zum Lebenslauf

Wissenschaftlicher Werdegang

8/1998 - 9/1998	Werkstudententätigkeit bei PH R Chem. Forschung Ltd. Bayer Wuppertal
3/2000 - 9 /2000	Studentische Hilfskraft am Institut für Organische Chemie CAU im Rahmen der Praktika im Fach Chemie
10/2000 - 6/2002	Mitarbeit in einem vom BMBF geförderten Forschungsprojekt im Arbeitskreis von Prof. Dr. T. K. Lindhorst zum Thema „Funktionelle supramolekulare Systeme“
06/2002 - 10/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie CAU als EDV-Netzwerkbeauftragter
04/2001	Teilnahme an einer Fortbildung nach § 15 GenTSV

Veröffentlichungen

2001	N. Röckendorf, Th. K. Lindhorst, <i>Topics Curr. Chem.</i> , 2001 , 217, 201 – 239: “Glycodendrimers”.
2002	N. Röckendorf, O. Sperling, Th. K. Lindhorst, <i>Aust. J. Chem.</i> , 2002 , 55, 87 – 93: “Trivalent Cluster Mannosides with Aromatic Partial Structure as Ligands for the Type 1 Fimbrial Lectin of <i>Escherichia coli</i> ”.

Danksagung

- ❖ Meinen Eltern **Biene** und **Peter Röckendorf** für ihre uneingeschränkte Unterstützung während aller Phasen meines Lebens.
- ❖ **Ingo Aumüller**, für seine Anwesenheit im Labor zu später Stunde.
- ❖ **Mike M. K. Boysen**, für die Zeit als Labor- und Abzugnachbar im Alderlabor, für Lausanne, die Halloweenparties, seine Kalauer und seine Langmut bei Computerproblemen.
- ❖ **Kathrin Doege** und **Katharina Elsner**, dem K-und-K Team, einzeln bis vor kurzem kaum vorstellbar, für ihre Kommunikationsfähigkeiten an Montagmorgenden, sowie für ihre spannenden NMR-Rätsel.
- ❖ **Michael Docdubbi Dubber** für seine wertvollen Tipps in präparativen Angelegenheiten und sein ausgedehntes Methodenrepertoire, als einziger hätte er mit Sicherheit mehr als vier Brötchen zum AK-Frühstück bestellt.
- ❖ **Andreas Fuchs** dem Fux, für seinen Bayrisch- und Minigolf Theorieunterricht sowie seine Hilfe beim Besiegen bockiger Computer.
- ❖ **Christine Haug**, unserer Sekretärin, für ihr Organisationstalent und die Hilfe beim Herausfinden von Personal- und Bearbeiternummer für die entsetzlichen Formulare bei Dienstreiseanträgen und -abrechnungen.
- ❖ **Christoph Heidecke**, für die Zuteilung fähiger OC-F Praktis und für seine Sprüche in der Kaffeepause - „darfst gar nich drüber nachdenken“.
- ❖ **Mike Blackhole Kleinert** für gute Zusammenarbeit in Gemeinschafts-Projekten und das zur Verfügung stellen von Unmengen klebriger Ethylenglykole sowie fürs unermüdliche Aktualisieren der Frühstyxliste, einer Paraderolle für einen Niedersachsen.
- ❖ **Elwira Klima-Bartczak**, unserer CTA, unverzichtbar in Materialfragen, für ihre gute Laune und ihr freundliches Wesen sowie die hervorragend durchgeführten Synthesen in den letzten Jahren.
- ❖ **Marco Kühne**, für seine ruhige und gelassene Art.

Danksagung

- ❖ **Anupama Patel** and **Kashinath Sadalpure** for being first class English training partners, for introducing me to Indian culture and gel-chromatography.
- ❖ **Oliver Sperling** für die *Gewissheit*, dass jemand anders Montags morgens noch schlechtere Laune hat als man selbst, für seine Kompetenz in Sachen ELISA und Fischzubereitung, sowie seine Expertise in Fragen des „Geistes“.
- ❖ **Florian Thieme** für seine Motivationshilfe, was Aktivitäten im Lauf- und Triathlonsport anbelangt, außerdem für die Unterstützung beim Messen immer neuer analytischer HPLC-Chromatogramme.
- ❖ **Mark Walter** fürs dealen vieler unverzichtbarer Diablo II Items aus seinem reichhaltigen Fundus, seinen 10.000 Geburtstag, den unvergleichlichen Tanzkurs sowie seine Bereitschaft, die Laborbelegschaft morgens um 100 % zu verstärken.
- ❖ **Timm Dreessen, Arne Stademann, Jan Eggert** und **Frank Fahrenkrug**, die wirklich während meines gesamten Studiums in Kiel immer mit von der Partie waren.
- ❖ **Regina Meinschmidt** für die Hilfe bei Bestellungen und organisatorischen Fragen aller Art.
- ❖ Den Mitarbeitern der NMR-Abteilung, **Dr. Christian Wolff, Holger Franzen, Marion Höftmann, Gitta Kohlmeyer-Yilmaz** und **Dirk Meyer** für die Messung des kompletten Programms auch an Proben, die nur in μ -Mengen zur Verfügung standen.
- ❖ Allen anderen Mitarbeitern des Instituts: **Monika Bänsch** (Reinigung), **Rüdiger Kargoll** (Werkstatt), **Katrin Wagener** (Bibliothek) und **M. Andreas Wilms** (Chemikalienausgabe).

10. Literatur

- [1] Newkome G. R., Baker G. R., Young K. J., Traynham J. G., *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **1993**, 31, 641-651.
- [2] Lindhorst T. K., *Che. I. u. Z.*, **2000**, 1, 38-52.
- [3] Bertozzi C. R., Kiessling L. L., *Science*, **2001**, 291, 2357-2364.
- [4] Varki A., *Glycobiology*, **1993**, 3, 97-130.
- [5] Ashwell G., Harford J., *J. Ann. Rev. Biochem.*, **1982**, 51, 531-554.
- [6] Lis H., Sharon N., *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 637-674.
- [7] Feizi T., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1992**, 1, 766-770.
- [8] Sharon N., Lis H., *Trends Biochem Sci.*, **1987**, 12, 488-491.
- [9] Sharon N., Lis H., *Science*, **1989**, 246, 227-234.
- [10] Sharon N., Lis H., *Spektrum der Wissenschaft*, **1993**, 3, 66-74.
- [11] Inbar M., Sachs L., *Nature*, **1969**, 223, 710-712.
- [12] Dwek R. A., *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 683-720.
- [13] Sears P., Wong C.-H., *Angew. Chem.*, **1999**, 111, 2446-2471; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 2300-2324.
- [14] Dell A., Morris H. R., *Science*, **2001**, 291, 2351-2356.
- [15] Toone E. J., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1994**, 4, 719-728.
- [16] Chapleur Y., *Carbohydrate Mimics*; Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [17] Lundquist J. J., Toone E. J., *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 555-578.
- [18] Martens C. L., Cwirla S. E., Lee R. Y. W., Whitehorn E., Chen E. Y. F., Bakker A., Martin E. L., Wagstrom C., Goplain P., Smith C. W., Tate E., Koller K. H., Schatz P. J., Dower W. J., Barrett R. W., *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 21129-21136.
- [19] Villar H. O. Koehler R. T., *TMMec*, **1997**, 1, 23
(<http://uqbar.ncifcrf.gov/tmmec>)
- [20] Herzner H., Reipen T., Schultz M., Kunz H., *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 4495-4537.
- [21] Merrifield R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154.
- [22] Kocienski P. J., *Protecting Groups*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **1994**.

- [23] Kessler H., Kottenhahn M., Kling A., Kolar C., *Angew. Chem.*, **1987**, 99, 919; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1987**, 26, 888-900.
- [24] Halkes K. M., Gotfredsen C. H., Grøtli M., Miranda L. P., Duus J. Ø., Meldal M., *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 16, 3584-3591.
- [25] Sears P., Wong C.-H., *Science*, **2001**, 291, 2344-2350.
- [26] Dondoni A., Marra A., *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 4395-4421.
- [27] Kessler H., Wittmann V., Köck M., Kottenhahn M., *Angew. Chem.*, **1992**, 104, 874-877; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1992**, 31, 902-904.
- [28] Nolen E. G., Watts M. M., Fowler D. J., *Org. Lett.*, **2002**, 4, 22, 3963-3965.
- [29] Haneda T., Goekjian P. G., Kim S. H., Kishi Y., *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 490-498.
- [30] Grison C., Coutrot F., Coutrot P., *Tetrahedron*, **2001**, 57, 6215-6227.
- [31] Tennand-Eyles R. J., Fairbanks A. J., *Tetrahedron Asym.*, **1999**, 10, 391-401.
- [32] Turner J. J., Filippov D. V., Overhand M., van der Marel G. A., van Boom J. H., *Tetrahedron. Lett.*, **2001**, 42, 5763-5767
- [33] Boysen M., Lindhorst T. K., *Org. Lett.*, **1999**, 1, 1925-1927.
- [34] Sadalapure K., Lindhorst T. K., *Angew. Chem.*, **2000**, 112, 2066-2069; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 2010-2013.
- [35] Mammen M., Choi S.-K., Whitesides G. M., *Angew. Chem.*, **1998**, 110, 2908; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 2754-2794.
- [36] Lindhorst T. K., *Topics Curr. Chem.*, **2002**, 218, 201-235.
- [37] Röckendorf N., Lindhorst T. K., *Topics Curr. Chem.*, **2001**, 217, 201-239.
- [38] Ulman A., *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 1533-1544.
- [39] Löfås S., Johnsson B., Tegendahl K., Rönnerberg I., *Colloid. Surf.*, **1993**, 1, 83-89.
- [40] Prime K. L., Whitesides G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 10714-10721.
- [41] Quian X., Metallo S. J., Choi I., Wu H., Liang M. N., Whitesides G. M., *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 1805-1810.

- [42] Bohrmann C., Tausch M. W., *Che. I. u. Z.*, **2002**, 36, 164-167.
- [43] Augustin C., *Dissertation*, **2001**, Universität Regensburg.
- [44] Terpetschnig E., Szmacinski H., Lakowicz J. R., *Anal. Biochem.*, **1997**, 254, 179-186.
- [45] Szmacinski H., Terpetschnig E., Lakowicz J. R., *Biophys. Chem.*, **1996**, 62, 109-120.
- [46] Castellano F., Dattelbaum J. D., Lakowicz J. R., *Anal. Biochem.*, **1998**, 255, 165.
- [47] Dandliker W. B., 1977, *Immunochemistry of Proteins*, Plenum, New York.
- [48] Friedman A., Egenbrib H. C., Sauvage J. P., Turro N. J., Barton J. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 4960-4962.
- [49] Geisser B., Ponce A., Alsfasser R., *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 2030-2037.
- [50] Garg H. G., von dem Bruch K., Kunz H., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1994**, 50, 277-310.
- [51] Ferrari S., Bannwarth W., Morley S. J., Totty N. F., Thomas G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 7282-7286.
- [52] Mort A. J., Lampport A. J. T., *Anal. Biochem.*, **1977**, 82, 289-309.
- [53] Mitchell S. A., Pratt M. R., Hruby V. J., Polt R., *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 2327-2342.
- [54] Mathieux N., Paulsen H., Meldal M., Bock K., *J. Chem. Soc. Perkin 1*, **1997**, 2359-2368.
- [55] Paulsen H., Adermann K., *Liebigs Ann. Chem.*, **1989**, 751-769.
- [56] Garg H. G., Hasenkamp T., Paulsen H., *Carbohydr. Res.*, **1986**, 151, 225-232.
- [57] Vegad H., Gray C. J., Somers P. J., Dutta A. S., *J. Chem. Soc. Perkin 1*, **1997**, 1429-1442.
- [58] Salvador L. A., Elofsson M., Kihlberg J., *Tetrahedron*, **1995**, 51, 5643-5656.
- [60] Sheehan J. C., Hess G. P., *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067-1068.
- [59] Meienhofer J., *The Mixed Carbonic Anhydride Method of Peptide Synthesis*, in Gross E., Meienhofer J. (Hrsg.), *The Peptides: Analysis*,

- Synthesis, Biology*, Vol 1-9, Academic Press, New York, **1975-1987**, Vol. 1, Chapter 6.
- [61] Fields G. B., Noble R. L., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1990**, 35, 161-214.
- [62] *ABI 433A Peptide Synthesizer User Manual Vol 1*, PE Applied Biosystems, **1997**.
- [63] Gordeev M. F., Luehr G. W., Hui H. C., Gordon E. M., Patel D. V., *Tetrahedron*, **1998**, 54, 15879-15890.
- [64] Parker D., *Chem. Soc. Rev.*, **1990**, 19, 271-291.
- [65] Kuhn K., Owen D. J., Bader B., Wittinghofer A., Kuhlmann J., Waldmann H., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1023-1035.
- [66] Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: London, **1996**; Chapters 2.2 and 5.
- [67] Ragupathi G., Koganty R. R., Qiu D., Lloyd K. O., Livingston P. O., *Glycoconjugate J.*, **1998**, 15, 217-221.
- [68] Newkome G. R., Weis C. D., *Oppi Briefs*, **1996**, 28, 4, 495.
- [69] Röckendorf N., Sperling O., Lindhorst T. K., *Aust. J. Chem.*, **2002**, 55, 87-93.
- [70] Schmidt R. R., Gaden H., Jatzke H., *Tetrahedron Let.*, **1990**, 31, 3, 327-330.
- [71] Treziak A., Bannwarth W., *Synthesis*, **1996**, 1433-1434.
- [72] Valencic M., van der Does T., de Vroom E., *Tetrahedron Let.*, **1998**, 39, 1625-1628.
- [73] Monsigny M., Quétard C., Bougerie S., Delay D., Pichon C., Midoux P., Mayer R., Roche A. C., *Biochimie*, **1998**, 80, 99-108.
- [74] Lubineau A., Augé J., Droillat B., *Carbohydrate Res.*, **1995**, 266, 211-219.
- [75] Teshima T., Nakajima K., Takahashi M., Shiba T., *Tetrahedron Let.*, **1992**, 33, 363-366.
- [76] Handlon A. L., Fraser Reid B. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 3796.
- [77] van Ameijde J., Bauke Albade H., Liskamp R. M. J., *J. Chem. Soc. Perkin 1*, **2002**, 1042-1049.

- [78] Malkinson J. P., Falconer R. A., Toth I., *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 5249-5252.
- [79] Urpi F., Vilarrasa J., *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4623-4624.
- [80] Gololobov Y. G., Kasukhin L. F., *Tetrahedron*, **1992**, 48, 1353-1406.
- [81] Maunier V., Boullanger P., Lafont D., *J. Carbohydrate Chemistry*, **1997**, 16, 231-235.
- [82] Mizuno M., Muramoto I., Kobayashi K., Yaginuma H., Inazu T., *Synthesis*, **1999**, 162-165.
- [83] Damkaci F., De Shong P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 4408-4409.
- [84] Newkome G. R., Nayak A., Behara R. K., Moorefield C. N., Baker G. R., *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 358-362.
- [85] Newkome G. R., Behara R. K., Moorefield C. N., Baker G. R., *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 7162-7169.
- [86] Brettreich M., Hirsch A., *Synlett*, **1998**, 4, 35, 1396-1398.
- [87] Rothe M., Brünig H., Eppert G., *J. Prakt. Chem.*, **1959**, 4, 8, 323-332.
- [88] Schubert U. S., Eschbaumer C., *Angew. Chem.*, **2002**, 114, 3016-3050; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2892-2926.
- [89] Newkome G. R., Günther R., Moorefield C. N., Cardullo F., Echegoyen L., Perez-Cordero E., Luftmann H., *Angew. Chem.*, **1995**, 107, 2159-2162; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1995**, 34, 2023-2026.
- [90] Kaneko M., Yamada A., Kurimura Y., *Inorg. Chim. Acta*, **1980**, 45, L73.
- [91] Plevoets M., Vögtle F., De Cola L., Balzani V., *New J. Chem.*, **1999**, 63-69.
- [92] Vögtle F., Plevoets M., Nieger M., Azzellini C. G., Credi A., De Cola L., De Marchis V., Venturi M., Balzani V., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 6290-6298.
- [93] Josel H. P., Hoess E., Herrmann R., von der Eltz H., *Pat. AU200215904A*
- [94] Zanini D., Park W. K. C., Roy R., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 7383-7386.
- [95] Lindhorst T. K., Kieburg C., Krallmann-Wenzel U., *Glycoconjugate J.*, **1998**, 15, 605-613.

- [96] Kötter S., *Dissertation*, 2000, Universität Hamburg.
- [97] Ashton P. R., Hounsell E. F., Jayaraman N., Nilsen T. M., Spencer N., Stoddart J. F., *J. Org. Chem.*, **1998**, 69, 3429-3437.
- [98] Boysen M. K., Lindhorst T. K., *Tetrahedron*, **2003**, 59, 3895-3898.
- [99] Choudhury D, Thompson A., Stojanoff V., Langermann S., Pinkner J., Hultgren S. J., Knight S. D., *Science*, **1999**, 285, 1061-1066.
- [100] Hung C. S., Bouckaert J., Hung D., Pinkner J., Widberg C., De Fusco A., Auguste C. G., Strouse R., Langermann S., Waksman G., Hultgren S. J., *Molecular Microbiology*, **2002**, 44, 4, 903-915.
- [101] Houseman B. T., Mrksich M., *Chem. Biol.*, **2002**, 9, 443-454.
- [102] Prime K. L., Whitesides G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 10714-10721.
- [103] Roberts C., Chen C. S., Mrksich M., Martichonok V., Ingber D. E., Whitesides G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 6548-6555.
- [104] Kleinert M., Röckendorf N., Lindhorst T. K., Publikation in Vorbereitung.
- [105] Präparative Gelchromatographie an Sephadex LH-20. Henke, H., Satz und Druck: Alpha Druck GmbH, 63773 Goldbach, **1994**.
- [106] Pharmacia-Biotech, Data File Sephadex LH-20, 18-1107-22.