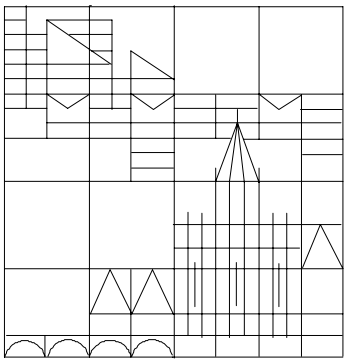


Synthese und Screening von Multivalenten Lektinliganden

Daniel Specker

Vollständiger Abdruck der vom Fachbereich Chemie der Universität Konstanz zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Dissertation der Universität Konstanz

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Mai 2008

1. Referent: Prof. Dr. Valentin Wittmann
2. Referent: Prof. Dr. Gerhard Müller

Konstanzer Online-Publikations-System (KOPS)
URL: http://www.ub.uni-konstanz.de/kops/volltexte/2008/6099/
URN: http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:352-opus-60999

Inhaltsverzeichnis

SYNTHESE UND SCREENING VON MULTIVALENTEN LEKTINLIGANDEN 1

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IV

1. EINLEITUNG ..... - 1 -

2. STAND DER FORSCHUNG UND KONZEPTION ..... - 5 -

2.1. DIE MISTEL ..... - 5 -
2.2. VISCUM ALBUM AGGLUTININ (VAA) ..... - 6 -
2.3. GALEKTINE ..... - 7 -
2.4. MULTIVALENTE ..... - 10 -
2.4.1. ...Wechselwirkungen ..... - 10 -
2.4.2. ...Lektinliganden ..... - 13 -
2.5. AUFGABENSTELLUNG UND KONZEPTION ..... - 19 -

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION ..... - 23 -

3.1. SYNTHESE DER ZUCKERBAUSTEINE ..... - 23 -
3.1.1. Laktosylcarbonat β-12 ..... - 23 -
3.1.2. Butenspacer-modifiziertes Aktivcarbonat 13 ..... - 26 -
3.1.3. Selektive Synthese weiterer Kohlenhydratcarbonate ..... - 28 -
3.2. MULTIVALENTE LEKTINLIGANDEN ..... - 31 -
3.2.1. Synthese ..... - 31 -
3.2.2. Biologische Tests ..... - 33 -
3.3. SYNTHESE VON BIBLIOTHEKEN CYCLISCHER GLYCOPEPTIDE ..... - 33 -
3.3.1. Analytische Überlegung: Edman-Abbau und/oder Massenspektrometrie ..... - 33 -
3.3.2. Photochemische und NMR-spektroskopische Untersuchung ..... - 36 -
3.3.3. Schutzgruppenstrategie ..... - 40 -
3.3.4. Synthese einzelner Glycopeptide ..... - 42 -
3.3.5. Split&Mix-Synthese ..... - 48 -
3.4. VISCUM ALBUM AGGLUTININ ..... - 51 -
3.4.1. Screening von VAA ..... - 51 -
3.4.2. Identifikation der Hitsequenzen ..... - 55 -
3.4.3. Synthese ausgewählter Hitsequenzen ..... - 59 -
3.4.4. Enzymgekoppelter Lektinbindungstest ..... - 66 -
3.5. SCREENING DER GALEKTINE ..... - 73 -
3.5.1. Unspezifische Wechselwirkung des Anti-Biotin-Antikörpers ..... - 77 -

4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK ..... - 80 -

5. EXPERIMENTELLER TEIL ..... - 86 -

5.1. ALLGEMEINE ANGABEN ..... - 86 -
5.2. ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN ..... - 89 -
5.2.1. AAVs für die Synthese in Lösung ..... - 89 -
5.2.2. AAVs für die Festphasensynthese ..... - 90 -
5.3. CHEMISCHE ARBEITEN ..... - 94 -
5.3.1. 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-(p-nitrophenoxycarbonyl)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosid (β-12) ..... - 94 -
5.3.2. 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-(p-nitrophenoxycarbonyl)-2,3,6-tri-O-acetyl-α-D-glukopyranosid (α-12) ..... - 95 -
5.3.3. [(Z)-4-(p-Nitrophenoxycarbonyloxy)-but-2-en-1-yl]-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosid (13) ..... - 96 -
5.3.4. 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-1,2,3,6-tetra-O-acetyl-α/β-D-glukopyranose (15)[111] - 98 -
5.3.5. 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-α/β-D-glukopyranose (16)[112] - 99 -
5.3.6. Trimethylsilyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosid (β-18) ..... - 100 -

5.3.7. Trimethylsilyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-α-D-glukopyranosid (α-18) - 101 -
5.3.8. 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-α-D-glukopyranosylbromid (19) - 102 -
5.3.9. 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-enol (21) - 104 -
5.3.10. (p-Nitrophenoxycarbonyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranosid (31) - 105 -
5.3.11. (p-Nitrophenoxycarbonyl)-2,3,4-tri-O-acetyl-α-D-xylopyranosid (33) - 107 -
5.3.12. (p-Nitrophenoxycarbonyl)-2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-ribopyranosid (34) - 108 -
5.3.13. (p-Nitrophenoxycarbonyl)-2,3,4-tri-O-acetyl-α-L-lyxopyranosid (35) - 109 -
5.3.14. (p-Nitrophenoxycarbonyl)-2,3,4-tri-O-acetyl-α-L-rhamnopyranosid (36) - 110 -
5.3.15. 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-α-D-glukopyranosyl-(1→4)-(p-nitrophenoxycarbonyl)-2,3,6-tri-O-acetyl-α-D-glukopyranosid (37) - 111 -
5.3.16. Tetra-(aminomethyl)-methan (44) - 113 -
5.3.17. Tetra-(azidomethyl)-methan (46) - 113 -
5.3.18. 1,4-Bis-(3-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosyloxycarbonylamino-propyloxy)-butan (Ac-47) - 114 -
5.3.19. 1,4-Bis-(3-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyloxycarbonylamino-propyloxy)-butan (47) - 116 -
5.3.20. (2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosyloxycarbonyl)-benzylamin (Ac-48) - 117 -
5.3.21. (β-D-Galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyloxycarbonyl)-benzylamin (48) - 118 -
5.3.22. Tris-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosyloxycarbonylamino)-ethyl)-amin (Ac-49) - 119 -
5.3.23. Tris-(2-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyloxycarbonylamino)-ethyl)-amin (49) - 120 -
5.3.24. N,N'-Bis-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosyloxycarbonyl)-m-xylylendiamin (Ac-50) - 121 -
5.3.25. N,N'-Bis-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyloxycarbonyl)-m-xylylen-diamin (50) - 122 -
5.3.26. Bis-(2-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosyloxycarbonylamino)-ethyl)-amin (Ac-51) - 123 -
5.3.27. Bis-(2-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyloxycarbonylamino)-ethyl)-amin (51) - 124 -
5.3.28. N,N'-Bis-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosyloxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin (Ac-52) - 125 -
5.3.29. N,N'-Bis-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyloxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin (52) - 127 -
5.3.30. N,N'-Bis-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosyloxycarbonyl)-p-xylylendiamin (Ac-53) - 128 -
5.3.31. N,N'-Bis-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonyl)-m-xylylendiamin (Ac-54) - 129 -
5.3.32. N,N'-Bis-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonyl)-m-xylylendiamin (54) - 131 -
5.3.33. N,N'-Bis-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonyl)-p-xylylendiamin (Ac-55) - 132 -
5.3.34. N,N'-Bis-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonyl)-p-xylylendiamin (55) - 134 -
5.3.35. N,N'-Bis-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin (Ac-56) - 135 -
5.3.36. N,N'-Bis-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)- β-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin (56) - 137 -
5.3.37. Tetrakis-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosyloxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonylamino-methyl)-methan (Ac-57) - 138 -
5.3.38. Tetrakis-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-β-D-glukopyranosyloxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonylamino-methyl)-methan (57) - 140 -
5.3.39. 4-(4-(1-(9-Fluorenylmethoxycarbonylamino)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)-butansäure (58) - 141 -
5.3.40. 4-(4-Acetyl-2-methoxyphenoxy)-butanethylester (61) - 142 -
5.3.41. 4-(4-(1-(Hydroxyimino)ethyl)-2-methoxyphenoxy)-butanethylester (62) - 143 -

5.3.42. 4-(2-Methoxy-4-(1-(trifluoracetamido)ethyl)-phenoxy)-butanethylester (64) ..... - 144 -
5.3.43. 4-(2-Methoxy-5-nitro-4-(1-(trifluoracetamido)-ethyl)-phenoxy)-butanethylester (65) ..... - 146 -
5.3.44. 4-(4-(1-Aminoethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)-butansäure und Dibenzofolven (68) ..... - 147 -
5.3.45. Boc-D-Lys-(Ddv)-OH (69) ..... - 148 -
5.3.46. A-F-L-G-V-I-G-Bal-NH-TG (77) ..... - 149 -
5.3.47. cyclo[Boc-K-A-Dab(Alloc)-D-Phe-D-Dpr(Alloc)-G-E]-Bal-NH_2 (c-82) ..... - 149 -
5.3.48. Split&Mix-Bibliotheken 92 und 93 ..... - 151 -
5.3.49. Synthese der VAA-Liganden 111-113 ..... - 152 -
5.3.50. cyclo[Boc-K-V-Dab(R)-G-D-A-L-A-E]-Bal-NH_2 (111) ..... - 152 -
5.3.51. cyclo[Boc-K-A-Dab(R)-D-F-D-Dpr(R)-Dab(R)-E]-Bal-NH_2 (112) ..... - 153 -
5.3.52. cyclo[Boc-K-D-Dpr(R)-D-F-D-Dpr(R)-D-F-D-Dpr(R)-Dab(R)-E]-Bal-NH_2 (113) ..... - 154 -
5.3.53. cyclo[Boc-K-D-Dpr(R)-Dab(R)-D-Dpr(R)-D-Dpr(R)-D-Dpr(R)-D-F-E]-Bal-NH_2 (114) ..... - 155 -
5.3.54. N-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonyl)-3-(2-(2-(3-(tritylamino)-propoxy)-ethoxy)-ethoxy)-propylamin (122) ..... - 156 -
5.3.55. N-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonyl)-3-(2-(2-(3-(amino)-propoxy)-ethoxy)-ethoxy)-propylamin (Ac-123) - 158 -
5.3.56. N-(β-D-Galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonyl)-3-(2-(2-(3-(amino)-propoxy)-ethoxy)-ethoxy)-propylamin (123) ..... - 159 -
5.4. BIOLOGISCHE TESTS ..... - 160 -
5.4.1. Zusammensetzung der Puffer für das Festphasen-Screening ..... - 160 -
5.4.2. Festphasen-Screening ..... - 162 -
5.4.3. Verwendete Puffer und Lösungen ..... - 164 -
5.4.4. Enzyme-Linked Immunosorbent Lektin Assay (ELISLA) ..... - 166 -

6. LITERATURVERZEICHNIS ..... - 168 -

7. ANHANG ..... - 173 -

7.1. AUSGEWÄHLTE NMR-SPEKTREN ..... - 173 -
7.2. AUSGEWÄHLTE SEQUENZIERUNGEN ..... - 184 -

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Å	Ångstrom
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs	absolut
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-diammonium-salz
Ac	Acetyl
Ac_2O	Acetanhydrid
AK	Antikörper
Alloc	Allyloxycarbonyl
Ala	Alanin
Ar	Aryl
Bal	β-Alanin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bn	Benzyl
ber.	berechnet
Boc	*tert*-Butylmethoxycarbonyl
Bu	Butyl
CHCA	Cyanohydroxyzimtsäure
Con A	*Concanavalin A*
CRD	Zucker erkennende Domäne
d	Dublett
Dab	Diaminobuttersäure
dd	Doppeldublett
ddd	doppeltes Doppeldublett
Ddv	1-[4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexyliden]isovaleryl
DC	Dünnschichtchromatogramm
DEA	Diethylamin
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DIEA	Diisopropylethylamin
Dmab	(4-{[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexyliden)-3-methylbutyl]-amino}benzyl)

DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dpr	Diaminopropionsäure
EE	Essigsäureethylester
eq	Äquivalente
ELISLA	Enzym-Linked-Immunosorbent-Lectin-Assay
ESI	Elektrospray Ionisation
Et	Ethyl
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Gal	Galektin
gef.	gefunden
Gly	Glycin
Glu	Glutaminsäure
HATU	*O*-Azabenzotriazolyl-1,1,3,3-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat
HBTU	*O*-Benzotriazolyl-1,1,3,3-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat
HOAt	Hydroxyazabenzotriazol
HOBt	Hydroxybenzotriazol
IC_{50}	Inhibitionskonstante
Ile	Isoleucin
J	Kopplungskonstante
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m	Multiplett
MALDI	*matrix assisted laser desorption ionisation*
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NMP	*N*-Methylpyrolidon
NMR	Kernmagnetische Resonanz
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung + Tween 20

PDB	Proteindatenbank
PDC	1,4-Phenylendiisothiocyanat
PE	Petrolether
Phe	Phenylalanin
ppm	parts per million
Py	Pyridin
Pro	Prolin
R	Rest
R_f	Retentionsfaktor
RIP	Ribosom inaktivierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochdruckflüssigchromatographie
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SPPS	Festphasenpeptidsynthese
t	Triplett
TFA	Trifluoressigsäure
TG	TentaGel
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
Trp	Tryptophan
TMS	Trimethylsilyl
TMSDEA	Trimethylsilyldiethylamin
TNBS	Trinitrobenolsulfonsäure
t_R	Retentionszeit
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
Val	Valin
WGA	Weizenkeimagglutinin
VAA	*Viscum Album Agglutinin*

1. Einleitung

Zucker, mehr als nur süß?

Das ist die Frage, die seit ca. 40 Jahren gestellt werden muss. Kohlenhydrate sind neben den Fetten, den Proteinen und den Nukleinsäuren eine der vier großen Naturstoffklassen. Ihnen wurde lange Zeit zwei Funktionen zugesprochen. Zum einen war ihre Rolle als wichtiger Energieträger z.B. in Form von Glukose oder Stärke bekannt, zum anderen kannte man ihre Funktion als Gerüst- und Stützsubstanz von Zellen in Form von Cellulose oder Chitin.

Ende der 60er Jahre des vergangenen Jahrhunderts änderte sich durch die Entdeckung von Kohlenhydraten auf Zelloberflächen die Sichtweise. Kovalent an Lipide oder Proteine geknüpft prägen sie wesentlich die Eigenschaft der Zelloberfläche (Abb. 1). Dieser von den Glycolipiden bzw. Glycoproteinen gebildete Zuckermantel, auch Glycocalix genannt, unterscheidet sich von Zelle zu Zelle und kann unterschiedlichste Kohlenhydratmuster beinhalten.

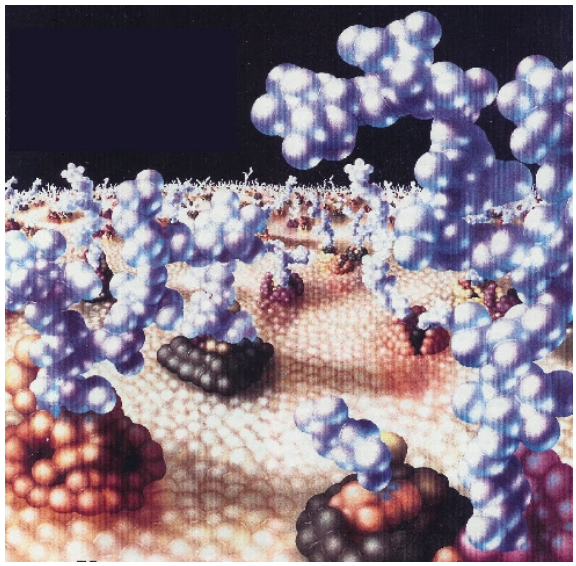


Abb. 1 Kohlenhydrate auf einer Zelloberfläche[1]

Aus dem Steckbrief der Glycocalix lassen sich häufig Herkunft einer Zelle, ihr Entwicklungsstand oder auch ihr gesunder bzw. krankhafter Zustand feststellen. Letzteres ist Voraussetzung für die zuverlässige Funktionsweise unseres Immunsystems. Krankhafte Zellen, die für die Entstehung von bösartigem Gewebe (Tumoren) verantwortlich sind, verändern neben ihrer Funktionsweise auch die Struktur der Glycocalix, d.h. die auf der Zelloberfläche befindlichen Zucker. Diese Modifikation wird meist vom Immunsystem erkannt und die krankhafte Zelle unschädlich gemacht[2]. Wird eine krankhafte Zelle mit

entartetem Wachstum nicht vom Immunsystem erkannt, dann führt dies zur Bildung von Tumoren.

Für die Erkennung, der durch Kohlenhydrate verschlüsselten Information sind Proteine verantwortlich, die sogenannten Lektine (lat. legere = lesen, auswählen). Lektine bilden die Gruppe unter den zuckererkennenden Proteinen, die Kohlenhydrate weder modifizieren können (Enzyme) noch den Immunoglobulinen (Antikörpern) zugeordnet werden.

Lektine wurden in nahezu allen Lebensformen entdeckt. So findet man sie in Viren, Bakterien, Pflanzen und Tieren. In Pflanzen kommen sie überwiegend in Samen vor, treten aber auch in anderen Pflanzenteilen auf und erfüllen zahlreiche Funktionen[3]. Eine dieser Funktionen ist z.B. der Schutz vor Fraßfeinden. So sind beispielsweise 2-4 Ricinussamen für einen Erwachsenen tödlich. Die Toxizität von Ricin beruht dabei auf einer Kombination aus Toxin und Lektin. Die toxische Domäne A (blau) besitzt enzymatische Aktivität (RNA-N-Glycosidase) und führt durch Inaktivierung der Ribosomen zum Zelltod (Abb. 2). Die Lektindomäne B (orange) sorgt durch gezieltes Andocken auf der Zelloberfläche für eine rasche Einschleusung in die Zelle. Ricin ist der bekannteste Vetreter der Gruppe der AB-Typ Lektine die auch als Ribosom-inaktivierende Proteine (RIPs) bezeichnet werden.

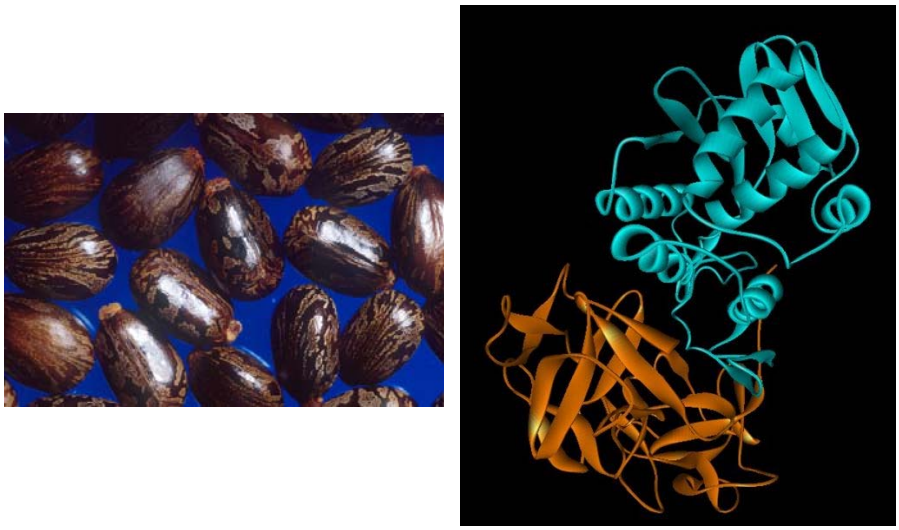


Abb. 2 Ricinussamen (links) und das tödliche Ricin (rechts) bestehend aus einem toxischen A-Kette (blau) und einer Lektinkomponente der B-Kette (orange) (PDB-Code 2AAI)[4]

In Tieren treten Lektine in den unterschiedlichsten Gewebeformen in Erscheinung. Sie finden sich nicht nur auf Zelloberflächen wieder, sondern erfüllen auch intrazellulär wichtige Aufgaben[5]. Sie sind intrazellulär z.B. für die Calnexin vermittelte Proteinfaltung verantwortlich[6] und stellen damit sicher, dass nur korrekt gefaltete Proteine aus dem Endoplasmatischen Reticulum in das Cytosol gelangen. Auf Zelloberflächen spielen sie,

neben der bereits erwähnten Rolle bei der Entstehung von Tumoren und der Wechselwirkung zwischen pflanzlichen Lektinen, auch eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation bei Entzündungsprozessen[7,8] bei der Anheftung von Viren oder Bakterien an Wirtszellen[9,10] oder auch beim Befruchtungsvorgang (Spermium/Eizelle)[11].

Das Zusammenspiel zwischen Kohlenhydraten und Lektinen wurde bereits in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts beobachtet[12]. S. Weir Mitchell beobachtete während seinen Untersuchungen von Schlangengift im Jahre 1860, dass Klapperschlangengift zur Verklumpung (Agglutination) von Taubenblut führt[13]. Damals war jedoch noch von Antikörper-ähnlichen Stoffen die Rede (der Begriff Lektin wurde erst 1954 von W. C. Boyd eingeführt[14]). H. Stillmark berichtete kurz darauf (1887-88) zum ersten Mal von der Aktivität eines pflanzlichen Lektins[15]. Er stellte fest, dass ein Extrakt aus Ricinussamen zur Agglutination von Erythrocyten verschiedener Tiere führt und nahm an, dass die für die Agglutination verantwortliche Substanz im Zusammenhang mit der Toxizität steht. Heute wissen wir, dass er mit seiner Annahme nicht ganz richtig lag, da für die toxische Wirkung das oben beschriebene Ricin (Dimer), für die Agglutination jedoch das eng verwandte Lektin *Ricinus communis* (Tetramer) verantwortlich ist.

Die Eigenschaft, Erythrocyten selektiv erkennen zu können, führte die Lektine über die Jahre zum ersten bedeutenden Einsatz in der Medizin. Seit 1940 dienen sie zur Bestimmung der Blutgruppen. Dank ihrer Selektivität konnten zudem die spezifischen Antigene der einzelnen Blutgruppen A, B und 0 (Abb. 3) identifiziert werden[16].

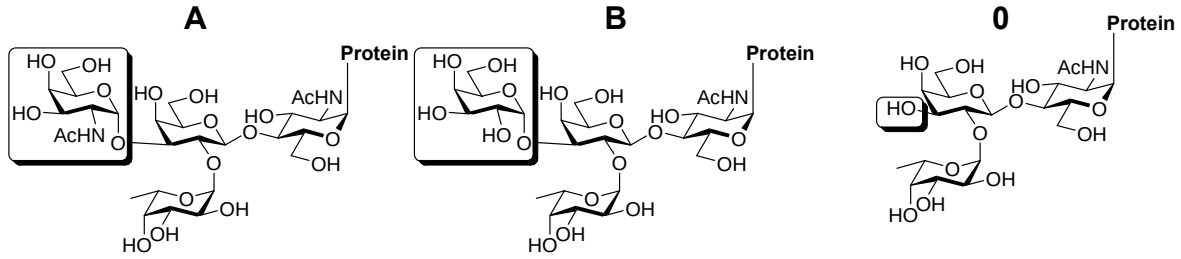


Abb. 3 Die Antigene der Blutgruppen A, B und 0

Die meisten der heute bekannte Lektine besitzen mehrere Zucker-erkennende Domänen (CRDs, engl. carbohydrate recognizing domains), d.h. sie besitzen die Fähigkeit zeitgleich mit mehreren Kohlenhydraten zu interagieren (Multivalenz). Diese Eigenschaft ist von großer Bedeutung, da die Bindungsstärke einzelner Interaktionen gering ist und durch Multivalenz deutlich erhöht wird[17]. Auch die Spezifität wird durch multivalente Interaktion erheblich verbessert.

Ziel der Lektinforschung ist es, durch Untersuchungen der Multivalenz ein tieferes Verständnis der Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung zu erlangen. Wenn Informationen zur Anordnung der Erkennungseinheiten und der daran beteiligten Strukturen vorliegen, dann sollten sich in Zukunft massgeschneiderte Liganden von therapeutischem Nutzen synthetisieren lassen.

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Identifikation hochaffiner multivalenter Lektinliganden zum Verständnis der Lektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkung beizutragen. Untersucht werden sollte das aus der Mistel gewonnene Lektin *Viscum Album Agglutinin* (VAA) sowie zahlreiche Galektine tierischen Ursprungs.

2. Stand der Forschung und Konzeption

2.1. Die Mistel

Seit jeher bedient sich der Mensch zur Heilung von Krankheiten in der Natur. Auch heute spielt die Alternativmedizin neben der Schulmedizin eine wichtige Rolle. Man erhofft sich mit ihr eine medizinische Wirksamkeit ohne Nebenwirkungen zu erzielen. Als Ursache wird häufig eine Immunsystem stimuliernde Wirkung angenommen. Eingesetzt werden Pflanzenextrakte, die Gemische aus unterschiedlichsten Substanzen darstellen, und deren für die heilende Wirkung verantwortliche(n) Verbindung(en) oft nicht bekannt sind.

Eine dieser seit Jahrtausenden für ihre heilende Wirkung bekannte Pflanze ist die Mistel. Sie spielte bereits in der Mythologie besonders der Germanen und der Kelten eine wichtige Rolle. Goscinny und Uderzo brachten durch den Druiden „Miraculix" die Mistel und mit ihr den Brauch die Mistel mit goldenen Sicheln zu schneiden einem breiten Publikum näher. Die Druiden, die Priester der Kelten (die Gallier sind ein Stamm unter vielen keltischen Stämmen), bestiegen weißgekleidet die Bäume und schnitten die Mistel für rituelle Handlungen. Für sie gab es nichts Heiligeres als die Mistel. Der Grund für die der Mistel zugesprochenen Kräfte liegt wahrscheinlich in ihrer außergewöhnlichen Art zu wachsen. Zum Einen grünt sie das ganze Jahr und zum Anderen wächst sie als Halbschmarotzer auf Bäumen. Die erste heilkundliche Erwähnung der Mistel stammt aus dem 5. Jahrhundert vor Christus. 600 Jahre später beschrieb Plinius die Wirkung der Mistel bei Fallsucht (Epilepsie). Auch im Mittelalter erfreute sich die Mistel bei Kräuterkundlern großer Beliebtheit. Hildegard von Bingen (1098-1179) verwendete sie ebenfalls zur Behandlung von Epilepsie, setzte Mistelsud aber auch gegen erfrorene Gliedmassen ein.

Rudolf Steiner (1861-1925) begründete im Rahmen seiner anthroposophischen Medizin 1916 zusammen mit der Ärztin Ita Wegmann den Einsatz von Mistelextrakten bei der Therapie gegen Krebs. Ob und in welcher Weise die Mistel eine Wirksamkeit gegen Krebs besitzt, ist jedoch bis heute umstritten[18,19] und Gegenstand biochemischer und pharmakologischer Mistelforschung. Die Forschung konzentrierte sich dabei insbesondere auf die Inhaltsstoffe Viscotoxine (Polypeptide), Polysaccharide[20] und Mistellektine[19] (VAA-I-III).

Durch gezieltes Entfernen der Lektine aus Mistelextrakten konnte gezeigt werden, dass die Immunantwort *in vivo* deutlich reduziert wird[21]. Seit dieser Entdeckung wird der Fokus der Mistelforschung insbesondere auf die Untersuchung der Lektine gerichtet.

2.2. *Viscum Album Agglutinin (VAA)*

Von den drei in der Mistel vorkommenden Lektinen VAA I-III ist VAA-I der am häufigsten untersuchte Vertreter[22]. VAA-I ist ein Galaktose-spezifisches Lektin aus der Gruppe der pflanzlichen AB-Toxine, bestehend aus zwei Proteinketten, dessen Aminosäuresequenz im Jahre 1996 (A-Kette) bzw. 1998 (B-Kette) von Soler et al. aufgeklärt wurde[23]. Die B-Kette beinhaltet die Galaktose erkennenden Domänen und ist somit der Lektinanteil. Die A-Kette besitzt eine rRNA N-Glycosidase Aktivität und hat die Fähigkeit irreversibel die Proteinbiosynthese zu inhibieren[24]. VAA zählt zur Gruppe der RIPs, dessen bekanntester Vertreter Ricin ist. Durch die Verknüpfung der cytotoxischen Proteinkomponente mit einer Galaktose erkennenden Untereinheit wird eine selektive und effiziente Aufnahme in die entsprechend glycosylierten Zellen garantiert. Die Cytotoxizität wird dadurch deutlich erhöht. Dies konnte durch Vergleichsstudien mit Mistelproteinen, denen die Lektinkomponente fehlt, gezeigt werden[25]. VAA besitzt auf der B-Kette zwei zuckererkennende Domänen (CRDs, engl. carboydrate-recognizing-domains) die sich voneinander unterscheiden. Beiden Domänen gemein, ist die Anordnung der für die Bindung notwendigen polaren Aminosäuren.

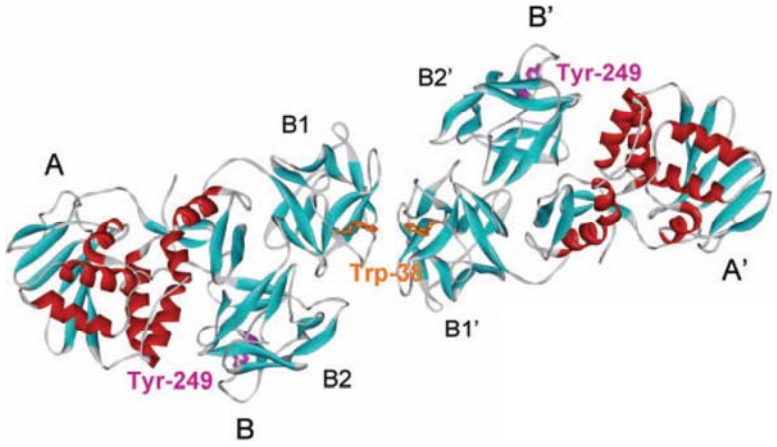


Abb. 4 VAA Dimer $[AB]_2$ gebildet durch nicht kovalente Wechselwirkung zweier B1-Subdomänen; die aromatischen Seitenketten der CRD-charakterisierenden aromatischen Aminosäuren sind farblich hervorgehoben (Tyr-249 in magenta, Trp-38 in gelb) (PDB-Code 1OQL)[26]

Der Unterschied liegt in der aromatischen Aminosäure, die durch unpolare Wechselwirkung die Bindung verstärkt. In Position 38 ist dies Tryptophan und in Position 249 Tyrosin[27]. Die beiden CRDs befinden sich ca. 40 Å voneinander. Jiménez et al. konnten zeigen, dass VAA in Abhängigkeit von der Konzentration auch als Dimer vorliegen kann[28]. Diese Eigenschaft war unter den AB-Toxinen nicht bekannt und macht VAA dadurch zu einem besonderen Mitglied dieser Klasse. Die Dimerisierung findet durch den nicht kovalenten Kontakt zweier B1-Subdomänen statt. Wie in Abb. 4 zu sehen ist, führt dies zu einer Anordnung bei der sich

zwei Trp-38 CRDs in einem Abstand von 15 Å befinden, eine Distanz bei der eine Interaktion bereits mit kleineren multivalenten Liganden möglich ist. Sie konnten auch zeigen, dass durch die Dimerisierung eine Besetzung der Trp-38 CRD mit Liganden aufgrund der sterischen Hinderung abnimmt und das, obwohl im Fall des Monomeren die Liganden vermehrt an diese CRD gebunden haben[24,26].

2.3. Galektine

Galektine bilden eine wichtige Lektinfamilie tierischen Ursprungs. Ihr Name, früher wurden sie S-Typ-Lektine genannt, leitet sich aus dem von ihnen spezifisch gebundenen Zucker Galaktose ab. Allen Galektinen gemein ist ihre weitestgehend konservierte Aminosäure-sequenz der CRDs. Bisher sind 14 verschiedene Mitglieder identifiziert worden, die wiederum in drei Gruppen eingeteilt werden: Den Prototyp, den Tandem-Repeat-Typ und den Chimärentyp. Tab. 1 gibt einen Überblick über deren Vorkommen und Eigenschaften. Die Mitglieder der Gruppe des Prototyps besitzen eine CRD pro Proteinkette und bilden häufig nicht kovalent verknüpfte Dimere wie am Beispiel von Galektin-1 in Abb. 5 dargestellt. Galektine des Tandem-Repeat-Typs besitzen zwei sich unterscheidende CRDs auf einem Protein. Zur Gruppe des Chimärentyps gehört bislang lediglich Galektin-3. Dieses Galektin besitzt neben einer CRD einen kollagenartigen Proteinanteil durch dessen intermolekulare Wechselwirkung die Bildung von Oligomeren möglich ist.

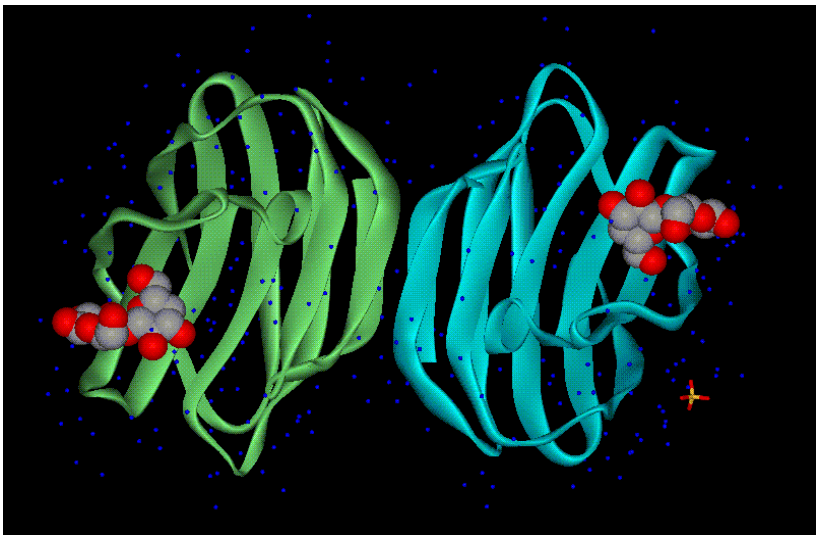


Abb. 5 Galektin-1 (prototyp) Homodimer mit Laktose (PDB-Code: 1W60)

Die Forschungsaktivitäten auf dem Gebiet der Galektine haben in den letzten Jahren stark zugenommen. Die Zahl der Publikationen pro Jahr verzehnfachte sich in den vergangenen 10 Jahren[29]. Der Grund hierfür liegt in ihrer weitreichenden Bedeutung sowohl im gesunden, als auch bei krankhaft verändertem Gewebe. Insbesondere ihre Rolle bei der Entstehung von

Krebs[30,31], aber auch ihr Einfluss auf das Immunsystem[7,8] sind hierfür treibende Kraft. Ein Ziel der Forschung ist es, hochaffine und selektive Inhibitoren für therapeutische Anwendungen zu finden.

Galektin-3 wird beispielsweise besonders auf Zelloberflächen von Tumoren und deren Metastasen gefunden[32]. Es trägt somit zur Verbreitung von Krebs bei, da es für die Anheftung von Metastasen an gesundes Gewebe verantwortlich ist. So konnte durch Verwendung eines Antikörpers gegen Galektin-3 die Bildung von Metastasen der Lunge um 90% reduziert werden[33].

Aber auch Galektin-1 spielt in zahlreichen malignen Prozessen in den unterschiedlichsten Gewebesorten eine wichtige Rolle. Z.B. ist es massgeblich für das Anheften von Metastasen an gesundem Gewebe beteiligt. Einen umfassenden Überblick geben die Übersichtsartikel von Rabinovich, Elola et al. und Camby et al.[30,34,35].

Über die Funktionsweisen der anderen Galektine ist weit weniger bekannt. E. Mizoguchi und A. Mizoguchi veröffentlichten 2007 die unerwartete Beobachtung, dass Galektin-4, das im Gegensatz zu Galektin-1 beim Entzündungsprozess des Darms nicht überexprimiert wird, für die chronische Entwicklung von Entzündungen verantwortlich ist[8].

Einen allgemeinen Überblick über die bisher bekannten Funktionsweisen aller Galektine geben die 2006 veröffentlichten Reviews von Gabius et al.[10,36].

Tab. 1 Vorkommen und Eigenschaften der 14 bisher bekannten Galektinfamilien[10]

Lektin	Vorkommen	Eigenschaften
Galektin-1	Viele Zelltypen	Prototyp; Homodimer, 14-15 kDa (je 1 CRD)
Galektin-2	Epithelzellen des Verdauungs- und Atmungstraktes	Prototyp; Homodimer, 14 kDa (je 1 CRD)
Galektin-3	Viele Zelltypen	Chimeratyp; Pentamerbildung möglich, Pro-, Tyr- und Gly-reiche Domäne (N-Terminal) (je 1 CRD)
Galektin-4	Verdauungstrakt, Lunge, Brust, Leber, Plazenta	Tandem-Repeat-Typ; Monomer, 34 kDa (2 CRDs)
Galektin-5	Erythrocyten (Ratte)	Prototyp; Monomer, 17 kDa (1 CRD)
Galektin-6	Darm (Maus)	Tandem-Repeat-Typ; Monomer, 33 kDa (2 CRDs)
Galektin-7	Keratinocyten, Krebszellen	Prototyp; Homodimer, 15 kDa (je 1CRD)
Galektin-8	Viele Zelltypen, häufig in Krebszellen	Tandem-Repeat-Typ; Monomer, 34 kDa (2 CRDs)
Galektin-9	Darm, Leber, Niere, Lunge, Lymphgewebe, B- und T-Zellen, Makrophagen	Tandem-Repeat-Typ; Monomer, 36 kDa (2 CRDs)
Galektin-10	Lunge	Prototyp; Monomer, (1 CRD ähnliche Struktur), Charkot-Leyden-Kristalle[37], (Mannose spezifisch)
Galektin-11	Magendarmtrakt (Schaf)	Prototyp; 14 kDa (1 CRD)
Galektin-12	Viele Zelltypen, häufig in Fettgewebe	Tandem-Repeat-Typ; Monomer, 35 kDa (2 CRDs)
Galektin-13	Plazenta, Milz, Niere, Blase, Tumorzellen	Prototyp; Homodimer, 16 kDa (je 1CRD)
Galektin-14	Lunge	Prototyp, 18 kDa (1CRD)

Anmerkungen:

Einige dieser Galektine konnten bisher beim Menschen nicht gefunden werden. Strukturell sehr ähnlich sind sich die Galektine 7, 10 und 13 sowie die Galektine des Tandem-Repeat-Typs: Galektin-4, -6, -8, -9 und -12.

2.4. Multivalente...

2.4.1. ...Wechselwirkungen

Die spezifische Erkennung von Molekülstrukturen durch Lektine ist in biologischen Systemen von großer Bedeutung. In den meisten Fällen handelt es sich um Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen wobei auch die selektive Interaktion mit Proteinen[38,39] oder anderen Strukturen wie z.B. Cholesterol-3-Sulfat[40] beobachtet wurde. Lektine besitzen meist mehrere CRDs und sind dadurch zur Ausbildung multivalenter Bindungen befähigt. Durch Multivalenz können die Affinitäten, die bei Interaktion mit monomeren Liganden oft im millimolaren Bereich liegen, deutlich erhöht werden. In Abb. 6 ist schematisch die Bindung einer Makrophage an Bakterien durch multivalente Interaktion mit Antikörpern dargestellt. Für die Bindung der Makrophage an die mit Antikörper markierten Bakterien sind Fc-Rezeptoren verantwortlich. Sie interagieren selektiv mit Mannoseresten am Stamm der Antikörper.

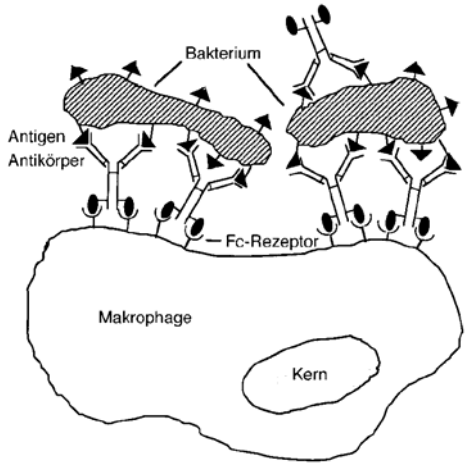


Abb. 6 Beispiel: Bindung einer Makrophage an Bakterien durch multivalente Interaktion von Antikörpern[41]

Die Hypothese, dass bei Auftreten mehrerer Liganden und Rezeptoren im Allgemeinen eine multivalente Interaktion eintritt, wurde 1998 von George M. Whitesides et al.[42] aufgestellt und seither durch weitere experimentelle Ergebnisse gestützt. Whitesides führte auch eine ausführliche thermodynamische Betrachtung der einfachsten multivalenten, d.h. divalenten Interaktion durch. Da diese Betrachtung zum Verständnis der Konzeption dieser Arbeit beiträgt, soll sie kurz wiedergegeben werden.

Die freie Bindungsenthalpie ΔG setzt sich aus enthalpischen und entropischen Beiträgen zusammen (Gleichung 1):

Gleichung 1: $$\Delta G^{multi} = \Delta H^{multi} - T\Delta S^{multi}$$

Für eine besseres Verständnis werden die Enthalpie ΔH^{multi} (Abb. 7) und die Entropie ΔS^{multi} (Abb. 8) nacheinander betrachtet.

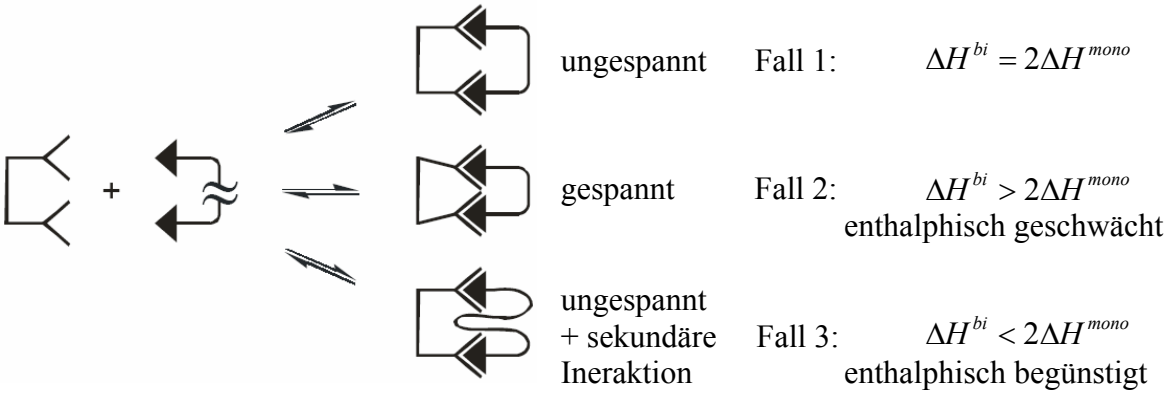


Abb. 7 Bindungsenthalpien der unterschiedlichen Bindungsarten verschiedener divalenter Liganden an einem divalenten Rezeptor

Fall 1: Bei einer ungespannten sich gegenseitig nicht beinflussenden Interaktion der Erkennungseinheiten entspricht die Bindungsenthalpie ΔH^{bi} dem Doppelten der Bindungsenthalpie ΔH^{mono}.

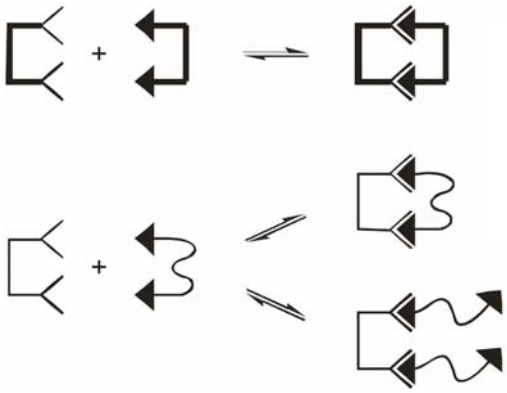
Fall 2: Ein gespannter Ligand oder eine negative gegenseitige Beeinflussung der beiden Bindungsereignisse führt zu einem weniger negativen d.h. ungünstigeren ΔH^{bi}. Sind Ligand und/oder Rezeptor starr, dann führt bereits eine geringe Abweichung von der passenden räumlichen Präsentation zu einer enthalpisch geschwächten Bindung.

Fall 3: Tritt der umgekehrte Fall ein, d.h. die Bindung der einen Erkennungseinheit führt zu einer Bindung der zweiten Erkennungseinheit mit günstigerer Enthalpie, dann spricht man von einer enthalpisch begünstigten Bindung. Dies kann z. B. durch sekundäre Wechselwirkungen oder einen positiven allosterischen Effekt verursacht werden. Die Enthalpie der multivalenten Wechselwirkung ist somit günstiger im Vergleich zu zwei monovalenten Bindungen.

Die Gesamtentropie (ΔS^{multi}) einer multivalenten Wechselwirkung setzt sich aus Translations- (ΔS_{trans}), Rotations- (ΔS_{rot}) und Konformationsentropie (ΔS_{konf}), die von Rezeptor und Ligand stammen, zusammen. Ein weiterer Beitrag resultiert aus der Entropieänderung des umgebenden Wassers ($\Delta S_{solvent}$) (Gleichung 2):

Gleichung 2: $$\Delta S^{multi} = \Delta S_{trans} + \Delta S_{rot} + \Delta S_{konf} + \Delta S_{solvent}$$

Da die Hydratisierungsentropie $\Delta S_{solvent}$ in allen Fällen ähnlich ist, wird sie zur vereinfachten Betrachtung vernachlässigt. Auch die schwache logarithmische Abhängigkeit der Translations- und Rotationsentropie von der Masse und Größe der Teilchen soll nicht berücksichtigt werden (Abb. 8).



rigider, perfekt passender Linker

Fall 1:
$$\Delta S^{bi} \approx \Delta S^{mono}_{trans} + \Delta S^{mono}_{rot} \approx \Delta S^{mono}$$

flexibler Linker entropisch begünstigt

Fall 2:
$$\Delta S^{bi} \approx \Delta S^{mono}_{trans} + \Delta S^{mono}_{rot} + \Delta S^{mono}_{konf}$$
$$\Delta S^{mono}_{konf} > \Delta S^{mono}_{trans} + \Delta S^{mono}_{rot}$$

Linker zu kurz oder zu lang

Fall 3:
$$\Delta S^{mono}_{konf} < \Delta S^{mono}_{trans} + \Delta S^{mono}_{rot}$$

Abb. 8 Entropie bei passendem, flexiblen oder nicht passendem Linker

Fall 1: Bei einem rigiden, perfekt passenden Linker ist $\Delta S_{konf} \approx 0$ und die Wechselwirkung erfolgt mit dem gleichen Entropieaufwand wie für eine monovalente Wechselwirkung. In der Realität sind jedoch alle Linker etwas flexibel, d.h. die Anzahl der möglichen Konformationen für den bivalenten Liganden vor einer Komplexierung ist größer als danach. Das bedeutet, dass der Idealzustand $\Delta S_{konf} = 0$ nur annähernd erreicht werden kann.

Fall 2: Wenn die Konformationsentropie ΔS^{mono}_{konf} kleiner als die Summe aus translatorischer und rotatorischer Entropie ist, dann ist der gesamte Entropieaufwand geringer als für den monovalenten Fall, so dass durch entropische Verstärkung eine bivalente Wechselwirkung begünstigt wird.

Fall 3: Ist der Aufwand der Konformationsentropie für die Bindung der zweiten Erkennungseinheit eines Liganden größer als die Summe der Translations- und Rotationsentropie, dann wird eher ein zweiter divalenter Ligand gebunden bevor es zu einer bivalenten Wechselwirkung kommt. Die bivalente Bindung ist entropisch geschwächt.

Ein rigider Linker mit räumlich passend dargebotenen Erkennungseinheiten führt zu der stärksten Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung, da die Entropieverluste bei der Bindung minimal sind.

2.4.2. ...Lektinliganden

Durch multivalente Interaktion sind Lektine in ihrer Rolle als Zelloberflächenrezeptoren in der Lage, die aus extrazellulären Umgebung aufgenommenen Signale als Informationen in das Innere der Zelle weiterzugeben[43]. Zahlreiche dieser Rezeptoren agieren nicht einzeln, sondern als Teil von dimeren oder oligomeren Komplexen. Durch den Zusammenschluss mehrerer Rezeptoren wird vorraussichtlich die hohe Empfindlichkeit von Signaltransduktionswegen, eine wesentliche Voraussetzung für das Funktionieren von komplexen Zellsystemen, erreicht. Von einem tiefergehenden Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen ist man heute noch weit entfernt. Durch die Untersuchung neuer multivalenter Liganden mit unterschiedlichen Valenzen und räumlicher Präsentation der Bindungspartner werden Antworten auf diese Fragen gesucht.

Zur Synthese multivanter Lektinliganden benötigt man zwei Komponenten. Eine Gerüststruktur, an die sich die Erkennungseinheit, d.h. die Zucker anknüpfen lassen, und Kohlenhydratderivate die entsprechende Funktionalitäten tragen.

Die in Frage kommenden Gerüststrukturen können natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein. Als natürliche Gerüststrukturen wurden Trägerproteine wie Rinderserumalbumin (BSA) und Streptavidin[44] oder auch Viren[45] eingesetzt. Da z.B. BSA mit einem Durchmesser von ca. 10 nm verglichen mit niedermolekularen Liganden groß ist, können damit Interaktionen mit weit auseinander liegenden Bindungstellen realisiert werden. Die Heterogenität der aus natürlichen Proteinen gewonnen Liganden ist ein Nachteil, der sich durch Synthese des Gerüsts vermeiden lässt.

Zur Gruppe der synthetischen Gerüststrukturen gehören Polymere, Dendrimere, Cyclodextrine und Peptide.

Polymere

Laura Kiessling et al. gelang es, durch Ringöffnungsmetathese-Polymerisation (ROMP) kohlenhydrathaltige Polymere zu synthetisieren[46](Abb. 9). Abhängig von der Wahl der Monomeren und den Polymerisationsbedingungen sind damit statistische Polymere möglich. Sie konnten bei durch Concanavalin A induzierten Hämagglutinationsreaktion zeigen, dass durch Multivalenz der α-glukose- und α-mannosehaltigen Glycopolymere **1** neben der Affinität auch die Spezifität erhöht wird[47].

Auf Basis eines Polyacrylamid-Polymers mit Neuraminsäuren in den Seitenketten gelang es der Gruppe um Whitesides eine 10^4- bis 10^5-fach stärkere Hämagglutinationsreaktion bezogen auf einzelne Neuraminsäurereste zu erzielen[48].

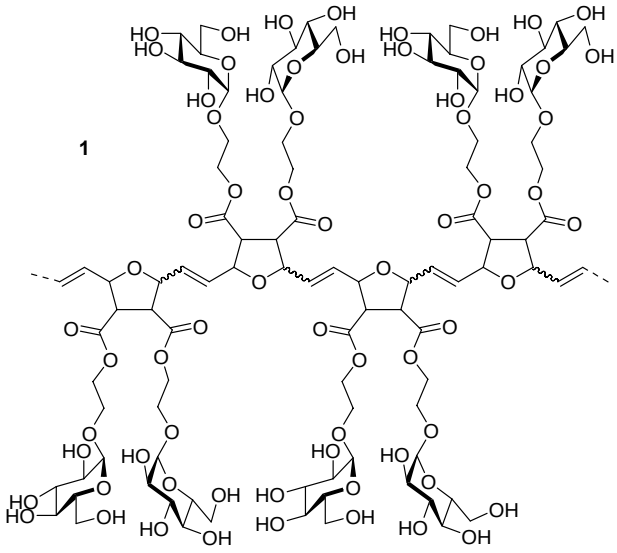


Abb. 9 Multivalentes Glycopolymer[47]

Dendrimere

Dendrime sind verzweigte Strukturen unterschiedlicher Größe und Valenz. Ausgehend von einem Kerngerüst ist durch geeignete Wahl multifunktionaler Verzweigungspunkte ein Schichtaufbau möglich. Die einzelnen Schichten werden als Generationen bezeichnet. Mit zunehmender Anzahl der Generationen erhöht sich die Valenz der Glycodendrimere wobei die für die Bindung an Lektine notwendigen Zucker an den Enden der einzelnen Äste angebracht werden. André et al. synthetisierten Glycodendrimere unterschiedlicher Valenz in dem sie Isothiocyanat-funktionalisierte Laktosederivate an aminofunktionalisierte Dendrimere, deren Verzweigung mit 3,5-Di-(2-aminoethoxy)-benzoesäure realisiert wurde, anknüpften[49]. Abb. 10 zeigt das tetravalente Derivat **2** der 2. Generation. Die untersuchten galaktose-spezifischen Lektine (VAA, Galektin-1, -3 und -7) zeigten unterschiedliche Aviditäten gegenüber den Glycodendrimeren der Generationen-1 (divalent), 2 (tetravalent) und 3 (oktavalent). Sie setzten Laktose, das β-1,4-verknüpfte Disaccharid aus Galaktose und Glukose ein, da Laktose ca. einen Faktor 100 besser bindet als Galaktose. Sie stellten auch fest, dass die gemessenen Aviditäten sehr stark von der verwendeten Matrix abhängt.

Sie konnten auch sogenannte Starburst-Dendrimere mit bis zu 128 Laktoseeinheit in der 5. Generation synthetisieren und ihre Avidität gegenüber VAA, Galektin-1 und -3 testen[50]. Das Derivat der 4. Generation mit 64 Laktoseeinheiten zeigte dabei eine 6 x 10^6-fach erhöhte Avidität an VAA im Vergleich zu Laktose. Das bedeutet, dass jede einzelne Laktoseeinheit ca. 10^5-fach besser bindet!

Davis und Mitarbeiter gelang durch gezielte Anknüpfung von Dendrimeren an Proteine die Darstellung multivalenter Glycodendriproteine[51]. Sie modifizierten eine Protease mit galaktosehaltigen Dendrimeren. Diese Dendrimere wurden selektiv von Bakterien-Rezeptoren erkannt und durch die Protease so modifizert, dass ihre Fähigkeit sich an gesunde Zellen anzulagern und diese zu infizieren, deutlich reduziert wurde.

Weitere Beispiele für den Einsatz von Dendrimen zur Darstellung multivalenter Liganden können den Übersichtsartikeln von Roy und Pieters entnommen werden[52].

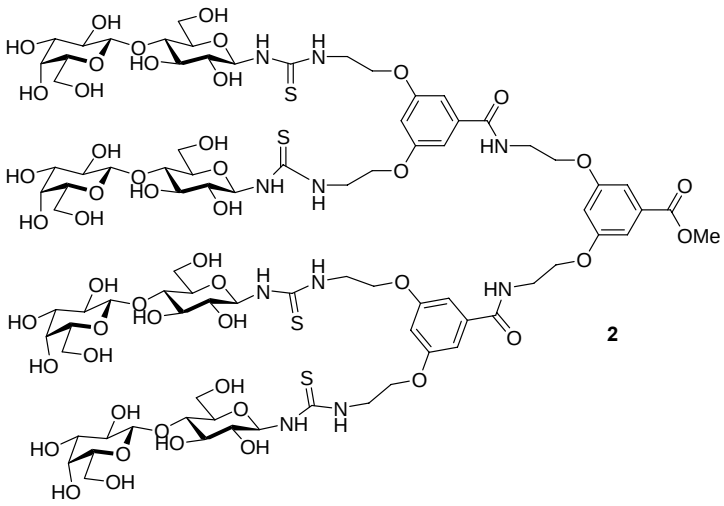


Abb. 10 Tetravalenter Glcyodendrimer der 2. Generation

Cyclodextrine

Cyclodextrine wurden zur Darstellung multivalenter Weizenkeimagglutinin- und Concanavalin A Liganden eingesetzt[53].

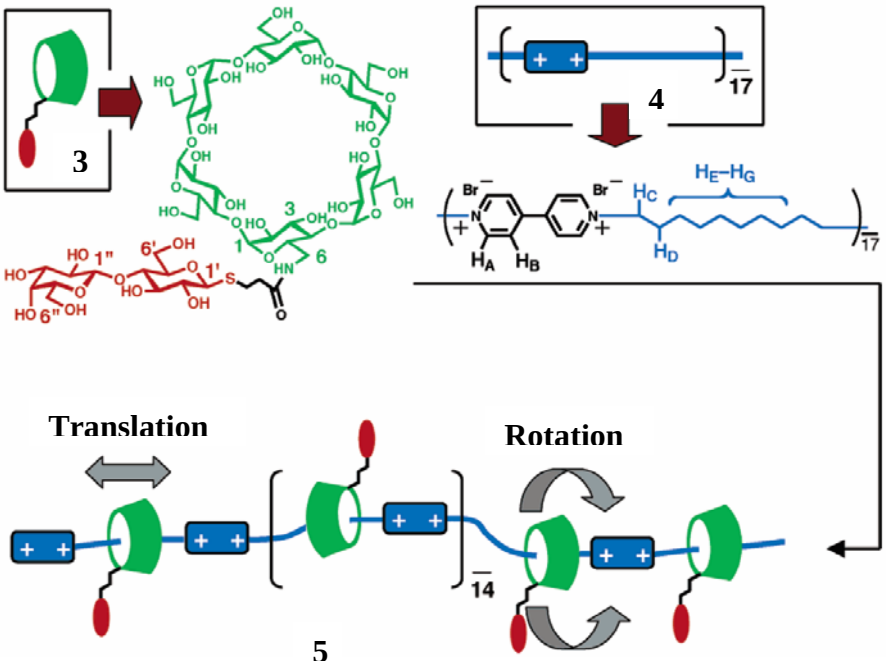


Abb. 11 Mit Laktose versehene Pseudopolyrotaxan-Liganden **5** für Galektin-1[54]

Stoddart und Mitarbeiter gingen einen Schritt weiter, indem sie mehrere laktosylierte Cyclodextrine **3** auf einem Polymermolekül **4** in durch Ladung getrennten Bereichen fixierten. Die Pseudopolyrotaxan-Liganden **5** waren in der Lage multivalente Interaktionen mit mehreren Galektin-1 Molekülen auszubilden[54,55].

Auch Ooya et al. gelang die Synthese von Polyrotaxanen, indem sie Cyclodextrine auf Polyethylenglycolpolymeren fixierten[56]. Mit den mannosehaltigen Derivaten konnten sie multivalente Interaktionen mit Concanavalin A beobachten.

Peptide

Die bisher genannten Strategien erlauben die Darstellung meist weniger multivalenter Liganden, da deren Synthese mit erheblichem Aufwand verbunden ist. Bei zahlreichen Lektinen ist jedoch die Anordnung der CRDs und damit die räumliche Präsentation eines passenden Liganden nicht bekannt und somit eine gezielte Synthese nicht möglich. Roy et al. konnten jedoch zeigen, dass eine spezifische Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkung erst durch passende räumliche Präsentation der Zucker zustande kommt[57].Deshalb besteht der Bedarf, eine möglichst große Anzahl von Verbindungen definierter Struktur herzustellen und durch deren Screening hochaffine Liganden zu identifizieren. Zur Darstellung einer Vielzahl von Liganden mit vergleichsweise geringem Zeit- und Kostenaufwand haben sich kombinatorische Ansätze an der festen Phase bewährt. Die Darstellung peptidischer Gerüststrukturen ist dafür besonders gut geeignet, da sowohl die Synthese[58] als auch die Analytik (Edman-Abbau[59], Massenspektrometrie[60]) von Peptiden etabliert ist. Mittels der Kombinatorik ist es gelungen, Substanzbibliotheken unterschiedlicher Architektur herzustellen und durch deren Screeening affine Liganden zu identifizieren[61].

Durch Festphasensynthese gelang Kolomiets et al. die Synthese einer Bibliothek bestehend aus 15625 neoglycopeptidischen Dendrimeren[62]. Sowohl die Verzweigung als auch die Anknüpfung der Zucker erfolgte durch den Einsatz der Aminosäure Lysin. Die Acylierung der Seitenketten von Lysin mit C-Fukosid **6** lieferte eine Neoglycopeptid-Bibliothek, bei deren Screening mit den Fukose-spezifischen Lektinen *Ulex europaeus* (UEA-I) und *Pseudomonas aeruginosa* (PA-IIL) tetravalentes Derivat **7** Affinitäten im mikromolaren Bereich zeigte (Abb. 12).

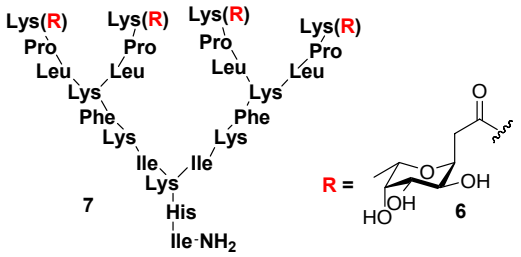


Abb. 12 Aus einer Bibliothek duch Screening identifiziertes tetravalentes Neoglycopeptid **7**

Durch Screening linearer (Glyco)peptidbibliotheken mit Galektin-1 und -3 fanden André et al. aktive Liganden mit 0-2 Saccharideinheiten[38]. Sie setzten die etablierte Leitersynthese ein und konnten somit die einzelnen Sequenzen mittels Massenspektrometrie identifizieren. Die Laktose- bzw. Galaktoseeinheiten wurden an Threonin und Asparagin geknüpft eingeführt. Eine Auswahl der gefundenen Verbindungen wurde anschließend auf ihr Affinität zu Galektin-1, -3, -9 und VAA getestet. Die dabei gefundenen Affinitäten variierten stark, so dass sich nur schwer eine Leitstruktur d.h. Sequenz ausmachen lies.

Seeberger und Wittmann verwendeten cyclische Peptide der allgemeinen Struktur **8** als Gerüste[61]. Durch Reaktion mit Carbonat-funktionalisiertem GlcNAc-Derivat **9** mit den Seitenketten verschiedener Diaminosäuren konnten Urethan-verknüpfte Neoglycopeptide unterschiedlicher Valenz (0-6) erhalten werden. Die Verwendung verschiedener D- und L-Aminosäuren garantierte eine möglichst große Vielfalt der räumlichen Präsentation der Zuckereinheiten.

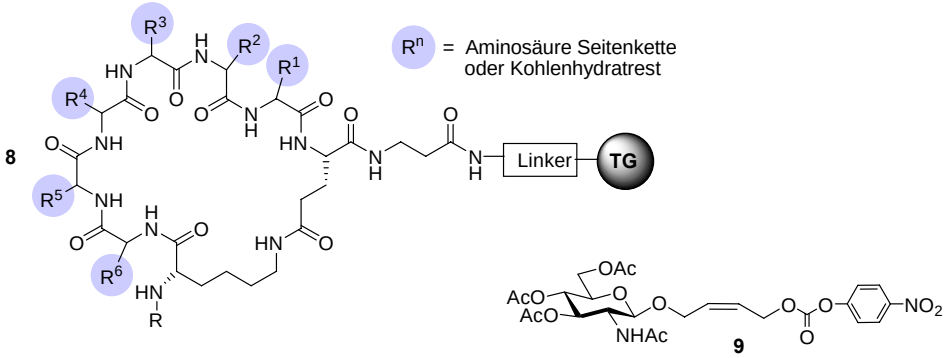


Abb. 13 Allgemeine Rückgratstruktur **8** der cyclischen Neoglycopeptide und das zur Anknüpfung verwendete Carbonat-funktionalisierte GlcNAc-Derivat **9**

Beim Screening der Bibliotheken mit Weizenkeimagglutinin (WGA) mit anschließender Edman-Sequenzierung wurden potente Liganden unterschiedlicher Valenz identifiziert. Die Affinitäten pro GlcNAc-Einheit waren bei den gefundenen tetra- bis hexavalenten Derivaten um ca. 2 Größenordnungen höher als mit monomerem GlcNAc. Wurde an die Gerüststruktur des tetravalenten Derivats **10** ein verkürztes GlcNAc-Derivat angeknüpft, so wurde das cyclische Neoglycopeptid **11** erhalten[63]. Verbindung **11** zeigte eine weitere Affinitäts-

steigerung um eine Größenordnung. Ob dies auf die Verkürzung des Linkers und damit der Reduktion von Freiheitsgraden, oder die geänderte anomere Konfiguration zurückzuführen ist, konnte bisher nicht geklärt werden.

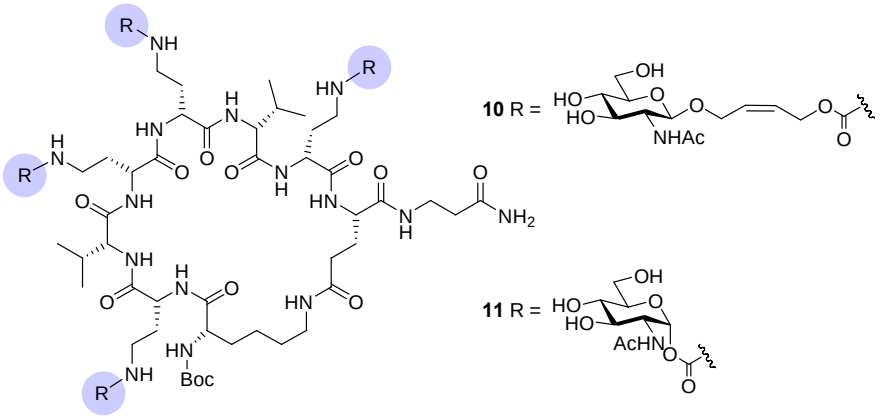


Abb. 14 Tetravalentes Neoglycopeptide **10** und **11** mit $2x10^2$ bzw. $3x10^3$ höheren Affinitäten pro GlcNAc-Einheit im Vergleich zu monomerem GlcNAc

2.5. Aufgabenstellung und Konzeption

Ziel dieser Arbeit war es, durch Synthese und Screening verschiedener Glycopeptidbibliotheken affine Lektinliganden für die Galaktose-spezifischen Lektine VAA und einige Vertreter der Galektinfamilie zu identifizieren.

Es sollte die von Seeberger und Wittmann entwickelte Strategie, cyclische Neoglycopeptide als Gerüststrukturen einzusetzen, verfolgt werden. Neoglycopeptide, das sind Glycopeptide, die im Peptidrückrat, der Anknüpfungsstelle der Kohlenhydrate und/oder im Kohlenhydratteil eine unnatürliche Verknüpfung aufweisen, lassen sich nach zwei unterschiedlichen Strategien herstellen. Verwendet man bei der Peptidsynthese mit Zuckern verknüpfte Aminosäurebausteine, spricht man von einer linearen Synthese. Baut man zunächst das Peptid auf und knüpft die Kohlenhydrate nach erfolgter Peptidsynthese an dieses an, so wird dies als konvergente Synthese bezeichnet (Abb. 15). Ein 2007 veröffentlicher Artikel gibt einen Überblick über die derzeit bekannten Synthesestrategien zur Darstellung neoglycopeptidischer Strukturen[64].

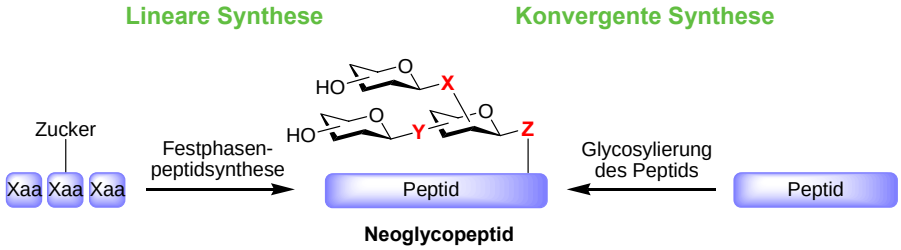


Abb. 15 Schematische Darstellung der linearen und konvergenten Synthese von Neoglycopeptiden. X, Y und Z stehen für variable Verknüpfungsstrategien

Die konvergente Synthese besitzt den Vorteil, dass vorhandene Peptide ohne größeren synthetischen Aufwand mit verschiedenen Zuckerresten modifiziert werden können. Da in dieser Arbeit verschiedene Kohlenhydratderivate an eine Gerüstbibliothek angeknüpft werden sollten, sollte der konvergente Ansatz verfolgt werden.

Hierzu werden geeignete Kohlenhydratderivate benötigt, die sich in nahezu quantitativen Ausbeuten an zuvor in das Peptid eingeführte Funktionalitäten anknüpfen lassen. Bei dieser Arbeit sollten Carbonat-funktionalisierte Zuckerderivate eingesetzt werden. Diese lassen sich durch die Reaktion mit Aminen quantitativ zu den entsprechenden Urethanen umsetzen[65]. Abb. 16 zeigt das allgemeine Reaktionsschema:

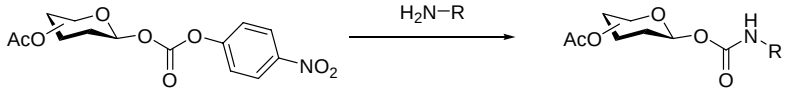
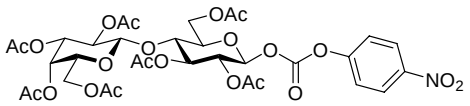


Abb. 16 Reaktion Carbonat-funktionalisierter Kohlenhydrate mit Aminen

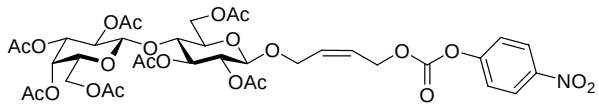
Als Erkennungseinheit der Lektine sollte Laktose dienen, da Laktose bereits als Monomer um einen Faktor 100 höhere Affinitäten als Galaktose aufweist[49]. Entsprechend musste eine stereoselektiven Synthese zur Darstellung von Carbonat-funktionalisierten Laktosylderivaten gefunden werden.

Reaktionen am anomeren Zentrum eines Zuckers verlaufen häufig nicht selektiv. Meist erhält man ein Gemisch aus α- und β-Anomeren. Verläuft eine Glycosylierungsreaktion intermediär über ein Glycosylkation, so sind Methoden zur selektiven Reaktionsführung bekannt. Hier sei auf die Königs-Knorr-Glycosylierung[66], die Trichloracetimidat-Methode nach R. R. Schmidt[67] und weitere Einflussgrößen wie z.B. die Nachbargruppenbeteiligung hingewiesen.

Es sollten selektiv die zwei β-Carbonat-funktionalisierten Laktosederivate **12** und **13** synthetisiert werden (Abb. 17). Das Butenspacer-modifizierte Laktosederivat **13** sollte unter Anwendung der Königs-Knorr-Bedingungen[66] hergestellt werden. Für die direkte selektive Synthese des Laktosylcarbonats **12** galt es geeignete Bedingungen zu finden.



12



13

Abb. 17 Darzustellende β-Laktosylcarbonate **12** und **13**

Da die Anordnung der CRDs bei Lektinen oft nicht bekannt ist, sollte eine möglichst große Anzahl von potenziellen multivalenten Lektinliganden synthetisiert werden. Dies sollte unter Anwendung der von Furka et al.[68] bzw. Lam et al.[69] 1991 entwickelten Split&Mix-Strategie realisiert werden, da sich hierbei in wenigen Reaktionsschritten eine Vielzahl von Verbindungen herstellen lässt. Das in Abb. 18 gezeigte Beispiel verdeutlicht dies. Eine lineare Zunahme der Reaktionsschritte (3 x 3) führt zur exponentiellen Zunahme der synthetisierten Verbindungen (3^3). Der Vorteil dieser Methode ist umso bedeutender, je mehr Verbindungen synthetisiert werden sollen.

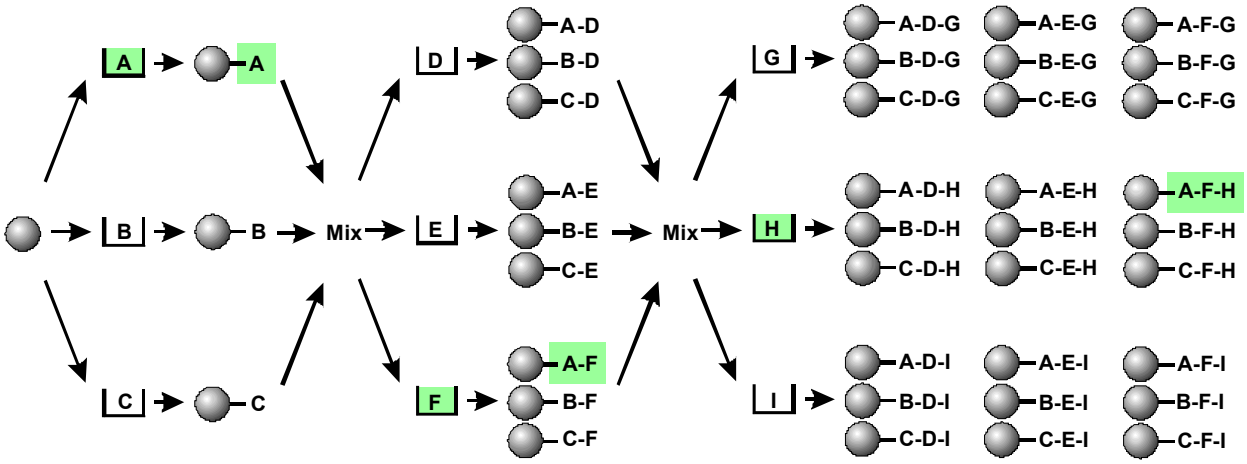


Abb. 18 Split&Mix-Synthese nach Furka et al.[68] bzw. Lam et al.[69]

Die allgemeine Struktur der Mitglieder der auf diesem Weg erhaltenen cyclischen-Glyopeptide ist in Abb. 19 dargestellt. Durch die große Anzahl an kommerziell erhältlichen Aminosäurederivaten ist eine große Stereo- und Positionsdiversität möglich. Peptide besitzen zudem den Vorteil, dass sie selbstkodierend sind, d.h. es ist möglich die Sequenz nach erfolgter Synthese zu identifizieren ohne zusätzliche Methoden des Taggings einzusetzen[70]. Durch die Cyclisierung der Peptide sollte die Rigidität der Gerüste erhöht werden. Dies sollte den entropischen Verlust im Falle einer räumlich passenden Präsentation der Zucker reduzieren und zu einer erhöhten Bindung führen (vgl. 2.4.1).

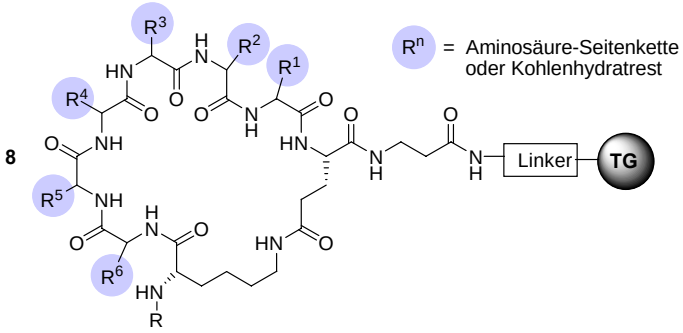


Abb. 19 Allgemeine Struktur der Bibliotheksmitglieder der zu synthetisierenden Split&Mix-Bibliotheken

Die Zuckeranknüpfung sollte an den Seitenketten der Diaminosäuren Diaminobutter- und Diaminopropionsäure erfolgen. Da für VAA und diverse Galektine bereits Peptidliganden identifiziert wurden, sollte durch gezielten Einbau aromatischer Aminosäuren eine sekundäre Wechselwirkung ermöglicht werden.

Die Identifikation potenter Lektinliganden sollte durch Screening der Glycopeptidbibliotheken erfolgen. Dafür sollten für verschiedene Lektine Screeningbedingungen optimiert

werden. Die nach erfolgtem Screening isolierten Verbindungen sollten mittels Edman-Abbau oder Massenspektrometrie identifiziert werden. Einzelne Glycopeptide sollten exemplarisch nachsynthetisiert und deren Affinität in Lösung bestätigt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Synthese der Zuckerbausteine

3.1.1. Laktosylcarbonat β-12

Ausgehend von Laktose **14** wurde unter Verwendung von Essigsäureanhydrid und Pyridin erschöpfend acetyliert[71]. Ohne weitere Aufreinigung wurde das Gemisch **15** aus α- und β-Peracetyllaktose in das anomer-entschützte Derivat **16** überführt. Dies wurde analog der Literatur[72] durch Zutropfen zu einer zuvor hergestellten Lösung aus Ethylendiamin und Essigsäure in sehr guter Ausbeute von 93% erhalten. Eine Möglichkeit zur Darstellung des β-Laktosylcarbonats β-**12** war der von Leenders et al.[73] für Glukosederivate beschriebene Syntheseweg, indem zunächst das TMS-Derivat **18** mit gewünscht hohem Anteil der β-Komponente (α:β / 1:9) hergestellt wurde. Dies gelang durch Umsetzung mit Trimethylsilyl-diethylamin im Verhältnis 1:1 in THF. Da das entstandene Produkt auf Kieselgel nicht stabil war, ließ sich der Umsatz der Reaktion nur bedingt mittels Dünnschichtchromatographie verfolgen. Die fehlende Stabilität erklärt die moderate Ausbeute von 67% nach säulenchromatographischer Reinigung. Die Abspaltung der TMS-Gruppe erfolgte mit TFA und katalytischen Mengen Wasser. In Form einer sequenziellen Eintopfreaktion wurde das entstandene Intermediat mit Chlorameisensäureester **17** in THF und Pyridin zum gewünschten β-Laktosylcarbonat β-**12** in Ausbeuten von 40 bis 60% umgesetzt.

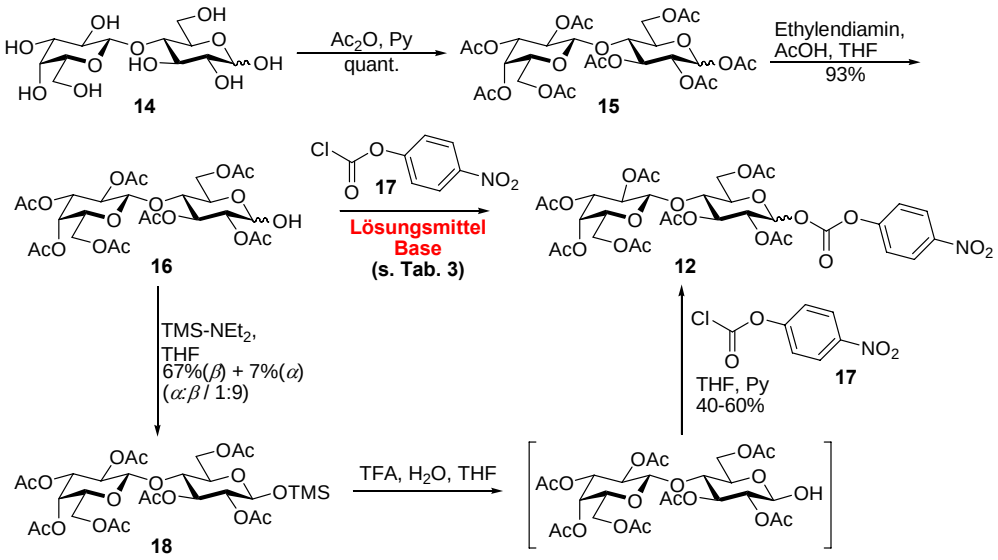


Abb. 20 Zwei Synthesewege zum gewünschten Laktosylcarbonat β-**12**

Auch durch die in Tab. 2 gezeigte Variation der Reaktionsbedingungen zur Abspaltung der TMS-Gruppe konnte keine wesentliche Steigerung der Ausbeute der zweistufigen Eintopfreaktion erreicht werden.

Tab. 2 Variation der Bedingungen zur Synthese des Laktosylcarbonats β-**12**

Ansatz	**LM**	**Abspaltungs-reagenz**	**Base**	**Reaktions-zeit in min**	**Ausbeute***	**α : β***
1	THF	TFA	Py	180	40%	1:99
2	THF	TFA	Py	5	60%	1:99
3	CH_3CN	TFA	Py	180	40%	5:95
4	CH_3CN	TFA	Py	5	30%	5:95
5	THF	TFA	DMAP	0.25	50%	1:99
6	Py	Py-HF	Py	15	60%	10:90

* bestimmt durch NMR-Spektroskopie (Rohprodukt)

Da das Laktosylcarbonat β-**12** auf diesem Weg nur in moderaten Ausbeuten synthetisiert werden konnte, wurde versucht, dieses durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen in einem Schritt ausgehend vom anomer-entschützten Laktosederivat **16** herzustellen. Hierfür wurden jeweils 1.5 eq des Chlorameisensäureesters **17** mit der gleichen Menge an Base in verschiedenen Lösungsmitteln umgesetzt. Tab. 3 gibt einen Überblick über die untersuchten Bedingungen. Bei Verwendung der Lösungsmittel Toluol, CH_2Cl_2 und THF konnten lediglich moderate Selektivitätssteigerungen in Abhängigkeit von der Wahl der Base erzielt werden. So konnte in THF und der Base Lutidin eine α:β-Selektivität von 1:7 bestimmt werden, dies jedoch bei geringem Reaktionsumsatz (30%). Führte man die Reaktion in Acetonitril durch, so konnte die Selektivität deutlich erhöht werden. Es gelang durch Verwendung der Base Lutidin, selektiv das Carbonat β-**12** in Ausbeuten von bis zu 50% zu isolieren. Versuche, den Umsatz des Eduktes durch Verlängerung der Reaktionszeiten unter Erhalt der Selektivität zu erhöhen, waren nicht erfolgreich. Es wurde auch beobachtet, dass die Konzentration einen entscheidenden Einfluss auf die Selektivität der Reaktion hat. Die Erhöhung der Konzentration von 0.03 M auf 0.4 M führte einerseits zu quantitativem Reaktionsumsatz, andererseits ging die Selektivität verloren (α:β / 1:1). Wurde die Konzentration auf 0.003 M verringert fand keine Reaktion statt.

Tab. 3 Verschiedene Reaktionsbedingungen für die selektive Synthese des Laktosylcarbonat *β*-**12**

Lösungs-mittel	Base	*α*:*β*[*]	Ausbeute[*]	Konz.
Toluol	K_2CO_3	1 : 2	70-90%	
	NaH	1 : 1	50-70%	
	Et_3N	1 : 1	60-80%	
	Pyridin	1 : 4	70-90%	
	Lutidin	1 : 1	80-90%	
CH_2Cl_2	K_2CO_3	n.b.	<10%	
	NaH	1 : 1.5	70-90%	
	Et_3N	1 : 1	70-90%	
	Pyridin	2 : 1	70-90%	
	DMAP	2 : 1	70-90%	
	Lutidin	1 : 4	85-90%	
THF	K_2CO_3	n.b.	<10%	
	Et_3N	1 : 2.5	70-90%	
	DMAP	2.5 : 1	70-90%	
	Pyridin	1 : 1	75-85%	
	Lutidin	1 : 7	30%	
CH_3CN	K_2CO_3	1 : 1	85-95%	
	Et_3N	1.5 : 1	85-95%	
	Pyridin	3 : 1	85-95%	
	K^tOBu	1 : 2.5	30-40%	
	DMAP	**>10 : 1**	**85-95%** [#]	
	Lutidin	**<1 : 10**	**50%** [#]	**0.03M**
	Lutidin	1 : 1	80-90%	0.4M
	Lutidin	n.b.	<10%	0.003M

[*] bestimmt durch NMR-Spektroskopie (Rohprodukt)
[#] isolierte Ausbeuten

Bei der Suche nach einer *β*-selektiven Syntheseroute für das Carbonat *β*-**12** wurde auch eine selektive Synthese für das entsprechende *α*-Derivat *α*-**12** gefunden. Hierbei war ebenfalls Acetonitril das Lösungsmittel der Wahl. Verwendete man die Base Dimethylaminopyridin (DMAP) so gelang die selektive Synthese von *α*-**12** in 85-95%iger Ausbeute. Die Ursache für die beobachteten Selektivitäten ist bislang nicht bekannt. Schmidt et al. führten Untersuchungen zur Selektivität der anomeren *O*-Alkylierung durch[67,74]. Sie stellten fest, dass für die Selektivität der anomeren *O*-Alkylierung ein rasches Gleichgewicht zwischen *α*- und *β*-Alkoxyderivaten verantwortlich ist. Ist die Geschwindigkeit der Alkylierungsreaktion schneller als die Einstellung des Gleichgewichts, dann spiegelt das *α*/*β*-Verhältnis des Produktes die Deprotonierungsgeschwindigkeit der beiden Anomeren wider. Da im polaren Lösungsmittel Acetonitril die Alkylierungsreaktion sehr schnell verläuft, beruht die erzielte

Selektivität voraussichtlich auf der unterschiedlichen Deprotonierungsgeschwindigkeit der beiden Anomeren, abhängig von der Wahl der Base. Dass nicht nur Lösungsmittel und Base die Selektivtät der anomerne O-Alkylierung beeinflussen, konnten Lubineau und Mitarbeiter zeigen[75]. Bei der Reaktion von anomer-entschützter Glukose mit Allylbromid in CH_2Cl_2 erhielten sie durch Zugaben von NaH selektiv β-Allylglycoside. Die Selektivität führten sie auf die erhöhte Reaktivität des β-Alkoxyanomeren zurück. Durch Zugabe von Tetrabutylammoniumiodid konnte die zuvor β-selektiv verlaufenden Synthese α-selektiv durchgeführt werden. Die veränderte Selektivität wird damit begründet, dass durch Zusatz des quartären Ammoniumsalzes die Reaktivität der Alkoxyderivate erhöht wird. Die Alkylierung findet dadurch schneller als die Gleichgewichtseinstellung statt, so dass das stabilere α-Anomer sofort reagiert und keine kontinuierliche Equilibrierung zum reaktiveren β-Anomer stattfindet.

Da α- bzw. β-selektive Synthesen in der Kohlenhydratchemie zur Darstellung einheitlicher Produkte von großer Bedeutung sind, wurden die für Laktose gefundenen Reaktionsbedingungen zur Darstellung weiterer Kohlenhydratcarbonate angewandt. Auf deren Darstellung, basierend auf den Ergebnissen bei der Synthese der Laktosylcarbonate, wird in Kapitel 3.1.3 eingegangen.

3.1.2. Butenspacer-modifiziertes Aktivcarbonat 13

Die Synthese des Butenspacer-modifizierten Laktosylcarbonats **13** ist in Abb. 21 dargestellt. Peracetylierte Laktose **15** wurde zunächst in Dichlormethan gelöst, auf 0°C gekühlt und mit Bromwasserstoffsäure (>33% in Essigsäure) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2.5 Stunden bei Raumtemperatur konnte das α-Laktosylbromid **19** in 95% Ausbeute isoliert werden. Die Reaktion lieferte ausschließlich das aufgrund des anomeren Effekts thermodynamisch stabilere α-Produkt.

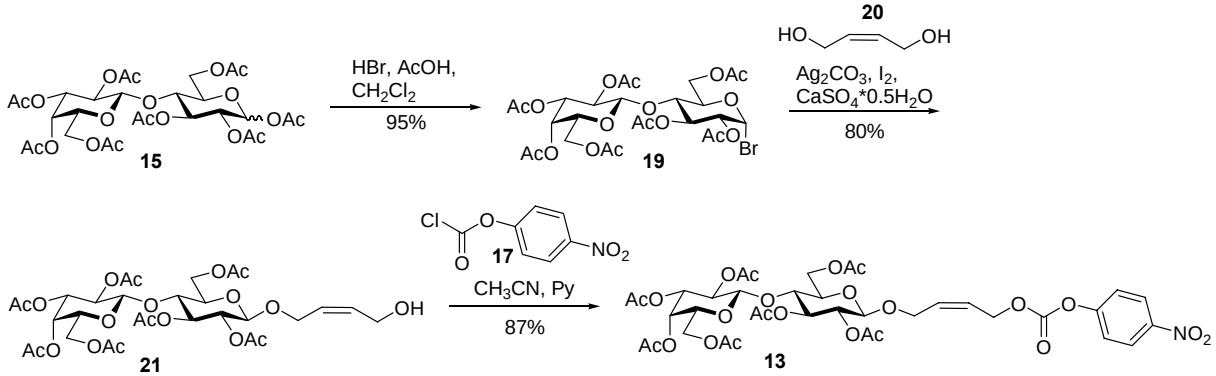


Abb. 21 Synthese des Butenspacer-modifizierten Laktosylcarbonats **13**

Nach der Koenigs-Knorr-Methode wurde das α-Laktosylbromid **19** mit 50-fachem Überschuss an (Z)-But-2-en-1,4-diol **20** (der Überschuss diente der Vermeidung von Bisubstitution), Silbercarbonat als Aktivator und $CaSO_4$ als Wasser entziehendes Reagenz umgesetzt. Die Zugabe von geringen Mengen Iod diente der Beschleunigung der Reaktion. Da das intermediär gebildete Carbeniumion durch die nachbargruppenaktive Acetylschutzgruppe in 2-Position unter Abschirmung der α-Seite stabilisiert wird (Abb. 22), erhielt man das β-Butendiol-modifizierte Laktosid **21** in einer Ausbeute von 80%.

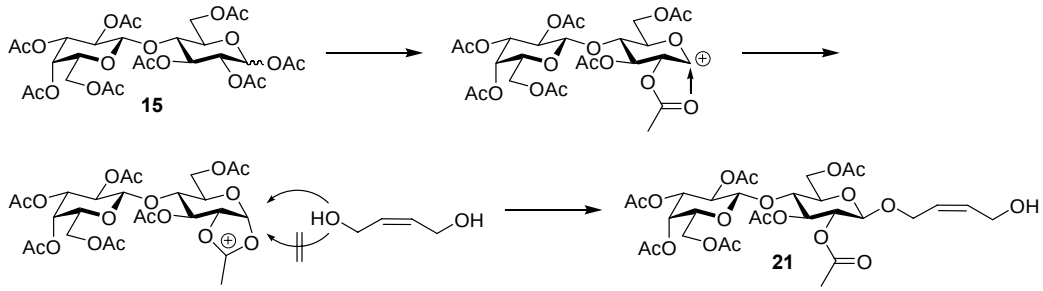


Abb. 22 Nachbargruppeneffekt bei der Synthese des Butenspacer-modifizierten β-Laktosids **21**

Die Darstellung des Butenspacer-modifizierten Laktosylcarbonats **13** gelang durch die Reaktion der freien Hydroxygruppe des Laktosids **21** mit 4-Nitrophenyl-chloroformiat **17** unter Zusatz von Pyridin als Base in 87%iger Ausbeute (Abb. 21).

3.1.3. Selektive Synthese weiterer Kohlenhydratcarbonate

Da sich die Kombination aus Acetonitril als Lösungsmittel und den Basen DMAP bzw. Lutidin, wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, zur selektiven Darstellung von α- bzw. β-Laktosylcarbonaten hervorragend eignete, wurden diese Bedingungen zur selektiven Darstellung weiterer Glycosylcarbonate angewandt. Auf Basis dieser Ergebnisse gelang Timo Immel im Rahmen seiner Masterarbeit erstmalig die selektive Darstellung des 2-Azido-β-glukosylcarbonats **22**[76]. Die zuvor durchgeführten Versuche, selektiv das β-Derivat darzustellen, zeigten keine bzw. geringe Selektivitäten[77]. Immel setzte das anomer-entschützte 2-Azidoglukosederivat **21** mit Chlorameisensäureester **17** bei 0°C in Acetonitril und Zugabe von Lutidin um. Die Synthese lieferte ein Verhältnis von α:β / 1:9. Durch Umkristallisation konnte selektiv das β-Derivat **22** in einer Ausbeute von 65% isoliert werden (Abb. 23).

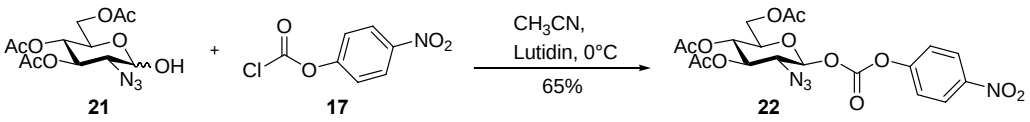


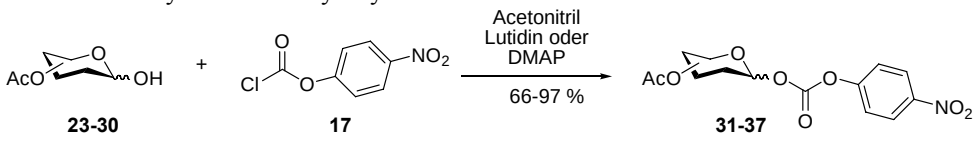
Abb. 23 Selektive Darstellung des 2-Azido-β-glukosylcarbonat **12**[76]

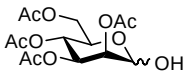
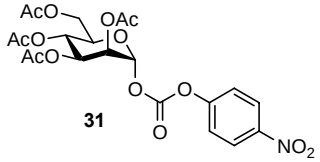
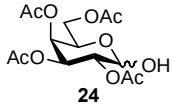
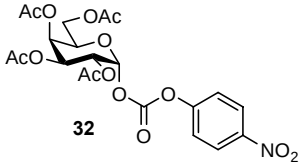
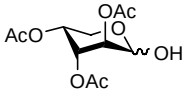
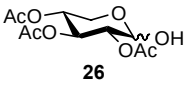
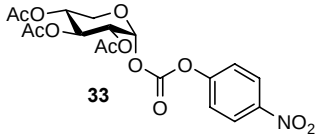
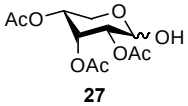
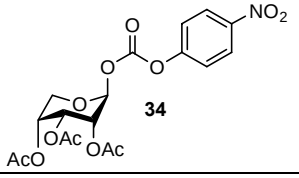
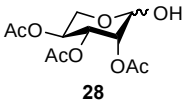
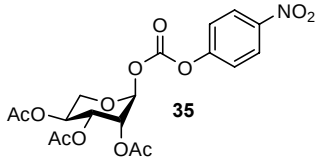
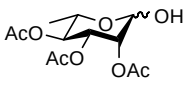
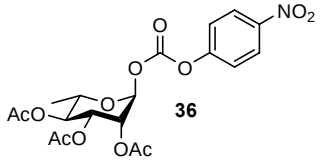
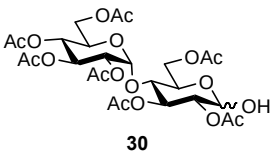
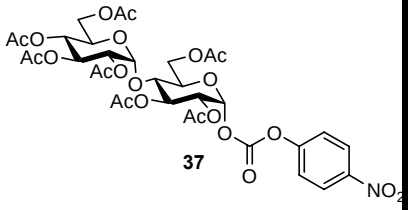
Tab. 4 gibt einen Überblick der in Zusammenarbeit mit Timo Immel durchgeführten Experimente wobei jeweils 1.5 eq der Base und des Chlorameisensäurester **17** eingesetzt wurden.

Ausgehend von den anomer entschützten Zuckerderivaten **23**-**30** konnte durch den Einsatz von Lutidin bzw. DMAP auch bei diesen Reaktionen eine stereoselektive Synthese der Glycosylcarbonate **23**-**30** beobachtet werden. Im Falle von Galaktose und Maltose konnten bei Verwendung von DMAP selektiv die entsprechenden α-Glycosylcarbonate **22** und **28** hergestellt werden. Bei Verwendung von Lutidin gelang ebenfalls die selektive Synthese der α-Carbonate der Zucker Mannose **21**, Xylose **23**, Lyxose **25** und Rhamnose **26** sowie des β-Carbonats der Ribose **24**. Dies widersprach den Erwartungen, da bisher bei Verwendung von Lutidin überwiegend das β-Derivat isoliert werden konnte. Durch die Selektivitätsumkehr wurde deutlich, dass eine Vorhersage der Selektivität nicht möglich ist. Sie ist nicht nur von der Base sondern auch stark vom verwendeten Zuckerderivat abhängig und somit bestätigte sich die erhoffte allgemeine β-Selektivität bei Verwendung von Lutidin nicht. In Tab. 4 sind auch die Anomerenverhältnisse der nicht selektiv verlaufenden Ansätze gezeigt. So konnte bei den Ansätzen der Galaktose, Arabinose und Maltose mit Lutidin bzw. Mannose,

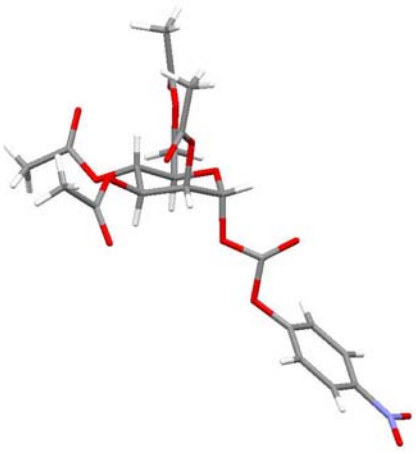
Arabinose, Xylose, Ribose, Lyxose und Rhamnose mit DMAP keine, eine geringe Selektivität oder komplexe Produktgemische (nicht bestimmt = n.b.) beobachtet werden.

Tab. 4 Selektive Synthese der Glycosylcarbonate **31-37**



Zucker	Edukt	Base	$\alpha : \beta$	Ausbeute	α-Carbonate
Mannose	 **23**	**Lutidin**	>20:1	**94%**	 **31**
		DMAP	3:1	n.b.	
Galaktose	 **24**	Lutidin	1:1	n.b.	 **32**
		DMAP	>20:1	**83%**	
Arabinose	 **25**	Lutidin	2:3	n.b.	-
		DMAP	n.b.	n.b.	
Xylose	 **26**	**Lutidin**	>20:1	**97%**	 **33**
		DMAP	n.b.	n.b.	
Ribose	 **27**	**Lutidin**	>20:1	**85%**	 **34**
		DMAP	n.b.	n.b.	
L-Lyxose	 **28**	**Lutidin**	>20:1	**66%**	 **35**
		DMAP	3:1	n.b.	
L-Rhamnose	 **29**	**Lutidin**	>20:1	**83%**	 **36**
		DMAP	n.b.	n.b.	
Maltose	 **30**	Lutidin	3:2	n.b.	 **37**
		DMAP	>20:1	**69%**	

Da die Differenzierung von α- und β-Anomeren bei 1,2-trans-Glycosylcarbonaten (Mannose, Lyxose, Rhamnose) nicht durch ^{1}H-NMR-Spektroskopie möglich war, wurden ^{1}J-Kopplungskonstanten durch Messung entkoppelter ^{1}H-^{13}C-NMR-Spektren ermittelt. Bock und Pederson konnten durch Messungen verschiedener Pyranosen zeigen, dass die Werte der β-Derivate, unabhängig vom vorliegenden Zucker, ca 10 Hz größer waren als die der α-Derivate[78]. Die damals gemessenen Kopplungskonstanten der β-Derivate lagen bei 170 Hz, die der α-Derivate bei 160 Hz. Die in dieser Arbeit gefundenen Werte lagen bei allen drei Zuckercarbonaten **31**, **35** und **36** bei 179 Hz. Dies erlaubte die Schlussfolgerung, dass es sich bei den vorliegenden Glycosylcarbonaten um die gleichen Anomere handelte. Da dadurch noch nicht endgültig geklärt werden konnte ob es sich um α- oder β-Anomere handelt, wurde vom Mannosylcarbonat die Kristallstruktur bestimmt. Durch Aufklärung der Kristallstruktur des Mannosylcarbonats **31** konnte das Vorliegen des α-Derivats belegt werden; somit lagen auch die Lyxosyl- und Rhamnosylcarbonate **35, 36** als α-Anomere vor. Die Kristallstruktur des α-Mannosylcarbonats **31** inkl. wesentlicher Kristallstrukturdaten sind in Abb. 24 dargestellt.



Strukturdaten	$\boldsymbol{R_1}$ **= 0.04,** $\boldsymbol{wR_2}$ **= 0.098**
Summenformel	C_{21} H_{23} N O_{14}
Molekulargewicht [g/mol]	513.40
Kristallsystem	orthorhombisch
Raumgruppe	$P2_12_12_1$ (No. 19)
a, b, c [Å]	8.8171(5), 8.8495(4), 29.9965(2)
V [Å^3]	2340.5(2)
Z	4
ρ_{ber}[g/cm^3]	1.457

Abb. 24 Kristallstruktur des α-Mannosylcarbonats **31**

3.2. Multivalente Lektinliganden

3.2.1. Synthese

Zur Darstellung erster multivalenter Liganden sollten die β-Laktosylcarbonate **12** und **13** zunächst mit den Aminen **37**-**44** umgesetzt werden. Die Amine **37**-**43** zur Synthese mono-, di- und trivalenter Liganden sind kommerziell erhältlich. Zur Darstellung eines tetravalenten Liganden wurde Tetra-(aminomethyl)-methan **44** entsprechend einer Vorschrift von Feldman und Masters synthetisiert[79].

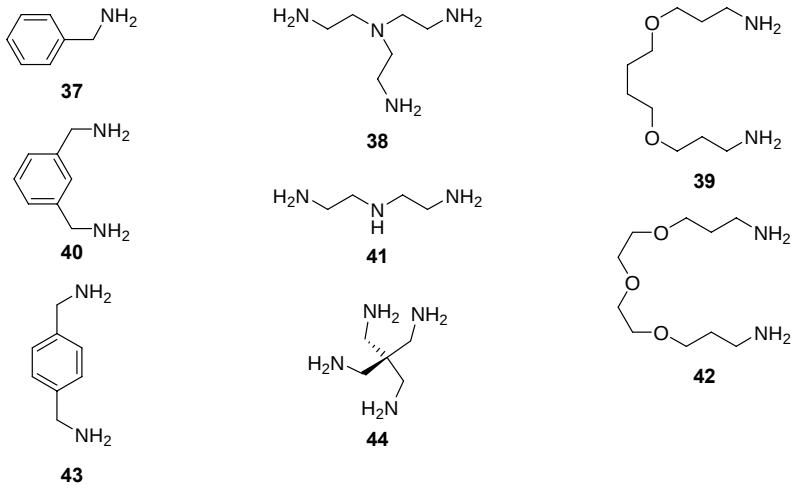


Abb. 25 Verwendete Amine **37**-**44** zur Darstellung multivalenter Lektinliganden

Ausgehend vom Tetra-(brommethyl)-methan **45** konnte durch Umsetzung mit NaN_3 das Tetra-(azidomethyl)-methan **46** erhalten werden (Abb. 26). Dieses wurde aufgrund der hohen Aziddichte und der damit verbundenen Explosionsgefahr ohne weitere Aufreinigung zu Tetra-(aminomethyl)-methan **44** reduziert. Die Vollständigkeit beider Reaktionsschritte konnte anhand der Verschiebung des Methylensinguletts in den ^{1}H-NMR-Spektren verfolgt werden.

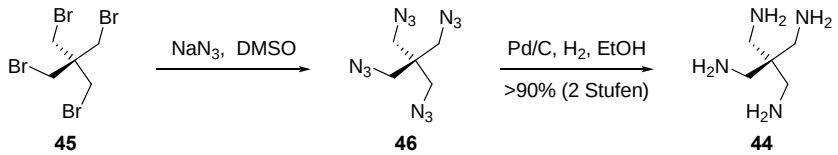


Abb. 26 Synthese des Tetra-(aminomethyl)-methan **44** nach Feldman und Masters[79]

Die Reaktion des geschützten Laktosylcarbonats β-**12** mit den Aminen **37**-**43** erfolgte unter Zusatz von Hünnig-Base in CH_2Cl_2 mit guten bis sehr guten Ausbeuten (Abb. 27) mit Ausnahme der Reaktion mit Tetra-(aminomethyl)-methan **44**. Hierbei konnte lediglich ein komplexes Produktgemisch beobachtet werden. Dies könnte daran liegen, dass sterisch keine

Vierfachsubstitution möglich ist und somit verschiedene ein- bis dreifachsubstituierte Derivate entstanden.

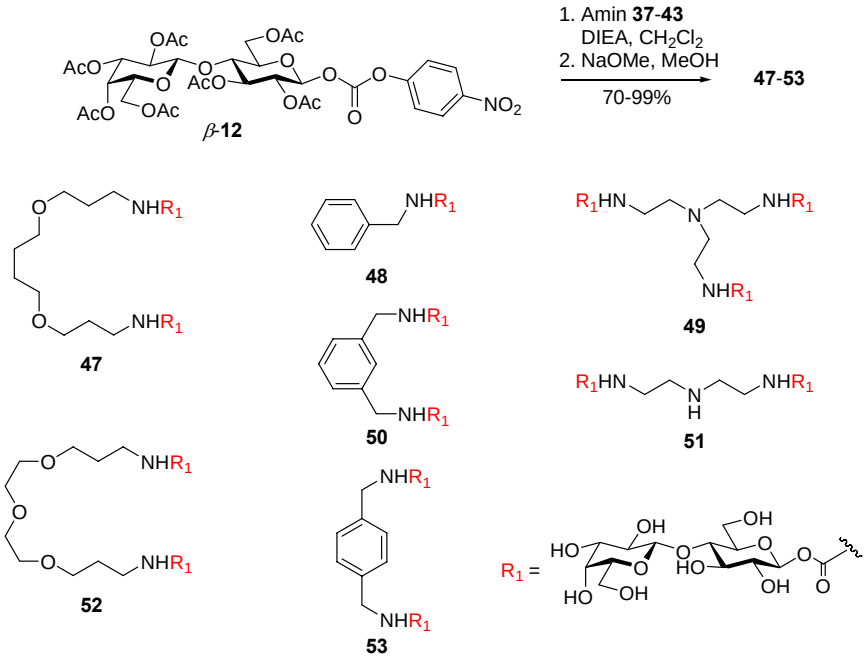


Abb. 27 Synthetisierte Liganden **47-53**

Damit die Liganden als Lektinliganden getestet werden konnten wurden sie in NaOMe/MeOH deacetyliert (**47-53**). Das para-substituierte divalente Derivat **53** war in Wasser nicht löslich und konnte somit nicht bei biologischen Tests eingesetzt werden. Auch durch Zugabe geringer Mengen DMSO (bis zu 20%) konnte es nicht gelöst werden. Mit den Liganden **47-52** konnten in der Arbeitsgruppe von Prof. Gabius in Zusammenarbeit mit Dr. Sabine André (LMU München) zahlreiche biologische Tests durchgeführt werden.

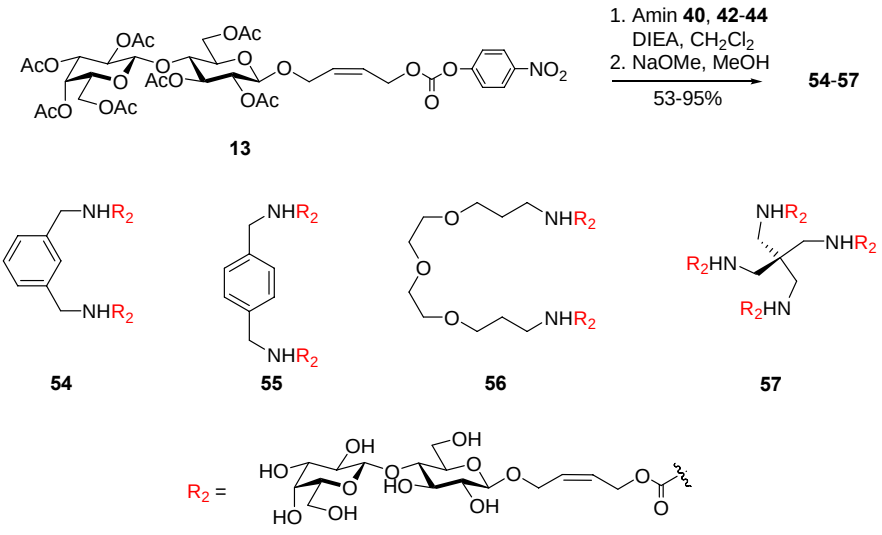


Abb. 28 Synthese der Butenspacer-modifizierten Liganden **54-57**

Zur Darstellung flexiblerer Liganden wurde das Butenspacer-modifizierte Laktosylcarbonat **13** mit den Aminen **40**, **42-44** in CH_2Cl_2 unter Zugabe von DIEA umgesetzt und anschließend unter Zemplén-Bedingungen deacetyliert. Durch Verwendung des Butenspacer-modifizierten Laktosylcarbonats **13** gelang auch die Synthese eines tetravalenten Liganden **57**. Auch ein parasubstituiertes divalentes Derivat **55** das wasserlöslich ist konnte so erhalten werden (Abb. 28). Die so dargestellten Verbindungen **54-57** wurden ebenfalls biologischen Tests unterzogen (Prof. Gabius, LMU München).

3.2.2. Biologische Tests

Die viel versprechenden Ergebnisse werden derzeit in München an der LMU ausgewertet und werden in Kürze veröffentlicht.

Mit diesen ersten Tests konnte gezeigt werden, dass die Urethanverknüpfung der Laktoseliganden nicht zum Verlust der Erkennung der Lektine führte. Darüber hinaus zeigten die metasubstituirten Derivate **50** und **54** eine erhöhte Affinität gegenüber Galektin-4[80].

3.3. Synthese von Bibliotheken cyclischer Glycopeptide

3.3.1. Analytische Überlegung: Edman-Abbau und/oder Massenspektrometrie

Da bei zahlreichen Lektinen die Anordnung der CRDs nicht bekannt ist, ist ein rationales Design potenter Liganden nicht möglich. Deshalb sollte durch die Split&Mix-Synthese eine Bibliothek bestehend aus cyclischen Glycopeptiden mit einer Vielzahl potenzieller Liganden in Form von cyclischen Glycopeptiden synthetisiert werden. Der Vorteil dieser Synthese, dass mit wenigen Arbeitsschritten eine große Anzahl verschiedener Verbindungen dargestellt werden kann, wird durch den Verlust der Sequenzinformation auf jeder einzelnen Kugel geschmälert. Diese Information muss nach erfolgtem Screening durch die zur Verfügung stehenden analytischen Methoden wieder gewonnen werden. Alternativ wäre es möglich, die Sequenzinformation durch chemische Reportermoleküle (Tagging)[81] während der Synthese auf den einzelnen Harzkugeln zu codieren. Neben dem zusätzlichen synthetischen Aufwand wurde darauf vorallem wegen den anschließenden biologischen Tests und der möglichen Störung durch die Reportermoleküle verzichtet. Aus gleichem Grund wurde auf die von Youngquist et al. eingeführte Leitersynthese[82] verzichtet. Die Sequenzanalyse kann durch den Edman-Abbau oder durch Massenspektrometrie erfolgen. Die Edman-Sequenzierung zur Identifikation der Peptidsequenz cyclischer Peptide von einzelnen Harzkugeln einer one-bead-

one-compound Bibliothek wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert[59]. Der Edman-Abbau besitzt den Nachteil, dass die Analyse der Sequenz lange dauert (ca. 1 Stunde pro Aminosäure) und kostenintensiv ist. Die Massenspektrometrie wurde ebenfalls erfolgreich zur Identfikation einzelner Mitglieder einer linearen Glycopeptidbibliothek eingesetzt[83]. Bei der massenspektromerischen Identifikation cyclischer Glycopeptide kam es stets zu Schwierigkeiten. So reicht oft die Substanzmenge auf einer Kugel mit ca. 100 pmol nicht aus um ein ausreichend gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Bei der Synthese cyclischer Peptid ist eine so niedrige Beladung zur Vermeidung intermolekularer Reaktionen notwendig (Pseudverdünnungsprinzip[84]). In unserer Arbeitsgruppe ist es Angelika Semmler jedoch gelungen, erstmalig eine bekannte cyclische Glycopeptidsequenz von einer einzelnen Harzkugel zu sequenzieren[85]. Die Anwendbarkeit dieser Methode zur Identifikation einzelner Mitglieder einer cyclischen Glycopeptidbibliothek unbekannter Sequenzen ist Ziel derzeitiger Forschungsaktivitäten. Wesentlich für die Möglichkeit des Einsatzes einer Analytikmethode ist die Wahl einer geeigneten Verknüpfung des Peptids mit der festen Phase. Die genannten Sequenzierungsmethoden stellen unterschiedliche Bedingungen an den Linker, über den die Peptide an die feste Phase geknüpft sind. Im Falle der Edman-Sequenzierung sollte das Peptid auch unter den stark sauren Reaktionsbedingungen der einzelnen Abbauschritte am Harz verbleiben wohingegen bei der Massenspektrometrie gewährleistet sein muss, dass sich das zu untersuchende Peptid von der Festphase abspalten lässt. Da zu Beginn der Festphasensynthese die Art des Linkers festgelegt wird ist damit auch die Entscheidung für eine Sequenzanalyse getroffen. Bei dieser Arbeit sollte ein Linker verwendet werden, der sowohl die etablierte Methode Edman-Sequenzierung als auch Untersuchungen von einzelnen Harzkugeln durch Massenspektrometrie erlaubte. Außerdem musste der Linker orthogonal zu den verwendeten Schutzgruppen sein. Der Linker **58,** dessen Synthese von C. P. Holmes bereits 1997 beschrieben wurde[86], schien diesen Anforderungen gerecht zu werden und sollte diesbezüglich untersucht werden. Zunächst wurde der photolabile Linker analog der Vorschrift von Holmes synthetisiert (Abb. 29). Acetovanillon **59** wurde mit Ethyl-4-bromobutyrat **60** unter Zugabe von K_2CO_3 in DMF umgesetzt. Die Reaktion verlief über Nacht quantitativ. Ohne weitere Aufarbeitung wurde das Keton **61** mit Hydroxylammoniumchlorid in einem Gemisch aus Pyridin:Wasser / 2:1 zum Oxim **62** umgesetzt. Durch Reduktion mittels Palladium-katalysierter Hydrierung gelangte man zum Amin **63**. Die Aminofunktion wurde durch Zugabe von Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) in Pyridin bei 0°C für die weiteren Reaktionsschritte geschützt. Durch Kristallisation konnte das Amid **64** über 4 Stufen in 63% Ausbeute isoliert werden. Die für die Photolabilität

maßgeblich verantwortliche Nitrogruppe wurde durch die Reaktion der Verbindung **64** mit konzentrierter Salpetersäure selektiv in ortho-Position eingeführt. Damit der nitrierte photolabile Linker **65** für die Festphasensynthese eingesetzt werden konnte, wurden die Schutzgruppen der Amino- und Carbonsäurefunktion in alkalischer Methanol-Lösung abgespalten und durch Zugabe von Fmoc-Chlorid abschließend die Aminogruppe Fmoc-geschützt. Der unter Standard-Peptidsynthesebedingungen einsetzbare photolabile Linker **58** wurde in sehr guter Gesamtausbeute von 48% über 6 Stufen erhalten.

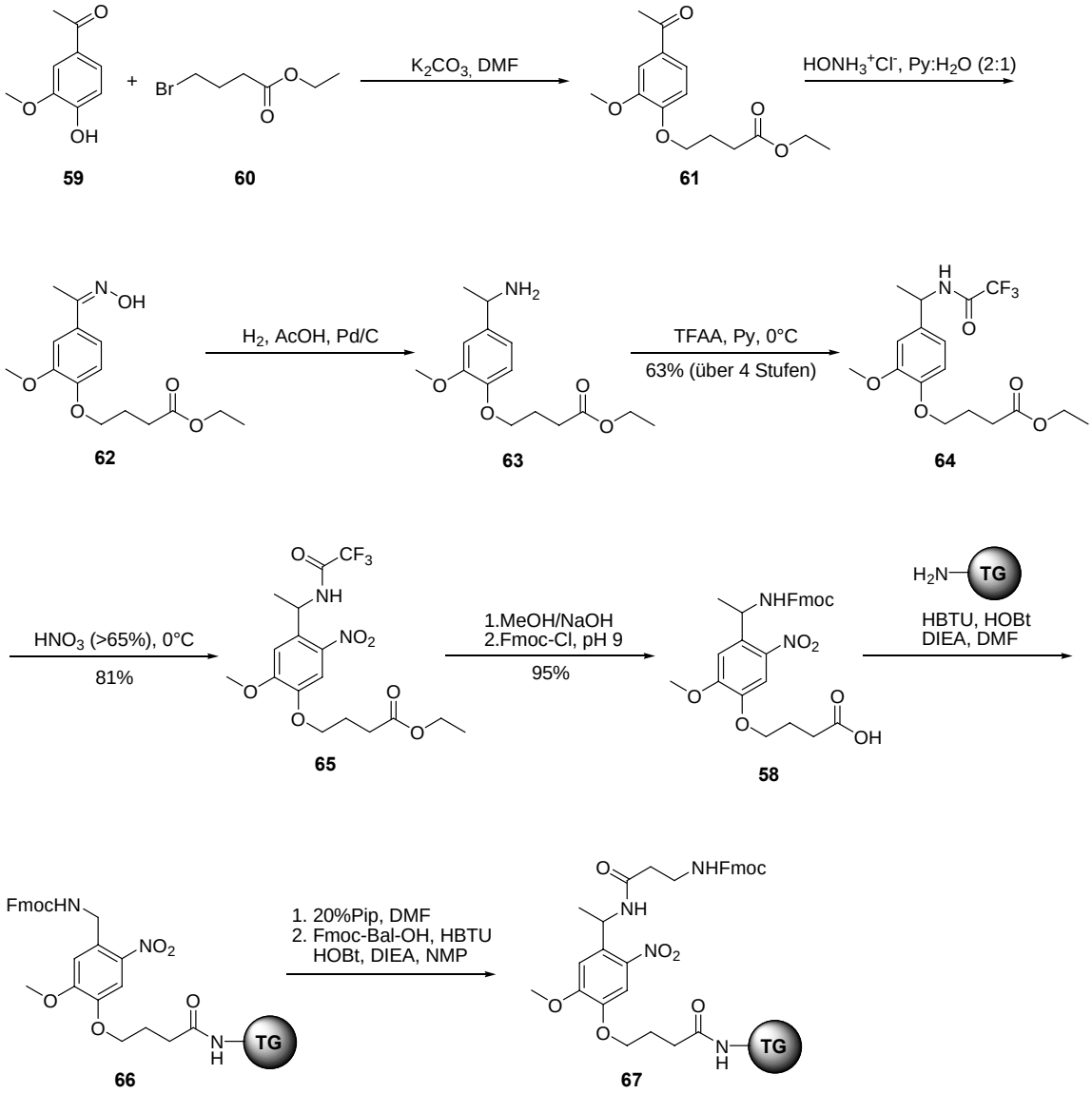


Abb. 29 Synthese des Fmoc-geschützten photolabilen Linkers **58** und dessen Anknüpfung an TentaGel

3.3.2. Photochemische und NMR-spektroskopische Untersuchung

Es wurde die Stabilität des Linkers **58** an fester Phase sowie die photochemische Abspaltbarkeit eines über den Linker an die feste Phase geknüpftes Peptids untersucht. Hierzu wurde aminofunktionalisiertes TentaGel mit dem Fmoc-geschützten Linker **58** beladen. Durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe des immobilisierten Photolinkers **66** wurde durch Zugabe der HBTU/HOBt-aktivierten Aminosäure Fmoc-Bal-OH eine Aminosäure angeknüpft (**67**).

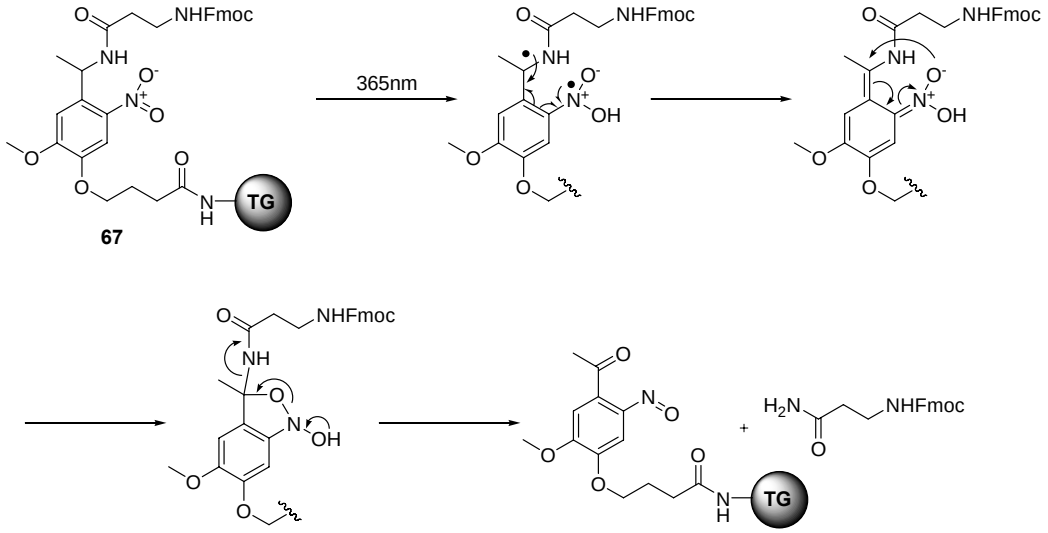


Abb. 30 Mechanismus der photochemischen Abspaltung des Photolinkers an der festen Phase **67**

Durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm wurde die Aminosäure photochemisch abgespalten. Den zugrunde liegenden Mechanismus zeigt Abb. 30. Die Bestrahlung mit UV-Licht führt zur Bildung eines Diradikals. Dieses stabilisiert sich durch drei Umlagerungsschritte bis schlussendlich die Abspaltung der Aminosäure bzw. des Peptids mit endständigem Amid stattfindet.

Nach unterschiedlichen Bestrahlungsdauern konnte durch Messung der Absorption von Fmoc-Bal-NH_2 in der Abspaltlösung die abgespaltene Menge quantifiziert werden. Hierzu wurden 3 mg des Harzes **67** in einer Küvette mit 3 mL DMF versetzt. Die Bestrahlung erfolgte mit einer LUMATEC-Lampe und die anschließenden Absorptionsmessungen wurden an einem UV-Spektrometer Cary 50 der Arbeitsgruppe Steiner im Hause durchgeführt. In Abb. 31 sind die Absorptionsspektren nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten gezeigt.

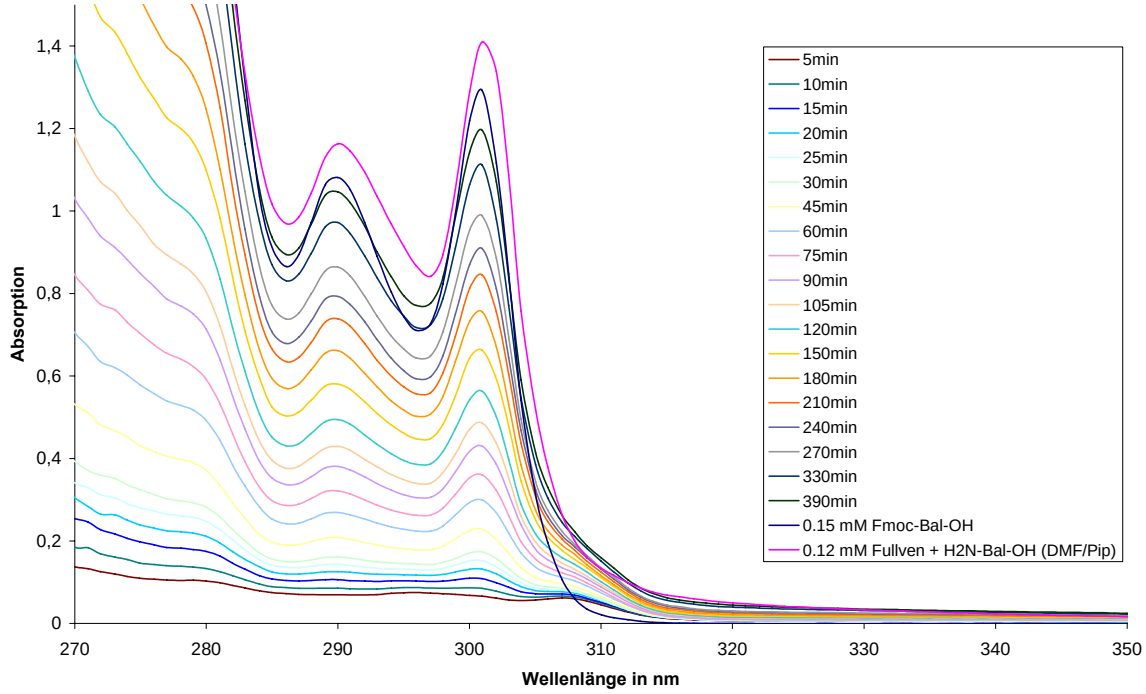


Abb. 31 Bestrahlung von Harz **67**

Mit zunehmender Bestrahlungsdauer konnte ein Anstieg der Absorption der Lösung gemessen werden. Die beobachteten Maxima bei 301 und 290 nm entsprechen den Absorptionsmaxima der Fmoc-Gruppe (vgl. Absorptionskurve von Fmoc-Bal-OH) und deuten auf eine erfolgreiche photochemische Abspaltung der Aminosäure vom Harz hin. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer zuvor erstellten Eichgerade. Neben dieser zu erwartenden Reaktion, bei der nach 390 Minuten 90% der Aminosäure abgespalten wurde, wurde eine weitere Reaktion beobachtet. Bereits vor Beginn der Bestrahlung wurde eine Änderung der Absorption gemessen (Abb. 32). Die Absorptionsspektren wiesen Maxima bei 307 und 295 nm auf. Dies deutete auf eine Nebenreaktion hin, die nach 40 Minuten deutlich zu beobachten war. Auch der Ausschluss von Licht konnte die Nebenreaktion des mit DMF versetzten Photolinker-modifizierten TentaGels **67** nicht verhindern. Ein Ende dieser Reaktion, bei der die Absorption auf ca. 0.5 angestiegen war konnte nach ca. 72 Stunden beobachtet werden (nicht abgebildet).

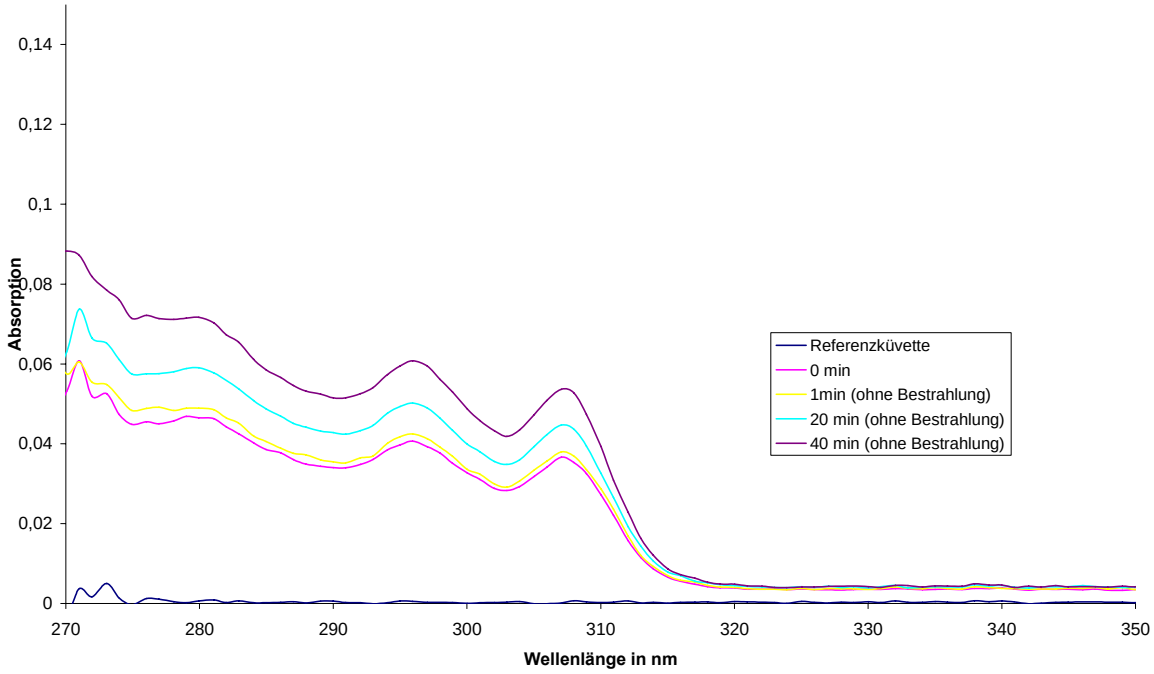


Abb. 32 Beobachtete Nebenreaktion vor Bestrahlungsbeginn von Harz **67**

Abb. 33 veranschaulicht den Unterschied zwischen den Absorptionsspektren nach der ungewünschten Nebenreaktion (Abb. 32) und nach Bestrahlungsbeginn (Abb. 31). Da eine Nebenreaktion des Photolinker-Harzes **67** dessen Anwendung bei der Synthese einer Split&Mix-Bibliothek ausschließt, sollte die Stabilität des nicht festphasengebundenen Photolinkers **58** NMR-spektroskopische untersucht werden. Da dieser in $CDCl_3$ nicht löslich war, wurde er in deuteriertem DMSO gelöst. Es wurde zu Beginn, nach 36 Stunden und nach 60 Stunden ein NMR-Spektrum aufgenommen (Spektren siehe Anhang). Bereits nach 36 h lag ein Substanzgemisch vor, indem noch ca. 50% des Edukts vorhanden war. Es handelte sich um eine partielle Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Dies konnte am entstandenen Singulett bei 6.27 ppm der vinyl-Protonen des Fullvens besonders gut beobachtet werden. Nach 72 Stunden war das Edukt nicht mehr nachweisbar und die Abspaltung der Fmoc-Gruppe vollständig (Abb. 34). Diese Abspaltung der Fmoc-Gruppe ohne Zusatz einer Base wurde nicht erwartet.

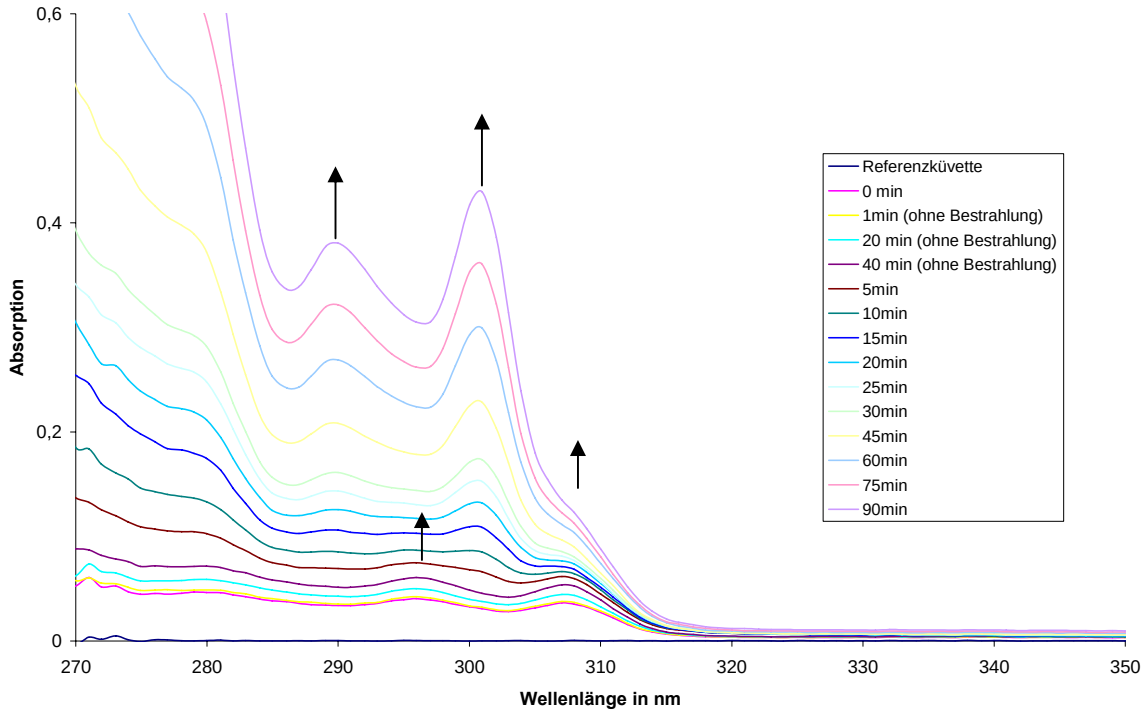


Abb. 33 Absorptionsspektren vor Beginn der Bestrahlung und Bestrahlungsbeginn

Da diese Reaktion bei den zuvor durchgeführten Absorptionsmessungen an fester Phase nicht beobachtet wurde, schien eine Reaktion mit dem verwendeten Lösungsmittel d^6-DMSO stattzufinden.

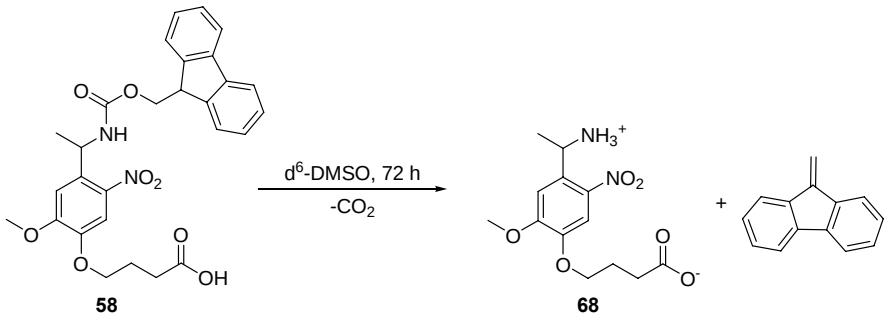


Abb. 34 Abspaltung der Fmoc-Gruppe durch d^6-DMSO

Deshalb wurde an Stelle des deuterierten DMSO, d^7-DMF als Lösungsmittel eingesetzt und nach verschiedenen Zeiten NMR-Spektren aufgenommen. Es zeigte sich, dass bei Verwendung von d^7-DMF auch nach 96 Stunden keine Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe stattfand. Somit ist DMSO für die Abspaltung der Fmoc-Gruppe verantwortlich. Nach unserem Kenntnisstand wurde eine Abspaltung von Fmoc durch DMSO bisher nicht in der Literatur beschrieben. Da zahlreiche Abspaltbedingungen in der Literatur bekannt sind, wurde auf eine Aufklärung des Reaktionsmechanismus verzichtet.

Der Photolinker **58** gelöst in DMF war stabil. Die bei den zuvor durchgeführten Absorptionsmessungen beobachtete Nebenreaktion war somit nicht auf eine Instabilität des Photolinkers selbst, sondern auf eine Reaktion mit der festen Phase, dem polymeren Trägerharz zurückzuführen. Da bei der Festphasensynthese insbesondere bei einer zeitaufwendigen Split&Mix-Synthese eine hohe Stabilität der Peptidanknüpfungsstelle gegeben sein muss, wurde auf den Einsatz dieses Linkers verzichtet und die Peptide direkt an aminofunktionalisiertes TentaGel geknüpft. Dies hatte zur Folge, dass zur Analyse der Peptidsequenzen die etablierte Edman-Sequenzierung eingesetzt und auf massenspektrometrische Methoden verzichtet werden musste.

3.3.3. Schutzgruppenstrategie

Zur Darstellung cyclischer Glycopeptide mussten Aminosäurederivate mit geeigneten Schutzgruppen eingesetzt werden. Da die Synthese der linearen Peptide nach der Fmoc-Strategie erfolgte, mussten die Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionalitäten hierzu orthogonal sein. Des Weiteren musste zwischen Cyclisierungspositionen und den Anknüpfungspunkten der Zuckercarbonate differenziert werden können. Die geplante Schutzgruppenstrategie ist in Abb. 35 dargestellt:

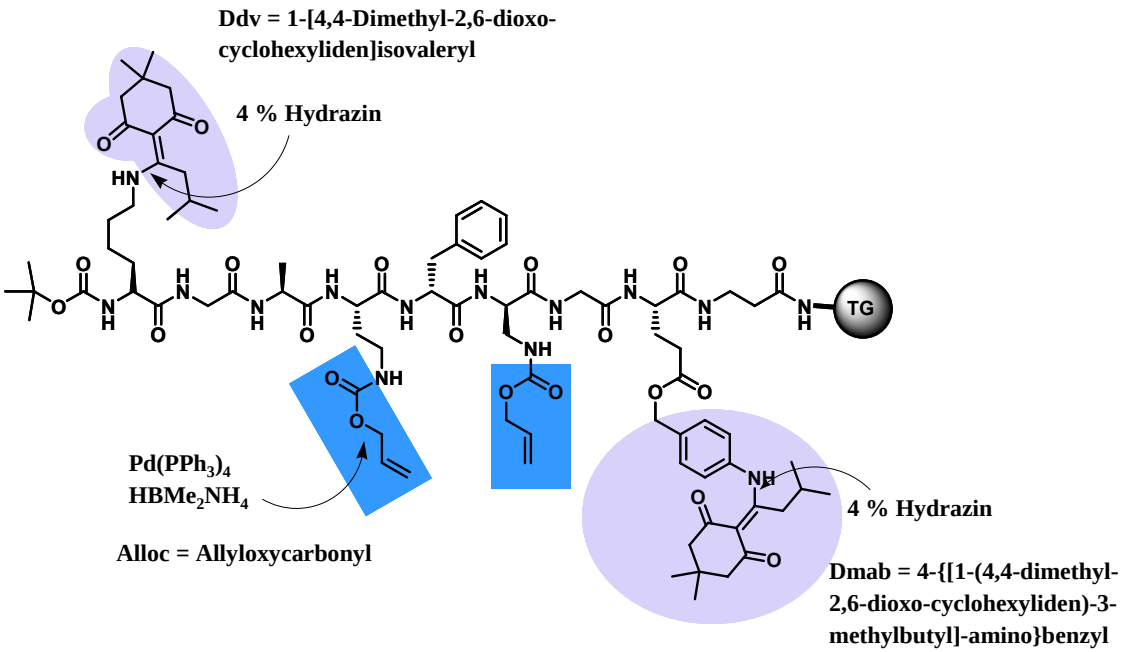


Abb. 35 Geplante Schutzgruppenstrategie mit Abspaltbedingungen für die Synthese cyclischer Glycopeptide

Die in unserer Arbeitsgruppe von Sonja Seeberger etablierte Schutzgruppenstrategie zur Darstellung cyclischer Glycopeptide wurde in dieser Arbeit modifiziert. Seeberger schützte die Cyclisierungspositionen mit Alloc- bzw. Allylschutzgruppen und setzte Ddv-geschützte Diaminosäuren (Ddv = 1-[4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexyliden]isovaleryl), die der späteren Anknüpfung von Kohlenhydratcarbonaten dienten, ein[63]. Die Ddv-Schutzgruppe[87] ist eine Weiterentwicklung der Dde-Schutzgruppe[88] mit reduzierter Migrationstendenz. Dennoch konnte bei Ddv-geschützten Diaminosäuren, während der Synthese der linearen Peptide nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe eine Migration auf die freie α-Aminogruppe beobachtet werden[89]. Deshalb, und da die Migrationstendenz bei den hier auf Grund ihrer geringen Flexibilität eingesetzten C3- bzw. C4-Diaminosäuren besonders ausgeprägt ist, wurden in dieser Arbeit diese kurzkettigen Diaminosäuren in Alloc-geschützter Form eingesetzt. Alloc-Schutzgruppen zeigen keine Migration und führen somit nicht zu Substanzgemischen, die mit einer one-bead-one-compound Bibliothek nicht vereinbar wären. Entsprechend mussten zur Cyclisierung, Aminosäuren mit den Schutzgruppen Ddv bzw. Dmab (4-{[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexyliden)-3-methylbutyl]-amino}benzyl) eingesetzt werden. Die N-terminale Aminosäure Boc-Lys(Ddv)-OH **69** war nicht kommerziell erhältlich und wurde ausgehend von Boc-Lys-OH **70** durch Reaktion mit 1,3-Cyclohexadion-Derivat **71** in Ethanol unter Rückflusskochen synthetisiert (Abb. 36). Verbindung **71** war durch Reaktion von Isovaleriansäure mit Dimedon zugänglich[90].

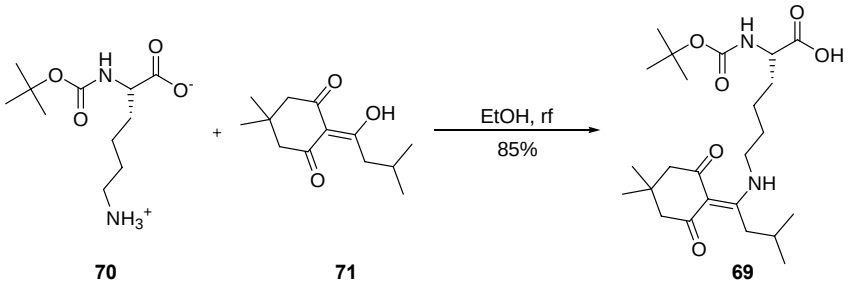


Abb. 36 Darstellung der Aminosäure Boc-Lys(Ddv)-OH

Zur Zuckeranknüpfung sollten die Seitenkettenfunktionalitäten der Diaminopropion- und Diaminobuttersäure dienen. Die hierfür verwendete Alloc-Schutzgruppe lässt sich quantitativ Pd-katalysiert unter Zugabe des Borankomplexes $BH_3 \cdot HNMe_2$ entfernen. Die für die Cyclisierungspositionen eingesetzten Schutzgruppen Ddv und Dmab lassen sich durch Zugabe einer 4%igen Hydrazin-Lösung in DMF abspalten. Erfolgt die Abspaltung der Ddv-/Dmab-Schutzgruppen in Gegenwart von Alloc-Schutzgruppen, so muss zur Vermeidung einer ungewünschten Reduktion der Doppelbindung der Alloc-Schutzgruppe, die ein späteres Abspalten verhindern würde, ein Überschuss von Allylalkohol als Scavanger zugesetzt werden[91]. Der Abspaltmechanismus der Dmab-Schutzgruppe ist in Abb. 37 am Beispiel von

Glu(Dmab) **73** dargestellt. Im ersten Schritt wird durch Zugabe von 4% Hydrazinhydrat in DMF das Indazol-Derivat **75** abgespalten. Dies entspricht der Abspaltung der Ddv-Schutzgruppe. Im Anschluss findet eine 1,6-Eliminierung statt, die zur ungeschützten Säurefunktion in Verbindung **76** führt. Diese kann durch Aktivierung zur Seitenkettencyclisierung eingesetzt werden. Es ist bekannt, dass die 1,6-Eliminierung abhängig von der Sequenz unterschiedlich viel Zeit in Anspruch nehmen kann[92]. Deshalb wurde nach hydrazinolytischer Spaltung ausgiebig mit DMF gewaschen um so eine quantitative 1,6-Elliminierung zu gewährleisten.

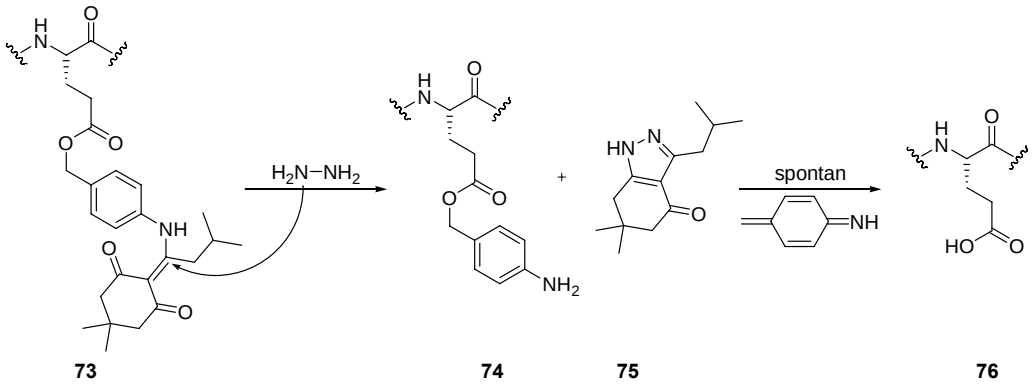


Abb. 37 Reaktionsmechansimus der Dmab-Abspaltung

3.3.4. Synthese einzelner Glycopeptide

Als nächstes wurde die Anwendbarkeit der Edman-Sequenzierung, die geplante Schutzgruppenstrategie und diverse Cyclisierungsbedingungen überprüft.

Da bei Synthesen an fester Phase keine Reinigung der Reaktionsprodukte möglich ist, sind effiziente Syntheseschritte grundlegende Voraussetzungen zur Darstellung einer one-bead-one-compound Bibliothek. Damit die verschiedenen Reaktionsschritte durch analytische RP-HPLC verfolgt werden konnten, wurden die Synthesen einzelner Peptide an aminofunktionalisiertem TentaGel mit einem Sieber-Amid-Linker durchgeführt. Dadurch war eine Abspaltung vom Harz unter schwach sauren Bedingungen (1% TFA) in Dichlormethan möglich. Die Synthese einer Testsequenz zur Überprüfung der Durchführbarkeit des Edman-Abbaus erfolgte direkt an aminofunktionalisiertem TentaGel, d.h. ohne den Einsatz eines Linkers, da die stark sauren Bedingung des Edman-Abbaus (95% TFA) zu einer Abspaltung des Peptids geführt und damit eine Sequenzierung an fester Phase unmöglich gemacht hätte.

Die Edman-Sequenzierung von der festen Phase wurde mehrfach beschrieben[93]. In unserer Gruppe wurde diese Methode bereits erfolgreich zur Identifikation von Sequenzen einzelner Harzkugeln angewandt[59]. Da die Zuverlässigkeit dieser Methode zur späteren Identifikation

von einzelnen Bibliotheksmitgliedern gewährleistet sein muss, wurde zunächst das lineare Oktapeptid **77** synthetisiert (Abb. 38).

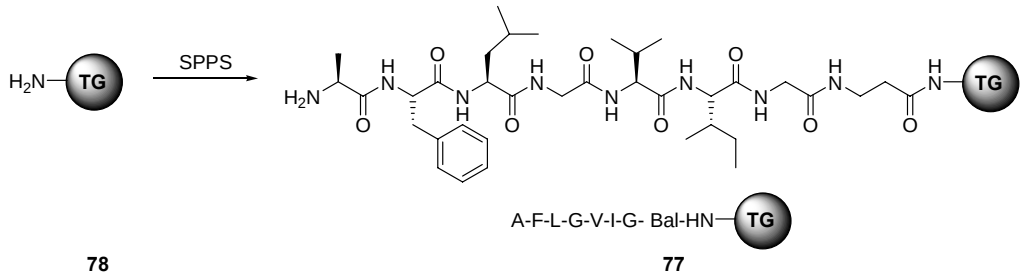


Abb. 38 Dargestelltes Oktapeptid **77** zur Überprüfung der Edman-Sequenzierung

Die Synthese wurde am Peptidsynthesizer 433A von Applied Biosystems durchgeführt. Als Harz diente aminofunktionalisiertes TentaGel **78**. Auf unnatürliche Aminosäuren und Aminosäuren mit Funktionalitäten in der Seitenkette wurde verzichtet.

Die Sequenz A-F-L-G-V-I-G konnte durch Edman-Sequenzierung bestätigt werden. Bei jedem Abbauschritt wurde jeweils nur ein PTH-Aminosäurederivat detektiert, dies belegt die annähernd quantitativen Ausbeuten der Festphasenpeptidsynthese (Abb. 39). Es ist auch zu erkennen, dass beim letzten Abbauschritt die β-Aminosäure nicht detektiert wird da die Edman-Sequenzierung ausschließlich für α-Aminosäuren anwendbar ist.

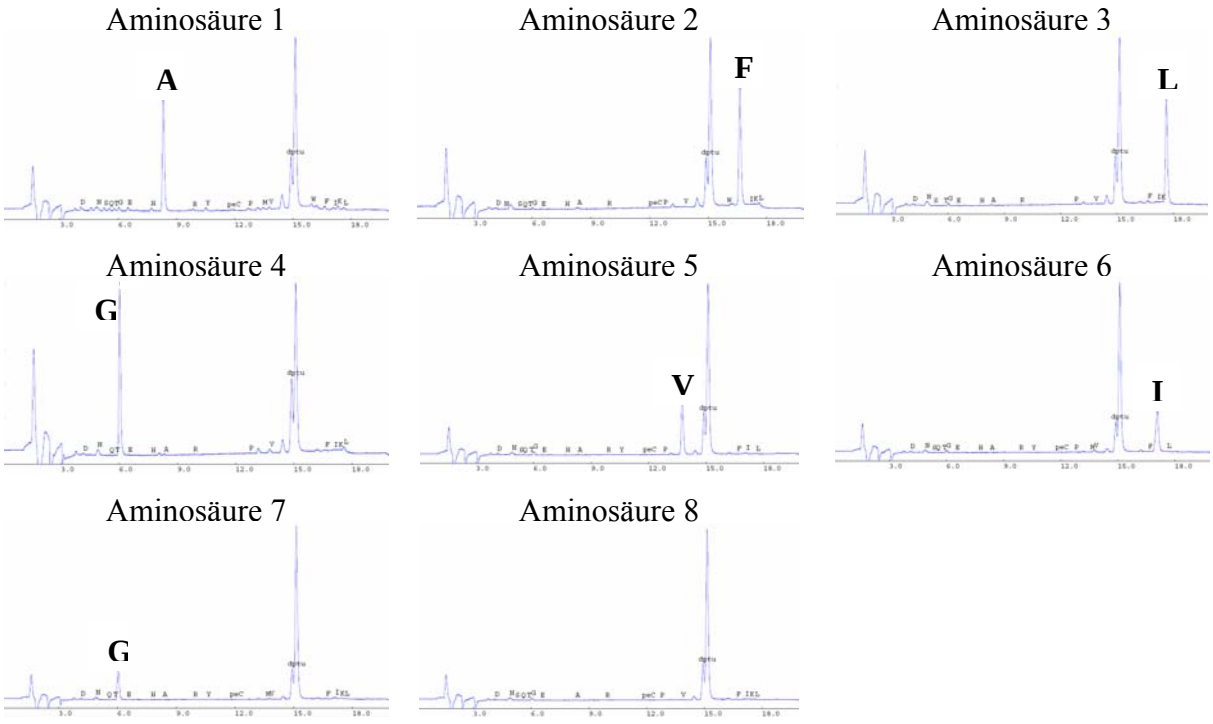


Abb. 39 Chromatogramme der Edman-Sequenzierung des Oktapeptids **77**

Zur Überprüfung der Schutzgruppenstrategie wurde Peptid **79** synthetisiert (Abb. 41). Als Harz diente erneut TentaGel, diesmal mit Sieber-Amid-Linker[94] versehen, sodass eine Abspaltung vom Harz und damit eine Überprüfung der Teilschritte möglich war. Der Sieberamid-Linker erlaubt eine Abspaltung vom Harz unter schwach sauren Bedingungen (1% TFA in Dichlormethan) und kann daher neben den verwendeten Schutzgruppen Alloc, Ddv/Dmab und Boc abgespalten werden. Die Synthese des linearen Peptids erfolgte nach der Fmoc-Strategie. Durch Abspaltung von einer kleinen Harzmenge konnte die erfolgreiche Festphasensynthese durch HPLC-MS Kontrolle bestätigt werden. Die Abspaltung der Ddv- und Dmab-Schutzgruppe erfolgte durch Zugabe von 4%iger Hydrazinlösung in DMF/Allylalkohol. Nach jeweils 5 Minuten wurde eine Absorptionsspektrum der Abspaltlösung aufgenommen und diese erneuert. Die Vollständigkeit der Ddv-Abspaltung war nach Verschwinden des Absorptionsmaximums bei 290 nm erreicht. Abb. 40 zeigt einen Screenshot der gemessenen Absorptionsspektren der ersten neun Abspaltlösungen.

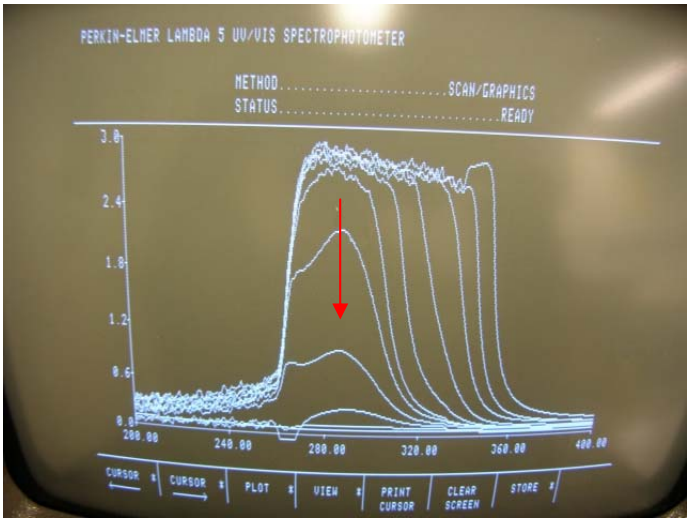


Abb. 40 Absorptionskurven der Ddv/Dmab-Abspaltlösungen aufgenommen am UV/VIS-Spektrometer Perkin-Elmer Lambda 5

Wurde direkt im Anschluss daran vom Harz abgespalten, zeigte das HPL-Chromatogramm einen Peak mit Schulter. Es konnte jedoch ausschließlich die Masse des erwarteten Produkts beobachtet werden. Dies könnte daran liegen, dass die 1,6-Eliminierung der Dmab-Schutzgruppe nach Behandlung mit Hydrazin noch nicht quantitativ stattgefunden hatte. Die unter HPLC-Bedingungen stabile Spezies zerfällt unter MALDI-MS Bedingungen, wodurch die Detektion nur einer Masse erklärt werden kann. Da die quantitative Abspaltung der Dmab-Schutzgruppe Voraussetzung für eine vollständige Cyclisierung ist, wurde in eineme erneuten Testansatz das Harz nach hydrazinolytischer Behandlung 12 Stunden mit DMF gewaschen. Das HPL-Chromatogramm zeigte dann die zunächst beobachtete Schulter nicht mehr.

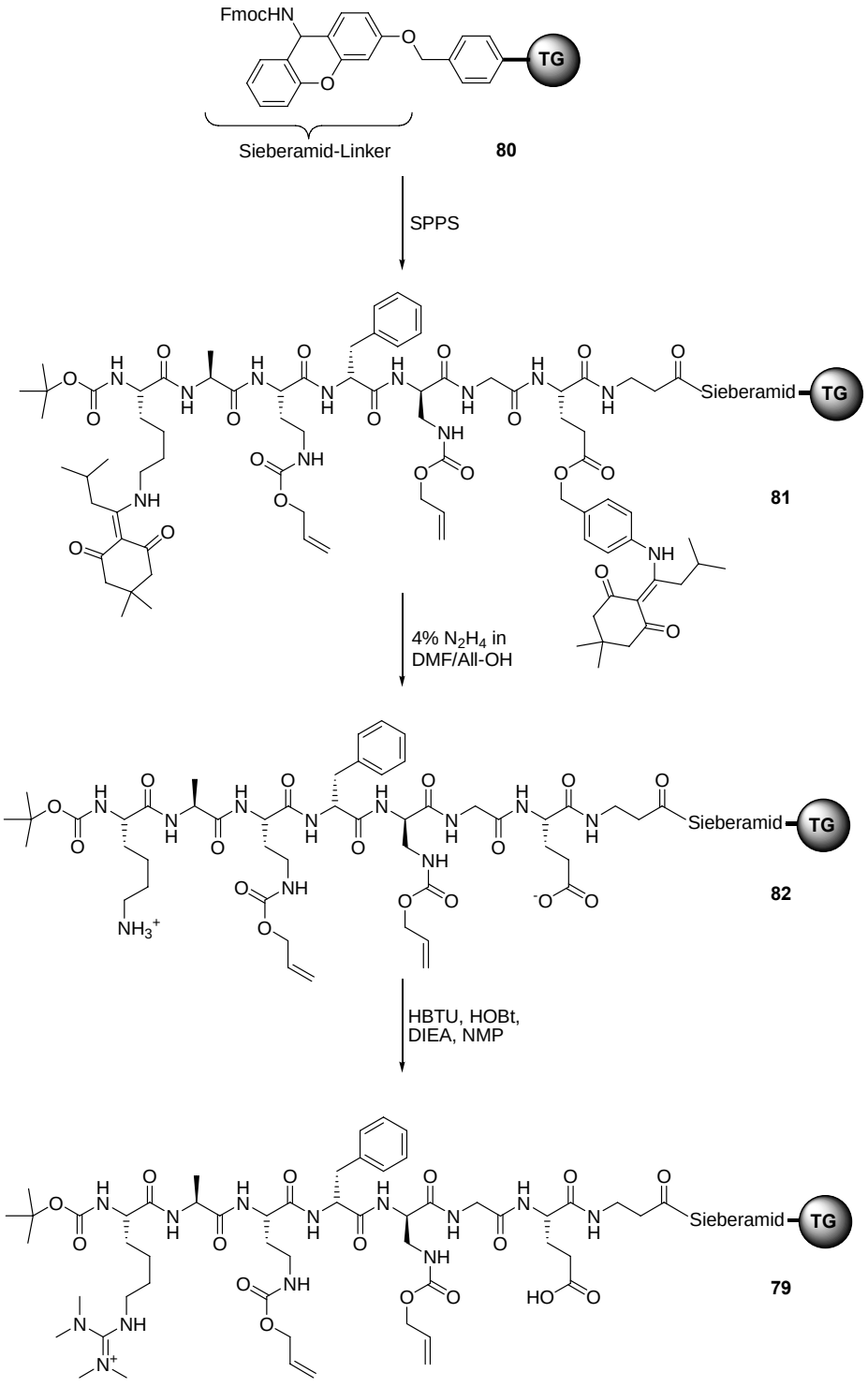


Abb. 41 Synthese des Peptids **79** zur Überprüfung der Schutzgruppenstrategie

Die Cyclisierung unter Ausbildung eines Amids erfolgte durch Aktivierung der Säuregruppe mit verschiedenen Aktivierungsreagenzien. Zunächst wurde die Cyclisierung von **82** durch Aktivierung mit HBTU **83** durchgeführt. HBTU ist ein häufig verwendetes Aktivierungsreagenz beim Aufbau linearer Peptide und wurde auch schon zur Darstellung cyclischer Peptide erfolgreich eingesetzt[63]. Die Aktivierung von Verbindung **82** führte jedoch nicht zur

gewünschten Cyclisierung. Stattdessen wurde ausschließlich das gecappte Produkt **79,** bei dem die Aminogruppe zum Guanidiniumsalz reagiert, gefunden (Abb. 41). Diese Nebenreaktion ist bei Verwendung eines als Guanidinumsalz vorliegenden Aktivierungsreagenz in Gegenwart einer Aminogruppe auch schon früher beobachtet worden[95]. Da bei der Cyclisierung von Peptiden stets eine Aminogruppe bei der Aktivierung der Säuregruppe zugegen ist, wurden weitere Aktivierungsreagenzien die nicht zum Guanidiniumsalz führen können untersucht. Es wurden PyBOP **84** (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat)[96], PyAOP **85** (7-Azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat)[97] und PyBrOP **86** (Bromo-tris-pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat)[98] verwendet (Abb. 42).

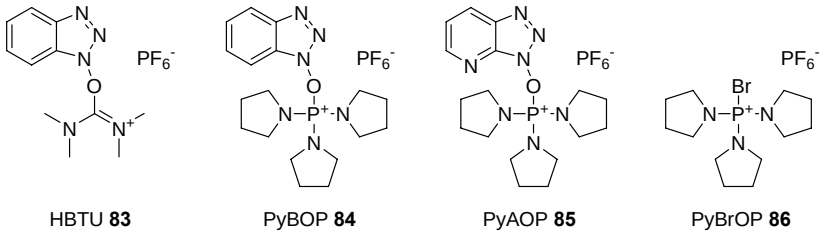


Abb. 42 Verwendete Kupplungsreagenzien zur Aktivierung der Säuregruppe (gezeigt ist jeweils die O-Form[95])

PyBOP ist ein nicht cancerogenes Phosphoniumsalz analog zu HBTU. Die Nebenreaktion zum Guanidinium-gecappten Peptid ist somit ausgeschlossen. PyAOP besitzt den gleichen Vorteil und ist zudem reaktiver als PyBOP. Da PyAOP recht teuer ist, wird es meist dann eingesetzt, wenn die Ausbeuten durch Aktivierung mit preiswerteren Aktivierungsreagenzien nicht zufriedenstellend sind. Dies trifft oft bei Cyclisierungsreaktionen zu, da nicht mit Überschüssen der aktivierten Aminosäure gearbeitet werden kann, eine Cyclisierung immer mit entropischem Verlust einhergeht und abhängig von der Sequenz die Reaktionspartner selten aufeinander treffen. PyBrOP dient meist zur Aktivierung sekundärer Aminosäuren wurde jedoch auch schon zur Cyclisierung eingesetzt[98] und in dieser Arbeit untersucht. Es zeigte sich, dass bei Verwendung von PyBOP sowohl bei Cyclisierung über Nacht als auch bei mehrmaliger Erneuerung der Kupplungslösung lediglich 20-30% Cyclisierungausbeute erhalten werden konnte. Mit PyAOP konnte unter den gleichen Reaktionsbedingungen bereits 50% Cyclisierung erreicht werden. Wurde die Kupplungslösung mehrfach erneuert, so konnte die Ausbeute auf annähernd 100% erhöht werden. Bei dem Versuch mit PyBrOP konnte lediglich ein Nebenprodukt (ca. 40%) neben nicht umgesetztem linearen Peptid durch HPLC-MS detektiert werden. Da die Verwendung von PyAOP unter den genannten Bedingungen zu

den höchsten Cyclisierungsausbeuten führte, wurde für alle weiteren Cyclisierungen PyAOP verwendet.

Die Überprüfung der Abspaltbedingungen der Alloc-Schutzgruppen erfolgte indem gecapptes Peptid **79** zweimal mit [$Pd(PPh_3)_4$] und Borankomplex $BH_3 \cdot HNMe_2$ versetzt wurde (Abb. 43). Nach mehrfachem Waschen mit DMF, DMSO und CH_2Cl_2 und der Behandlung mit Natriumdiethyldithiocarbamat wurde das entschützte Peptid **87** (TNBS-[99] und Kaiser-Test[100] positiv) basenkatalysiert mit Laktosylcarbonat *β*-**12** umgesetzt. Nach Reaktion über Nacht konnten keine freien Aminogruppen durch TNBS- und Kaiser-Test nachgewiesen werden. Auch die Überprüfung mittels HPLC-MS belegte die gelungene Synthese des gewünschten Glycopeptids **88**.

Nachdem die Effizienz der geplante Schutzgruppenstrategie und anschließende Edman-Sequenzierung gezeigt werden konnte, folgte die Synthese der cyclischen Glycopeptidbibliotheken.

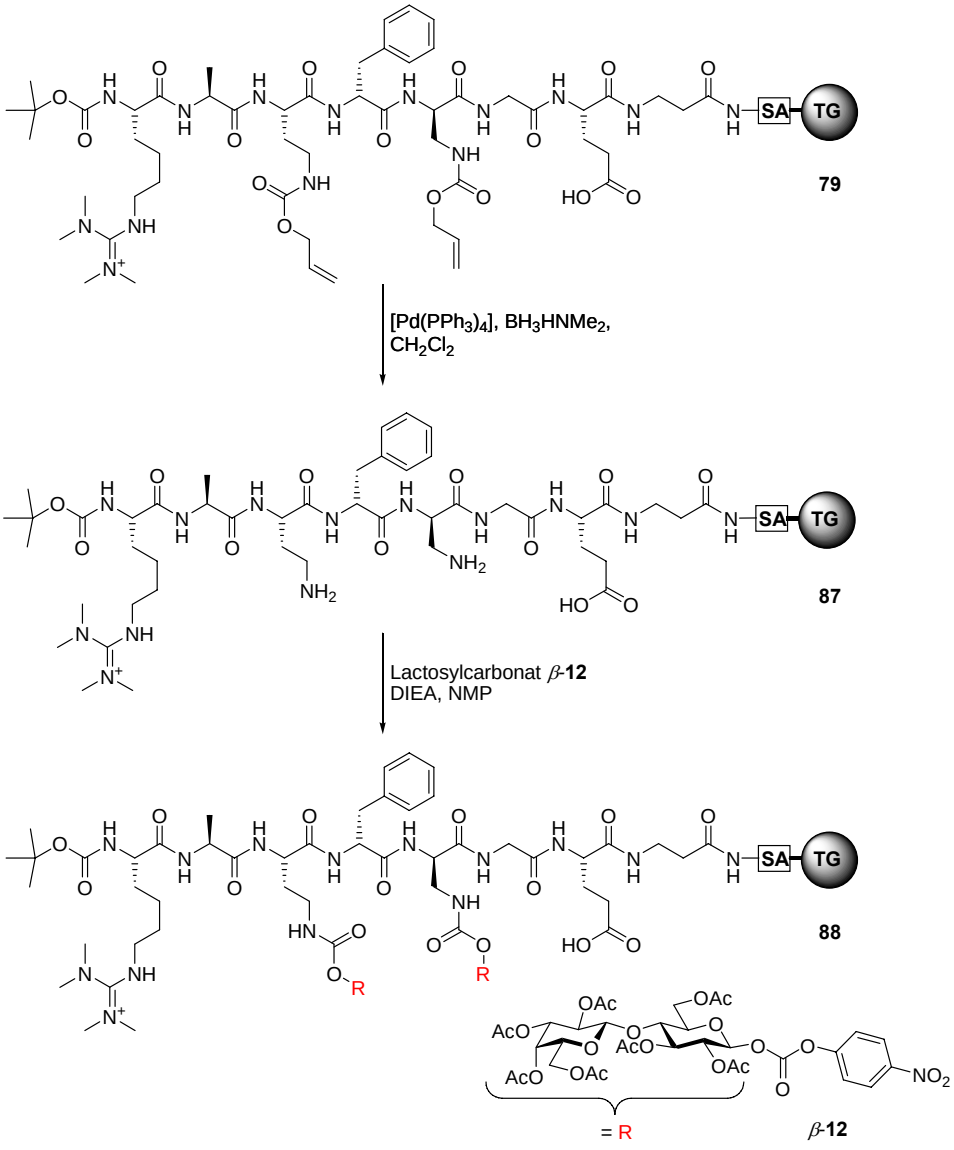


Abb. 43 Synthese des Glycopeptids **88** zur Überprüfung der Schutzgruppenstrategie

3.3.5. Split&Mix-Synthese

Mittels der Split&Mix-Synthese sollte eine Vielzahl cyclischer Neoglycopeptide der in Abb. 44 gezeigten Struktur synthetisiert werden.

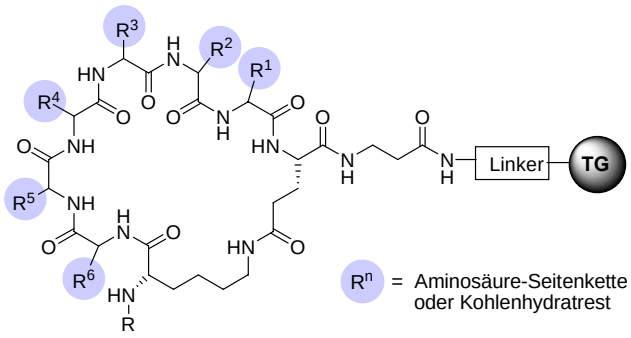


Abb. 44 Allgemeine Struktur der cyclischen Neoglycopeptide der Split&Mix-Bibliothek

Die Darstellung der Split&Mix-Bibliotheken bestehend aus cyclischen Glycopeptiden wurde unter Anwendung der etablierten Synthesebedingungen durchgeführt. Zunächst sollte die in Abb. 45 dargestellte Bibliothek linearer Peptide synthetisiert werden.

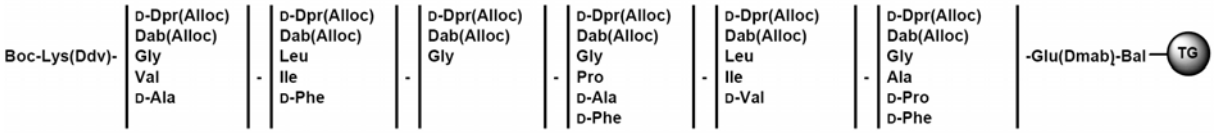


Abb. 45 Dargestellte Split&Mix-Bibliothek **89** bestehend aus 13500 Peptiden

Die Bibliothek **89** beinhaltet bei dem gezeigten Aufbau 13500 verschiedene Peptide mit 0-6 Zuckeranknüpfungsmöglichkeiten. Durch die Anwendung der Split&Mix-Technik sind die 13500 Verbindungen in 33 (1+5+5+3+6+5+6+1+1) Kupplungsschritten zugänglich. Die Verteilung der Valenzen, die sich aus dieser Bibliotheks-Architektur ergeben, ist in Tab. 5 dargestellt. Da zahlreiche Lektine divalent sind, wurde der Aufbau der Bibliothek so gewählt, dass ein großer Anteil divalenter Peptide vorlag.

Tab. 5 Verteilung der Valenzen der Peptid-Bibliothek **89**

Gesamtzahl der Verbindungen	**13500**	**In Prozent**
ohne Zucker	432	3.2
mit 1 Zucker	2160	16.0
mit 2 Zuckern	**4140**	**30.7**
mit 3 Zuckern	4016	29.7
mit 4 Zuckern	2112	15.6
mit 5 Zuckern	576	4.3
mit 6 Zuckern	64	0.5

Die Festphasensynthese erfolgte an TentaGel. Es handelt sich hierbei um ein Propfkopolymer aus Polystyrol und Polyethylenglycol, wodurch es nicht nur in organischen, sondern auch wässrigen Lösungsmitteln hervorragende Quelleigenschaften besitzt[101,102]. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung dafür, dass nach der Synthese der Bibliothek ein Screening an fester Phase erfolgen kann. Damit eine intramolekulare Cyclisierung an fester Phase möglich ist, wurde die Beladungsdichte von 0.32 mmol/g durch die Reaktion mit dem Gemisch Boc-Bal-OH:Fmoc-Bal-OH / 3:2 auf 0.1 mmol/g reduziert (Pseudoverdünnungsprinzip[101]). Als nächstes wurde die für die Cyclisierung benötigte in der Seitenkette Dmab-geschützte Glutaminsäure nach der Fmoc-Strategie eingeführt (**90**). Es folgten sechs Split&Mix-Syntheseschritte, bevor Boc-Lys(Ddv)-OH Lysins angekuppelt wurde (**89**).

Bei den Split&Mix-Schritten wurde in jeder Position D-Diaminopropion- und L-Diaminobuttersäure eingesetzt. Da diese als Anknüpfungsstellen der Laktosylcarbonate *β*-**12** und **13** dienten, wurde so eine große Stereodiversität und Variabilität der Valenz der Bibliotheksmitglieder gewährleistet.

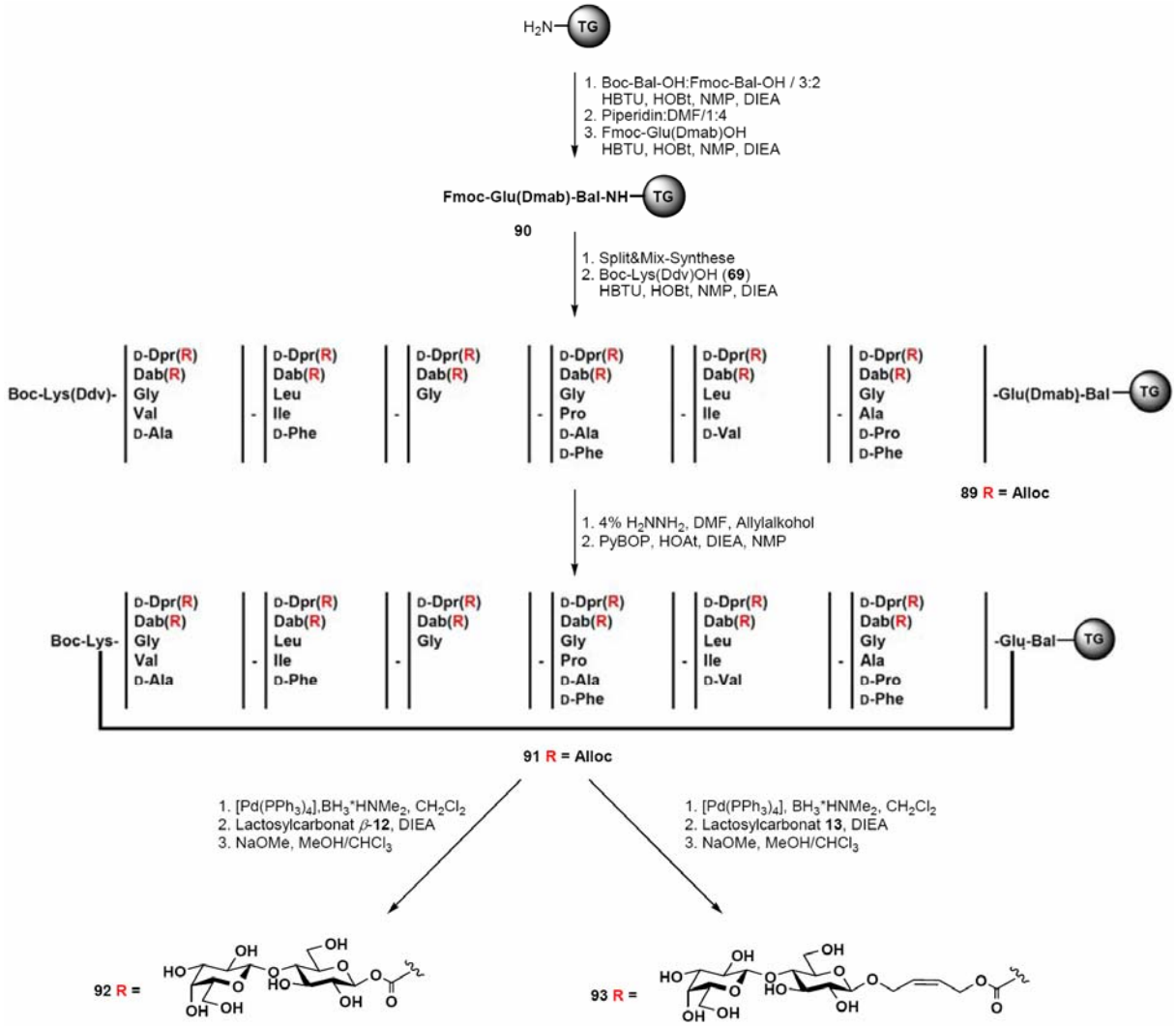


Abb. 46 Synthese der cyclischen Neoglycopeptid-Bibliotheken **92** und **93**

Bei der Auswahl der weiteren Aminosäuren wurden folgende Aspekte beachtet. Es wurden ausschließlich Aminosäuren ohne Seitenkettenfunktionalität eingesetzt, da dadurch auf weitere Schutzgruppen verzichtet werden konnte. Mit den Schutzgruppen Fmoc, Alloc, Ddv/Dmab und Boc wurden bereits vier Schutzgruppentypen eingesetzt. Die Stereodiversität wurde durch den Einsatz von D- und L-Aminosäuren in den unterschiedlichsten Positionen gewährleistet, wobei nie D- und L-Derivat einer Aminosäure an der gleichen Position verwendet wurde, da diese durch die abschließenden Edman-Sequenzierung nicht unterscheidbar sind. Es wurde, abgesehen von den Diaminosäuren, darauf verzichtet, in aufeinander folgenden Positionen die gleichen Aminosäuren einzusetzen. Die Sequenzanalyse durch den Edman-Abbau wurde dadurch erleichtert, weil dabei gelegentlich einzelne Aminosäureabbauschritte nicht vollständig ablaufen und das vorherige PTH-Aminosäurederivat im Chromatogramm der nächsten Abbauschritte erneut detektiert wird. Wenn sich eine Aminosäure von der vorherigen unterscheidet, dann ist die Identifikation anhand von zwei auftretenden Peaks problemlos möglich. Handelt es sich um die gleiche Aminosäure, dann erscheint nur ein Peak über dessen Integral Sequenzaussagen getroffen werden müssen. Dies ist meist möglich kann jedoch besonders bei späten Abbauschritten bei denen die Integrale größeren Schwankungen unterliegen schwierig werden. Da der Effekt des unvollständigen Aminosäure-Abbaus bei Prolin besonders groß ist, auf Prolin wegen seiner β-Loop induzierenden Eigenschaft jedoch nicht verzichtet werden sollte, wurde Prolin nur in Position 5 und 7, d.h. späten Edman-Abbaupositionen eingesetzt. Dadurch störte dieser Effekt nur noch minimal bei der Sequenzanalyse.

Da die Peptide nicht ausschließlich als Gerüste der darzubietenden Zucker betrachtet werden dürfen, sondern durch direkte Wechselwirkung mit den Lektinen einen Beitrag zur Bindung leisten können, wurde an mehreren Stellen die aromatische Aminosäure Phenylalanin eingebaut. Dadurch ist eine π-Kation-Wechselwirkung möglich, ein Effekt der neben Van-der-Waals-Kontakten wesentlich zur Erhöhung der Bindungsstärke zwischen Ligand und Protein beitragen kann[103].

Der Abspaltung der Ddv/Dmab-Schutgruppen mit Hydrazin in DMF und Allylalkohol folgte die Cyclisierung der linearen Peptidbibliothek. Nach ca. einer Woche fiel der TNBS-Test nur noch bei vereinzelten Harzkugeln schwach positiv aus, so dass von nahezu vollständiger Cyclisierung aller Bibliotheksmitglieder ausgegangen wurde. Die Cyclopeptidbibliothek **91** wurde nach Palladium-katalysierter Abspaltung der Alloc-Schutzgruppen mit den Laktosylcarbonaten β-**12** bzw. **13** modifiziert. Die Deacetylierung der Zuckerreste lieferte die

Neoglycopeptid-Bibliotheken **92** bzw. **93** deren Screening mit mehreren Lektinen im weiteren Verlauf dieser Arbeit durchgeführt wurde.

3.4. Viscum Album Agglutinin

3.4.1. Screening von VAA

Ausgehend von den Ergebnissen von D. Kahne et al.[104] und den für das Lektin WGA in unserer Arbeitsgruppe etablierten Screeningbedingungen[61], sollten geeignete Screening-bedingungen für VAA gefunden werden. Zu deren Optimierung wurden je 3-5 mg Harz, das entspricht 2500-4000 Kugeln verwendet. Das Screening wurde – wie die Synthese auch – in mit PE-Filterfritten versehenen Plastikspritzen durchgeführt. Der allgemeine Ablauf des Festphasen-Screenings ist in Abb. 47 schematisch dargestellt.

Abb. 47 A:

Das Harz wurde 15 Minuten in Wasser gequollen, 3 x mit mit Tween (0.05%) versehenem Phosphat-Puffer (PBST) je 5 Minuten gewaschen und zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkung der Lektine mit der festen Phase mit BSA geblockt (30 Minuten). Als Lektin-Puffer diente entweder ein Tris- (TBS) oder Hepes-gepuffertes System. In der Literatur ist häufig auch der Einsatz von Phosphatpuffern wie PBS bzw. PBST beschrieben[105].

Abb. 47 B:

Es erfolgte für 3 Stunden die Inkubation mit biotinyliertem Lektin unter Zusatz von Laktose als Konkurrenzligand. Harzkugeln auf denen sich cyclische Glycopeptide befanden, bei denen die Laktosederivate räumlich passend dargeboten wurden, führten zu einer Bindung des Lektins. Laktose diente hierbei als kompetitiver Inhibitor so dass die Hitrate, d.h. die Anzahl der Kugeln, an die das Lektin bindet, auf unter 0.1% reduziert werden konnte und entsprechend die am besten bindenden Glycopeptid-Derivate identifiziert wurden. Der Zusatz eines kompetitiven Inhibitors wurde bereits bei Seeberger als entscheidend zur Durchführung eines erfolgreichen Screenings erkannt[61]. Nach Inkubation mit Lektin wurde 3 x 5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen.

Abb. 47 C:

Durch einstündige Inkubation des Harzes mit einer gepufferten Lösung, die das Konjugat bestehend aus Anti-Biotin-Antikörper und Alkalischer Phosphatase enthielt, konnten selektiv die Harzkugeln mit Alkalischer Phosphatase versehen werden, auf denen sich biotinyliertes Lektin befand. Dieser Inkubation folgte gründliches Waschen (6 x 5 Minuten mit TBST-Puffer) und ein Wechsel auf den Alkalische Phosphatase-Puffer pH 9.5 (3 x 5 Minuten).

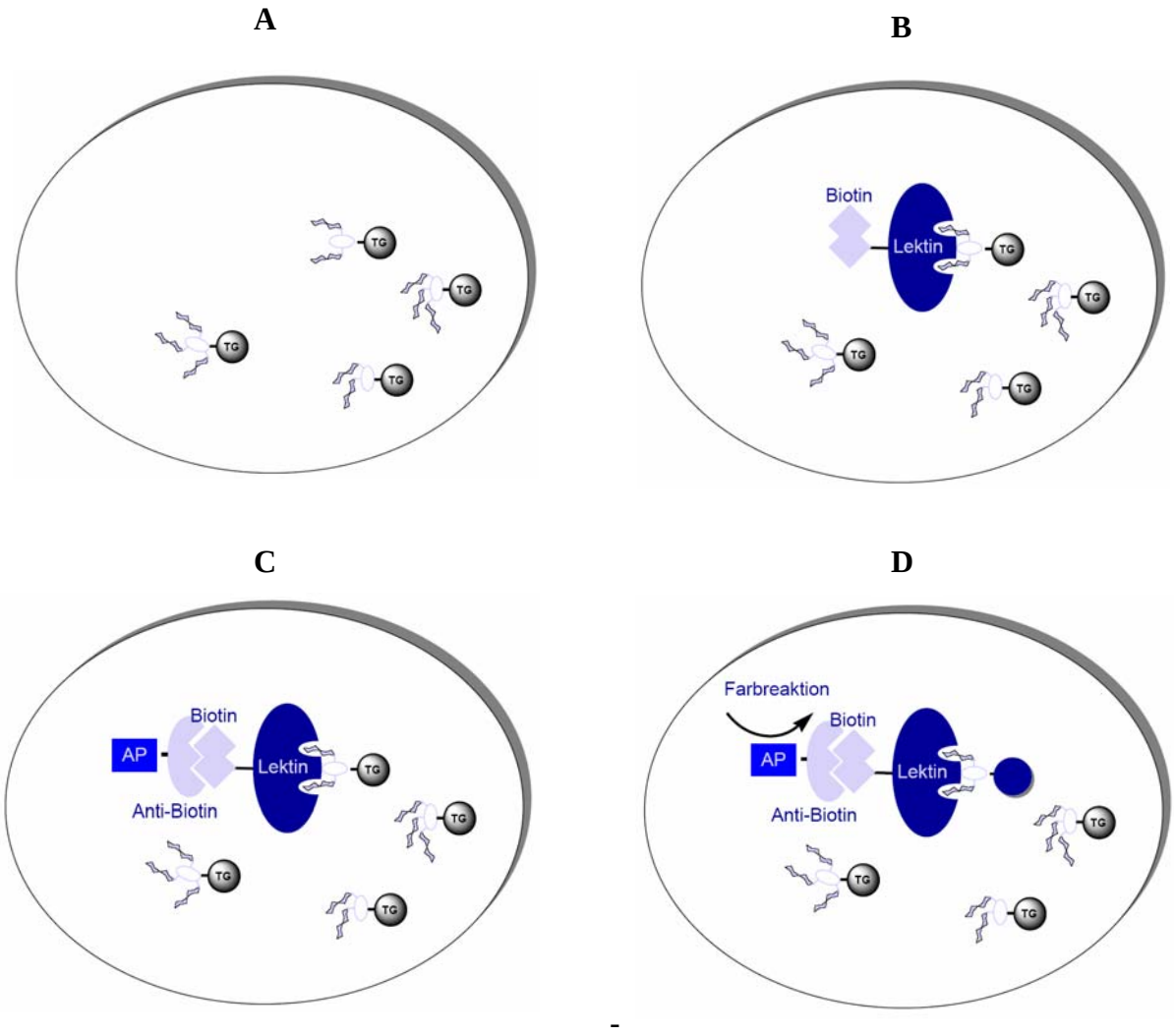


Abb. 47 Schematische Darstellung des Festphasen-Screenings (Beschreibung siehe Text)

Abb. 47 D:

Die Visualisierung der Lektinbindung an einzelne Harzkugeln erfolgte durch Zugabe einer Färbelösung bestehend aus 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) **94** und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) **97** für 10 Minuten. Abb. 48 zeigt die durch die Alkalische Phosphatase induzierte Farbreaktionen. Zunächst katalysiert die Alkalische Phosphatase die Verseifung des Phosphorsäureesters **94** zu 5-Brom-4-chlor-indoxyl **95**. Dieses wird durch Oxidation mit NBT **97** in das schwerlösliche hellblaue Indigoderivat **96** überführt, wobei die reduzierte Form des NBTs als dunkelvioletter Diformazan-Farbstoff **98** ausfällt der in Wasser schwer löslich ist und somit zur selektiven Anfärbung einzelner Kugeln führt. Durch 3 x Waschen mit Wasser (je 2 Minuten) und 2 x mit EDTA-Lösung (je 5 Minuten) wurde die Färbereaktion gestoppt.

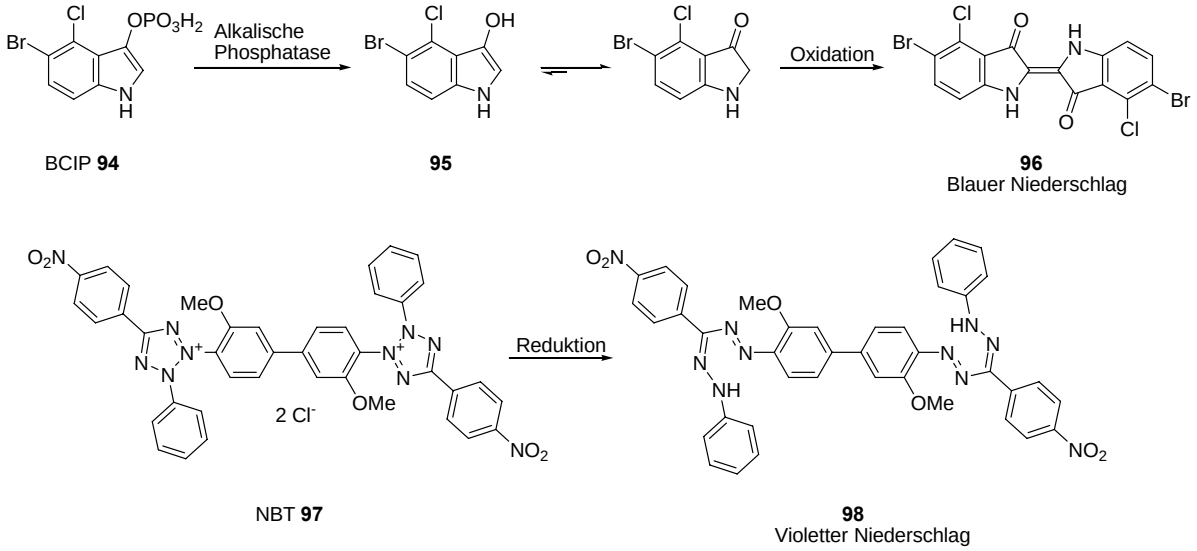


Abb. 48 Farbreaktion, die zur Anfärbung der Harzkugeln führt

Damit ein erfolgreiches Screening durchgeführt werden konnte, musste eine geeignete Konzentration des Lektins und des kompetitiven Inhibitors gefunden werden. Als geeignete Verdünnung des Anti-Biotin-Antikörper/Alkalische-Phosphatase-Konjugats erwies sich 1:1000 in TBS-Puffer. Wurde eine Verdünnung von 1:100 eingesetzt, kam es beim Blindtest, bei dem auf die Inkubation mit Lektin verzichtet wurde, zu falsch-positiven Harzkugeln. Im Gegensatz dazu führte eine Verdünnung von 1:10000 lediglich zu sehr schwacher Anfärbung einzelner Harzkugeln, deren Kontrast zu gering war, um Aussagen treffen zu können.

Die Konzentration von 20µg/mL erwies sich als geeignete VAA Konzentration. Dies war die Minimalkonzentration bei der ohne Zusatz eines kompetitiv Inhibitor über 90% der Harzkugeln angefärbt wurden (Abb. 49 ohne Laktose). Wenn man davon ausgeht, dass es sich um eine Lektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkung handelte, dann entsprach dies der zu erwartenden maximalen Menge gefärbter Harzkugeln, da eine geringe Anzahl (3.2%) der Bibliotheksmitglieder nicht glycosyliert war und somit auch keine Lektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkung auftreten kann.

Die Auswirkung der Zugabe des kompetitiven Inhibitors Laktose in unterschiedlichen Konzentrationen ist in Abb. 49 dargestellt. Durch Erniedrigung der Konzentration von Laktose nahm die Anzahl der stark gefärbten Kugeln zu und erreichte bei einer Laktose-Konzentration kleiner 0.1 mM die Hitrate, die man ohne Zugabe zusätzlicher Laktose beobachtet hatte. Bei einer Konzentration von 10 mM wurde die Wechselwirkung mit den Glycopeptiden auf den Harzkugeln vollständig unterdrückt.

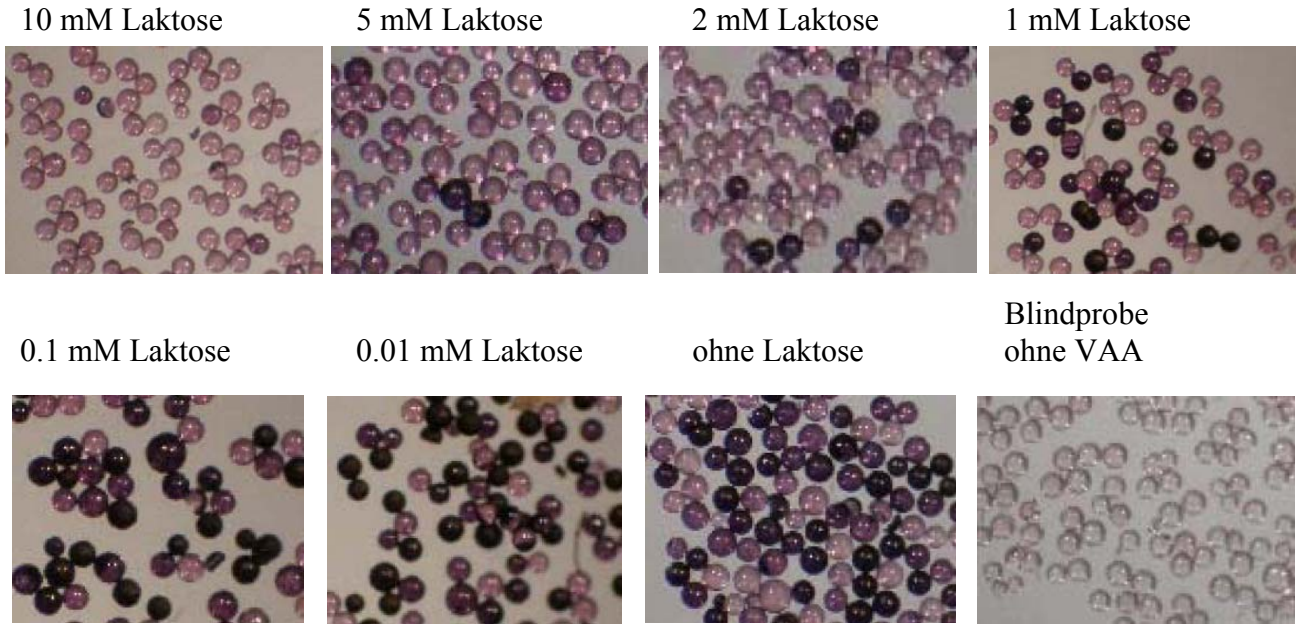


Abb. 49 Hitrate in Abhängigkeit von der Laktosekonzentration (VAA-Konzentration = 20 µg/mL, Verdünnung Anti-Biotin-AK/AP-Konjugat 1:1000 (Der Durchmesser der Kugeln beträgt im Mittel 130 µm)

Ziel war es, die Anzahl der Hitbeads auf ca. 0.1% zu reduzieren. Dies wurde mit der Konzentration von 5 mM erreicht. Da bei diesen Test-Screenings jeweils 3-5 mg Harz eingesetzt wurden, wurden lediglich 250 µl des Lektinpuffers mit VAA und Laktose eingesetzt. Das entspricht der minimalen Menge, die bei Verwendung der Spritzen mit PE-Fritte notwendig ist, um das Harz noch vollständig mit Lektinpuffer zu umgeben. Der Versuch diese Bedingungen (VAA-Konz. = 20 µg/mL und Laktose-Konz. = 5 mM) beim Screening von 50 mg Harz mit 1mL Lektinpuffer einzusetzen, führte zu einer unerwartet hohen Hitrate. Dies könnte daran liegen, dass nicht nur die Konzentration, sondern auch die absolute Menge des kompetitiven Liganden Laktose im Vergleich zu den auf den Harzkugeln befindlichen Glycopeptidliganden ausschlaggebend ist. Die Harzmenge wurde etwa um den Faktor 10 erhöht, wobei die Menge der Laktose lediglich vervierfacht wurde. Durch Erhöhung der Laktose-Konzentration auf 10 mM, d.h. durch Verdopplung der Laktose Menge, konnte die Hitrate erneut auf ca. 0.1% reduziert werden. Es sei angemerkt, dass auf eine naheliegende Vervielfachung der Lektinpuffermenge gegebener VAA- und Laktose-Konzentration verzichtet wurde, da dies einen deutlich höheren Lektinbedarf bedeutet hätte.
Aus den vorausgegangen Versuchen ergab sich folgendes Protokoll des VAA-Screenings:

1 x 15 min	Wasser (quellen)
3 x 5 min	PBST-Puffer
1 x 30 min	PBST-Puffer + 2% BSA
3 x 5 min	Lektin-Puffer
1 x 3 h	**1 mL** biotinyliertes Lektin **20 µg/mL** und **Laktose 10 mM** in Lektin-Puffer
3 x 5 min	TBST-Puffer
1 x 1h	Anti-Biotin-AK/AP-Lösung in **TBS-Puffer 1:1000**
5 x 5 min	TBST-Puffer
3 x 5 min	AP-Puffer
1 x 10 min	Färbelösung
3 x 2 min	Wasser
2 x 5 min	EDTA-Lösung

Nach erfolgtem Screening von 50 mg Harz, das entspricht ca. 40 000 Kugeln, wurden 36 der am stärksten gefärbten Kugeln unter dem Stereomikroskop aussortiert (Abb. 50).

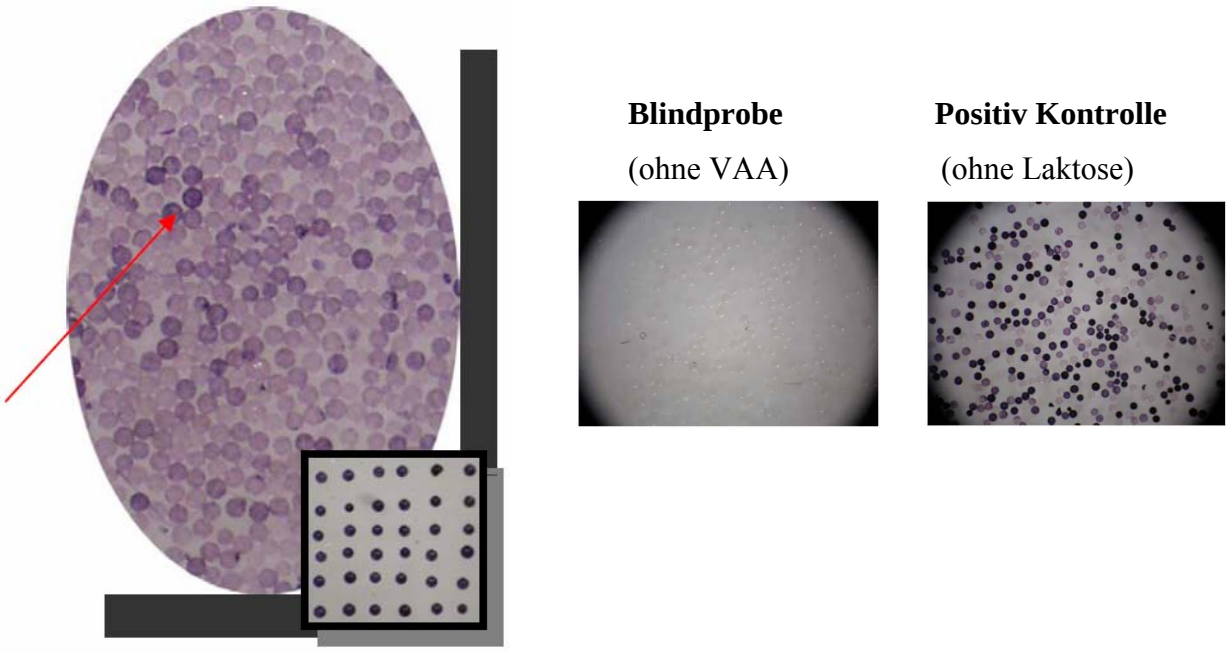


Abb. 50 Screening der Bibliothek **93** mit VAA (20 µg/mL+10 mM Laktose). Zum Vergleich sind die Blindprobe, sowie die positiv Kontrolle abgebildet (Kugeldurchmesser beträgt im Mittel 130 µm)

3.4.2. Identifikation der Hitsequenzen

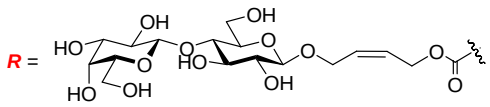
Damit die Zuverlässigkeit der Edman-Sequenzierung gewährleistet ist, mussten die gebundenen Proteine (VAA, Anti-Biotin-AK/AP-Konjugat) von den zu sequenzierenden Harzkugeln entfernt werden. Dafür wurden die gebundenen Proteine mit einer Lösung von

100 mM AcOH und 8 M Harnstoff (5 x 5min) denaturiert und die Harzkugeln anschließend nacheinander mit H_2O, MeOH, CH_2Cl_2, MeOH, H_2O, 100 mM AcOH / 8 M Harnstoff und H_2O gewaschen wurden.

Danach erfolgte die Edman-Sequenzierung. Die farblosen Harzkugeln - der Farbstoff wurde durch waschen mit CH_2Cl_2 ebenfalls entfernt- wurden einzeln zwischen zwei PVDF-Membranen platziert und in Zusammenarbeit mit Adrian Moise im Hause sequenziert.

Von 12 Harzkugeln, deren Sequenz bestimmt werden sollte, konnten alle Sequenzen eindeutig zugeordnet werden (Abb. 51). Dies unterstreicht die hohe Zuverlässigkeit der Synthese. Auch die mit Bedacht gewählte Rückgratarchitektur der Peptid-Bibliothek zahlte sich hierbei aus (vgl. Kap. 3.4.1).

Die identifizierten Sequenzen umfassten eine monovalente Verbindung (**99**), sechs tri- (**100-105**), drei tetra- (**106-108**) und zwei pentavalenten cyclischen Neoglycopeptiden (**109**, **110**).



99 Boc-Lys-Val-Dab(*R*)-Gly-D-Ala-Leu-Ala-Glu-Bal—TG

100 Boc-Lys-Val-D-Phe-D-Dpr(*R*)-D-Phe-D-Dpr(*R*)-Dab(*R*)-Glu-Bal—TG

101 Boc-Lys-Dab(*R*)-Dab(*R*)-Dab(*R*)-D-Ala-Ile-D-Phe-Glu-Bal—TG

102 Boc-Lys-Dab(*R*)-Dab(*R*)-Dab(*R*)-D-Phe-D-Val-D-Phe-Glu-Bal—TG

103 Boc-Lys-D-Dpr(*R*)-D-Phe-D-Dpr(*R*)-Gly-Leu-Dab(*R*)-Glu-Bal—TG

104 Boc-Lys-Val-Dab(*R*)-D-Dpr(*R*)-D-Dpr(*R*)-Ile-D-Phe-Glu-Bal—TG

105 Boc-Lys-D-Dpr(*R*)-Leu-D-Dpr(*R*)-D-Dpr(*R*)-D-Val-D-Phe-Glu-Bal—TG

106 Boc-Lys-Dab(*R*)-Dab(*R*)-D-Dpr(*R*)-D-Phe-Ile-Dab(*R*)-Glu-Bal—TG

107 Boc-Lys-D-Dpr(*R*)-D-Phe-D-Dpr(*R*)-D-Phe-D-Dpr(*R*)-Dab(*R*)-Glu-Bal—TG

108 Boc-Lys-D-Dpr(*R*)-D-Phe-D-Dpr(*R*)-D-Phe-Dab(*R*)-Dab(*R*)-Glu-Bal—TG

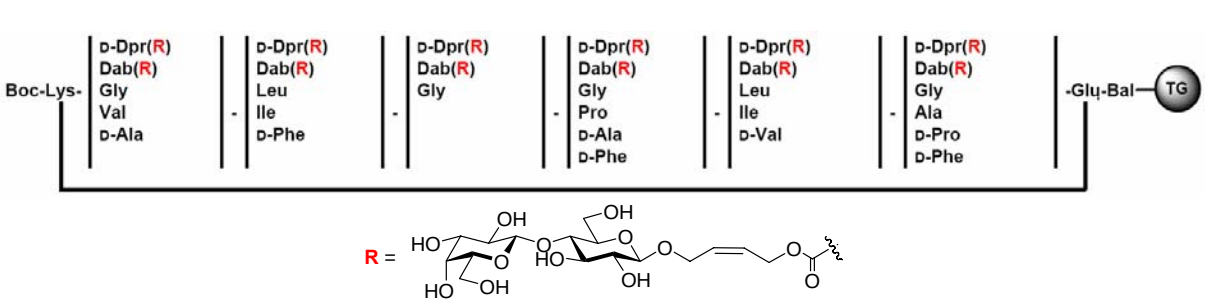
109 Boc-Lys-D-Dpr(*R*)-Dab(*R*)-D-Dpr(*R*)-D-Dpr(*R*)-D-Dpr(*R*)-D-Phe-Glu-Bal—TG

110 Boc-Lys-D-Dpr(*R*)-D-Phe-Dab(*R*)-Dab(*R*)-Dab(*R*)-Dab(*R*)-Glu-Bal—TG

Abb. 51 12 identifizierte Hitsequenzen aus dem Sreening der Bibliothek **93** mit VAA (1 x mono- (**99**), 6 x tri- (**100-105**), 3 x tetra- (**106-108**) und 2 x pentavalent (**109**, **110**))

Cyclische Peptide ohne Laktose, sowie di- und hexavalente Derivate konnten nicht als stark bindende Derivate identifiziert werden. Ersteres wurde erwartet, da Laktose wesentlich für eine starke Bindung sein sollte. Dass weder divalente Derivate noch hexavalente Sequenzen gefunden wurden, war überraschend. Dies deutet darauf hin, dass die Anordnung der Zucker wichtiger ist als deren Anzahl. Die Tatsache, dass keine divalenten Derivate gefunden wurden, spricht für die angewandte Methode und belegt, dass die identifizierten Hitsequenzen nicht rein statistisch in der zu erwartenden Häufigkeit auftraten - fast ein Drittel der Bibliothek waren divalente Glycopeptide - sondern einer Selektion unterlagen.

Tab. 6 Farblich codierte Darstellung der Hitsequenzen aus dem Screening der Bibliothek **93** mit VAA. Jede Farbe entspricht einer Aminosäure



	Sequenz (cyclisch)								Valenz
	1	2	3	4	5	6	7	8	
99	K	V	Dab	*G*	a	L	A	E	1
100	K	V	f	dpr	f	dpr	Dab	E	3
101	K	Dab	Dab	Dab	a	I	f	E	3
102	K	Dab	Dab	Dab	f	v	f	E	3
103	K	dpr	f	dpr	*G*	L	Dab	E	3
104	K	V	Dab	dpr	dpr	I	f	E	3
105	K	dpr	L	dpr	dpr	v	f	E	3
106	K	Dab	Dab	dpr	f	I	Dab	E	4
107	K	dpr	f	dpr	f	dpr	Dab	E	4
108	K	dpr	f	dpr	f	Dab	Dab	E	4
109	K	dpr	Dab	dpr	dpr	dpr	f	E	5
110	K	dpr	f	Dab	Dab	Dab	Dab	E	5

Neben der primären Wechselwirkung der Zucker mit VAA spielte auch die Wechselwirkung der Peptidrückgrate mit dem Lektin mit großer Wahrscheinlichkeit eine Rolle. In Tab. 6 sind die 12 identifizierten Sequenzen dargestellt wobei die variablen Positionen farblich codiert sind. Jede Farbe entspricht dabei einer Aminosäure. Die Zucker sind über die Seitenketten der Aminosäuren Dab bzw. D-Dpr angeknüpft. Bei den groß geschriebenen Derivaten handelt es sich um L-, bei den klein geschriebenen um D-Aminosäuren.

Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Positionen fällt auf, dass nicht alle der möglichen Aminosäuren gefunden wurden, und dass in einzelnen Positionen bestimmte Aminosäuren vermehrt identifiziert wurden. In Position 2 konnte kein Gly und D-Ala gefunden werden. In Position 3 wurde weder Ile noch D-Dpr gefunden, wobei an dieser Stelle bevorzugt Dab und Phe zu finden waren. Bei Position 4 wurde D-Dpr doppelt so oft wie die beiden alternativ möglichen Aminosäuren zusammen identifiziert. In Position 5 trat lediglich Pro nicht in Erscheinung. Eine Gleichverteilung aller möglichen Aminosäuren konnte nur in Position 6 gefunden werden. Auch in Position 7 wurden nahezu ausschließlich Dab und Phe gefunden wobei Ala, D-Dpr und D-Pro in keiner der Sequenzen an dieser Position auftrat.

Allgemein lässt sich festhalten, dass in nahezu jeder Sequenz (außer **13**) neben mindestens drei Laktosederivaten auch mindestens ein aromatischer Ring, die Seitenkette des Phenylalanins zu finden war. Es ist auffällig, dass in allen drei Positionen (3, 5, 7) in denen Phe vorkommen konnte Phe jeweils in 5 von 12 Fällen gefunden wurde. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Wechselwirkung in Form einer π-Kation-Interaktion an der Bindung beteiligt war. Auch hydrophobe Wechselwirkungen könnten zur Verstärkung der Bindung beigetragen haben.

Bei einem Vergleich der Sequenzen **100** und **107**, bzw. **107** und **108** fällt auf, dass sich diese jeweils nur durch eine Aminosäure unterscheiden. Dies könnte bereits ein Indiz für eine Vorzugssequenz sein. Damit hierzu zuverlässige Aussagen gemacht werden können sind weitere Untersuchungen nötig.

Die Betrachtung der D- und L-Aminosäureverteilung, wovon die räumliche Struktur des peptidischen Rückgrats abhängt, liefert kaum Vorzugskonfigurationen (Tab. 7). Lediglich in Position 5 scheinen D-Aminosäuren bevorzugt zu werden, in den anderen Positionen finden sich D- und L-Aminosäuren in ähnlicher Häufigkeit wieder.

Von den gefundenen Hitsequenzen sollten exemplarisch vier cyclische Glycopeptide unterschiedlicher Valenz nachsynthetisiert und ihr Bindungsverhalten in Lösung untersucht werden. Mögliche Artefakte der festen Phase selbst bzw. bei der Wechselwirkung zwischen Glycopeptiden und VAA an der festen Phase lassen sich somit ausschließen.

Tab. 7 Farblich codierte Darstellung der D- und L-Aminosäureverteilung der Hitsequenzen aus dem Screening der Bibliothek **93** mit VAA. Hellblau: L-Aminosäuren, dunkelblau: D-Aminosäuren

	Sequenz (cyclisch)								Valenz
	1	2	3	4	5	6	7	8	
99	K	V	Dab	*G*	a	L	A	E	1
100	K	V	f	dpr	f	dpr	Dab	E	3
101	K	Dab	Dab	Dab	a	I	f	E	3
102	K	Dab	Dab	Dab	f	v	f	E	3
103	K	dpr	f	dpr	*G*	L	Dab	E	3
104	K	V	Dab	dpr	dpr	I	f	E	3
105	K	dpr	L	dpr	dpr	v	f	E	3
106	K	Dab	Dab	dpr	f	I	Dab	E	4
107	K	dpr	f	dpr	f	dpr	Dab	E	4
108	K	dpr	f	dpr	f	Dab	Dab	E	4
109	K	dpr	Dab	dpr	dpr	dpr	f	E	5
110	K	dpr	f	Dab	Dab	Dab	Dab	E	5

3.4.3. Synthese ausgewählter Hitsequenzen

In Abb. 52 sind die vier nachsynthetisierten, nicht mehr festphasengebundenen cyclischen Glycopeptide von mono- bis pentavalent zusammengefasst. Die Derivate **112** und **113** unterscheiden sich lediglich in der Aminosäure in der Position 2. Die anderen Positionen dieser Sequenz sind identisch.

111 Boc-Lys-Val-Dab(*R*)-Gly-D-Ala-Leu-Ala-Glu-Bal-NH_2

112 Boc-Lys-Val-D-Phe-D-Dpr(*R*)-D-Phe-D-Dpr(*R*)-Dab(*R*)-Glu-Bal-NH_2

113 Boc-Lys-D-Dpr(*R*)-D-Phe-D-Dpr(*R*)-D-Phe-D-Dpr(*R*)-Dab(*R*)-Glu-Bal-NH_2

114 Boc-Lys-D-Dpr(*R*)-Dab(*R*)-D-Dpr(*R*)-D-Dpr(*R*)-D-Dpr(*R*)-D-Phe-Glu-Bal-NH_2

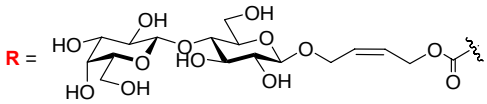


Abb. 52 Nachsynthetisierte Hitsequenzen für weitere Untersuchungen in Lösung

Die Synthese erfolgte an TentaGel. Damit die cyclischen Glycopeptide nach erfolgter Festphasensynthese vom Harz abgespalten werden konnten, kam der mit 1%iger TFA spaltbare Sieber-Amid-Linker zum Einsatz. Die Synthese der cyclischen Glycopeptide ist am Beispiel des monovalenten Derivats **112** in Abb. 53 dargestellt. Die Kupplung der ersten

Aminosäure Fmoc-Bal-OH erfolgte manuell über Nacht. Die danach bestimmte Beladungsdichte betrug 0.20 mmol/g. Die weitere Synthese der linearen Peptide erfolgte automatisiert am Peptidsynthesizer A433 von Applied Biosystems. Der Erfolg der Synthese wurde durch das automatische Messen der Leitfähigkeit der Fmoc-Abspaltlösung nach jedem Schritt kontrolliert. Auch der negative TNBS-Test am Ende der Synthese der linearen noch geschützten Peptide belegte die gelungene Synthese.

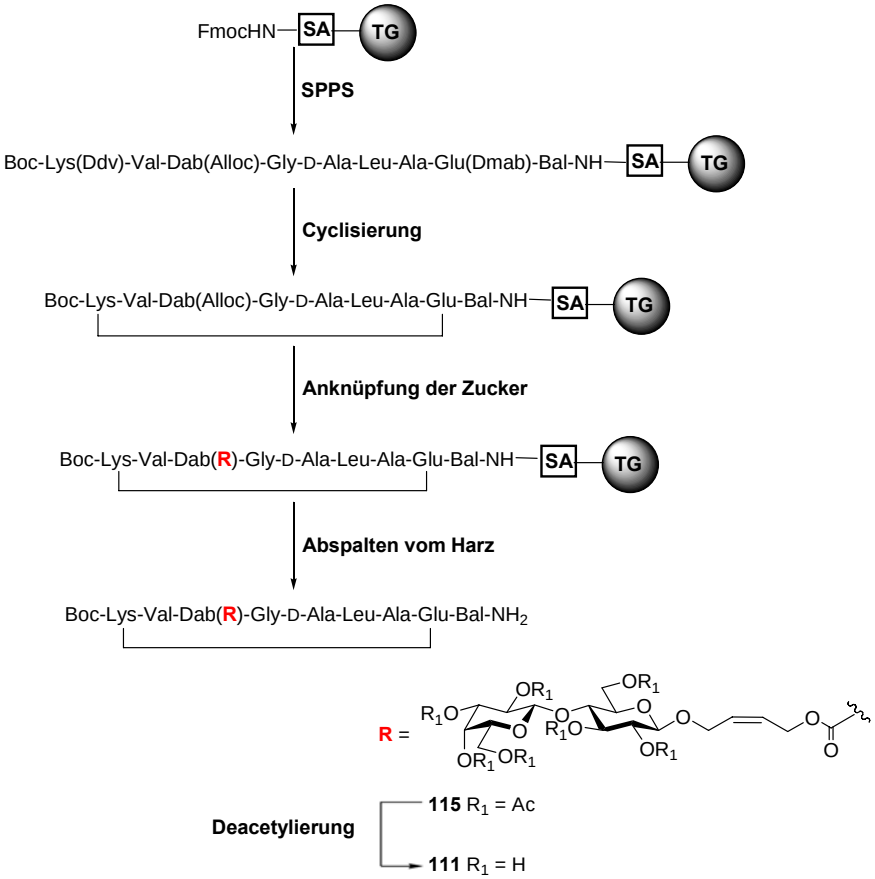
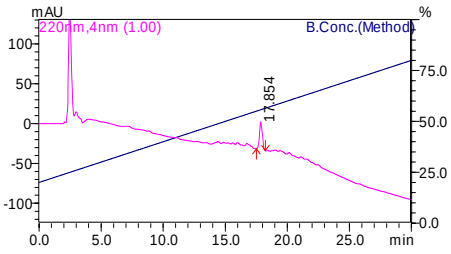


Abb. 53 Synthese des cyclischen Glycopeptids **111**

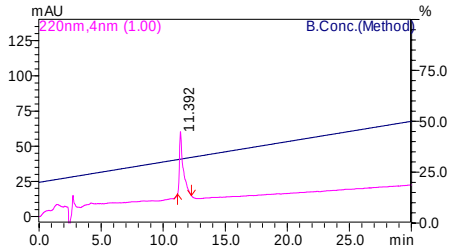
Die Abspaltung der Ddv/Dmab-Schutzgruppen erfolgte mit Hydrazin in DMF und Allylalkohol. Zur Feststellung der vollständigen Abspaltung der Ddv/Dmab-Schutgruppen wurde von jeder Abspaltlösung die Absorption gemessen (vgl. Abb. 40). Die anschließende Cyclisierung der linearen Peptide wurde durch Zugabe von DIEA und der Aktivierung mit PyAOP und HOAt durchgeführt. Die nahezu quantitative Cyclisierung konnte durch mehrfachen Austausch der Cyclisierungsreagenzien und Variation des Lösungsmittels (NMP, DMSO, CH_2Cl_2) nach 7 Tagen erreicht werden. Nach Palladium-katalysierter Abspaltung der Alloc-Schutzgruppen erfolgte die Anknüpfung des Acetyl-geschützten β-Laktosylcarbonats **13**. Bei der Abspaltung der Alloc-Schutzgruppen war darauf zu achten, dass ausgiebig mit

DMF/DMSO gewaschen wurde, um die bei dieser Reaktion eingesetzten Reagenzien ($[Pd(PPh_3)_4]$, $BH_3 \cdot HNMe_2$) vollständig zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden die cyclischen Glycopeptide mit 1% TFA in CH_2Cl_2 vom Harz abgespalten. Mehrfaches Waschen des Harzes mit TFE, MeOH, CH_2Cl_2 und Gemischen aus diesen Lösungsmitteln garantierte, dass die evtl. durch nicht kovalente Bindung auf dem Harz zurückgebliebenen Glycopeptide gelöst wurden. Die HPL-Chromatogramme der Acetyl-geschützten Glycopeptide **115-118** sowie die der gereinigten deacetylierten Zielverbindungen **111-113** sind in den Abb. 54 bis Abb. 57 dargestellt. Mit steigender Zahl der Valenz erhöhte sich die Anzahl der beobachteten Peaks. Bei dem monovalenten Glycopeptid **115** war im Wesentlichen einzig der Produktpeak zu beobachten, wohingegen bei den multivalenten Derivaten weitere Peaks detektiert wurden. Beim pentavalenten Derivat **118** konnte die gewünschte Produktmasse keinem der detektierten Peaks zugeordnet werden. Nach Deacetylierung konnten die entschützten cyclischen Neoglycopeptide **111-113** erhalten werden. Die Aufreinigung erfolgte durch präparative HPLC. Beim Versuch das pentavalente Derivat **118** zu entschützen, wurde ein komplexes Produktgemisch erhalten aus, dem die gewünschte Verbindung nicht isoliert werden konnte (Abb. 57). Bei dem trivalenten und tetravalenten Derivaten **112** und **113** wurden zwei nahe beieinander liegende Peaks mit identischer Masse isoliert (14.30 und 14.67 Minuten bei Verbindung **112** bzw. 12.33 und 12.39 Minuten bei Verbindung **113**). Die Acetylschutzgruppen wurden unter basischen Bedingungen über Nacht abgespalten und dabei könnte eine Epimerisierung eines stereogenen Zentrums aufgetreten sein. Da beide Derivate vergleichbare Aktivitäten zeigten wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet (vgl. Abb. 65). Zur Vermeidung der Epimerisierung sollte bei einer erneuten Synthese bei der Deacetylierung darauf geachtet werden, dass der pH-Wert nicht über 10-11 liegt.

I: **115** (roh)



II: **111** (aufgereinigt)



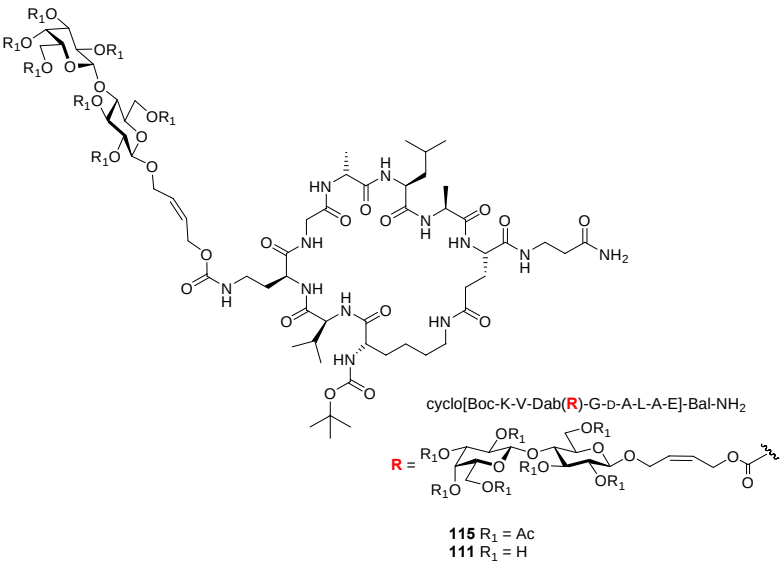
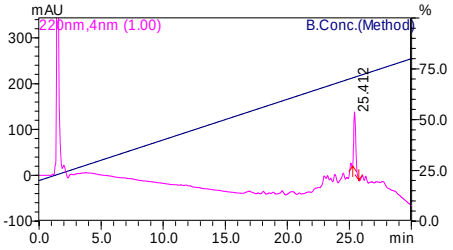
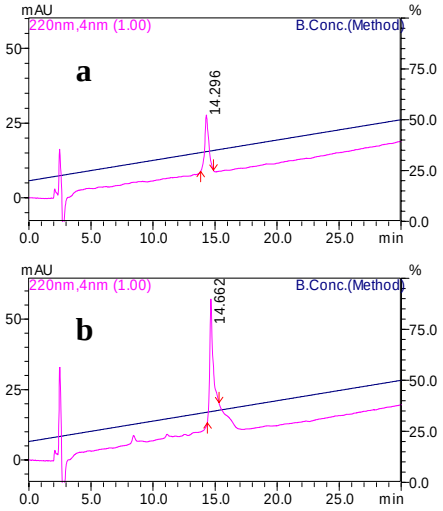


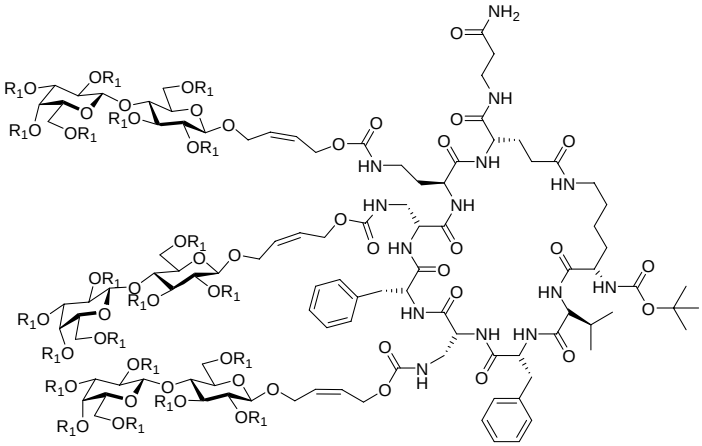
Abb. 54 Monovalentes cyclisches Neoglycopeptid **111**.
Chromatogramm I acetyliert (**115**): Eluent A: 0.1% TFA in H_2O; Eluent B: 0.1%TFA in MeCN; Gradient: 20-80% in 30 Minuten bezogen auf B. Säule: EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, Fluss: 1mL/min.
Chromatogramm II deacetyliert (**111**): Eluent A: 0.1% TFA in H_2O; Eluent B: 0.1%TFA in MeCN; Gradient: 20-50% in 30 Minuten bezogen auf B. Säule: EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, Fluss: 1mL/min.

I: **116** (roh)



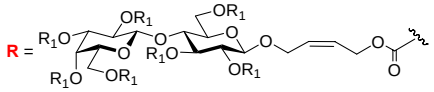
II: **112** (aufgereinigt)





cyclo[Boc-K-V-D-F-D-Dpr(**R**)-D-F-D-Dpr(**R**)-Dab(**R**)-E]-Bal-NH_2

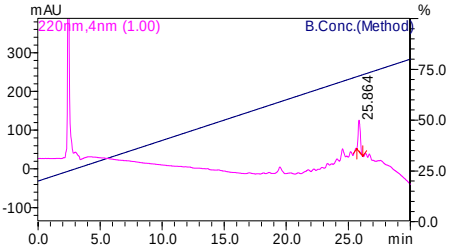
R =



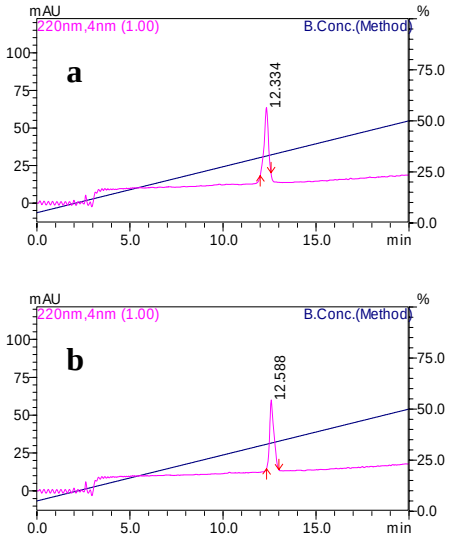
116 R_1 = Ac
112 R_1 = H

Abb. 55 Trivalentes cyclisches Neoglycopeptid **112**.
Chromatogramm I acetyliert (**116**): Eluent A: 0.1% TFA in H_2O; Eluent B: 0.1%TFA in MeCN; Gradient: 20-80% in 30 Minuten bezogen auf B. Säule: EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, Fluss: 1mL/min.
Chromatogramm II deacetyliert (**112**): Eluent A: 0.1% TFA in H_2O; Eluent B: 0.1%TFA in MeCN; Gradient: 20-50% in 30 Minuten bezogen auf B. Säule: EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, Fluss: 1mL/min.

I: **117** (roh)



II: **113** (aufgereinigt)



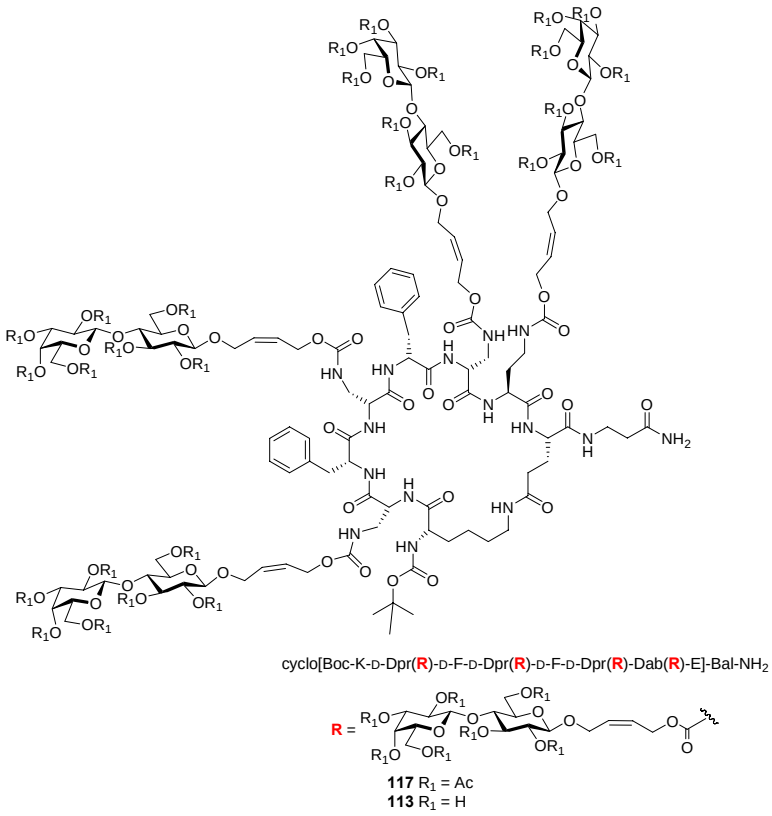
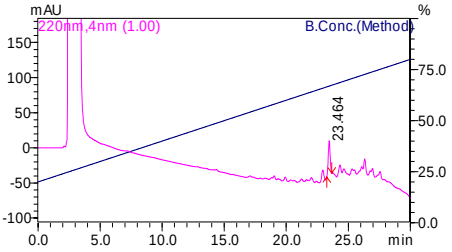
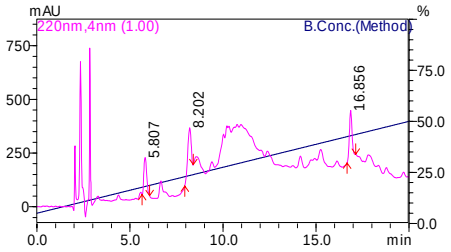


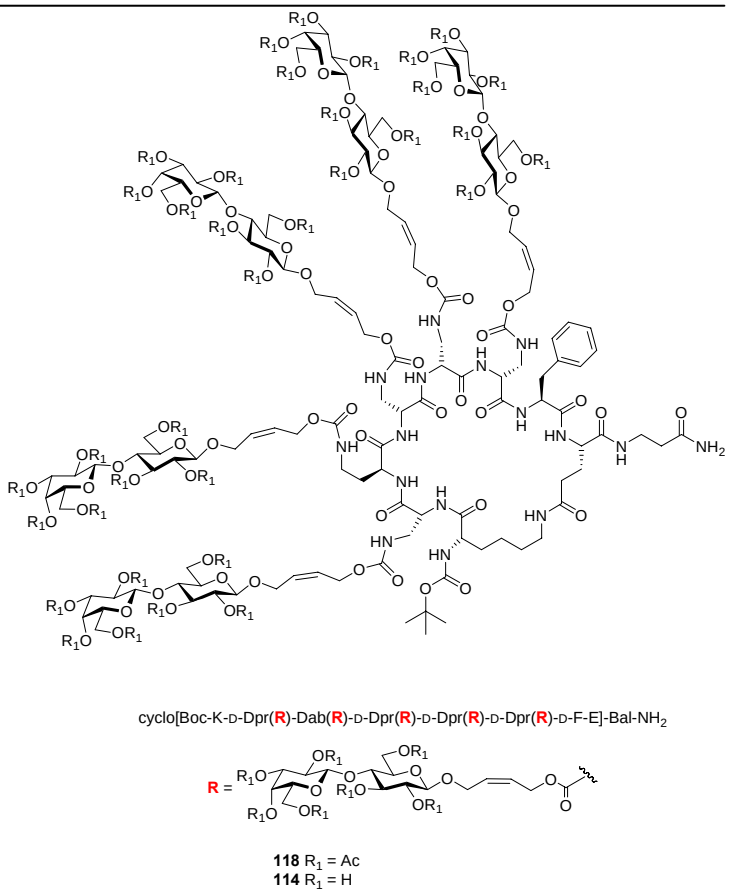
Abb. 56 Tetravalentes cyclisches Neoglycopeptid **113**
Chromatogramm I acetyliert (**117**): Eluent A: 0.1% TFA in H_2O; Eluent B: 0.1%TFA in MeCN; Gradient: 20-80% in 30 Minuten bezogen auf B. Säule: EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, Fluss: 1mL/min.
Chromatogramm II deacetyliert (**113**): Eluent A: 0.1% TFA in H_2O; Eluent B: 0.1%TFA in MeCN; Gradient: 5-50% in 30 Minuten bezogen auf B. Säule: EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, Fluss: 1mL/min.

I: **118** (roh)



II: **114** (roh)





cyclo[Boc-K-D-Dpr(**R**)-Dab(**R**)-D-Dpr(**R**)-D-Dpr(**R**)-D-Dpr(**R**)-D-F-E]-Bal-NH_2

118 R_1 = Ac
114 R_1 = H

Abb. 57 Versuch der Reinigung des pentavalenten cyclischen Neoglycopeptids **114**.
Chromatogramm I acetyliert (**118**): Eluent A: 0.1% TFA in H_2O; Eluent B: 0.1%TFA in MeCN; Gradient: 20-80% in 30 Minuten bezogen auf B. Säule: EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, Fluss: 1mL/min.
Chromatogramm II deacetyliert (**114**): Eluent A: 0.1% TFA in H_2O; Eluent B: 0.1%TFA in MeCN; Gradient: 5-50% in 30 Minuten bezogen auf B. Säule: EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, Fluss: 1mL/min. Die gewünschte Produktmasse konnte nicht identifiziert werden.

3.4.4. Enzymgekoppelter Lektinbindungstest

Die Affinitäten der ausgewählten Hitsequenzen in Lösung sollte durch einen Enzym-Linked-ImmunoSorbent-Lectin-Assay (ELISLA) getestet werden (Abb. 58). Zur Durchführung eines ELISLAs wurde im ersten Schritt die Oberfläche einer Polystyrol-Mikrotiterplatte mit einem Kohlenhydrat-Derivat beschichtet, das den Referenzliganden darstellt. In Frage kamen sowohl natürliche Kohlenhydratderivate, z.B. in Form von Glycoproteinen oder auch synthetische Derivate. Letztere haben den Vorteil, dass sich damit Oberflächen einheitlich mit einer Zuckerspezies beschichten lassen, da die alternativ verwendeten natürlichen Glycoproteine in der Regel unterschiedliche Glycosylierungsmuster aufweisen. Anschließend wurden IC_{50}-Werte für die Inhibition der Bindung von biotinyliertem Lektin an die Mikrotiterplatte durch die zu untersuchenden Neoglycopeptide bestimmt. Der IC_{50}-Wert entspricht der Konzentration des zu untersuchenden Liganden, bei der die Bindung des Lektins zu 50% inhibiert wird. Ein guter Inhibitor besitzt somit einen niedrigen IC_{50}-Wert, ein schlechter Inhibitor entsprechend einen höheren. Eine geeignete kovalente Immobilisierungsstrategie zur Beschichtung aminofunktionalisierter Mikrotiterplatten mit einem passend funktionalisierten Kohlenhydratderivat wurde in unserer Gruppe entwickelt[106]. Abb. 58 zeigt schematisch die Durchführung des ELISLAs.

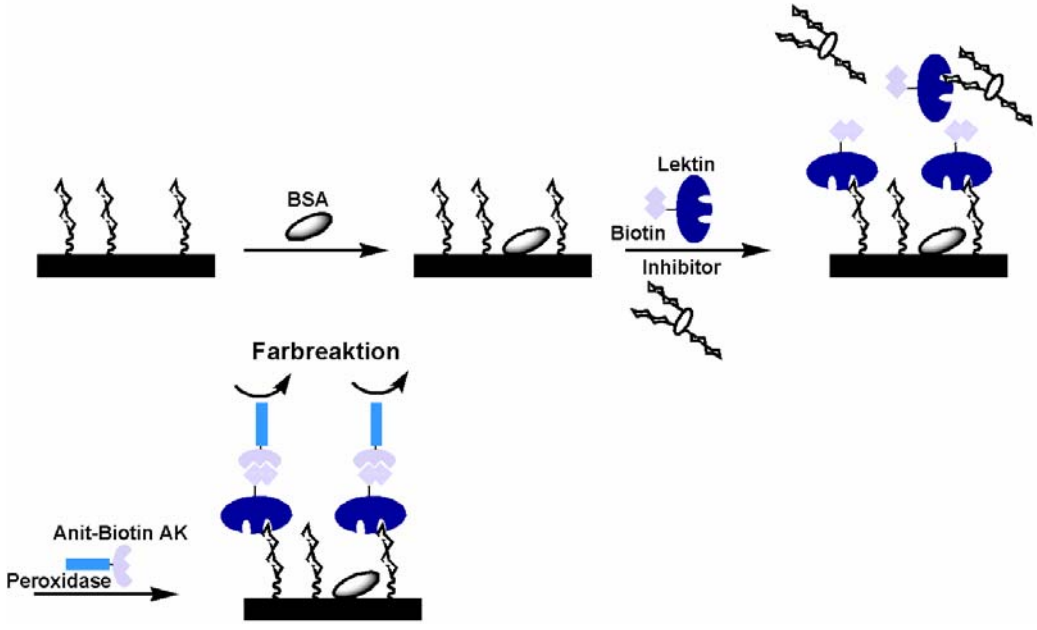


Abb. 58 Schematische Darstellung des Enzym-Linked-Immunosorbent-Lectin-Assay (ELISLA)

Nach der Immobilisierung wurde gründlich gewaschen und zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen die noch freie Oberfläche der Mikrotiterplatten mit Rinderserumalbumin (BSA) geblockt. Es folgte die Inkubation mit biotinyliertem VAA und dem zu

untersuchenden Inhibitor. Ist die Bindung an den in Lösung befindlichen Inhibitor stark, dann wird wenig des biotinylierten Lektins an den Referenzliganden auf der Mikrotiterplattenoberfläche gebunden. Tritt hingegen keine oder nur eine schwache Bindung auf ist die Menge des gebundenen Lektins an das immoblisierten Zuckerderivat entsprechend größer. Anschließend wurde nichtgebundenes Lektin ausgewaschen und durch Zugabe eines Konjugates aus Anti-Biotin-Antikörper und Meerrettich-Peroxidase das am Referenzliganden gebundene biotinylierte-Lektin mit Peroxidase versehen[107]. Die Visualisierung des gebunden Lektins erfolgte schließlich durch die Zugabe des Meerrettich-Peroxidase Substrats ABTS **119** (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz). In Gegenwart des Enzyms Meerrettich-Peroxidase und H_2O_2 wird bei pH 4.0 aus der farblosen Spezies ABTS durch Oxidation die blau-grünlich gefärbte radikalische Kationenform $ABTS^{+\bullet}$ **120** gebildet, deren Absorptionsmaximum bei 414 nm liegt (Abb. 59). Mittels eines Mikrotiterplatten-Readers wurde die Absorption in diesem Bereich gemessen.

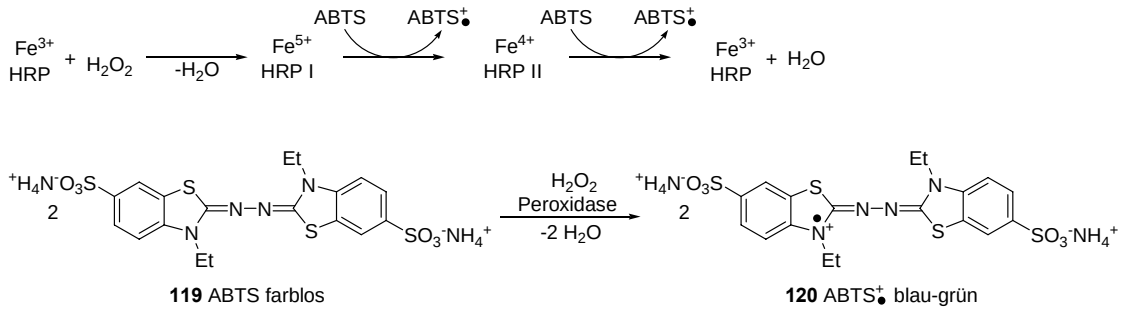


Abb. 59 Peroxidase-katalysierte Farbreaktion zur Quantifizierung der Lektinbindung

Die Berechnung der prozentualen Inhibition erfolgte nach der Gleichung

$$I = \frac{A_{ohneInhibitor} - A_{mitInhibitor}}{A_{ohneInhibitor}} \times 100$$

Die prozentuale Inhibition wurde gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen und aus den erhaltenen Kurven der IC_{50}-Wert ermittelt.

3.4.4.1. Synthese des zu immobilisierenden Laktosederivats

Das zur Immobilisierung dienende aminofunktionalisierte Laktosylderivat **123** konnte ausgehend vom Butenspacer-modifizierten Laktosylcarbonat **13** in 3 Stufen erhalten werden (Abb. 60).

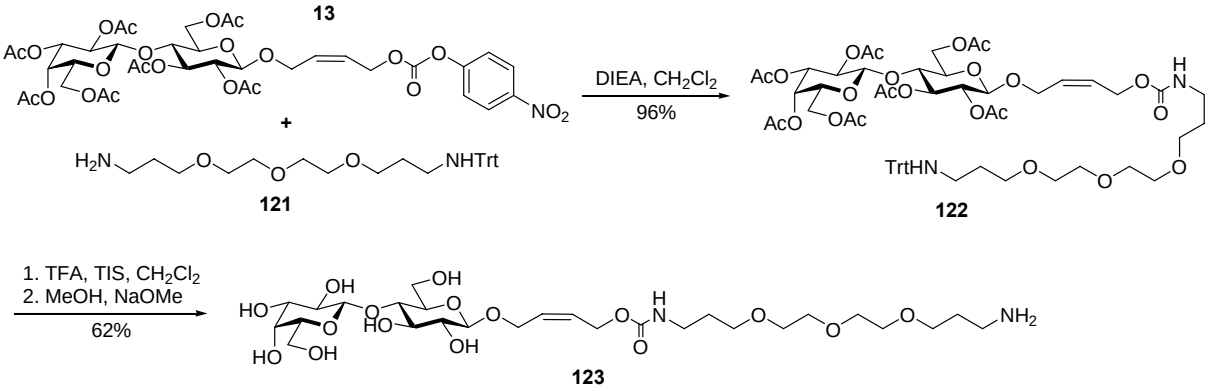


Abb. 60 Synthese des für die Immobilisierung benötigten aminofunktionalisierten Laktosylderivats **123**

Im ersten Schritt wurde das β-Laktosylcarbonat **13** in Dichlormethan mit monotrityl-geschütztem PEG-Derivat **121** zum PEG-funktionalisierten Urethan **122** umgesetzt. Die Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe erfolgte durch Zugabe von TFA, die Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppen durch NaOMe in MeOH. Die Ausbeute des aminofunktionalisierten Laktosylurethans **123** betrug 62%. Nach DC-Kontrolle konnte in den einzelnen Schritten von quantitativen Ausbeuten ausgegangen werden, die PEG-Modifikation erschwerte jedoch die Extraktionsschritte und somit die Reinigung der Verbindungen.

3.4.4.2. Durchführung

Zur Immobilisierung des aminofunktionalisierten Laktosylurethans **123** wurde eine aminofunktionalisierte Mikrotiterplatte **124** der Firma Nunc (Covalink NH, Nunc 478042, Gesamtoberfläche 2,7cm²/well, Beladungsdichte 10^{14} Aminogruppen/cm²) zunächst mit in DMSO gelöstem Phenylendiisothiocyanat (PDITC) **125** modifiziert (Abb. 61). PDITC wurde durch Ausbildung eines Thioharnstoffs immobilisiert und erlaubte durch die noch verbliebene Isothiocyanatfunktionalität die Immobilisierung des Laktosylurethans **125** in Carbonat-Puffer bei pH 10. Die so entstandenen Mikrotiterplatten **127,** an deren Oberflächen über einen PEG-Linker Laktose kovalent immobilisiert war, wurden für die folgenden ELISLAs eingesetzt.

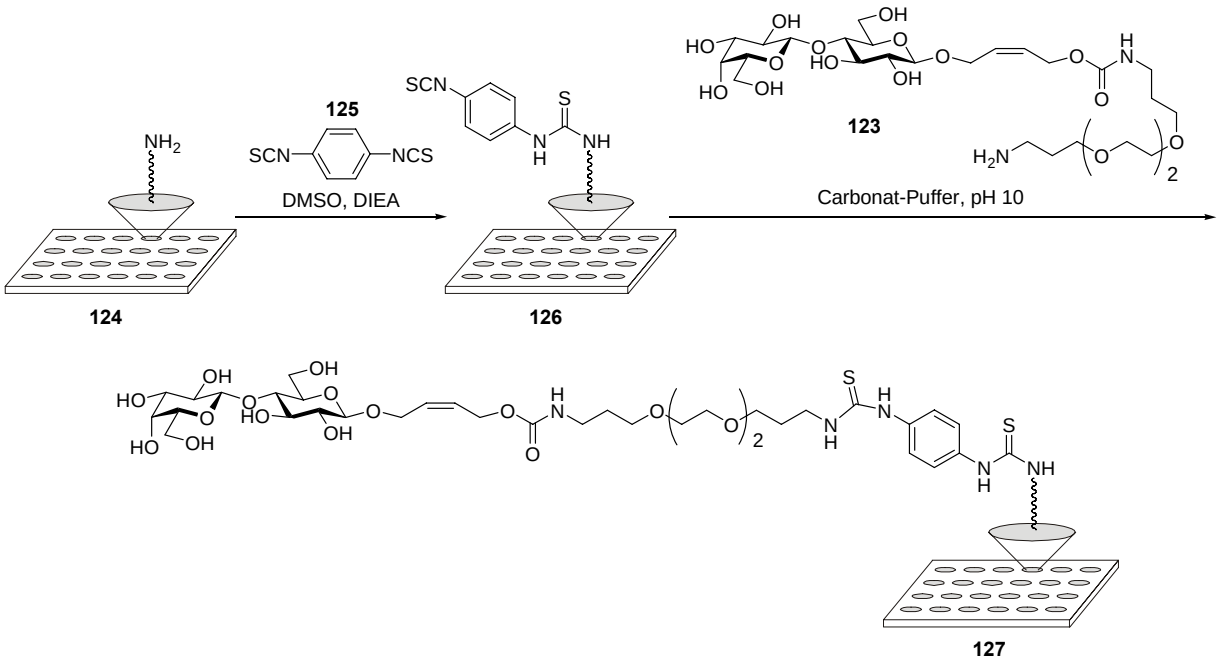


Abb. 61 Immobilisierung des aminofunktionalisierten Laktosederivats **123** an aminofunktionalisierten Mikrotiterplatten **124** analog einer Vorschrift von Maierhofer und Rohmer[106,108]

Bevor ein zuverlässiger ELISLA durchgeführt werden konnte, musste eine geeignete Verdünnung des Anti-Biotin-Antikörper/Peroxidase-Konjugats und eine geeignete VAA-Konzentration ermittelt werden. Hierzu wurde eine sogenannte Schachbrett-Titration durchgeführt[109]. Dabei wird eine Verdünnungsreihe eines Reagenzes vertikal, die eines anderen horizontal auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach Durchführung des Testes werden die erhaltenen Absorptionen gegen die Reagenzkonzentration aufgetragen und aus den erhaltenen Kurven die geeigneten Verdünnungen ermittelt. Abb. 62 zeigt die gemessene Absorption bei 405 nm aufgetragen gegen die VAA-Konzentration bei Verwendung verschiedener Anti-Biotin-AK/Peroxidase Verdünnungen. War die Verdünnung gering (1:100 und 1:300), wurde selbst noch bei sehr geringen VAA-Konzentrationen eine unspezifische Bindung detektiert. Im Gegensatz dazu wurde bei hoher Verdünnung (1:8100 oder höher) selbst bei hohen VAA-Konzentrationen keine Absorption detektiert. Als geeignet erwies sich die Verdünnung von 1:900. Bei dieser Verdünnung wurde bei hohen VAA-Konzentrationen eine große Absorption und bei geringen VAA-Konzentrationen keine unspezifische Wechselwirkung detektiert.

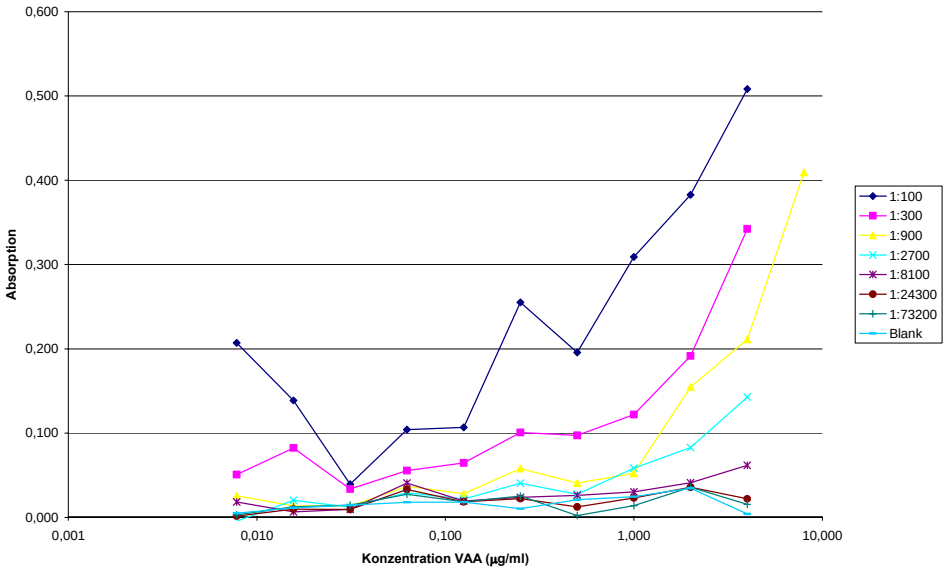


Abb. 62 Bestimmung der geeigneten Verdünnung des Anti-Biotin-Antikörper/Peroxidase-Konjugats

Trägt man die Absorption gegen die Verdünnung des AK-Konjugats auf (Abb. 62) so zeigt sich, dass auch bei der größten verwendeten Lektinkonzentration von 4 µg/mL keine Sättigung der Absorption eintritt. Ab einer Konzentration von 2 µg/mL konnte bei Anwendung einer 1:900 Verdünnung des AK-Konjugats ein deutlicher Anstieg der Absorption beobachtet werden. Da bei den bisherigen Messungen noch keine Sättigung detektiert werden konnte, wurde erneut unter Verwendung einer AK-Verdünnung von 1:1000 die Absorption bei höheren Lektinkonzentrationen bestimmt (Abb. 64). Zur Durchführung eines ELISLAs ist eine Konzentration des Lektins knapp unterhalb der Sättigung am besten. Würde die Konzentration so groß gewählt, dass es zu einer Sättigung der Mikrotiterplatte mit VAA kommt, dann wäre überschüssiges Lektin vorhanden unde es könnte nicht von einem rein kompetitiven Versuchsaufbau ausgegangen werden. Verwendet man eine Konzentration des Lektins in deren Bereich bereits geringe Änderungen der Lektinkonzentration zu großen Veränderungen der Absorption führen, vergrößert sich dadurch der Fehler der Messwerte.

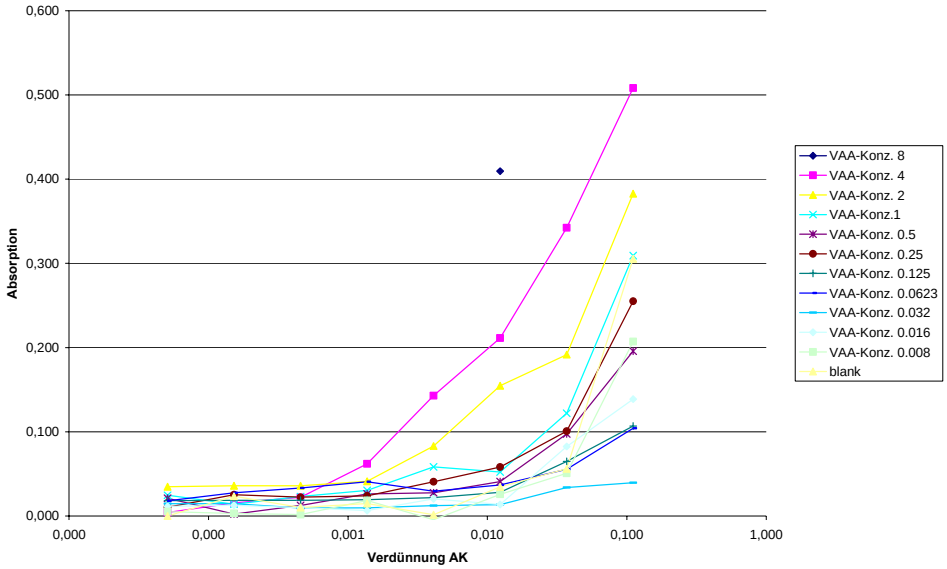


Abb. 63 Bestimmung der geeigneten Konzentration von biotinyliertem VAA

Es konnte jedoch festgestellt werden, dass auch bei einer VAA-Konzentration von 24 µg/mL noch keine Sättigung der Absorption erreicht wurde (Abb. 64). Da die verfügbaren Menge biotinylierten-VAAs den Einsatz dieser hohen Lektinkonzentrationen zur Durchführung von ELISLAs ausschloss wurde die maximal mögliche Konzentration von 13.3 µg/mL gewählt. Dies entsprach der 5-10fachen Menge der in der Literatur verwendeten VAA-Konzentration[49].

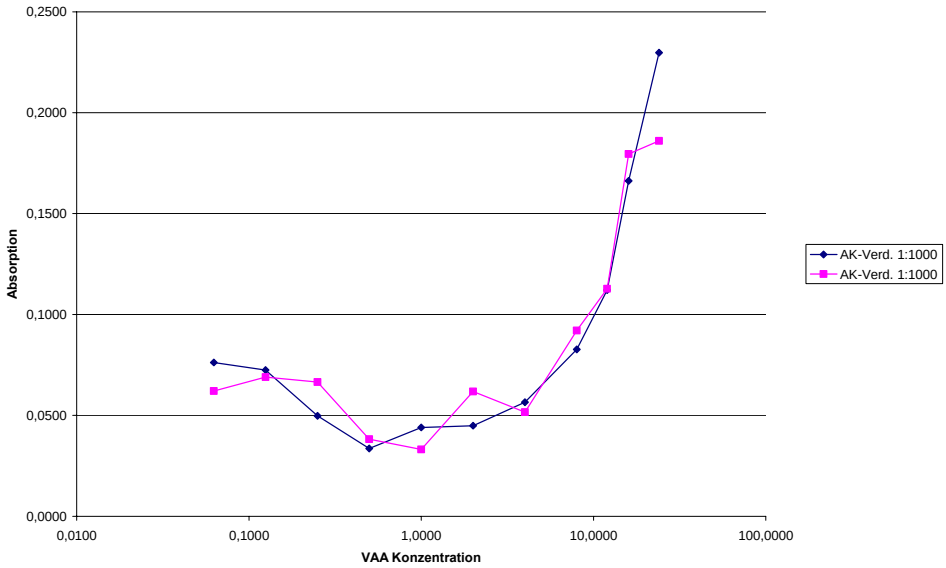


Abb. 64 Bestimmung der geeigneten Konzentration von biotinyliertem VAA

Die Ergebnisse der ELISLAs der cyclischen Neoglycopeptide **111**, **112**, **113a** und **113b** sowie Laktose sind in Abb. 65 dargestellt. Verbindung **113a** und **113b** sind die isolierten Glycopeptide gleicher Masse mit geringfügig unterschiedlicher Retentionszeit (12.33 Minuten bzw. 12.59 Minuten). Der ermittelte IC_{50}-Wert von Laktose liegt mit 1mM im erwarteten Bereich[49]. Die getesteten Hitsequenzen **111**, **112**, **113a** und **113b** besaßen unabhängig von ihrer Valenz einen IC_{50}-Wert der zwei Größenordnungen geringer war als der von Laktose (IC_{50}-Werte: **111** = 10-20 µM, **112**, **113a** und **113b** = 1-10 µM). Da die Derivate **113a** und **113b** vergleichbare Affinitäten zeigten, wurde auf weitere Untersuchungen zur Klärung, welches der beiden Glycopeptide das gewünschte Derivat ist, verzichtet. Die dargestellten cyclischen Neoglycopeptide sind somit auch in Lösung gute VAA-Liganden. Da ähnlich hohe Affinitäten unabhängig von der Valenz der getesteten Glycopeptide beobachtet wurden und bereits das monovalente cyclische Glycopeptid-Derivat **111** eine deutlich höhere Affinität im Vergleich zu Laktose aufwies, liegt die Vermutung nahe, dass die höheren Affinitäten einer Wechselwirkungen von VAA und dem cyclischen Peptidrückgrat zuzuschreiben ist. Dafür könnten π-Kation-Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Seitenketten der Aminosäuren von VAA mit aromatischen Seitenketten der cyclischen Glycopeptide verantwortlich sein. Diese Art der Affinitätssteigerung wurde auch schon von Nilsson et al. beobachtet[103]. Sie untersuchten Galektin-3 und fanden eine erhöhte Affinität von aromatisch modifizierten LacNAc-Derivaten. Auch die auffällig große Häufigkeit von Phenylalanin, der einzigen eingesetzten aromatischen Aminosäure, bei den gefundenen Hitsequenzen **111**, **112** und **113** stützt diese These.

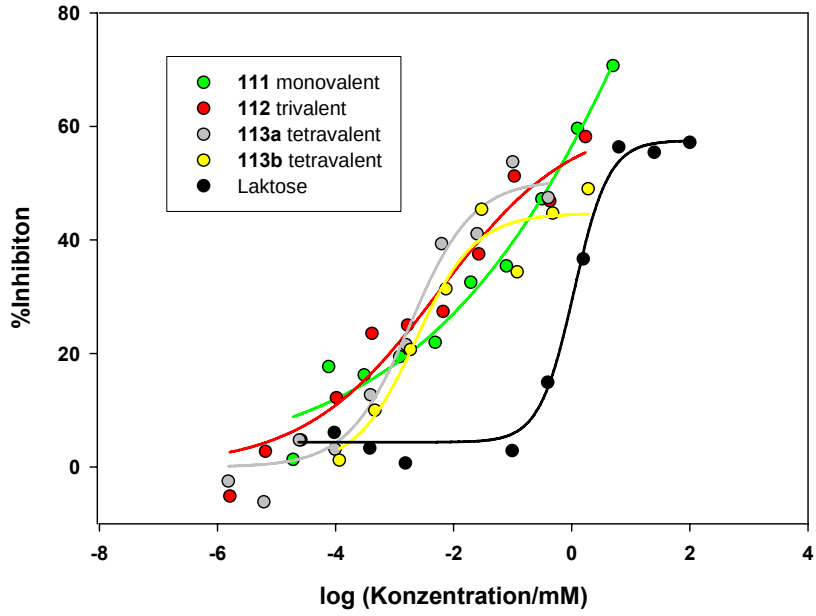


Abb. 65 Inhibitionskurven der cyclischen Neoglycopeptide (monovalent **111**, trivalent **112**, tetravalent **113a** und **113b**) und Laktose

3.5. Screening der Galektine

Die Bibliotheken **92** und **93** wurden mit weiteren Laktose bzw. Galaktose spezifischen Lektinen gescreent. Zum Einsatz kamen die in Tab. 8 aufgeführten Galektine.

Tab. 8 Zum Screening der Bibliotheken **92** und **93** verwendete Galektine

Galektin	Vorkommen	Eigenschaften
Galektin-1	Viele Zelltypen	Prototyp; Homodimer, 14-15 kDa (je 1CRD)
Galektin-3	Viele Zelltypen	Chimärentyp; Pentamerbildung möglich, Pro-, Tyr- und Gly-reiche Domäne (N-Terminal) (je 1 CRD)
Galektin-4	Verdauungstrakt, Lunge, Brust, Leber, Plazenta	Tandem-Repeat-Typ; Monomer, 34 kDa, (2 CRDs)
Galektin-9 (N-Terminale Domäne)	Darm, Leber, Niere, Lunge, Lymphgewebe, B- und T-Zellen, Makrophagen	Tandem-Repeat-Typ; Monomer, 36 kDa, (2 CRDs)

Die zum Screening verwendeten Galektine gehören zu unterschiedlichen Galektintypen. Galektin-1[35] ist Vertreter der Prototyp-Familie, Galektin-3 repräsentiert als einziges Galektin den Chimärentyp und die eng verwandten Galektine 4 und 9 vertraten den Tandem-Repeat-, den dritten Galektintyp. Es wurden neben den Galektinen 1, 3 und 4 auch die N- und C-terminalen Domänen von Galektin-4, mit je einer CRD, sowie die N-terminale Domäne von Galektin-9 zum Screening der Bibliotheken verwendet. Die verwendeten Galektine lagen in biotinylierter Form vor. Das Screening der Bibliotheken mit den Galektinen erfolgte analog dem für VAA beschriebenen Verfahren (Vgl. Kap. 3.4.1).

Das Screening der Glycopeptidbibliothek **93**, die Bibliothek die erfolgreich mit VAA gescreent werden konnte, führte, auch nach zahlreichen Versuchen geeignete Screening-bedingungen zu finden, zu keinem Erfolg. Meist waren alle Kugeln gleichermaßen schwach angefärbt oder der Kontrast der unterschiedlich angefärbten Kugeln zu gering (Abb. 66).

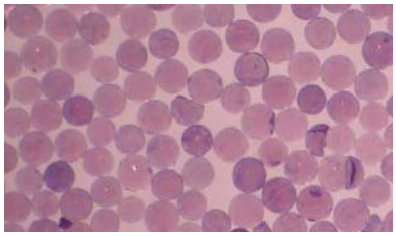


Abb. 66 Screeningversuche der Glycopeptidbibliothek **93** mit den Galektinen 1, 3, 4 und 9; Foto zeigt beispielhaft einen Ausschnitt aus dem Screening mit Galectin-3

Anschließend sollte Glycopeptidbibliothek **92** mit den Galektinen 1, 3, 4 und den Galektinfragmenten (Galektin-4 und -9) gescreent werden. Da bei Verwendung des Anti-Biotin-AK/AP-Konjugats bei diesen Screeningversuchen unerwartete Beobachtungen gemacht wurden (siehe Kap. 3.5.1), sollte ein Streptavidin/AP-Konjugat eingesetzt werden. Dadurch gab es keine durch Interaktion des Anti-Biotin-Antikörpers falsch-positiv angefärbte Hitbeads mehr. An dieser Stelle sei angemerkt, dass in der Literatur häufig der umgekehrte Fall beschrieben wird, d.h. zur Vermeidung unspezifischer Interaktionen des Streptavidins kommt ein Anti-Biotin-Antikörper/Konjugat zum Einsatz[61,63].

Das Screening mit Galektin-1 führte zu einer nahezu gleichmäßigen Anfärbung aller Kugeln (Abb. 67). Der Kontrast der Kugelfärbung konnte auch durch Zusatz unterschiedlicher Mengen von Laktose (0.1-10 mM) nicht verbessert werden. Auch beim Screening mit Galektin-3 konnten keine Hitbeads gefunden werden (Abb. 67). Im Gegensatz zu Galektin-1 schien Galektin-3 schwächer mit der Glycopeptidbibliothek **92** zu interagieren Die Harzkugeln waren lediglich schwach gefärbt, d.h. Galektin-1 zeigte im Gegensatz zu Galektin-3 eine allgemein höhere Affinität zu den cyclischen Glycopeptiden der Bibliothek **92**. Dies könnte von Interesse sein, da Galektin-1 und -3 bei zahlreichen Krebserkrankungen gegensätzlich in Erscheinung treten[38,110]. Zur Klärung der Ursache des beobachteten Affinitätsunterschieds sind weitere Untersuchungen notwendig.

Galektin-1 Galektin-3

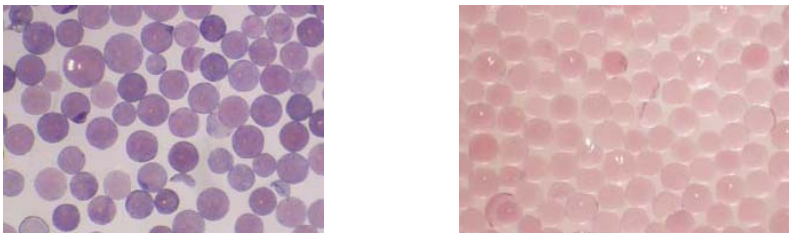


Abb. 67 Screening der Bibliothek **92** mit Galektin-1 und Galektin-3

Mit Galektin-4 gelang ein erfolgreiches Screening der Neoglycopeptidbibliothek 92 (Abb. 68)**.** Der Zusatz von 5 mM Laktose führte zu einer Reduktion der Hitrate auf ca. 0.1% unter Beibehaltung des hervorragenden Kontrasts. Es wurden 36 der am stärksten gefärbten Kugeln aussortiert und nach Behandlung mit AcOH/Harnstoff von 10 Kugeln die Sequenzen der darauf befindlichen cyclischen Glycopeptide bestimmt (vgl. Kap. 3.4.2).

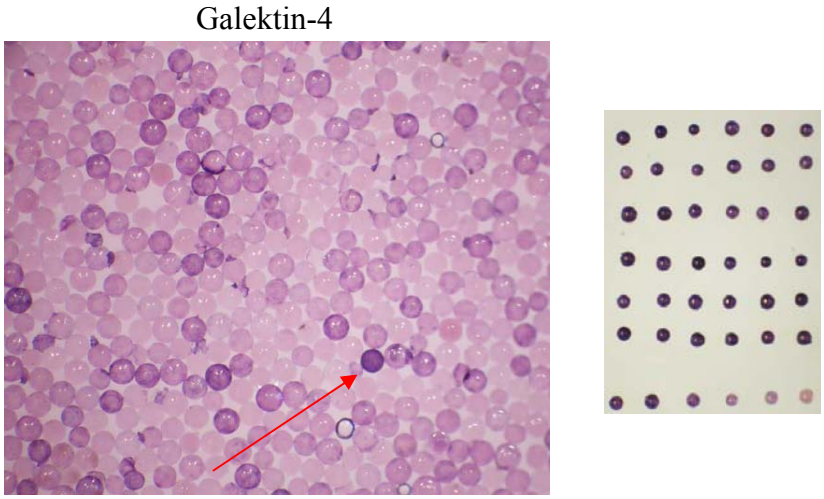
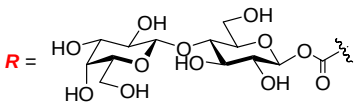


Abb. 68 Screening der Bibliothek **92** mit Galektin-4

Es konnten 2 mono- (**128**, **129**), 1 di- (**130**), 4 tri- (**131-134**) und 2 tetravalente (**135**, **136**) Glycopeptide identifiziert werden (Abb. 69).



128 Boc-Lys-D-Ala-D-Phe-Dab(*R*)-D-Phe-Pro-Ile- D-Phe-Glu-Bal—TG

129 Boc-Lys-Gly-Ile-Dab(*R*)-Pro-Ile-D-Pro-Glu-Bal—TG

130 Boc-Lys-Dab(*R*)-D-Phe-Gly-D-Phe-Dab(*R*)-D-Phe-Glu-Bal—TG

131 Boc-Lys-Dab(*R*)-Ile-Dab(*R*)-D-Phe-Dab(*R*)-D-Phe-Glu-Bal—TG

132 Boc-Lys-Dab(*R*)-D-Phe-Dab(*R*)-D-Ala-Dab(*R*)-D-Phe-Glu-Bal—TG

133 Boc-Lys-Dab(*R*)-D-Phe-Dab(*R*)-Gly-Dab(*R*)-D-Phe-Glu-Bal—TG

134 Boc-Lys-Dab(*R*)-Leu-Dab(*R*)-D-Phe-Dab(*R*)-Ala-Glu-Bal—TG

135 Boc-Lys-D-Ala-D-Phe-Dab(*R*)-Dab(*R*)-Dab(*R*)-Dab(*R*)-Glu-Bal—TG

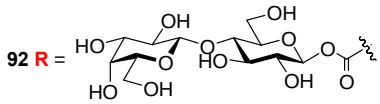
136 Boc-Lys-Dab(*R*)-Dab(*R*)-Dab(*R*)-Dab(*R*)-Leu-Ala-Glu-Bal—TG

Abb. 69 9 identifizierte Hitsequenzen aus dem Sreening der Bibliothek **92** mit Galektin-4 (2 x mono- (**128**, **129**), 1 x di- (**130**), 4 x tri- (**131-134**) und 2 x tetravalent (**135**, **136**))

Es ist bemerkenswert, dass ausschließlich Sequenzen bei denen Dab zur Anknüpfung des Laktosylcarbonats ***β*-12** diente, gefunden wurden. Evtl. ist dies auf eine für die Bindung benötigte Flexibilität der dargebotenen Zucker zurückzuführen. Da kein einziges Mal D-Dpr gefunden wurde ist auch denkbar, dass die Anknüpfung von ***β*-12** an D-Dpr aus sterischen Gründen nicht möglich. Die Beobachtungen bei der Synthese der Reaktion des Tetraamins **12**, bei Verwendung des Laktosylcarbonats ***β*-12** stützen diese Annahme (Vgl. Kap. 3.2.1). Es gelang nicht, mit Laktosylcarbonat ***β*-12** eine Vierfachsubstitution zu erreichen. Mit dem flexibleren Butenspacer-modifizierten Laktosylcarbonat **13** war hingegen eine Vierfach-substitution möglich.

In Tab. 9 sind die identifizierten Hitsequenzen in farblich codierter Form dargestellt.

Tab. 9 Farblich codierte Darstellung der Hitsequenzen **128-136** aus Sceening der Bibliothek **92** mit Galektin-4



	Sequenz (cyclisch)								Valenz
	1	2	3	4	5	6	7	8	
128	K	a	f	Dab	P	I	f	E	1
129	K	*G*	I	Dab	P	I	p	E	1
130	K	Dab	f	*G*	f	Dab	f	E	2
131	K	Dab	I	Dab	f	Dab	f	E	3
132	K	Dab	f	Dab	a	Dab	f	E	3
133	K	Dab	f	Dab	*G*	Dab	f	E	3
134	K	Dab	L	Dab	f	Dab	A	E	3
135	K	a	f	Dab	Dab	Dab	Dab	E	4
136	K	Dab	Dab	Dab	Dab	L	A	E	4

Wie für stark bindende Galektinliganden zu erwarten war, beinhaltet jede der gefundenen Sequenzen mindestens eine Laktoseeinheit. Da D-Phe in den Positionen 3, 5 und 7 in ca 50% aller Fälle gefunden wurde, ist eine Interaktionen der cyclischen Glycopeptide mit Galektin-4 durch π-Kation-Wechselwirkungen denkbar (Vgl. Kap. 3.4.2).

Betrachtet man die einzelnen Positionen so fällt auf, dass in den Positionen 2, 4 und 6 Dab besonders häufig vorliegt. In den Positionen 3, 5 und 7 in denen D-Phe eingebaut wurde, wurde diese Aminosäure auch vermehrt gefunden. Nicht gefunden wurden neben D-Dpr die Aminosäuren Val in Position 2 und 6 sowie Gly in Position 7.

Damit ein Einfluss der festen Phase bei den gefundenen Sequenzen ausgeschlossen werden kann, sollten in weiteren Arbeiten einzelne Sequenzen erneut synthetisiert und anschließend in Lösung untersucht werden.

Da Galektin-4 ein Vertreter der Tandem-Repeat-Typ Galektine ist und somit zwei ähnliche jedoch nicht identische CRDs besitzt, sollte im nächsten Schritt durch Screnning mit der N- bzw. der C-terminalen Domäne überprüft werden, welche der beiden CRDs für die Bindung verantwortlich ist. Abb. 70 zeigt, dass ausschließlich die CRD in der N-terminalen Domäne für die Bindung einzelner Bibliotheksmitglieder verantwortlich ist. Beim Screening mit der C-terminalen Domäne waren die Kugeln nahezu farblos.

N-terminale Domäne C-terminale Domäne

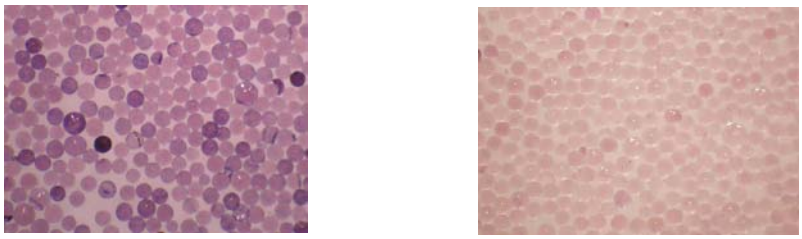


Abb. 70 Screnning der Glycopeptidbibliothek **92** mit der N-terminalen Domäne (links) bzw. C-terminalen Domäne (rechts) von Galektin-4

Ein Screening mit der N-terminalen Domän des Galektins-9 führte auch mit Bibliothek **92** nicht zum Erfolg. Die Harzkugeln zeigten lediglich schwache Intensitätsunterschiede in ihrer Anfärbung (entsprechend Abb. 66).

3.5.1. Unspezifische Wechselwirkung des Anti-Biotin-Antikörpers

Beim Screening der Glycopeptidbibliothek **92** wurde bei Verwendung des Anti-Biotin-Antikörper-Konjugats eine unerwartete Beobachtung gemacht. Das Screening mit Galektin-1

zeigte keine Anfärbung der Harzkugeln (Abb. 71). Bei den Screenings mit den Galektinen 3 und 4 sowie der N-terminalen Domäne von Galektin-9 konnten hingegen ca. 1% kontrastreich angefärbte Hitbeads beobachtet werden. Bei Betrachtung der Blindprobe (ohne Galektin) wurden jedoch auch ca. 1% falsch-positiv gefärbte Beads beobachtet. Somit schienen die zunächst gefundenen Hitbeads nicht auf einer spezifische Wechselwirkung der Galektine 3, 4 bzw. der N-terminalen Domäne von Galektin-9 mit einzelnen Bibliotheksmitgliedern zu beruhen sondern vielmehr auf einer Wechselwirkung des Antikörpters oder der daran gebundenen Phosphatase.

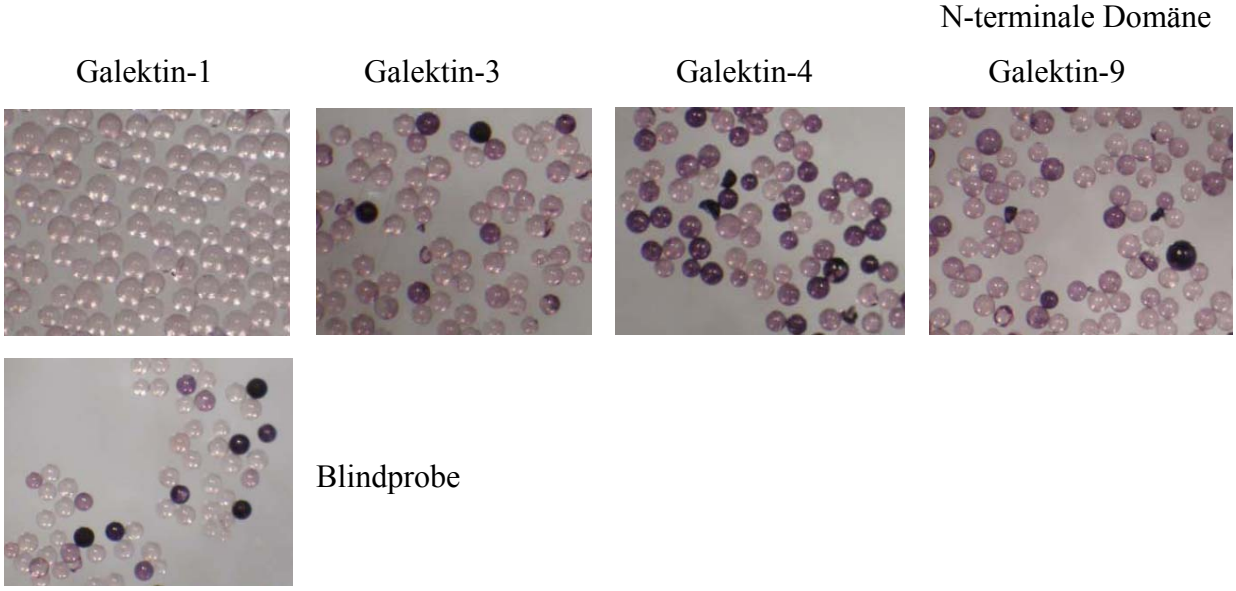


Abb. 71 Gefärbte Beads bei Inkubation der Bibliothek **92** mit dem Anti-Biotin-Antikörper/AP-Konjugat

Überraschend war jedoch, dass beim Screening mit Galektin-1 keine Hitbeads auftraten. Dies deutete darauf hin, dass die Inkubation mit Galektin-1 die Wechselwirkung des Anti-Biotion-AK/AP-Konjugats unterdrückte. Reduzierte man die Konzentration des zur Inkubation verwendeten Galektin-1, sollte die Wechselwirkung erneut beobachtet werden können. Abb. 72 zeigt die Screeningergebnisse bei Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von Galektin-1. Tatsächlich traten bei Konzentrationen ≤1 μg/mL erneut Hitbeads auf.

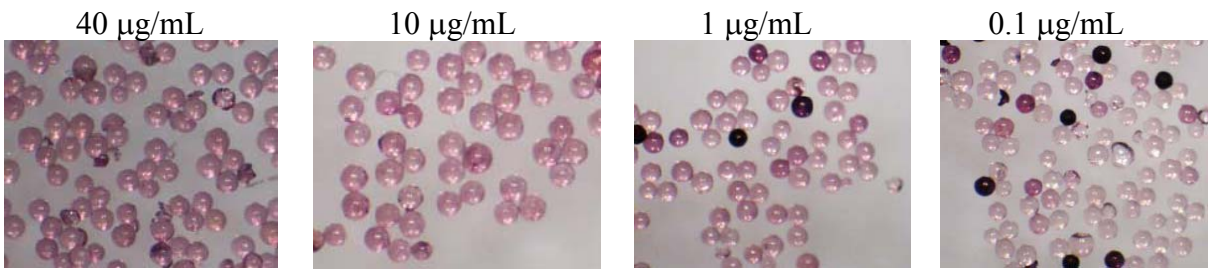


Abb. 72 Einfluss der Inkubation mit Galektin-1 auf die Wechselwirkung des Anti-Biotin-Antikörpers mit einzelnen cyclischen Glycopeptiden aus Bibliothek **92** (Durchmesser Harzkugeln = 130 μm)

Daraus lässt sich schließen, dass die vorherige Inkubation mit Galektin-1 ab einer Konzentration von 10 µg/mL dafür verantwortlich war, dass die falsch-positiven Hitbeads nicht gefunden wurden. Da bei Verwendung des Streptavidin/AP-Konjugat keine falsch-positiven Beads detektiert wurden, lässt sich die beobachtete Wechselwirkung dem Anti-Biotin-Antikörper-Anteil des Anti-Biotin-Antikörper/AP-Konjugats zuschreiben. Wodurch die selektive Wechselwirkung des Anti-Biotin-Antikörpers mit einzelnen Bibliotheks-mitgliedern der Bibliothek **92** zustande kam, konnte nicht geklärt werden. Von zwei stark gefärbten Harzkugeln wurden die Sequenzen ermittelt (Abb. 73). Die identifizierten Sequenzen **137** und **138** zeigten eine hohe Sequenzhomologie. An vier der sechs variablen Positionen waren die Aminosäuren identisch. In den beiden anderen Split&Mix-Positionen wurden ähnliche Aminosäuren (Val-Ile bzw. Ala-Leu) gefunden. Dass bei zwei untersuchten Verbindung die gefundenen Sequenzen zufällig eine solche Ähnlichkeit aufweisen ist unwahrscheinlich. Es könnte sich somit um ein Glycopeptidmotiv handeln, das selektiv an den Anti-Biotin-Antikörper bindet. Damit eine verlässliche Aussage gemacht werde kann, sollten weitere Sequenzierungen durchgeführt werden.

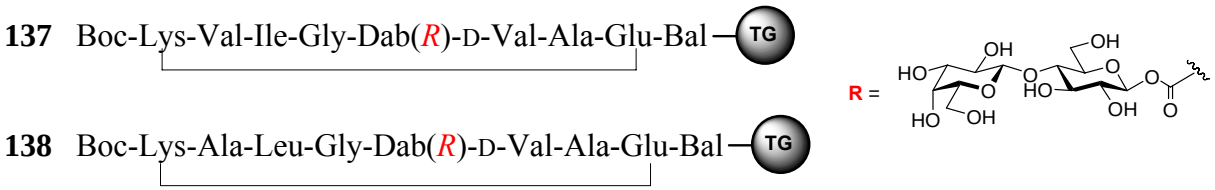


Abb. 73 Zwei Hitsequenzen **137** und **138** die spezifisch an den Anti-Biotin-Antikörper binden

4. Zusammenfassung und Ausblick

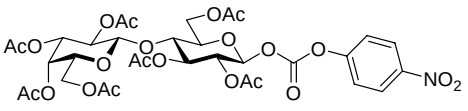
Kohlenhydrate sind in nahezu allen Lebewesen wichtige Informationsträger. Für die Erkennung, der durch die Kohlenhydrate verschlüsselten Information sind Proteine verantwortlich, die so genannten Lektine. Lektine bilden die Gruppe unter den zuckererkennenden Proteinen, die Kohlenhydrate weder modifizieren (Enzyme) noch den Immunoglobulinen (Antikörpern) zugeordnet werden. Auf Zelloberflächen spielen sie beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren[29], in der Zell-Zell-Kommunikation bei Entzündungsprozessen[7,8], bei der Anheftung von Viren oder Bakterien an Wirtszellen[9,10] oder auch beim Befruchtungsvorgang (Spermium/Eizelle)[11].

Ziel dieser Arbeit war es, hochaffine multivalente Lektinliganden zu identifizieren und damit einen Beitrag zum Verständnis der Lektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkung zu leisten. Bei den untersuchten Galaktose-spezifischen Lektinen handelte es sich um das aus der Mistel gewonnene Lektin *Viscum Album Agglutinin* (VAA) sowie zahlreiche Galektine tierischen Ursprungs.

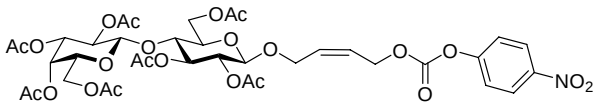
Zunächst wurden geeignete Kohlenhydratderivate benötigt, die sich in nahezu quantitativen Ausbeuten an aminofunktionalisierte Gerüststrukturen anknüpfen lassen. In dieser Arbeit wurden Carbonat-funktionalisierte Zuckerderivate eingesetzt, die sich durch die Reaktion mit Aminen quantitativ zu den entsprechenden Urethanen umsetzen ließen[65].

Als Erkennungseinheit der Lektine diente Laktose, da Laktose bereits als Monomer um einen Faktor 100 höhere Affinitäten als Galaktose aufweist[49]. Entsprechend musste eine stereoselektive Synthese zur Darstellung von Carbonat-funktionalisierten Laktosylderivaten gefunden werden.

Ausgehend von Laktose, konnte durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen in 3 Stufen selektiv das Laktosylcarbonat β-**12** (Abb. 74) erhalten werden. Die Synthese des Butenspacer-modifizierten β-Laktosylcarbonats **13** gelang in 4 Stufen.



β-**12**



13

Abb. 74 Laktosylcarbonate β-**12** und **13**

Die für die stereoselektive Darstellung der Laktosylcarbonate gefundenen Reaktionsbedingungen, zeigten auch bei der Darstellung weiterer Kohlenhydratcarbonate hohe Stereoselektivitäten. So gelang neben der α-selektiven Synthese des Carbonats der

Laktose die α-selektive Synthese der Carbonate von Mannose, Galaktose, Xylose, Lyxose, Rhamnose und Maltose sowie die selektive Synthese des β-Carbonats der Ribose. Die Differenzierung der α- und β-Anomeren bei 1,2-trans-Glycosylcarbonaten (Mannose, Lyxose, Rhamnose) erfolgte durch Messung entkoppelter ^{1}H-^{13}C-NMR-Spektren und Lösen der Kristallstruktur des Mannosylcarbonats**.**

Zur Darstellung erster multivalenter Lektinliganden wurden Laktosylcarbonate β-**12** bzw. **13** mit verschiedenen Aminen zu den Derivaten **47-52** in Ausbeuten von 70-99% bzw. **54-57** in Ausbeuten von 53-95% umgesetzt (Abb. 75).

Mit diesen Liganden konnten in der Arbeitsgruppe von Prof. Gabius in Zusammenarbeit mit Dr. Sabine André (LMU München) zahlreiche biologische Tests durchgeführt werden. Die metasubstituirten Derivate **50** und **54** zeigten eine erhöhte Affinität gegenüber Galektin-4.[80]

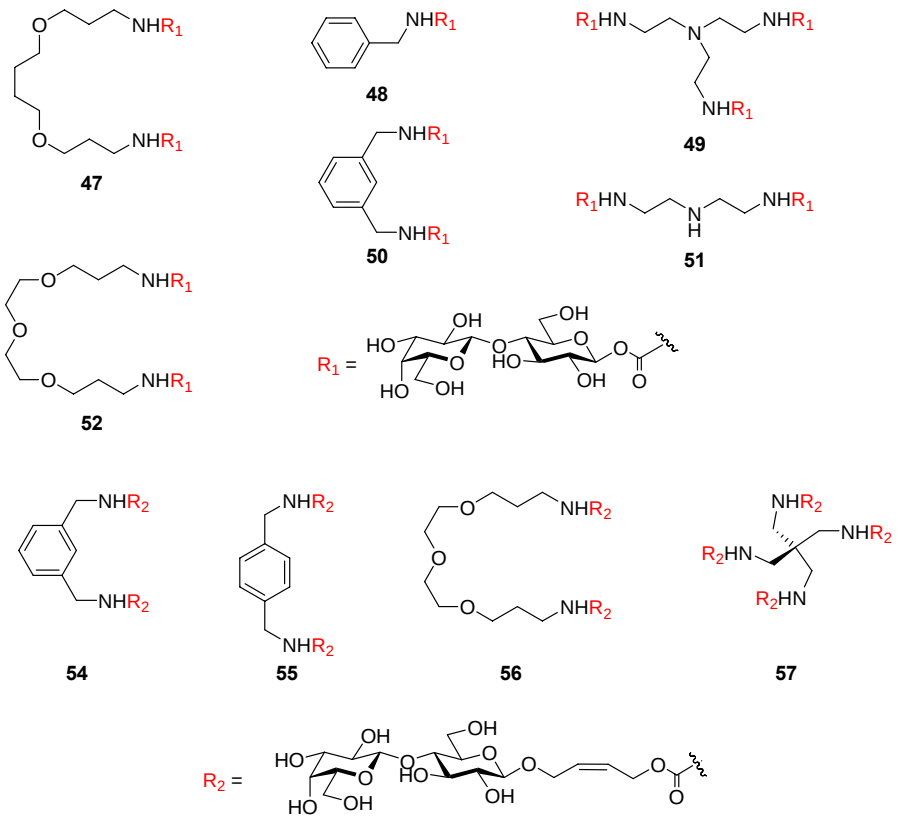


Abb. 75 Multivalente Lektinliganden **47-52** und **54-57**

Da die Anordnung der zuckererkennenden Domänen bei Lektinen oft nicht bekannt ist, erfolgte die Identifikation von weiteren Lektinliganden durch Screening von Substanzbibliotheken, bestehend aus cyclischen Neoglycopeptiden. Diese Strategie wurde bereits von Seeberger und Wittmann zur Identifikation hochaffiner WGA-Liganden erfolgreich eingesetzt[61]. Die Synthese der cyclischen Peptide geschah unter Anwendung der von Furka et al.[68] bzw. Lam et al.[69] 1991 entwickelten Split&Mix-Strategie. Die

Zuckeranknüpfung erfolgte an den Seitenketten der Diaminosäuren Diaminobutter- und Diaminopropionsäure. Nach Umsetzung der cyclischen Glycopeptidbibliotheken mit den Laktosylcarbonaten *β*-**12** bzw. **13** erhielt man die aus 13500 Verbindungen bestehenden Neoglycopeptidbibliotheken **92** und **93** (Abb. 76).

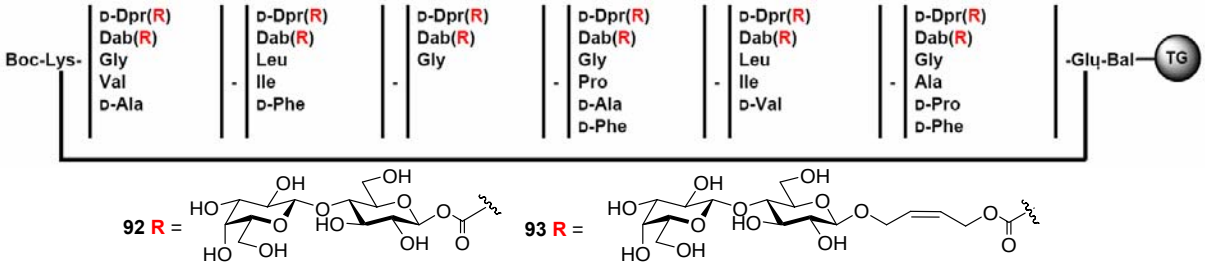


Abb. 76 Neoglycopeptidbibliotheken **92** und **93**

Nach Optimierung der Screeningbedingungen, gelang durch Screening der Bibliothek **93** die Identifikation 12 potenter Liganden für das Mistellektin VAA. VAA ist ein Galaktose-spezifisches Lektin aus der Gruppe der pflanzlichen AB-Toxine. Die B-Kette beinhaltet die Galaktose erkennenden Domänen und ist somit der Lektinanteil. Die A-Kette besitzt eine rRNA N-Glycosidase Aktivität und hat die Fähigkeit irreversibel die Proteinbiosynthese zu inhibieren[24]. Durch die Verknüpfung der cytotoxischen Proteinkomponente mit einer Galaktose erkennenden Untereinheit wird eine selektive und effiziente Aufnahme in die entsprechend glycosylierten Zellen garantiert. Die Cytotoxizität wird dadurch deutlich erhöht. Tab. 10 zeigt die gefundenen Sequenzen in farblich codierter Darstellung. Die Seitenketten der Diaminosäuren Dab und D-Dpr dienten der Zuckeranknüpfung.

Tab. 10 12 Gefunden Hitsequenzen aus dem Screening der Bibliothek **93** mit VAA. (Kleine Buchstaben stehen für D-, große für L-Aminosäure)

	Sequenz (cyclisch)								Valenz
	1	2	3	4	5	6	7	8	
99	K	V	Dab	*G*	a	L	A	E	1
100	K	V	f	dpr	f	dpr	Dab	E	3
101	K	Dab	Dab	Dab	a	I	f	E	3
102	K	Dab	Dab	Dab	f	v	f	E	3
103	K	dpr	f	dpr	*G*	L	Dab	E	3
104	K	V	Dab	dpr	dpr	I	f	E	3
105	K	dpr	L	dpr	dpr	v	f	E	3
106	K	Dab	Dab	dpr	f	I	Dab	E	4
107	K	dpr	f	dpr	f	dpr	Dab	E	4
108	K	dpr	f	dpr	f	Dab	Dab	E	4
109	K	dpr	Dab	dpr	dpr	dpr	f	E	5
110	K	dpr	f	Dab	Dab	Dab	Dab	E	5

Die Verbindungen **99**, **100** und **107** unterschiedlicher Valenz wurden einzeln an fester Phase nachsynthetisiert und nach Abspaltung vom Harz (**111-113**) in Lösung weiter untersucht (Abb. 77).

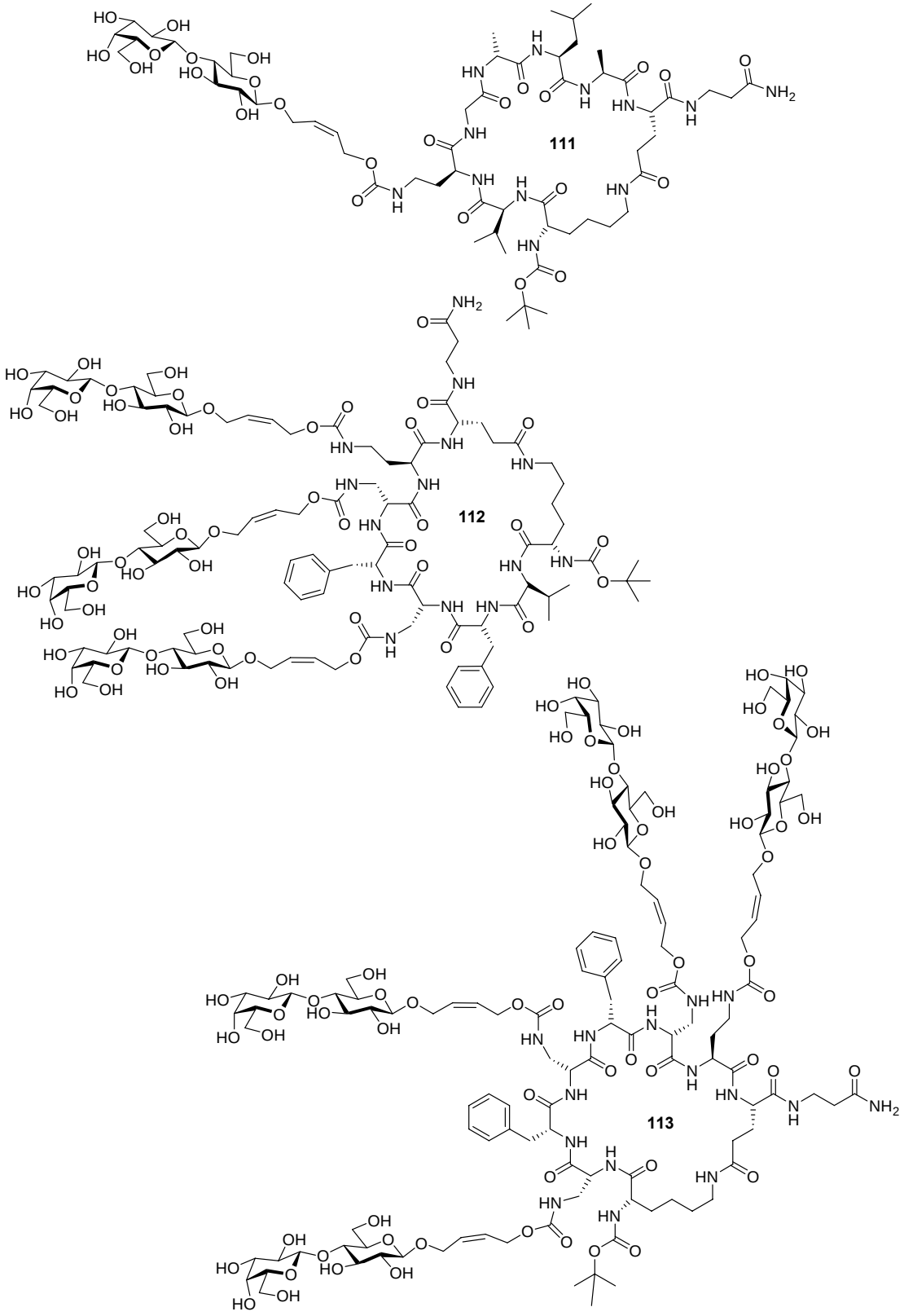
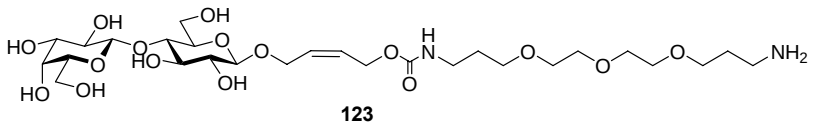


Abb. 77 Cyclische Neoglycopeptide **111-113**

Die Affinitäten der ausgewählten Hitsequenzen in Lösung wurden durch einen Enzymimmuno-Lektinbindungstest (enzyme-linked immuno sorbent lectin assay, ELISLA) getestet. Für den Test wurde ein aminofunktionalisiertes Laktosylderivat **123** benötigt (Abb. 78).



123

Abb. 78 Für die Immobilisierung benötigtes aminofunktionalisiertes Laktosylderivat **123**

Dieses war ausgehend von Laktosylcarbonat **13** in 3 Schritten zugänglich. Die Immobilisierung erfolgte an zuvor mit Phenylendiisothiocyanat (PDITC) **125** modifizierten Platten (Abb. 79).

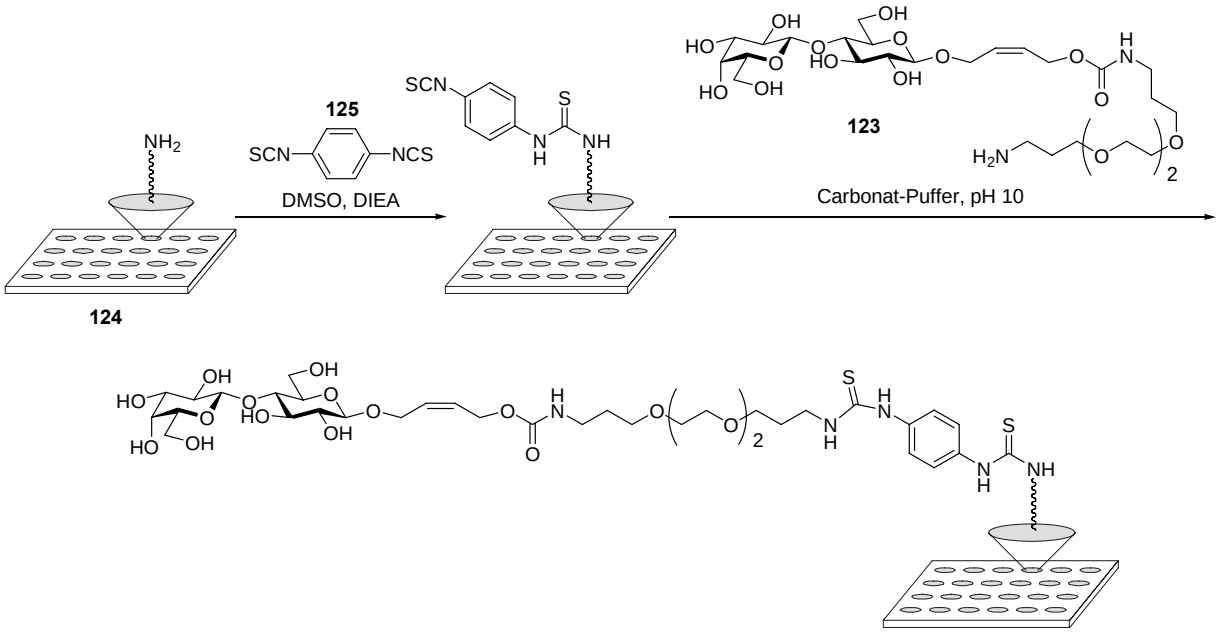


Abb. 79 Immobilisierung des aminofunktionalisierten Laktosederivats **123** an aminofunktionalisierten Mikrotiterplatten **124**

Beim anschließenden ELISLA zeigte sich, dass die ermittelten IC_{50}-Werte der cyclischen Neoglycopeptide **111-113** unabhängig von ihrer Valenz zwei Größenordnungen geringer waren, als der von Laktose (IC_{50}-Werte: Laktose = 1 mM, **111** = 10-20 µM, **112**, **113** = 1-10 µM). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die hohe Affinität an fester Phase mit der in Lösung korreliert.

Die Identifikation potenter Liganden für Galektin-4 gelang durch Screening der Bibliothek **92**. Galektin-4 ist aus der Familie der Galektine ein Vertreter des Tandem-Repeat-Typs, d.h. es besitzt zwei CRDs innerhalb eines Proteins. Es wird vermutet, dass Galektin-4 beim chronischen Verlauf von Entzündungsprozessen des Darms eine wesentliche Rolle spielt[8].

Die durch Edman-Abbau identifizierten Sequenzen aus dem Screening mit Galektin-4 sind in Tab. 11 in farblich codierter Form dargestellt.

Tab. 11 10 Hitsequenzen aus dem Screening der Bibliothek **92** mit Galektin-4. (Kleine Buchstaben stehen für D-, große für L-Aminosäuren)

	Sequenz (cyclisch)								Valenz
	1	2	3	4	5	6	7	8	
128	K	a	f	Dab	P	I	f	E	1
129	K	*G*	I	Dab	P	I	p	E	1
130	K	Dab	f	*G*	f	Dab	f	E	2
131	K	Dab	I	Dab	f	Dab	f	E	3
132	K	Dab	f	Dab	a	Dab	f	E	3
133	K	Dab	f	Dab	*G*	Dab	f	E	3
134	K	Dab	L	Dab	f	Dab	A	E	3
135	K	a	f	Dab	Dab	Dab	Dab	E	4
136	K	Dab	Dab	Dab	Dab	L	A	E	4

In weiterführenden Arbeiten sollten einzelne Vertreter dieser Hitsequenzen erneut synthetisiert und in Lösung mittels eines ELISLAs getestet werden. Damit lassen sich evtl. vorhandene Einflüsse der festen Phase ausschließen.

Beim Screening der Glycopeptidbibliothek **92** konnten zudem zwei Sequenzen identifiziert werden, die auf eine spezifische Wechselwirkung des Anti-Biotin-Antikörpers mit einzelnen Bibliotheksmitgliedern zurückzuführen waren (Tab. 12). Zur Erhöhung der Aussagekraft sollten weitere Sequenzen aufgeklärt werden.

Tab. 12 2 Hitsequenzen aus dem Screening der Bibliothek **92** basierend auf einer spezifischen Wechselwirkung des Anti-Biotin-Antikörpers. (Kleine Buchstaben stehen für D-, große für L-Aminosäuren)

	Sequenz (cyclisch)								Valenz
	1	2	3	4	5	6	7	8	
137	K	V	I	*G*	Dab	v	A	E	1
138	K	A	L	*G*	Dab	v	A	E	1

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch das Screening von Bibliotheken bestehend aus cyclischen Neoglycopeptiden affine Lektinliganden identifiziert werden. Durch die Anwendung dieser Strategie, in Verbindung mit den in dieser Arbeit etablierten stereoselektiven Syntheserouten weiterer Kohlenhydratcarbonate, werden zahlreiche Möglichkeiten für die Suche nach Zielstrukturen weiterer Lektine eröffnet.

5. Experimenteller Teil

5.1. Allgemeine Angaben

Die analytische **Dünnschichtchromatographie** erfolgte unter Verwendung von mit Kieselgel 60 F_{254} beschichteten Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (Merck Nr. 5554; 0.2 mm Schichtdicke). UV-aktive Substanzen wurden bei 254 nm (Absorption) und 366 nm (Fluoreszenz) detektiert. Des Weiteren wurden folgende Färbereagenzien verwendet:

Cer-Reagenz, 5 g Phosphormolybdänsäure, 25 mL konz. H_2SO_4, 2.5 g $Ce(SO_4)_2$ x H_2O, und 225 mL dest. Wasser

Kaliumpermanganat-Lösung, 1%ige Lösung in 1 M wässriger Na_2CO_3-Lösung

15% Schwefelsäure in Ethanol

3 g **Ninhydrin** in 100 mL Ethanol

Die DC-Folien wurden nach Behandlung mit einem dieser Tauchreagenzien durch Wärmebehandlung visualisiert. Alle R_f-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt.

Für die **Flash-Chromatographie** wurde Kieselgel 60 der Firma Merck (Nr. 9385) mit einer Korngröße von 40 – 63 µm verwendet. Technische Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert.

RP-HPLC-Analytik und **-Trennung** erfolgte an einer LC-20A prominence-Anlage (Hochdruckpumpen LC-20AT, Autosampler SIL-20A, Säulenofen CTO-20AC, Detektor SPD-M20A, Controller CBM-20A und Software LC-Solution) der Firma Shimadzu. Verwendung fanden Nucleosil 100-5 C-18 Säulen (analytisch 4*250 mm, Flussrate 1.0 mL/min; präparativ 8*250 mm, Flussrate 4 mL/min) der Firma Knauer. Als Eluent diente:

A: 0.1% TFA in H_2O; B: 0.1% TFA in MeCN

Die gemessenen **Kernresonanzspektren** wurden an den Geräten AC 250 und Avance DRX 600 der Firma Bruker aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ (ppm) wurde auf das

jeweilige Lösungsmittelsignal referenziert. Als Lösungsmittel (nicht vollständig deuteriert) wurden D_2O (δ_H = 4.63 ppm), D_3COD (δ_H = 4.87 ppm, δ_C = 49.15 ppm), $CDCl_3$ (δ_H = 7.26 ppm, δ_C = 77.0 ppm), DMSO-d_6 (δ_H = 2.50 ppm, δ_C = 39.5 ppm) verwendet. Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme von zweidimensionalen Spektren (DQF-COSY, HMQC, ROESY). Alle Spektren wurden bei 300 K gemessen.

UV-Absorptionsspektren wurden mit einem Cary 50 – Einstrahlspektrometer von Varian in Präzisions-Küvetten aus Quarzglas Suprasil aufgenommen.

Als **Bestrahlungsapparaturen** zur photochemischen Abspaltung der Peptide vom Harz diente die Lumatec-Lampe (Typ: Superlite-SUV-DC-P) mit einer Wellenlänge von 366 nm und einer Leistungsaufnahme von max. 360 VA.

Die **Röntgenstrukturanalyse** wurde an einem STOE IPDS–II Diffraktometer ausgerüstet mit einer Graphit monochromisierten Strahlungsquelle (λ = 0.71073 Å) und einem Image Plate Detektionsystem durchgeführt. Die Auswahl, Integration und Mittelung der gemessenen Reflexintensitäten, die Bestimmung der Elementarzelle mit einem Least-Square Fit der 2Q (ϑ) Werte, Datenreduktion, LP Korrektur und die Bestimmung der Raumgruppe erfolgte mit dem X-Area Softwarepaket. Nach Indizierung der Kristallflächen wurde eine semiempirische Absorptionskorrekturmethode angewandt. Die Struktur wurde mit direkten Methoden (SHELXS-97)3333 und Standard Fourier-Techniken (F2 mit einem Full-Matrix Least-Squares Algorithmus (SHELXL-97 und WinGX (1.70)34)) ermittelt.
Die **Synthese einzelner Peptide** erfolgte an einem automatisierten Peptidsynthesizer ABI 433A von Applied Biosystems unter Verwendung der FastMoc-Chemistry-Datei.

Die **Edmansequenzierung** erfolgte am automatisierten Peptid-Sequenzierer von Applied Biosystems Model 494 Procise Sequencer verbunden mit dem HPLC-System Model 140C und einem programmierbaren Absorptionsdetektor 785A. Alle verwendeten Lösungsmittel wurden in “sequencing grade purity“ (Applied Biosystems) eingesetzt. Die Sequenzdaten wurden mit dem Model 610 A Data Analysis ausgewertet.

Position	**Reagenzien / Lösungsmittel**

R1	5% PITC in n-Heptan, 40 mL
R2C	*N*-Methylpiperidin in Isopropanol, Butanol, Wasser
R3	Trifluoressigsäure, 40 mL
R4A	25% Trifluoressigsäure in Wasser, 40 mL
R5B LM	MeCN/AcetylCys, 40mL
R5 PTH	20 Aminosäuren PTH Standard
S1	Heptan, 200 mL
S2B	Ethylacetat, 450 mL
S3	n-Butylchlorid, 200 mL
S4B	20% MeCN in Wasser
A3	3.5% THF in Wasser, 1 L
B2	Isopropanol und MeCN, 1 L
Vorgemixter Puffer	Vorgemixtes Pufferkonzentrat, 100 mL
Säule	SPHERI-5 PTH 5UM 0.2X22CM

MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem Biflex III Massenspektrometer der FirmaBruker Daltonics im positiven Modus mit einem gepulsten Stickstofflaser (337 nm) aufgenommen. Als Matrix wurde CHCA oder DHB verwendet. Zur Probenpräparation wurden je 0.5 µL der Matrixlösung und 0.5 µL der Probenlösung (ca. 1 mg/mL) auf das Target pipettiert und bei Raumtemperatur kristallisiert.

ESI-IT-Massenspektren wurden an einem Esquire 3000 plus der Firma Bruker Daltonics im positiven oder negativen Modus gemessen. Die Proben (ca. 1 µg/mL in Methanol) wurden dabei mit einer Flussrate von 3 µL/min eingespritzt.

Die **Elementaranalysen** wurden an einem Gerät der Firma Foss-Heraeus (CHN-O-Rapid) durchgeführt.

5.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften

5.2.1. AAVs für die Synthese in Lösung

AAV 1a: Synthese von p-Nitrophenylcarbonat-funktionalisierten Zuckerderivaten

Das anomer entschützte Zuckerderivat wird in CH_3CN gelöst (0.03 M), auf 0°C gekühlt und mit 1.1-1.5 eq Chlorameisensäurenitrophenylester, gelöst in Acetonitril, und 1.1-1.5 eq Lutidin versetzt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen und je 1 x mit Wasser, 1 M HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch getrennt oder aus PE/EE umkristallisiert. Das gereinigte Produkt wird im Ölpumpenvakuum getrocknet.

AAV 1b: Synthese von p-Nitrophenylcarbonat-funktionalisierten Zuckerderivaten

Das anomer entschützte Zuckerderivat wird in CH_3CN gelöst, mit 1.1-1.5 eq Chlorameisensäurenitrophenylester, gelöst in Acetonitril, und 1.1-1.5 eq DMAP versetzt. Nach Beendigung der Reaktion (innerhalb weniger Minuten) wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Essigsäureethylesther aufgenommen und je 1 x mit Wasser, 1M HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet das Lösungsmittel am Rotationsverdamfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch getrennt oder aus PE/EE umkristallisiert. Das gereinigte Produkt wird im Ölpumpenvakuum getrocknet.

AAV 2: Kupplung von p-Nitrophenylcarbonaten an primäre Amine

Das Carbonat-funktionalisierte Zuckerderivat wird in geringem Überschuss (1.1-1.3 eq pro Aminogruppe), gelöst in abs. Dichlormethan (3-10 mL pro mmol Zuckerderivat), vorgelegt. Dazu gibt man das Amin und DIEA (1 eq pro Aminogruppe), wobei sich die Lösung gelb färbt. Nach Beendigung der Reaktion – die Reaktionskontrolle erfolgt durch Dünnschicht-chromatographie – wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch getrennt. Das erhaltene Produkt wird im Ölpumpenvakuum getrocknet.

AAV 3a: Deacetylierung mit NaOMe/MeOH

Zu einem in 4-7 mL Methanol gelösten acetylierten Liganden wird 0.5 M methanolischen NaOMe-Lösung (250 µL pro mmol Zuckerderivat) gegeben. Nach vollständiger Deacetylierung wird ggf. entstandener Niederschlag durch Zugabe von dest. Wasser oder MeOH in Lösung gebracht und mit saurem Ionenaustauscher (H^+-Form, DOWEX 50 WX 8 oder Amberlite IRC-86) neutralisiert. Der Ionenaustauscher wird anschließend abfiltriert und mit MeOH und H_2O gewaschen. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingeengt und anschließend gefriergetrocknet.

AAV 3b: Deacetylierung mit $EtNMe_2$/MeOH

Zum acetylierten Liganden wird $EtNMe_2$:MeOH / 5:1 (15-30 mL pro mmol acetyliertem Zuckerderivat) gegeben. Nach vollständiger Deacetylierung wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet.

5.2.2. AAVs für die Festphasensynthese

AAV 4: Peptidkupplung an fester Phase

Das Harz wird in eine Einwegspritze mit eingesetzter Fritte eingewogen. Zunächst lässt man 3 Minuten in DMF (0.5 mL für 100 mg Harz) quellen. Anschließend wird zweimal eine Lösung aus 20% Piperidin in DMF (0.5 mL für 100 mg Harz) aufgezogen und einmal 3 und einmal 10 Minuten geschüttelt. Es folgen 10 Waschschritte á 1 Minute mit DMF (0.5 mL für 100 mg Harz). Die anzukuppelnde Aminosäure (4 eq), HBTU (3.8 eq), HOBt (6 eq) und DIEA (8 eq) werden in NMP (0.5 – 2 mL) gelöst und aufgezogen. Nach 1 bis 3 Stunden Reaktionszeit wird zehnmal eine Minute mit DMF (0.5 mL für 100 mg Harz) sowie zweimal drei Minuten mit CH_2Cl_2 (0.5 mL für 100 mg Harz) gewaschen. Das Harz wird im Vakuum getrocknet und die Überprüfung der Vollständigkeit der Kupplung mit Kaiser-Test nach **AAV 5** und TNBS-Test nach **AAV 6** überprüft.

Zur Bestimmung der Beladungsdichte wird eine kleine Menge Harz (3 – 5 mg) mit 20% Piperidin in DMF (10 mL) 15 Minuten behandelt. Von dieser Lösung wird eine Verdünnungsreihe hergestellt und die UV-Absorption bei 301 nm in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Über die Gleichung der Eichgeraden

$$E = 0.0077 \cdot c$$

mit E = Extinktion (bei 301 nm), c = Konzentration in µmol/L, wird die Konzentration der Abspaltlösung und darüber die Beladung berechnet.

AAV 5: Kaiser-Test[100]

Die bei unvollständiger Kupplung verbleibenden primären Aminogruppen können mit Hilfe des Kaiser-Tests detektiert werden. Man entnimmt eine Spatelspitze Harz und überführt diese in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß. Durch Zugabe von je drei Tropfen der folgenden Lösungen 1-3 und anschließender Erwärmung für 5 Minuten auf 80°C im Wasserbad, färben sich die Harzkugeln bei unvollständiger Kupplung blau.

Lösung 1: 5 g Ninhydrin in 100 mL Ethanol
Lösung 2: 2 mL 0.001 M KCN_{aq} in 98 mL Pyridin
Lösung 3: 80 g Phenol in 20 mL Ethanol

AAV 6: TNBS-Test[99]

Die bei unvollständiger Kupplung verbleibenden primären Aminogruppen können mit Hilfe des TNBS-Tests detektiert werden. Man entnimmt wenige Kugeln Harz (10-30) und überführt diese in eine Petrischale. Durch Zugabe von je einem Tropfen der folgenden Lösungen 1-3 färbt sich im Falle noch freier Aminogruppen das Harz orange. Durch Betrachtung der Kugeln unter dem Mikroskop ist dies besonders gut erkennbar.

Lösung 1: 1 M TNBS in dest. Wasser
Lösung 2: 10% DIEA in DMF

AAV 7: Abspaltung der Ddv/Dmab-Gruppe

Zunächst wird das Harz 15 Minuten mit DMF gequollen. Die Abspaltung erfolgt durch Zugabe von 4%iger Hydrazinhydrat-Lösung in DMF und ca. 80 eq Allylalkohol pro Aminogruppe (1 mL pro 100 mg Harz). Durch Zugabe eines großen Überschusses von Allylalkohl wird eine ungewünschte Reduktion der Alloc-Schutzgruppen vermieden. Die Vollständigkeit der Abspaltung wird durch Absorptionsmessung im Wellenlängenbereich von 250 – 350 nm der jeweiligen Abspaltlösung detektiert. Anschließend wird erneut zweimal für 2 Minuten mit DMF gewaschen.

AAV 8: Cyclisierung an der festen Phase

Das Harz wird mit NMP gequollen. Die Cyclisierung erfolgt durch Zugabe von PyBOP (4 eq), HOAt (8 eq) und DIEA (8eq) gelöst in NMP (0.5 mL pro 100 mg Harz) für mindestens 48 Stunden. Nach dem Testauf freie Aminogruppen nach **AAV 5** und **AAV 6** wird ggf. erneut bis zur Vollständigkeit cyclisiert. Nach vollständiger Cyclisierung wird 10 x 2 Minuten mit DMF und 2 x mit CH_2Cl_2 gewaschen.

AAV 9: Abspalten der Alloc-Schutzgruppe

Zunächst wird das Harz mit CH_2Cl_2 gequollen. Dann wird 2 x 20 Minuten mit einer Lösung von $[Pd(PPh_3)_4]$ und $BH_3 \cdot NMe_2$ in CH_2Cl_2 abgespalten. Anschließend wird 2 x 1 Minute mit DMF, 2 x mit 0.5%iger Natriumdiethyldithiocarbamat, 10 x mit DMF/DMSO und 2x mit DMF gewaschen.

AAV 10: Ankupplung der p-Nitrophenylcarbonat-funktionalisierten Zucker

Zum zuvor in NMP gequollenen Harz wird eine Lösung des Carbonat-funktionalisierten Zuckerderivats (2 eq) und DIEA (2 eq) in NMP gegeben. Nach 12 Stunden wird die Vollständigkeit der Reaktion durch Überprüfung auf freie Aminogruppen nach **AAV 6** getestet und ggf. erneut bis zur Vollständigkeit der Reaktion mit Carbonat-funktionalisiertes Zuckerderivat zugegeben. Nach Beendigung der Reaktion wird 15 x 1 Minute und 2 x 3 Minuten mit CH_2Cl_2 gewaschen.

AAV 11: Deacetylierung an fester Phase mit NaOMe/MeOH/$CHCl_3$

Zu einem Gemisch aus Methanol und $CHCl_3$ wird 5.4 M methanolischen NaOMe-Lösung (25 µL pro mmol Zuckerderivat) gegeben. Diese Lösung wird in die mit Harz gefüllte Spritze aufgezogen. Nach 3-6 Stunden wird eine Lösung aus Methanol und 5.4 M methanolischen NaOMe-Lösung (25 µL pro mmol Zuckerderivat) hergestellt und diese in die Spritze aufgezogen. Nach weiteren 3-6 Stunden wird 5 x 1 Minuten mit MeOH, 5 x 1 Minute mit DMF und 2 x 3 Minuten mit CH_2Cl_2 gewaschen und das Harz anschließend im Vakuum getrocknet.

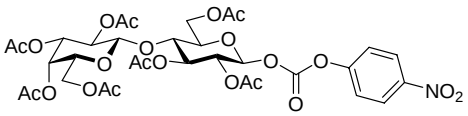
AAV 12: Abspaltung vom Sieber-Amid-Harz

Das Harz wird mit CH_2Cl_2 gequollen und anschließend mit einer Lösung von TFA/TIS/CH_2Cl_2 1:1:98 (0.5 mL für 100 mg Harz) 1 x 10 und 4 x 2 Minuten geschüttelt. Danach wird das Harz je 2 x mit TFE, TFE/MeOH, MeOH und CH_2Cl_2 gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit Pyridin neutralisiert und das Lösungsmittel am

Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in MilliQ und TFE gelöst und auf das 10-15fache Volumen eiskalten *tert*-Butylmethylethers getropft, wobei das Glycopeptid ausfällt. Nach Ruhen über Nacht wird bei 6400 g für 20 Minuten zentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Man resuspendiert das Pellet in *tert*-Butylmethylether und zentrifugiert erneut. Dies wird nochmals wiederholt. Dann wird das Glycopeptid in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Anschließend wird das Produkt mittels RP-HPLC (Nucleosil C18, Knauer, analytisch: 250 mm, 4 mm ID, präparativ: 250 mm, 8 mm ID) mit einem Gradienten von 20-80% Acetonitril (Eluenten B) in 30 Minuten isoliert.

5.3. Chemische Arbeiten

5.3.1. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-(*p*-nitrophenoxycarbonyl)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-*β*-D-glukopyranosid (*β*-12)



$C_{33}H_{39}NO_{22}$

801.66 g/mol

8.6 g (13.5 mmol) der Verbindung **16** wurden analog **AAV 1a** mit 2.89 g (14.3 mmol) Chlorameisensäureester **17** in 430 mL MeCN umgesetzt. Nach Umkristallisation aus PE/EE erhielt man 5.40 g (50%) des Derivats *β*-**12** als weißen Feststoff.

DC: R_f = 0.47 (PE:EE / 1:2)

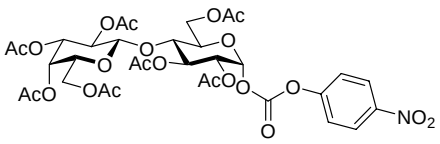
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 8.30-8.28 (m, 2 H, Ar), 7.42-7.40 (m, 2 H, Ar), 5.63 (d, J = 7.8 Hz, 1 H, H-1^{Glc}), 5.35 (dd, J = 3.4 Hz, J = 0.8 Hz, 1 H, H-4^{Gal}), 5.26 (t, J = 9.0 Hz, 1 H, H-3^{Glc}), 5.15-5.10 (m, 2 H, H-2^{Glc}, H-2^{Gal}), 4.96 (dd, J = 10.4 Hz, J = 3.2 Hz, 1 H, H-3^{Gal}), 4.53-4.49 (m, 2 H, H-6^{Glc}, H-1^{Gal}), 4.16-4.06 (m, 3 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.94-3.88 (m, 2 H, H-4^{Glc}, H-5^{Gal}), 3.83-3.81 (m, 1 H, H-5^{Glc}), 2.16 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.13 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.09 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.07 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.05 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 3 H, C(O)CH_3), 1.97 (s, 3 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.4, 170.2, 170.1, 169.6, 169.4, 169.0 (*C*(O)CH_3), 154.7 (OC(O)O), 150.7, 145.7, 125.4, 121.6 (Ar), 101.0 (C-1^{Gal}), 95.7 (C-1^{Glc}), 75.3 (C-4^{Glc}), 73.7 (C-5^{Glc}), 72.6 (C-3^{Glc}), 71.0 (C-3^{Gal}), 70.7 (C-5^{Gal}), 70.2 (C-2^{Glc}), 69.0 (C-2^{Gal}), 66.5 (C-4^{Gal}), 61.4 (C-6^{Glc}), 60.8 (C-6^{Gal}), 20.8-20.5 (C(O)*C*H_3),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 824.2	m/z = 840.2
	gef.:	m/z = 824.1	m/z = 840.0

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 49.44	H: 4.90	N: 1.75
	gef.:	C: 48.98	H: 5.22	N: 1.82

5.3.2. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-(*p*-nitrophenoxycarbonyl)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-α-D-glukopyranosid (α-12)



$C_{33}H_{39}NO_{22}$

801.66 g/mol

100 mg (0.16 mmol) der Verbindung **16** wurden analog **AAV 1b** mit 48 mg (0.24 mmol) Chlorameisensäureester **17** in 4 mL MeCN umgesetzt umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Trennung (PE:EE = 1:1 → 1:2) erhielt man 122 mg (95%) des Derivats α-**12** als weißen Feststoff.

DC: R_f = 0.45 (PE:EE / 1:2)

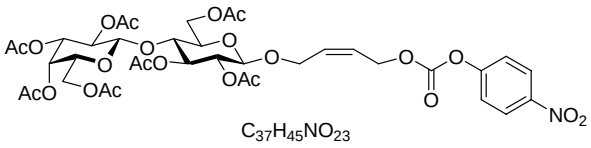
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 8.30-8.28 (m, 2 H, Ar), 7.43-7.42 (m, 2 H, Ar), 6.20 (d, J = 3.6 Hz, 1 H, H-1^{Glc}), 5.54 (dd, J = 10.1 Hz, J = 9.5 Hz, 1 H, H-3^{Glc}), 5.35 (dd, J = 3.3 Hz, J = 0.7 Hz, 1 H, H-4^{Gal}), 5.12 (dd, J = 10.4 Hz, J = 7.9 Hz, 1 H, H-2^{Gal}), 5.07 (dd, J = 10.3 Hz, J = 3.6 Hz, 1 H, H-2^{Glc}), 4.96 (dd, J = 10.4 Hz, J = 3.5 Hz, 1 H, H-3^{Gal}), 4.53-4.51 (m, 2 H, H-6^{Glc}, H-1^{Gal}), 4.17-4.06 (m, 4 H, H-5^{Glc}, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.91-3.87 (m, 2 H, H-4^{Glc}, H-5^{Gal}), 2.15 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.13 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.07 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.05 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 3 H, C(O)CH_3), 1.95 (s, 3 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.2, 170.1, 170.0, 170.0, 169.7, 169.4, 168.9 (*C*(O)CH_3), 154.9 (OC(O)O), 150.7, 145.6, 125.4, 121.4 (Ar), 101.0 (C-1^{Gal}), 94.0 (C-1^{Glc}), 75.2 (C-4^{Glc}), 71.3 (C-5^{Glc}), 70.9 (C-3^{Gal}), 70.7 (C-5^{Gal}), 79.3 (C-2^{Glc}), 69.1 (C-3^{Glc}), 69.0 (C-2^{Gal}), 66.5 (C-4^{Gal}), 61.1 (C-6^{Glc}), 60.7 (C-6^{Gal}), 20.7-20.4 (C(O)*C*H),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 824.2	m/z = 840.2
	gef.:	m/z = 824.0	m/z = 839.9

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 49.44	H: 4.90	N: 1.75
	gef.:	C: 49.24	H: 4.98	N: 1.76

5.3.3. [(Z)-4-(p-Nitrophenoxycarbonyloxy)-but-2-en-1-yl]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-β-D-glukopyranosid (13)



$C_{37}H_{45}NO_{23}$

871.75 g/mol

Verbindung **21** (1.72 g, 2.43 mmol) wurde entsprechend **AAV 1** mit **17** (0.59 g, 2.92 mmol) und Pyridin (0.24 mL, 2.92 mmol) umgesetzt. Nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (PE:EE / 1:1 → 1:2) wurden 1.84 g (87%) des Butenspacer-modifizierten Laktosylcarbonats **13** erhalten.

DC: R_f = 0.50 (PE:EE / 1:2)
R_f = 0.20 (PE:EE / 1:1)

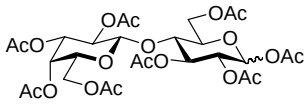
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 8.29-8.28 (m, 2 H, Ar), 7.39-7.37 (m, 2 H, Ar), 5.83-5.78 (m, 2 H, Vinyl-H), 5.34 (d, *J* = 3.0 Hz, 1 H, H-4^{Gal}), 5.19 (d, *J* = 9.3 Hz, 1 H, H-3^{Glc}), 5.09 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 7.9 Hz, 1 H, H-2^{Gal}), 4.95 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 3.4 Hz, 1 H, H-3^{Gal}), 4.90 (dd, *J* = 9.4 Hz, *J* = 8.0 Hz, 1 H, H-2^{Glc}), 4.87-4.79 (m, 2 H, Allyl-H), 4.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, H-1^{Glc}), 4.51 (dd, *J* = 11.8 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1 H, H-6^{Glc}), 4.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, H-1^{Gal}), 4.34 (ddd, *J* = 18.6 Hz, *J* = 13.3 Hz, *J* = 4.2 Hz, 2 H, Allyl-H), 4.14-4.05 (m, 3 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.86 (bt, *J* = 6.9 Hz, 1 H, H-5^{Gal}), 3.80 (t, *J* = 9.4 Hz, 1 H, H-4^{Glc}), 3.60 (ddd, *J* = 9.8 Hz, *J* = 4.7 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1 H, H-5^{Glc}), 2.14 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.11 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.05 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.03 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.01 (s, 3 H, C(O)CH_3), 1.96 (s, 3 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.3, 170.3, 170.1, 170.0, 169.7, 169.6, 169.0 (*C*(O)CH_3), 155.4 (OC(O)O), 152.3, 145.5 (Ar), 130.8, 126.0 (Olefin CH), 125.3, 121.7 (Ar), 101.1 (C-1^{Gal}), 99.2 (C-1^{Glc}), 76.2 (C-4^{Glc}), 72.9 (C-3^{Glc}), 72.7 (C-5^{Glc}), 71.5 (C-2^{Glc}), 70.9 (C-3^{Gal}), 70.7 (C-5^{Gal}), 69.1 (C-2^{Gal}), 66.5 (C-4^{Gal}), 64.5, 64.4 (Allyl CH_2), 61.8 (C-6^{Glc}), 60.7 (C-6^{Gal}), 20.8-20.5 (C(O)*C*H_3),

MALDI-MS:		$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$
	ber.:	m/z = 894.2	m/z = 910.2
	gef.:	m/z = 894.0	m/z = 910.0

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 50.98	H: 5.20	N: 1.61
	gef.:	C: 50.80	H: 5.23	N: 1.61

5.3.4. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-1,2,3,6-tetra-*O*-acetyl-*α*/*β*-D-glukopyranose (15)[111]



$C_{28}H_{38}O_{19}$

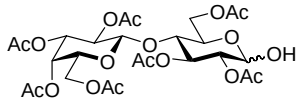
678.59 g/mol

62.3 g (173 mmol) Laktose **14** wurden in einem 1 L Kolben vorgelegt und 250 mL (2.66 mol) Essigsäureanhydrid und 217 mL (2.66 mol) Pyridin zugegeben. Man erhielt eine gelbe Suspension. Nach 2.5 h war der Niederschlag komplett gelöst. Nach 20 h Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in EE aufgenommen, 3 x mit 1M HCl gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasenl 1 x mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden 2 x mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und 1 x mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Man erhielt 117.7 g peracetylierte Laktose **15** als weißer Schaum in quantitativer Rohausbeute.

DC: $R_f = 0.24$ (PE:EE / 1:1)
$R_f = 0.31$ (PE:EE / 1:2)

MALDI-MS:		$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$
	ber.:	m/z = 701.2	m/z = 717.2
	gef.:	m/z = 701.4	m/z = 717.4

5.3.5. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-α/β-D-glukopyranose (16)[112]



$C_{26}H_{36}O_{18}$

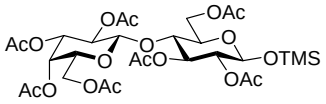
636.55 g/mol

In einem 1 L Kolben wurden 7.1 mL (106 mmol) Ethylendiamin, gelöst in 200 mL THF (abs.), vorgelegt. Unter Schutzgasatmosphäre und Wasserbadkühlung wurden 7.1 mL (124mmol) Essigsäure zugetropft. Zu der entstandenen Suspension wurden 60 g (88.4 mmol) der peracetylierten Laktose **15,** gelöst in 220 mL THF (abs.), während 90 Minuten zugetropft. Nach 60 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 mL Wasser beendet. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in EE und Wasser gelöst. Die wässrige Phase wurde 2 x mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M HCl, ges. $NaHCO_3$-Lösung, ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man anomer deacetylierte Laktose **16** in 93% Ausbeute (52.1 g) als weißer Schaum.

DC: $R_f = 0.17$ (PE:EE / 1:2)

MALDI-MS:		$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$
	ber.:	m/z = 659.2	m/z = 675.2
	gef.:	m/z = 658.9	m/z = 675.0

5.3.6. Trimethylsilyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-*β*-D-glukopyranosid (*β*-18)



$C_{29}H_{44}O_{18}Si$

708.73 g/mol

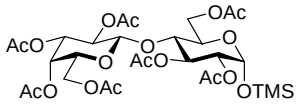
Eine Lösung von 200 mg (0.31 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acteyl-D-glukopyranose **16** in 490 µL (2.5 mmol) TMSDEA und 490 µL THF wurden 2 h bei Raumtemperatur unter Schutzgas gerührt. Die Reaktion konnte nicht mittels DC auf vollständigen Umsatz kontrolliert werden, da das Produkt auf dem DC instabil ist. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Laktosyl-TMS-Derivat *β*-**18** säulenchromatographisch (PE:EE / 1:1) gereinigt. Die Ausbeute des isolierten *β*-Derivats betrug 150 mg (67%).

DC: R_f = 0.61 (PE:EE / 1:2)

^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 5.34 (dd, J = 3.3 Hz, J = 0.7 Hz, 1 H, H-4^{Gal}), 5.17 (d, J = 9.4 Hz, 1 H, H-3^{Glc}), 5.10 (dd, J = 10.4 Hz, J = 8.0 Hz, 1 H, H-2^{Gal}), 4.95 (dd, J = 10.4 Hz, J = 3.5 Hz, 1 H, H-3^{Gal}), 4.81 (dd, J = 9.7 Hz, J = 7.7 Hz, 1 H, H-2^{Glc}), 4.71 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, H-1^{Glc}), 4.47-4.44 (m, 2 H, H-1^{Gal}, H-6^{Glc}), 4.14-4.06 (m, 3 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.88-3.85 (m, 1 H, H-5^{Gal}), 3.75 (t, J = 9.5 Hz, 1 H, H-4^{Glc}), 3.62 (ddd, J = 9.8 Hz, J = 6.0 Hz, J = 2.1 Hz, 1 H, H-5^{Glc}), 2.14 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.09 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.05 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.03 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.02 (s, 3 H, C(O)CH_3), 1.96 (s, 6 H, C(O)CH_3), 0.13 (s, 9 H, $(CH_3)_3$Si),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.3, 170.3, 170.1, 170.0, 169.8, 169.6, 169.0 (C(O)CH_3), 101.0 (C-1^{Gal}), 95.3 (C-1^{Glc}), 76.6 (C-4^{Glc}), 73.6 (C-2^{Glc}), 72.8 (C-3^{Glc}), 72.8 (C-5^{Glc}), 71.0 (C-3^{Gal}), 70.7 (C-5^{Gal}), 69.1 (C-2^{Gal}), 66.6 (C-4^{Gal}), 62.2 (C-6^{Glc}), 60.8 (C-6^{Gal}), 20.8-20.6 (C(O)CH$_3$), -0.3 ((CH$_3$)$_3$Si).

5.3.7. Trimethylsilyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-α-D-glukopyranosid (α-18)



$C_{29}H_{44}O_{18}Si$

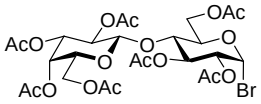
708.73 g/mol

Das TMS-Derivat α-**18** entsteht in geringen Mengen (<10%) bei der Umsetzung zum gewünschten Derivat β-**18**. Bei säulenchromatographischer Reinigung von β-**18** (PE:EE / 1:1) konnten 10 mg α-**18** isoliert und NMR-spektroskopisch untersucht werden.

^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 5.47 (t, J = 9.6 Hz, 1 H, H-3^{Glc}), 5.34 (dd, J = 3.5 Hz, J = 0.8 Hz, 1 H, H-4^{Gal}), 5.28 (d, J = 3.4 Hz, 1 H, H-1^{Glc}), 5.11 (dd, J = 10.4 Hz, J = 8.0 Hz, 1 H, H-2^{Gal}), 4.95 (dd, J = 10.4 Hz, J = 3.5 Hz, 1 H, H-3^{Gal}), 4.72 (dd, J = 10.1 Hz, J = 3.4 Hz, 1 H, H-2^{Glc}), 4.47 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, H-1^{Gal}), 4.37 (dd, J = 11.8 Hz, J = 3.9 Hz, 1 H, H-6^{Glc}), 4.16-4.04 (m, 4 H, H-5^{Glc}, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.87-3.85 (m, 1 H, H-5^{Gal}), 3.70 (t, J = 9.6 Hz, 1 H, H-4^{Glc}), 2.15 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.10 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.05 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.05 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.03 (s, 3 H, C(O)CH_3), 1.96 (s, 6 H, C(O)CH_3), 0.15 (s, 9 H, $(CH_3)_3$Si),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.4, 170.3, 170.3, 170.2, 170.1, 169.6, 169.1 (C(O)CH_3), 101.2 (C-1^{Gal}), 90.2 (C-1^{Glc}), 76.9 (C-4^{Glc}), 72.1 (C-2^{Glc}), 71.1 (C-3^{Gal}), 70.6 (C-5^{Gal}), 70.0 (C-3^{Glc}), 69.2 (C-2^{Gal}), 67.9 (C-5^{Glc}), 66.6 (C-4^{Gal}), 62.2 (C-6^{Glc}), 60.8 (C-6^{Gal}), 20.9-20.5 (C(O)CH_3), -0.3 ((CH_3)$_3$Si).

5.3.8. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-α-D-glukopyranosylbromid (19)



$C_{26}H_{35}BrO_{17}$

699.45 g/mol

Die peracetylierte Laktose **15** (10 g, 14.7 mmol) wurde unter Lichtausschluss in 5 mL CH_2Cl_2 gelöst und auf 0°C gekühlt. Hierzu wurde portionsweise 25.1 mL HBr-Lösung (33%ig in AcOH, 147 mmol) gegeben. Nach 2 h wurde die Reaktionslösung auf Eiswasser geschüttet und in EE aufgenommen. Anschließend wurde die organische Phase 4 x mit ges. $NaHCO_3$-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mit PE versetzt. Es wurde gerührt und nach Abdekantieren der überstehenden Lösung und 3 x Waschen mit PE 9.8 g (95%) des Laktosylbromid **19** in kristalliner Form isoliert.

DC: $R_f = 0.53$ (PE:EE / 1:2)

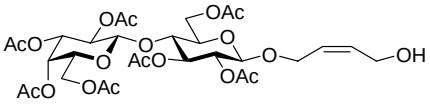
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 6.52 (d, J = 4.0 Hz, H-1^{Glc}), 5.55 (t, J = 4.0 Hz, 1 H, H-3^{Glc}), 5.35 (d, J = 3.2 Hz, 1 H, H-4^{Gal}), 5.12 (dd, J = 10.4 Hz, J = 7.9 Hz, 1 H, H-2^{Gal}), 4.96 (dd, J = 10.4 Hz, J = 3.5 Hz, 1 H, H-3^{Gal}), 4.76 (dd, J = 10.0 Hz, J = 4.1 Hz, 1 H, H-2^{Glc}), 4.52-4.49 (m, 2 H, H-1^{Gal}, H-6^{Glc}), 4.22-4.06 (m, 4 H, H-5^{Glc}, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.90-3.84 (m, 2 H, H-4^{Glc}, H-5^{Gal}), 2.16 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.13 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.09 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.07 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.06 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.05 (s, 3 H, C(O)CH_3), 1.96 (s, 3 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.3, 170.2, 170.1, 170.1, 170.0, 169.2, 169.0 (C(O)CH_3), 100.8 (C-1^{Gal}), 86.4 (C-1^{Glc}), 75.0 (C-4^{Glc}), 73.0 (C-5^{Glc}), 71.0 (C-3^{Gal}), 70.9 (C-2^{Glc}),70.8 (C-5^{Gal}), 69.6 (C-3^{Glc}), 69.0 (C-2^{Gal}), 66.6 (C-4^{Gal}), 61.1 (C-6^{Glc}), 60.9 (C-6^{Gal}), 20.8-20.5 (C(O)CH$_3$),

MALDI-MS:		$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$
	ber.:	m/z = 721.1	m/z = 737.1
	gef.:	m/z = 720.8	m/z = 736.8

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 44.65	H: 5.04	N: -
	gef.:	C: 44.91	H: 5.20	N: -

5.3.9. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-*β*-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-enol (21)



$C_{30}H_{42}O_{19}$

706.64 g/mol

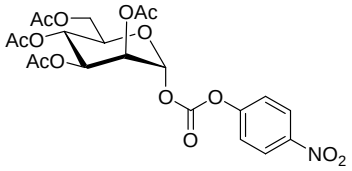
Unter Schutzgas wurden 2.7 g (9.7 mmol) Ag_2CO_3, 6.5 g (45 mmol) $CaSO_4 \cdot 1/2H_2O$ katalytische Mengen Jod und 26 mL (322 mmol) (*Z*)-But-2-en-1,4-diol **20** in einem Schlenk-Kolben 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe des *α*-Laktosylbromids **19** (3 g, 4.3 mmol) wurde weitere 24 h unter Lichtausschluss gerührt. Anschließend wurden 100 mL CH_2Cl_2 zugegeben und das Gemisch über Kieselgur filtriert. Zu dem zweiphasigen Filtrat wurden 100 mL H_2O gegeben, die wässrige Phase abgetrennt und mit 50 mL CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden 3 x mit 100 mL H_2O, 1 x mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels und säulenchromatographischer Trennung (PE:EE / 1:2) konnten 1.85 g (61%) des Hydroxybutenyllaktosids **21** erhalten werden.

DC: $R_f = 0.25$ (PE:EE / 1:2)

^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 5.85-5.81 (m, 1 H, Vinyl-H), 5.63-5.59 (m, 1 H, Vinyl-H), 5.34 (d, J = 3.0 Hz, 1 H, H-4^{Gal}), 5.19 (d, J = 9.3 Hz, 1 H, H-3^{Glc}), 5.10 (dd, J = 10.4 Hz, J = 7.9 Hz, 1 H, H-2^{Gal}), 4.95 (dd, J = 10.4 Hz, J = 3.5 Hz, 1 H, H-3^{Gal}), 4.90 (dd, J = 9.4 Hz, J = 8.0 Hz, 1 H, H-2^{Glc}), 4.53-4.50 (m, 2 H, H-1^{Glc}, H-6^{Glc}), 4.49 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, H-1^{Gal}), 4.28 (ddd, J = 19.9 Hz, J = 12.6 Hz, J = 6.7 Hz, 2 H, Allyl-H), 4.18 (bd, J = 6.2 Hz, 2 H, Allyl-H), 4.14-4.06 (m, 3 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.87 (bt, J = 6.7 Hz, 1 H, H-5^{Gal}), 3.79 (t, J = 9.5 Hz, 1 H, H-4^{Glc}), 3.61 (ddd, J = 9.8 Hz, J = 5.0 Hz, J = 2.0 Hz, 2 H, H-5^{Glc}), 2.14 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.13 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.05 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 9 H, C(O)CH_3), 1.96 (s, 3 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.4, 170.3, 170.1, 170.0, 169.7, 169.7, 169.0 (*C*(O)CH_3), 133.3, 126.8 (Olefin CH), 125.3, 121.7 (Ar), 101.0 (C-1^{Gal}), 99.1 (C-1^{Glc}), 76.2 (C-4^{Glc}), 72.8 (C-3^{Glc}), 72.7 (C-5^{Glc}), 71.6 (C-2^{Glc}), 71.0 (C-3^{Gal}), 70.7 (C-5^{Gal}), 69.1 (C-2^{Gal}), 66.6 (C-4^{Gal}), 64.3 (Allyl CH_2), 61.9 (C-6^{Glc}), 60.8 (C-6^{Gal}), 58.5 (Allyl CH_2), 20.8-20.5 (C(O)*C*H_3).

5.3.10. (*p*-Nitrophenoxycarbonyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosid (31)



$C_{21}H_{23}NO_{14}$

513.41 g/mol

200 mg (0.57 mmol) der anomer-entschützten Mannose **23** wurden entsprechend **AAV 1a** mit 91 mg (0.86 mmol) Lutidin und 172 mg (0.86 mmol) Chlorameisensäureester **17** in 4 mL CH_3CN umgesetzt. Nach Umkristallisation aus EE/PE konnten 276 mg (94%) des α-Carbonats **31** in kristalliner Form erhalten werden. Durch Röntgenstrukturanalyse konnte das Vorliegen des α-Anomers nachgewiesen werden.

DC: $R_f = 0.37$ (PE:EE / 1:1)
$R_f = 0.19$ (PE:EE / 1:1) (Edukt)

^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 8.32-8.30 (m, 2 H, Ar), 7.44-7.43 (m, 2 H, Ar), 6.10 (d, J = 1.0 Hz, 1 H, H-1), 5.43-5.41 (m, 3 H, H-2, H-3, H-4), 4.33 (dd, J = 12.2 Hz, J = 4.4 Hz, 1 H, H-6), 4.20-4.16 (m, 2 H, H-5, H-6´), 2.21 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.11 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.07 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.03 (s, 3 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.5, 169.9, 169.6, 169.5 (*C*(O)CH_3), 154.9 (OC(O)O), 150.2, 145.7, 125.4, 121.6 (Ar), 95.0 (C-1), 71.2 (C-5), 68.3 (C-3), 67.9 (C-2), 65.2 (C-4), 61.9 (C-6), 20.7-20.6 (C(O)*C*H),

$^1J_{CH}$ = 179.8 (Kopplung C^1 mit H^1)

MALDI-MS:		[M+Na^+]	[M+K^+]
	ber.:	m/z = 526.4	m/z = 542.4
	gef.:	m/z = 526.3	m/z = 542.3

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 49.13	H: 4.52	N: 2.73
	gef.:	C: 49.32	H: 4.82	N: 2.55

Kristallstrukturdaten (tibman)	**R_1 = 0.04, wR_2 = 0.098**
Summenformel	C_{21} H_{23} N O_{14}
Molekulargewicht [g/mol]	513.4
Kristallsystem	orthorhombisch
Raumgruppe	$P2_12_12_1$ (No. 19)
a, *b*, *c* [Å]	8.8171(5) 8.8495(4) 29.9965(15)
V [Å^3]	2340.5(2)
Z	4
ρ_{ber} [g/cm^3]	1.457
Aufnahmeparameter	
Temperatur (K)	100
λ [Å] (MoK_α)	0.71073
Tot. Data, Uniq. Data, *R*(int)	31812, 4422, 0.135
Observed data [$I > 2\sigma(I)$]	3631
Verfeinerung	
R_1[a], wR_2[b]	0.0418, 0.0980
Max. and Av. Shift/Error	0.00, 0.00
Flack x	0.000
Min. and Max. Resd. Dens. [e/Å^3]	-0.24, 0.17

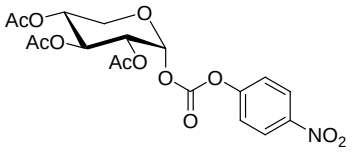
[a] $R_1 = \sum \left| |F_0| - |F_c| \right| / \sum |F_0|$

[b] $wR_2 = \left[\sum \left[w\left(F_0^2 - F_c^2\right)^2 \right] / \sum \left[w\left(F_0^2\right)^2 \right] \right]^{1/2}$

mit $w = 1/\left[\sigma^2\left(F_0^2\right) + \left(0.0526p\right)^2 \right]$

und $p = \left[\max\left(F_0^2, 0\right) + 2f_c^2 \right] / 3$

5.3.11. (*p*-Nitrophenoxycarbonyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-α-D-xylopyranosid (33)



$C_{18}H_{19}NO_{12}$

441.34 g/mol

200 mg (0.72 mmol) der anomer entschützten Xylose **26** wurden analog **AAV 1a** mit 125 mg (1.18 mmol) Lutidin und 203 mg (1.18 mmol) Chlorameisensäureester **17** in 4 mL CH_3CN zum α-Carbonat **33** umgesetzt. Nach Reinigung mittels Säulenchromatographie (PE:EE / 2:1) konnten 310 mg (97%) des α-Xylopyranosids **33** als weißer Feststoff isoliert werden.

DC: R_f = 0.44 (PE:EE / 1:1)
R_f = 0.24 (PE:EE / 1:1) (Edukt)

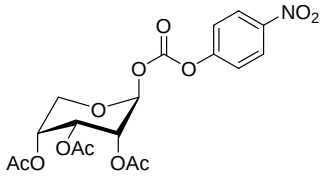
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 8.29-8.28 (m, 2 H, Ar), 7.42-7.41 (m, 2 H, Ar), 6.21 (d, *J* = 3.5 Hz, 1 H, H-1), 5.52 (t, *J* = 9.9 Hz, 1 H, H-3), 5.09 (dd, *J* = 10.1 Hz, *J* = 3.6 Hz,1 H, H-2), 5.08-5.04 (m, 1 H, H-4), 4.03 (dd, *J* = 11.3 Hz, *J* = 5.9 Hz, 1 H, H-5), 3.81 (t, *J* = 11.4 Hz, 1 H, H-5´), 2.05 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 3 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 169.9, 169.7, 169.6 (*C*(O)CH_3), 155.0 (OC(O)O), 150.8, 145.6, 125.3, 121.5 (Ar), 94.3 (C-1), 69.2 (C-2), 68.9 (C-3), 68.2 (C-4), 61.0 (C-5), 20.6-20.4 (C(O)*C*H),

MALDI-MS:		[M+Na^+]	[M+K^+]
	ber.:	m/z = 464.3	m/z = 480.3
	gef.:	m/z = 464.2	m/z = 480.2

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 48.99	H: 4.34	N: 3.17
	gef.:	C: 48.89	H: 4.55	N: 3.03

5.3.12. (*p*-Nitrophenoxycarbonyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-β-D-ribopyranosid (34)



$C_{18}H_{19}NO_{12}$

441.34 g/mol

200 mg (0.72 mmol) der anomer entschützten Ribose **27** wurden nach **AAV 1a** mit 125 mg (1.18 mmol) Lutidin und 203 mg (1.18 mmol) Chlorameisensäureester **17** in 4 mL CH_3CN umgesetzt. Durch Umkristallisation aus PE/EE konnten 270 mg (85%) des β-Carbonats der Ribose **34** in kristalliner Form erhalten werden.

DC: R_f = 0.40 (PE:EE / 1:1)
R_f = 0.15 (PE:EE / 1:1) (Edukt)

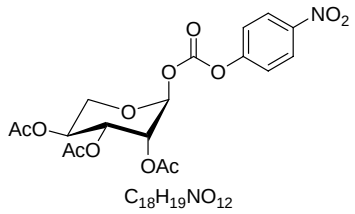
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 8.31-8.29 (m, 2 H, Ar), 7.43-7.41 (m, 2 H, Ar), 6.00 (d, J = 4.2 Hz, 1 H, H-1), 5.52 (t, J = 3.4 Hz, 1 H, H-3), 5.23-5.21 (m, 1 H, H-4), 5.19 (t, J = 3.8 Hz, 1 H, H-2), 4.16 (dd, J = 12.6 Hz, J = 2.9 Hz, 1 H, H-5), 4.00 (dd, J = 12.6 Hz, J = 5.0 Hz, 1 H, H-5´), 2.15 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.12 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.10 (s, 3 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 169.9, 169.6, 169.4 (*C*(O)CH_3), 154.9 (OC(O)O), 150.7, 145.7, 125.4, 121.6 (Ar), 95.6 (C-1), 66.8 (C-2), 65.9 (C-4), 65.6 (C-3), 63.2 (C-5), 20.8-20.6 (C(O)*C*H),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 464.3	m/z = 480.3
	gef.:	m/z = 464.2	m/z = 480.2

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 48.99	H: 4.34	N: 3.17
	gef.:	C: 49.63	H: 4.64	N: 3.24

5.3.13. (*p*-Nitrophenoxycarbonyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-α-L-lyxopyranosid (35)



$C_{18}H_{19}NO_{12}$

441.34 g/mol

Die anomer entschützte Lyxose **28** (200 mg, 0.72 mmol) wurde entsprechend **AAV 1a** mit 125 mg (1.18 mmol) Lutidin und 203 mg (1.18 mmol) Chlorameisensäureester **17** in 4 mL CH_3CN umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE / 2:1) konnten 210 mg (66%) des α-Derivats **35** in Form eines weißen Feststoffs isoliert werden.

DC: R_f = 0.43 (PE:EE / 1:1)
R_f = 0.24 (PE:EE / 1:1) (Edukt)

^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 8.31-8.29 (m, 2 H, Ar), 7.43-7.42 (m, 2 H, Ar), 5.98 (d, J = 2.9 Hz, 1 H, H-1), 5.44-5.40 (m, 2 H, H-2, H-3), 5.26 (dt, J = 9.0 Hz, J = 5.1 Hz, 1 H, H-4), 4.10 (dd, J = 11.5 Hz, J = 5.0 Hz, 1 H, H-5), 3.83 (dd, J = 11.3 Hz, J = 9.3 Hz, 1 H, H-5´), 2.17 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.10 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.07 (s, 3 H, C(O)CH_3),

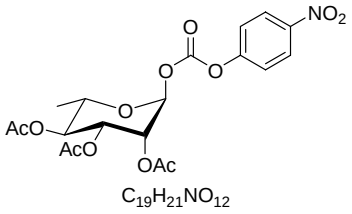
^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 169.8, 169.7, 169.6 (*C*(O)CH_3), 154.9 (OC(O)O), 150.0, 145.7, 125.4, 121.6 (Ar), 95.1 (C-1), 67.8 (C-2) und (C-3), 66.1 (C-4), 62.3 (C-5), 20.7-20.6 (C(O)*C*H),

$^1J_{CH}$ = 179.2 (Kopplung C^1 mit H^1)

MALDI-MS:		[M+Na^+]	[M+K^+]
	ber.:	m/z = 464.3	m/z = 480.3
	gef.:	m/z = -	m/z = 480.2

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 48.99	H: 4.34	N: 3.17
	gef.:	C: 49.20	H: 4.40	N: 3.23

5.3.14. (*p*-Nitrophenoxycarbonyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-α-L-rhamnopyranosid (36)



$C_{19}H_{21}NO_{12}$

455.37 g/mol

200 mg (0.69 mmol) der anomer entschützten Rhamnose **29** wurden analog **AAV 1a** mit 111 mg (1.04 mmol) Lutidin und 210 mg (1.04 mmol) Chlorameisensäureester **17** in 4 mL CH_3CN zum α-Carbonat **36** umgesetzt. Mittels Flash-Chromatographie (PE:EE / 2:1) konnten 210 mg (83%) des α-Rhamnospyranosids **36** als weißer Feststoff erhalten werden.

DC: $R_f = 0.52$ (PE:EE / 1:1)
$R_f = 0.32$ (PE:EE / 1:1) (Edukt)

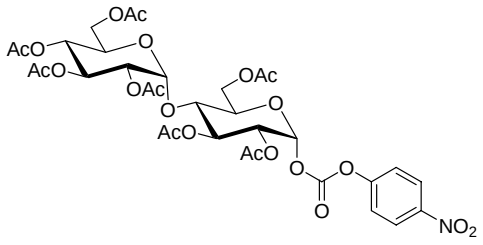
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 8.28-8.26 (m, 2 H, Ar), 7.42-7.40 (m, 2 H, Ar), 5.98 (d, J = 1.6 Hz, 1 H, H-1), 5.39 (dd, J = 3.2 Hz, J = 2.0 Hz, 1 H, H-2), 5.33 (dd, J = 10.2 Hz, J = 3.5 Hz, 1 H, H-3), 5.15 (t, J = 10.0 Hz, 1 H, H-4), 4.07-4.04 (m, 1 H, H-5), 2.17 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.06 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.00 (s, 3 H, C(O)CH_3), 1.26 (d, J = 6.3 Hz, 3 H, H-6),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 169.9, 169.7, 169.6 (*C*(O)CH_3), 154.9 (OC(O)O), 150.3, 145.6, 125.3, 121.6 (Ar), 95.1 (C-1), 70.0 (C-4), 69.3 (C-5), 68.3 (C-3), 68.1 (C-2), 20.6-20.5 (C(O)*C*H), 17.3 (C-6),

$^1J_{CH}$ = 179.4 (Kopplung C^1 mit H^1)

MALDI-MS:		[M+Na^+]	[M+K^+]
	ber.:	m/z = 478.4	m/z = 494.4
	gef.:	m/z = 478.3	m/z = 494.3

5.3.15. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-α-D-glukopyranosyl-(1→4)-(*p*-nitrophenoxycarbonyl)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-α-D-glukopyranosid (37)



$C_{33}H_{39}NO_{22}$

801.66 g/mol

Die anomer entschützte Maltose **30** (200 mg, 0.31 mmol) wurde entsprechend **AAV 1b** mit 55 mg (0.45 mmol) DMAP und 91 mg (0.45 mmol) Chlorameisensäureester **17** in 4 mL CH_3CN umgesetzt umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE / 1:1) konnten 174 mg (69%) des α-Maltosids **37** erhalten werden.

DC: R_f = 0.26 (PE:EE / 1:1)
R_f = 0.08 (PE:EE / 1:1) (Edukt)

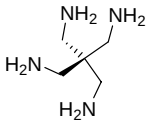
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 8.33-8.31 (m, 2 H, Ar), 7.47-7.45 (m, 2 H, Ar), 6.21 (d, J = 3.5 Hz, 1 H, H^B-1), 5.59 (t, J = 9.6 Hz, 1 H, H^B-3), 5.47 (d, J = 3.9 Hz, 1 H, H^A-1), 5.38 (t, J = 3.9 Hz, 1 H, H^A-3), 5.09 (t, J = 9.9 Hz, 1 H, H^A-4), 5.04 (dd, J = 10.2 Hz, J = 3.6 Hz, 1 H, H^B-2), 4.88 (dd, J = 10.6 Hz, J = 4.0 Hz, 1 H, H^A-2), 4.53 (dd, J = 12.4 Hz, J = 2.2 Hz, 1 H, H^B-6), 4.28-4.21 (m, 3 H, H'^B-6, H^A-6, H^B-5), 4.11 (t, J = 9.4 Hz, 1 H, H^B-4), 4.07 (dd, J = 12.5 Hz, J = 2.1 Hz, 1 H, H'^A-6), 3.95 (dt, J = 10.1 Hz, J = 2.6 Hz, 1 H, H^A-5), 2.16 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.11 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.08 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.05 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.03 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.01 (s, 3 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.6, 170.5, 170.3, 169.9, 169.9, 169.7, 169.4 (*C*(O)CH_3), 155.0 (OC(O)O), 150.7, 145.7, 125.4, 121.6 (Ar), 95.8 (C^A-1), 93.9 (C^B-1), 71.9 (C^B-4), 71.8 (C^B-3), 70.8 (C^B-5), 70.1 (C^A-2), 69.6 (C^B-2), 69.2 (C^A-3), 68.7 (C^A-5), 67.9 (C^A-4), 62.1 (C^B-6), 61.3 (C^A-6), 20.9-20.4 (C(O)*C*H),

MALDI-MS:		$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$
	ber.:	m/z = 824.7	m/z = 840.7
	gef.:	m/z = 824.9	m/z = 840.9

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 49.64	H: 4.90	N: 1.75
	gef.:	C: 49.48	H: 5.36	N: 1.93

5.3.16. Tetra-(aminomethyl)-methan (44)



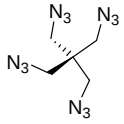
$C_5H_{16}N_4$

132.21 g/mol

Durch Reduktion von Tetra-(azidomethyl)-methan **46** analog der Literatur[79] konnte Tetra-(aminomethyl)-methan **44** in quantitativer Ausbeute erhalten werden.

^{1}H-NMR [250 MHz, $CDCl_3$]: δ = 2.58 (s, 8 H, CH_2).

5.3.17. Tetra-(azidomethyl)-methan (46)



$C_5H_8N_{12}$

236.2 g/mol

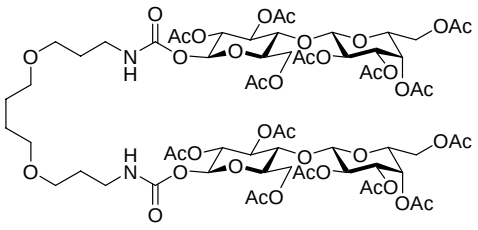
Tetra-(azidomethyl)-methan **46** konnte ausgehend von Tetra-(brommethyl)-methan **45** (1 g, 2.6 mmol) entsprechend der Vorschrift von Feldman und Masters [79] synthetisiert werden. Das Tetraazid **46** wurde ohne weitere Reinigung (Explosionsgefahr!) umgesetzt.

^{1}H-NMR [250 MHz, $CDCl_3$]: δ = 3.33 (s, 8 H, CH_2).

Edukt Tetra-(brommethyl)-methan:

^{1}H-NMR [250 MHz, $CDCl_3$]: δ = 3.59 (s, 8 H, CH_2).

5.3.18. 1,4-Bis-(3-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-*β*-D-glukopyranosyloxycarbonylamino-propyloxy)-butan (Ac-47)



$C_{64}H_{92}N_2O_{40}$

1529.40 g/mol

Durch Reaktion von 148 mg (0.188 mmol) des Aktivcarbonats *β*-**12** entsprechend **AAV 2** mit 16 µl (0.075 mmol) 1,4-Bis-(3-aminopropyloxy)-butan **39** in 4 mL CH_2Cl_2 (abs.) konnten nach säulenchromatographischer Trennung (PE:EE / 1:3 → EE) 114 mg (99%) des Acetyl-geschützten divalenten Liganden Ac-**47** in Form von weißem Feststoff isoliert werden.

DC: $R_f = 0.38$ (EE)

$R_f = 0.08$ (PE:EE / 1:3)

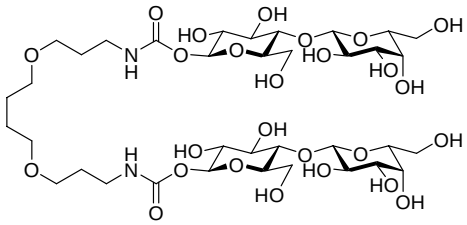
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: $\delta = 5.62$ (d, $J = 8.1$ Hz, 2 H, H-1^{Glc}), 5.36-5.34 (m, 4 H, H-4^{Gal}, NHC(O)), 5.25 (t, $J = 9.2$ Hz, 2 H, H-3^{Glc}), 5.09 (t, $J = 8.1$ Hz, 2 H, H-2^{Gal}), 5.00 (t, 2 H, $J =$ 8.8 Hz,, H-2^{Glc}), 4.94 (dd, 2 H, $J = 10.1$ Hz, $J = 2.5$ Hz, H-3^{Gal}), 4.48-4.43 (m, 4 H, H-1^{Gal}, H-6^{Glc}), 4.15-4.05 (m, 6 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.87-3.83 (m, 4 H, H-4^{Glc}, H-5^{Gal}), 3.75 (m, 2 H, H-5^{Glc}), 3.47 (bs, 4 H, OC*H*$_2$CH$_2$), 3.41 (bs, 4 H, CH$_2$C*H*$_2$O), 3.28 (bs, 4 H, CH$_2$C*H*$_2$NH), 2.15 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 2.11 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 2.06 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 2.04 (s, 12 H, C(O)CH$_3$), 2.02 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 1.96 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 1.76 (bs, 4 H, CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$), 1.59 (bs, 4 H, C*H*$_2$CH$_2$O),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.3, 170.1, 170.0, 169.7, 169.6, 169.0 (*C*(O)CH$_3$), 153.6 (OC(O)N), 100.9 (C-1^{Gal}), 92.6 (C-1^{Glc}), 75.7 (C-4^{Glc}), 73.2 (C-5^{Glc}), 72.8 (C-3^{Glc}), 71.0 (C-3^{Gal}), 70.8 (CH$_2$*C*H$_2$O), 70.7 (C-5^{Gal}), 70.6 (C-2^{Glc}), 69.0 (C-2^{Gal}), 68.9 (O*C*H$_2$CH$_2$), 66.6 (C-4^{Gal}), 61.8 (C-6^{Glc}), 60.8 (C-6^{Gal}), 39.4 (CH$_2$*C*H$_2$NH), 29.3 (CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$), 26.3 (*C*H$_2$CH$_2$O), 20.9-20.5 (C(O)*C*H$_3$),

MALDI-MS:		$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$
	ber.:	m/z = 1551.5	m/z = 1567.5
	gef.:	m/z = 1551.2	m/z = 1567.1

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 50.26	H: 6.06	N: 1.83
	gef.:	C: 49.88	H: 6.05	N: 1.90

5.3.19. 1,4-Bis-(3-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyloxycarbonylamino-propyloxy)-butan (47)



$C_{36}H_{64}N_2O_{26}$

940.89 g/mol

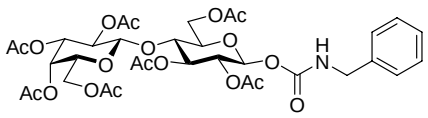
Das acetylgeschützte Derivat Ac-**47** (93 mg, 0.061 mmol) wurde entsprechend **AAV 3a** mit 100 µL 0.5 M NaOMe-Lösung in 2 mL Methanol (abs.) umgesetzt. Die Ausbeute des divalenten Liganden **47** betrug 58 mg (100%).

^{1}H-NMR [600 MHz, D_2O]: δ = 5.31 (d, J = 8.2 Hz, 2 H, H-1^{Glc}), 4.35 (d, J = 7.8 Hz, 2 H, H-1^{Gal}), 3.85-3.81 (m, 4 H, H-4^{Gal}, H-6^{Glc}), 3.74-3.60 (m, 14 H, H-3^{Glc}, H-4^{Glc}, H-5^{Glc}, H-5^{Gal}, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.55 (dd, J = 10.0 Hz, J = 3.3 Hz, 2 H, H-3^{Gal}), 3.46-3.38 (m, 12 H, H-2^{Glc}, H-2^{Gal}, OCH_2CH$_2$), 3.16-3.10 (m, 4 H, CH$_2$CH_2NH), 1.71-1.66 (m, 4 H, CH$_2$CH_2CH$_2$), 1.51 (bs, 4 H, OCH$_2$CH_2),

^{13}C-NMR [150 MHz, D_2O]: δ = 156.4 (OC(O)N), 102.9 (C-1^{Gal}), 94.7 (C-1^{Glc}), 77.8, 75.4, 75.3 (C-4^{Glc}, C-5^{Glc}, C-5^{Gal}), 74.1 (C-3^{Glc}), 72.5 (C-3^{Gal}), 71.7 (C-2^{Glc}), 71.0 (C-2^{Gal}), 70.4 (OCH$_2$CH$_2$), 68.6 (C-4^{Gal}), 67.7 (OCH$_2$CH$_2$), 61.1 (C-6^{Gal}), 59.8 (C-6^{Glc}), 37.6 (CH$_2$$CH_2$NH), 28.6 (CH$_2$$CH_2CH_2$), 25.3 (OCH$_2CH_2$),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 963.4	m/z = 979.3
	gef.:	m/z = 963.4	m/z = 979.1

5.3.20. (2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-β-D-glukopyranosyloxycarbonyl)-benzylamin (Ac-48)



$C_{34}H_{43}NO_{19}$

769.7 g/mol

115 mg (0.14 mmol) des Aktivcarbonats β-**12** wurden entsprechend **AAV 2** mit 14 mg (0.13 mol) Benzylamin **37** in 3 mL CH_2Cl_2 (abs.) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Trennung (PE:EE / 1:1) konnten 100 mg (99%) des monovalenten Liganden Ac-**48** als weißer Schaum isoliert werden.

DC: R_f = 0.16 (PE:EE / 1:1)
R_f = 0.45 (PE:EE / 1:2)

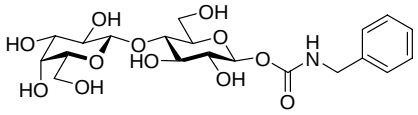
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 7.35-7.27 (m, 5 H, Ar), 5.67 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, H-1^{Glc}), 5.35 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, H-4^{Gal}), 5.25 (t, J = 9.0 Hz, 1 H, H-3^{Glc}), 5.17-5.10 (m, 2 H, H-2^{Gal}, NHC(O)), 5.02 (t, J = 8.7 Hz, 1 H, H-2^{Glc}), 4.95 (dd, J = 10.4 Hz, J = 3.4 Hz, 1 H, H-3^{Gal}), 4.48-4.45 (m, 2 H, H-6^{Glc}, H-1^{Gal}), 4.38-4.36 (m, 2 H, CH_2^{Bn}), 4.17-4.07 (m, 3 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.88-3.83 (m, 2 H, H-4^{Glc}, H-5^{Gal}), 3.78-3.76 (m, 1 H, H-5^{Glc}), 2.16 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.12 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.07 (s, 3 H, C(O)CH_3), 2.05 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.02 (s, 3 H, C(O)CH_3), 1.97 (s, 3 H, C(O)CH_3), 1.97 (s, 3 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.3, 170.2, 170.1, 169.7, 169.5, 169.0 (*C*(O)CH_3), 153.7 (OC(O)N), 137.4, 128.8, 127.8, 127.6 (Ar), 101.0 (C-1^{Gal}), 92.8 (C-1^{Glc}), 75.8 (C-4^{Glc}), 73.3 (C-5^{Glc}), 72.6 (C-3^{Glc}), 71.0 (C-3^{Gal}), 70.7 (C-5^{Gal}), 70.6 (C-2^{Glc}), 69.0 (C-2^{Gal}), 66.6 (C-4^{Gal}), 61.8 (C-6^{Glc}), 60.8 (C-6^{Gal}), 45.2 (CH_2^{Bn}), 20.9-20.5 (C(O)*C*H_3),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 792.2	m/z = 808.2
	gef.:	m/z = 792.4	m/z = 808.4

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 53.05	H: 5.63	N: 1.82
	gef.:	C: 53.03	H: 5.66	N: 1.83

5.3.21. (β-D-Galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyl-oxycarbonyl)-benzylamin (48)



$C_{20}H_{29}NO_{12}$

475.44 g/mol

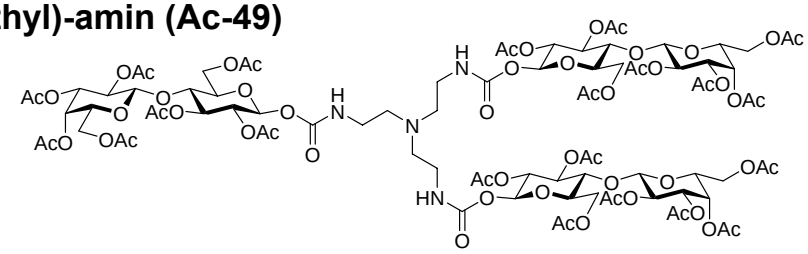
Das peracetylierte Laktosylderivat Ac-**48** (100 mg, 0.14 mmol) wurde entsprechend **AAV 3a** mit 250 µL 0.5 M NaOMe-Lösung in 3 mL Methanol umgesetzt. Man erhielt 66 mg (99%) des monovalenten Liganden **48** als weißen Feststoff.

^{1}H-NMR [600 MHz, D_2O]: δ = 7.33-7.25 (m, 5 H, Ar), 5.36 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, H-1^{Glc}), 4.35 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, H-1^{Gal}), 4.26 (m, 2 H, CH_2^{Bn}), 3.86-3.82 (m, 2 H, H-4^{Gal}, H-6^{Glc}), 3.73-3.56 (m, 8 H, H-3^{Glc}, H-3^{Gal}, H-4^{Glc}, H-5^{Glc}, H-5^{Gal}, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.47-3.40 (m, 2 H, H-2^{Glc}, H-2^{Gal}),

^{13}C-NMR [150 MHz, D_2O]: δ = 156.6 (OC(O)N), 138.2, 128.8, 127.5, 127.1 (Ar), 102.9 (C-1^{Gal}), 94.8 (C-1^{Glc}), 77.8, 75.4, 75.3, 74.1, 72.5 (C-3^{Glc}, C-3^{Gal}, C-4^{Glc}, C-5^{Glc}, C-5^{Gal}), 71.7 (C-2^{Glc}), 70.9 (C-2^{Gal}), 68.6 (C-4^{Gal}), 61.0 (C-6^{Glc}), 59.8 (C-6^{Gal}), 44.2 (CH_2^{Bn}),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 498.2	m/z = 514.2
	gef.:	m/z = 498.1	m/z = 514.1

5.3.22. Tris-(2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-*β*-D-glukopyranosyloxycarbonylamino)-ethyl)-amin (Ac-49)



$C_{87}H_{120}N_4O_{57}$

2133.88 g/mol

144 mg (0.18 mmol) des Laktosylcarbonats *β*-**12** wurden entsprechend **AAV 2** mit 8 µl (0.047 mmol) Tris-(2-aminoethyl)-amin **38** in 4 mL CH_2Cl_2 (abs.) umgesetzt. Nach Flash-Chromatographie (PE:EE / 1:1 → EE) und Trocknung im Ölpumpenvakuum konnten 111 mg (97%) des trivalenten Derivats Ac-**49** als weißer Feststoff erhalten werden.

DC: R_f = 0.32 (EE)

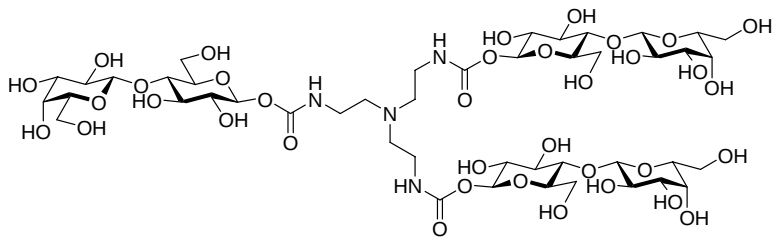
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 5.61 (d, J = 8.0 Hz, 3 H, H-1^{Glc}), 5.49 (bs, 3 H, NHC(O)), 5.34 (s, 3 H, H-4^{Gal}), 5.25 (t, J = 9.1 Hz, 3 H, H-3^{Glc}), 5.10 (t, J = 9.2 Hz, 3 H, H-2^{Gal}), 5.03-4.94 (m, 6 H, H-2^{Glc}, H-3^{Gal}), 4.50-4.45 (m, 6 H, H-1^{Gal}, H-6^{Glc}), 4.15-4.05 (m, 9 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.89-3.84 (m, 6 H, H-4^{Glc}, H-5^{Gal}), 3.75 (m, 3 H, H-5^{Glc}), 3.33 (bs, 3 H, CH_2CH$_2$NH), 3.23 (bs, 3 H, CH_2CH$_2$NH), 2.77 (bs, 6 H, CH$_2$CH_2NH), 2.15 (s, 9 H, C(O)CH$_3$), 2.11 (s, 18 H, C(O)CH$_3$), 2.06 (s, 9 H, C(O)CH$_3$), 2.05 (s, 9 H, C(O)CH$_3$), 2.04 (s, 9 H, C(O)CH$_3$), 1.96 (s, 9 H, C(O)CH$_3$),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.4, 170.1, 170.1, 169.8, 169.6, 169.0 (*C*(O)CH$_3$), 154.0 (OC(O)N), 100.9 (C-1^{Gal}), 92.7 (C-1^{Glc}), 75.6 (C-4^{Glc}), 73.3 (C-5^{Glc}), 72.7 (C-3^{Glc}), 71.0 (C-3^{Gal}), 70.7 (C-5^{Gal}), 70.6 (C-2^{Glc}), 69.0 (C-2^{Gal}), 66.6 (C-4^{Gal}), 61.8 (C-6^{Glc}), 60.7 (C-6^{Gal}), 48.2 (*C*H$_2$CH$_2$NH), 40.6 (CH$_2$*C*H$_2$NH), 20.9-20.5 (C(O)*C*H$_3$),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 2155.7	m/z = 2171.6
	gef.:	m/z = 2155.2	m/z = -

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 48.97	H: 5.67	N: 2.63
	gef.:	C: 49.14	H: 5.84	N: 2.59

5.3.23. Tris-(2-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyloxycarbonylamino)-ethyl)-amin (49)



$C_{45}H_{78}N_4O_{36}$

1251.11 g/mol

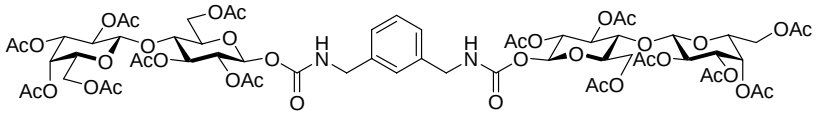
Entsprechend **AAV 3b** wurden 67 mg (0.031 mmol) der geschützten Verbindung Ac-**49** gelöst in 1.8 mL $EtNMe_2$:MeOH / 5:1 umgesetzt. Nach 5 Tagen Reaktionszeit wurde der trivalente Ligand **49** in quantitativer Ausbeute (38 mg) erhalten.

^{1}H-NMR [600 MHz, D_2O]: δ = 5.33 (d, J = 8.2 Hz, 3 H, H-1^{Glc}), 4.34 (d, J = 7.8 Hz, 3 H, H-1^{Gal}), 3.85-3.81 (m, 6 H, H-4^{Gal}, H-6^{Glc}), 3.72-3.60 (m, 21 H, H-3^{Glc}, H-4^{Glc}, H-5^{Glc}, H-5^{Gal}, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.55 (dd, J = 10.0 Hz, J = 3.4 Hz, 3 H, H-3^{Gal}), 3.43 (dd, J = 9.7 Hz, J = 8.1 Hz, 3 H, H-2^{Gal}), 3.40 (t, J = 8.1 Hz, 3 H, H-2^{Glc}), 3.20-3.13 (bs, 6 H, CH_2CH$_2$NH), 2.63 (bs, 6 H, CH$_2$CH_2NH),

^{13}C-NMR [150 MHz, D_2O]: δ = 156.4 (OC(O)N), 102.9 (C-1^{Gal}), 94.7 (C-1^{Glc}), 77.7, 75.4, 75.3, 74.1 (C-3^{Glc}, C-4^{Glc}, C-5^{Glc}, C-5^{Gal}), 72.5 (C-3^{Gal}), 71.6 (C-2^{Glc}), 70.9 (C-2^{Gal}), 68.5 (C-4^{Gal}), 61.0 (C-6^{Gal}), 59.7 (C-6^{Glc}), 52.5 (CH$_2$$CH_2$NH), 38.1 ($CH_2CH_2$NH),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 1273.4	m/z = 1289.4
	gef.:	m/z = 1273.4	m/z = 1289.4

5.3.24. *N*,*N*'-Bis-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-*β*-D-glukopyranosyloxycarbonyl)-*m*-xylylendiamin (Ac-50)



$C_{62}H_{80}N_2O_{38}$

1461.29 g/mol

123 mg (0.15 mmol) des Aktivcarbonats *β*-**12** wurden analog **AAV 2** mit 9.5 mg (0.07 mmol) *α*,*α*´-Diamino-*m*-xylol **40** in 3 mL CH_2Cl_2 (abs.) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Trennung (PE:EE / 1:2) konnten 102 mg (99%) des Acetyl-geschützten metasubstituierten divalenten Liganden Ac-**50** in Form von weißem Schaum isoliert werden.

DC: R_f = 0.18 (PE:EE / 1:2)

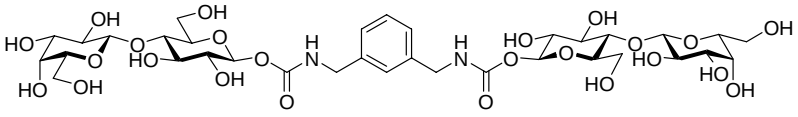
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 7.27-7.25 (m, 1 H, Ar), 7.15-7.11 (m, 3 H, Ar), 5.62 (m, 4 H, H-1^{Glc}, NHC(O)), 5.33 (bs, 2 H, H-4^{Gal}), 5.23 (t, J = 9.1 Hz, 2 H, H-3^{Glc}), 5.09 (t, J = 9.4 Hz, 2 H, H-2^{Gal}), 5.00 (t, J = 8.7 Hz, 2 H, H-2^{Glc}), 4.94 (bd, J = 10.2 Hz, 2 H, H-3^{Gal}), 4.49-4.38 (m, 6 H, H-6^{Glc}, H-1^{Gal}, CH_2^{Bn}), 4.26 (dd, J = 14.9 Hz, J = 4.5 Hz, 2 H, CH_2^{Bn}), 4.18-4.03 (m, 6 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.88-3.86 (m, 4 H, H-4^{Glc}, H-5^{Gal}), 3.73-3.72 (m, 2 H, H-5^{Glc}), 2.14 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.03 (s, 18 H, C(O)CH_3), 2.00 (s, 6 H, C(O)CH_3), 1.95 (s, 6 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.4, 170.3, 170.1, 170.0, 169.8, 169.5, 169.0, (*C*(O)CH_3), 153.9 (OC(O)N), 138.4, 129.0, 126.7, 125.7 (Ar), 100.9 (C-1^{Gal}), 92.8 (C-1^{Glc}), 75.7 (C-4^{Glc}), 73.4 (C-5^{Glc}), 72.7 (C-3^{Glc}), 71.0 (C-3^{Gal}), 70.6 (C-5^{Gal}), 70.6 (C-2^{Glc}), 69.0 (C-2^{Gal}), 66.5 (C-4^{Gal}), 61.6 (C-6^{Glc}), 60.6 (C-6^{Gal}), 44.8 (CH_2^{Bn}), 20.7-20.5 (C(O)*C*H_3),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 1483.4	m/z = 1499.4
	gef.:	m/z = 1483.4	m/z = 1499.7

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 50.96	H: 5.52	N: 1.92
	gef.:	C: 50.80	H: 5.70	N: 1.88

5.3.25. *N*,*N*'-Bis-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyloxycarbonyl)-*m*-xylylen-diamin (50)



$C_{34}H_{52}N_2O_{24}$

872.78 g/mol

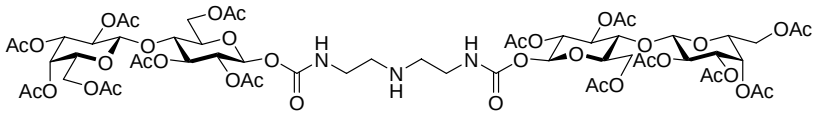
Durch Reaktion des divalenten acetylierten Derivats Ac-**50** (102 mg, 0.154 mmol) mit 500 µL 0.5 M NaOMe-Lösung in 2 mL Methanol entsprechend **AAV 3a,** konnten in quantitativer Ausbeute 134 mg des metasubstituierten divalentenen Liganden **50** erhalten werden.

^{1}H-NMR [600 MHz, D_2O]: δ = 7.30-7.28 (m, 1 H, Ar), 7.18-7.16 (m, 3 H, Ar), 5.35 (d, J = 8.2 Hz, 2 H, H-1^{Glc}), 4.36 (d, J = 7.7 Hz, 2 H, H-1^{Gal}), 4.25 (bs, 4 H, CH_2^{Bn}), 3.85-3.82 (m, 4 H, H-4^{Gal}, H-6^{Glc}), 3.72-3.60 (m, 14 H, H-3^{Glc}, H-4^{Glc}, H-5^{Glc}, H-5^{Gal}, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.57-3.55 (m, 2 H, H-3^{Gal}), 3.46-3.40 (m, 4 H, H-2^{Glc}, H-2^{Gal}),

^{13}C-NMR [150 MHz, D_2O]: δ = 156.6 (OC(O)N), 138.6, 129.1, 126.1, 126.0 (Ar), 102.9 (C-1^{Gal}), 94.9 (C-1^{Glc}), 77.8, 75.4, 75.4, 74.1, 72.5 (C-3^{Glc}, C-3^{Gal}, C-4^{Glc}, C-5^{Glc}, C-5^{Gal}), 71.7 (C-2^{Glc}), 71.0 (C-2^{Gal}), 68.6 (C-4^{Gal}), 61.1 (C-6^{Gal}), 59.8 (C-6^{Glc}), 44.0 (CH_2^{Bn}),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 895.3	m/z = 911.3
	gef.:	m/z = 895.2	m/z = 911.1

5.3.26. Bis-(2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-*β*-D-glukopyranosyloxycarbonylamino)-ethyl)-amin (Ac-51)



$C_{58}H_{81}N_3O_{38}$

1428.26 g/mol

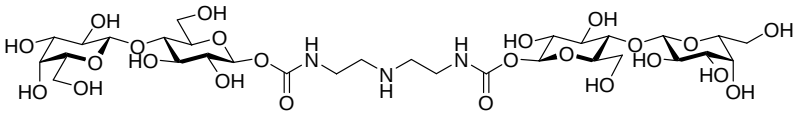
202 mg (0.252 mmol) des Laktosylcarbonats *β*-**12** wurden entsprechend **AAV 2** mit 11 µl (0.105 mmol) Diethylentriamin in 2 mL CH_2Cl_2 (abs.) umgesetzt. Nach Flash-Chromatographie (CH_2Cl_2:MeOH / 15:1) und Trocknung im Ölpumpenvakuum konnten 105 mg (71%) des divalenten Derivats Ac-**51** isoliert werden.

^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 5.76 (t, *J* = 5.1 Hz, 2 H, NHC(O)), 5.58 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H, H-1^{Glc}), 5.31 (d, *J* = 2.8 Hz, 2 H, H-4^{Gal}), 5.21 (t, *J* = 9.1 Hz, 2 H, H-3^{Glc}), 5.06 (dd, *J* = 9.9 Hz, *J* = 8.3 Hz, 2 H, H-2^{Gal}), 4.98 (t, *J* = 8.9 Hz, 2 H, H-2^{Glc}), 4.91 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 2.9 Hz, 2 H, H-3^{Gal}), 4.48-4.42 (m, 4 H, H-1^{Gal}, H-6^{Glc}), 4.11-4.09 (m, 2 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal},), 4.05-4.02 (m, 2 H, H-6´^{Gal}), 3.86-3.84 (m, 4 H, H-4^{Glc}, H-5^{Gal},), 3.73-3.71 (m, 2 H, H-5^{Glc}), 3.40-3.18 (m, 4 H, CH_2CH_2NH), 2.76-2.71 (m, 4 H, CH_2CH_2NH), 2.11 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.07 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.02 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.01 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.00 (s, 6 H, C(O)CH_3), 1.99 (s, 6 H, C(O)CH_3), 1.95 (s, 6 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.3, 170.2, 170.0, 170.0, 169.5, 168.9 (*C*(O)CH_3), 154.0 (OC(O)N), 100.8 (C-1^{Gal}), 92.6 (C-1^{Glc}), 75.5 (C-4^{Glc}), 73.2 (C-5^{Glc}), 72.6 (C-3^{Glc}), 70.9 (C-3^{Gal}), 70.5 (C-5^{Gal}), 70.5 (C-2^{Glc}), 68.9 (C-2^{Gal}), 66.5 (C-4^{Gal}), 61.6 (C-6^{Glc}), 60.6 (C-6^{Gal}), 48.0 (CH_2CH_2NH), 40.3 (CH_2CH_2NH), 20.8-20.5 (C(O)CH_3),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 1450.5	m/z = 1466.5
	gef.:	m/z = 1449.6	m/z = 14.66.0

5.3.27. Bis-(2-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyloxycarbonylamino)-ethyl)-amin (51)



$C_{30}H_{53}N_3O_{24}$

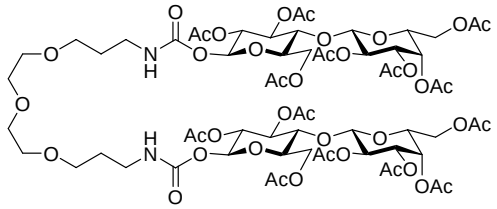
839.75 g/mol

67 mg (0.047 mmol) des divalenten Derivats Ac-**51** wurden entsprechend **AAV 3b** gelöst in 2.4 mL $EtNMe_2$:MeOH / 5:1 umgesetzt. Nach 7 Tagen konnten 39 mg (99%) des divalenten Liganden **51** als weißes Lyophilisat erhalten werden.

^{1}H-NMR [600 MHz, D_2O]: δ = 5.34 (d, J = 8.2 Hz, 2 H, H-1^{Glc}), 4.35 (d, J = 7.5 Hz, 2 H, H-1^{Gal}), 3.85-3.82 (m, 4 H, H-4^{Gal}, H-6^{Glc}), 3.72-3.54 (m, 16 H, H-3^{Glc}, H-3^{Gal}, H-4^{Glc}, H-5^{Glc}, H-5^{Gal}, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.45-3.39 (m, 4 H, H-2^{Gal}, H-2^{Glc}), 3.20-3.13 (bs, 4 H, CH_2CH$_2$NH), 2.78 (bs, 4 H, CH$_2$CH_2NH),

^{13}C-NMR [150 MHz, D_2O]: δ = 156.6 (OC(O)N), 102.9 (C-1^{Gal}), 94.8 (C-1^{Glc}), 77.8, 75.4, 75.3, 74.1 (C-3^{Glc}, C-4^{Glc}, C-5^{Glc}, C-5^{Gal}), 72.6 (C-3^{Gal}), 71.6 (C-2^{Glc}), 71.0 (C-2^{Gal}), 68.6 (C-4^{Gal}), 61.1 (C-6^{Gal}), 59.7 (C-6^{Glc}), 47.2 (CH$_2$*C*H$_2$NH), 38.9 (*C*H$_2$CH$_2$NH).

5.3.28. *N*,*N*'-Bis-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-*β*-D-glukopyranosyloxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin (Ac-52)



$C_{64}H_{92}N_2O_{41}$

1545.4 g/mol

150 mg (0.190 mmol) des Laktosylcarbonats *β*-**12** wurden entsprechend **AAV 2** mit 17 µl (0.078 mmol) 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin **42** in 4 mL CH_2Cl_2 (abs.) umgesetzt. Nach Flash-Chromatographie (EE) und Trocknung im Ölpumpenvakuum konnten 91 mg (89%) des divalenten Derivats Ac-**52** als weißer Feststoff erhalten werden.

DC: R_f = 0.36 (EE)

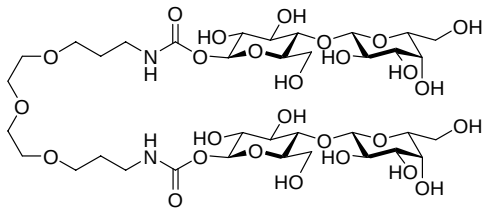
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 5.62 (d, J = 8.2 Hz, 2 H, H-1^{Glc}), 5.54 (t, J = 5.3 Hz, 2 H, NHC(O)), 5.35 (bs, 2 H, H-4^{Gal}), 5.24 (t, J = 9.4 Hz, 2 H, H-3^{Glc}), 5.10 (t, J = 8.2 Hz, 2 H, H-2^{Gal}), 5.00 (t, 2 H, J = 8.8 Hz, H-2^{Glc}), 4.94 (dd, 2 H, J = 10.0 Hz, J = 2.9 Hz, H-3^{Gal}), 4.48-4.44 (m, 4 H, H-1^{Gal}, H-6^{Glc}), 4.15-4.07 (m, 6 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.88-3.84 (m, 4 H, H-4^{Glc}, H-5^{Gal}), 3.76-3.75 (m, 2 H, H-5^{Glc}), 3.61 (bs, 4 H, OCH_2CH$_2$O), 3.58 (bs, 4 H, OCH$_2$CH_2O), 3.54 (bs, 4 H, OCH_2CH$_2$), 3.29 (bs, 4 H, CH$_2$CH_2NH), 2.15 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 2.11 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 2.06 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 2.04 (s, 12 H, C(O)CH$_3$), 2.03 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 1.96 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 1.79 (bs, 4 H, CH$_2$CH_2CH$_2$),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.3, 170.1, 170.1, 169.7, 169.6, 169.0 (*C*(O)CH$_3$), 153.7 (OC(O)N), 100.9 (C-1^{Gal}), 92.5 (C-1^{Glc}), 75.7 (C-4^{Glc}), 73.2 (C-5^{Glc}), 72.8 (C-3^{Glc}), 71.0 (C-3^{Gal}), 70.7 (C-5^{Gal}), 70.6 (C-2^{Glc}), 70.5 (O*C*H$_2$CH$_2$O), 70.2 (OCH$_2$*C*H$_2$O), 69.4 (O*C*H$_2$CH$_2$), 69.0 (C-2^{Gal}), 66.6 (C-4^{Gal}), 61.8 (C-6^{Glc}), 60.8 (C-6^{Gal}), 39.3 (CH$_2$*C*H$_2$NH), 29.1 (CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$), 20.8-20.5 (C(O)*C*H$_3$),

MALDI-MS:		$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$
	ber.:	m/z = 1567.5	m/z = 1583.5
	gef.:	m/z = 1567.9	m/z = 1583.9

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 49.74	H: 6.00	N: 1.81
	gef.:	C: 49.58	H: 6.18	N: 1.81

5.3.29. *N,N'*-Bis-(*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-*β*-D-glukopyranosyloxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin (52)



$C_{36}H_{64}N_2O_{27}$

956.89 g/mol

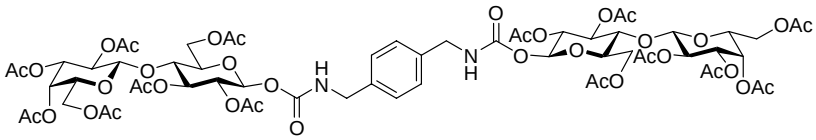
Das peracetylierte Laktosylderivat Ac-**52** (100 mg, 0.065 mmol) wurde entsprechend **AAV 3a** mit 500 µL 0.5 M NaOMe-Lösung in 2 mL Methanol umgesetzt. Man erhielt 58 mg (94%) des divalenten Liganden **52** als weißen Feststoff.

^{1}H-NMR [600 MHz, D_2O]: δ = 5.33 (d, J = 8.3 Hz, 2 H, H-1^{Glc}), 4.36 (d, J = 7.8 Hz, 2 H, H-1^{Gal}), 3.86-3.83 (m, 4 H, H-4^{Gal}, H-6^{Glc}), 3.74-3.56 (m, 24 H, H-3^{Glc}, H-3^{Gal}, H-4^{Glc}, H-5^{Glc}, H-5^{Gal}, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}, OCH_2CH$_2$O, OCH$_2$CH_2O), 3.51-3.44 (m, 6 H, H-2^{Gal}, OCH_2CH$_2$), 3.40 (t, J = 8.6 Hz, 2 H, H-2^{Glc}), 3.15 (bs, 4 H, CH$_2$CH_2NH), 1.73-1.69 (m, 4 H, CH$_2$CH_2CH$_2$),

^{13}C-NMR [150 MHz, D_2O]: δ = 156.4 (OC(O)N), 102.9 (C-1^{Gal}), 94.7 (C-1^{Glc}), 77.8, 75.4, 75.3, 74.1, 72.5 (C-3^{Glc}, C-3^{Gal}, C-4^{Glc}, C-5^{Glc}, C-5^{Gal}), 71.7 (C-2^{Glc}), 70.9 (C-2^{Gal}), 69.6 (OCH$_2$CH$_2$O), 69.3(OCH$_2$$CH_2$O), 68.6 (C-4^{Gal}), 68.3(OCH$_2$CH$_2$), 61.1 (C-6^{Gal}), 59.8 (C-6^{Glc}), 37.6 (CH$_2$$CH_2$NH), 28.5 (CH$_2$$CH_2CH_2$),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 979.4	m/z = 995.4
	gef.:	m/z = 979.4	m/z = 995.3

5.3.30. *N*,*N*'-Bis-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-*β*-D-glukopyranosyloxycarbonyl)-*p*-xylylendiamin (Ac-53)



$C_{62}H_{80}N_2O_{38}$

1461.29 g/mol

Durch Umsetzung von 123 mg (0.15 mmol) des Aktivcarbonats *β*-**12** entsprechend **AAV 2** mit 9.5 mg (0.07 mmol) *α,α´*-Diamino-*p*-xylol **43** in 3 mL CH_2Cl_2 (abs.) konnten nach säulenchromatographischer Trennung (PE:EE / 1:2) 93 mg (91%) des parasubstituierten divalenten Liganden Ac-**53** in Form von weißem Schaum isoliert werden.

DC: R_f = 0.13 (PE:EE / 1:2)

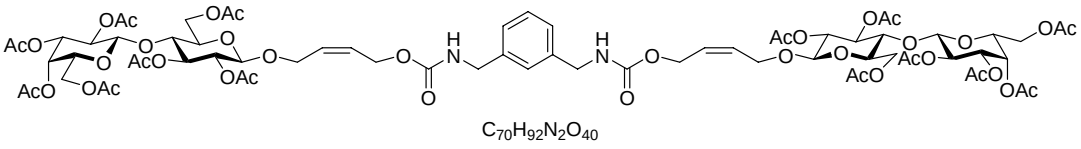
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 7.22 (bs, 4 H, Ar), 5.64 (d, J = 8.4 Hz, 2 H, H-1^{Glc}), 5.34 (bd, J = 3.4 Hz, 2 H, H-4^{Gal}), 5.27-5.22 (m, 4 H, H-3^{Glc}, NHC(O)), 5.09 (t, J = 9.8 Hz, 2 H, H-2^{Gal}), 5.00 (t, J = 9.0 Hz, 2 H, H-2^{Glc}), 4.94 (dd, J = 10.4 Hz, J = 3.4 Hz, 2 H, H-3^{Gal}), 4.48-4.43 (m, 4 H, H-6^{Glc}, H-1^{Gal}), 4.33 (d, J = 5.6 Hz, 4 H, CH_2^{Bn}), 4.14-4.05 (m, 6 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.87-3.82 (m, 4 H, H-4^{Glc}, H-5^{Gal}), 3.74-3.73 (m, 2 H, H-5^{Glc}), 2.14 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.10 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.05 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 12 H, C(O)CH_3), 2.00 (s, 6 H, C(O)CH_3), 1.95 (s, 6 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.3, 170.1, 170.0, 169.7, 169.5, 169.0 (*C*(O)CH_3), 153.7 (OC(O)N), 137.1, 127.9 (Ar), 100.9 (C-1^{Gal}), 92.8 (C-1^{Glc}), 75.7 (C-4^{Glc}), 73.3 (C-5^{Glc}), 72.6 (C-3^{Glc}), 70.9 (C-3^{Gal}), 70.7 (C-5^{Gal}), 70.5 (C-2^{Glc}), 69.0 (C-2^{Gal}), 66.6 (C-4^{Gal}), 61.7 (C-6^{Glc}), 60.8 (C-6^{Gal}), 44.7 (CH_2^{Bn}), 20.8-20.4 (C(O)*C*H_3),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 1483.4	m/z = 1499.4
	gef.:	m/z = 1483.4	m/z = 1499.4

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 50.96	H: 5.52	N: 1.92
	gef.:	C: 51.13	H: 5.71	N: 1.98

5.3.31. *N*,*N*'-Bis-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-*β*-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonyl)-*m*-xylylendiamin (Ac-54)



$C_{70}H_{92}N_2O_{40}$

1601.47 g/mol

Entsprechend **AAV 2** wurden durch Reaktion von 171 mg (196 mmol) des Aktivcarbonats **13** mit 12 mg (0.089 mmol) *α,α´*-Diamino-*m*-xylol **40** in 3 mL CH_2Cl_2 (abs.) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Trennung (PE:EE / 1:2 → 1:3) konnten 135 mg (95%) des metasubstituierten divalenten Derivats Ac-**54** isoliert werden.

DC: R_f = 0.15 (PE:EE / 1:2)

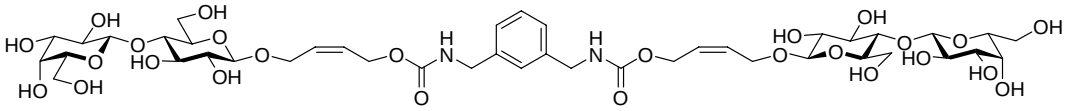
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 7.33-7.30 (m, 1 H, Ar), 7.21-7.18 (m, 3 H, Ar), 5.75-5.64 (m, 4 H, Vinyl-H), 5.35 (dd, *J* = 3.3 Hz, *J* = 0.7 Hz, 2 H, H-4^{Gal}), 5.20 (bs, 2 H, NHC(O)), 5.16 (t, *J* = 9.3 Hz, 2 H, H-3^{Glc}), 5.10 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 7.9 Hz, 2 H, H-2^{Gal}), 4.95 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 3.5 Hz, 2 H, H-3^{Gal}), 4.89 (dd, *J* = 9.4 Hz, *J* = 8.0 Hz, 2 H, H-2^{Glc}), 4.69 (dd, *J* = 13.0 Hz, *J* = 6.9 Hz, 2 H, Allyl-H), 4.57 (dd, *J* = 13.1 Hz, *J* = 5.7 Hz, 2 H, Allyl-H), 4.52-4.50 (m, 4 H, H-1^{Glc} H-6^{Glc}), 4.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 2 H, H-1^{Gal}), 4.35 (d, *J* = 5.9 Hz, 4 H, Benzyl-H), 4.31 (d, *J* = 6.2 Hz, 4 H, Allyl-H), 4.14-4.11 (m, 2 H, H-6^{Gal}), 4.09-4.06 (m, 4 H, H-6´^{Glc}, H-6´^{Gal}), 3.87 (bt, *J* = 6.8 Hz, 2 H, H-5^{Gal}), 3.79 (t, *J* = 9.5 Hz, 2 H, H-4^{Glc}), 3.61-3.59 (m, 2 H, H-5^{Glc}), 2.15 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.11 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.06 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.02 (s, 6 H, C(O)CH_3), 1.96 (s, 6 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.4, 170.3, 170.1, 170.0, 169.8, 169.7, 169.1 (*C*(O)CH_3), 156.2 (OC(O)N), 137.1, 129.1 (Ar), 128.9, 128.5 (Olefin CH), 128.5,126.6 (Ar), 101.1 (C-1^{Gal}), 99.0 (C-1^{Glc}), 76.3 (C-4^{Glc}), 72.9 (C-3^{Glc}), 72.6 (C-5^{Glc}), 71.6 (C-2^{Glc}), 71.0 (C-3^{Gal}), 70.7 (C-5^{Gal}), 69.1 (C-2^{Gal}), 66.6 (C-4^{Gal}), 64.3 (Allyl CH_2), 62.0 (C-6^{Glc}), 60.8 (C-6^{Gal}), 60.5 (Allyl CH_2), 44.9 (CH_2^{Bn}), 20.9-20.5 (C(O)*C*H_3),

MALDI-MS:		$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$
	ber.:	m/z = 1623.5	m/z = 1639.5
	gef.:	m/z = 1623.6	m/z = 1639.6

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 52.50	H: 5.79	N: 1.75
	gef.:	C: 51.92	H: 5.81	N: 1.84

5.3.32. *N*,*N*'-Bis-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-β-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonyl)-*m*-xylylendiamin (54)



$C_{42}H_{64}N_2O_{26}$

1012.96 g/mol

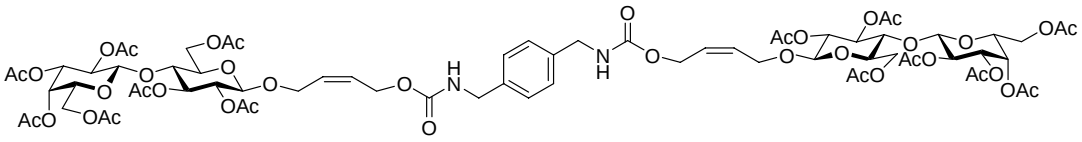
Durch Reaktion von 135 mg (0.084 mmol) der Acetyl-geschützten Verbindung Ac-**54** mit 500 µL 0.5 M NaOMe-Lösung in 2 mL Methanol (abs.) entsprechend **AAV 3a**, konnten 84 mg (98%) des metasubstituierten divalenten Liganden **54** erhalten werden.

^{1}H-NMR [600 MHz, D_2O]: δ = 7.29-7.27 (m, 1 H, Ar), 7.14-7.12 (m, 3 H, Ar), 5.73-5.71 (m, 4 H, Vinyl-H), 4.60-4.54 (m, 4 H, Allyl-H), 4.38-4.28 (m, 8 H, H-1^{Glc}, H-1^{Gal}, Allyl-H), 4.20 (s, 4 H, Benzyl-H), 3.84-3.82 (m, 4 H, H-4^{Gal}, H-6^{Glc}), 3.70-3.60 (m, 8 H, H-5^{Gal}, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.57-3.48 (m, 6 H, H-3^{Glc}, H-3^{Gal}, H-4^{Glc}), 3.45-3.42 (m, 4 H, H-2^{Gal}, H-5^{Glc}), 3.20 (t, J = 8.3 Hz, 2 H, H-2^{Glc}),

^{13}C-NMR [150 MHz, D_2O]: δ = 158.4 (OC(O)N), 139.2, 129.0 (Ar), 128.9, 128.5 (Olefin CH), 125.9, 125.3 (Ar), 102.9 (C-1^{Gal}), 100.9 (C-1^{Glc}), 78.3 (C-4^{Glc}), 75.4 (C-5^{Gal}), 74.8 (C-5^{Glc}), 74.4 (C-3^{Glc}), 72.8 (C-3^{Gal}), 72.6 (C-2^{Glc}), 71.0 (C-2^{Gal}), 68.6 (C-4^{Gal}), 64.8 (Allyl CH_2), 61.0 (C-6^{Gal}), 61.0 (Allyl CH_2), 60.0 (C-6^{Glc}), 43.9 (CH_2^{Bn}),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 1035.4	m/z = 1051.3
	gef.:	m/z = 1035.4	m/z = -

5.3.33. *N*,*N*'-Bis-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-*β*-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonyl)-*p*-xylylendiamin (Ac-55)



$C_{70}H_{92}N_2O_{40}$

1601.47 g/mol

Unter Anwendung der **AAV 2** wurden 157 mg (180 mmol) des Aktivcarbonats **13** mit 12 mg (0.084 mmol) *α,α´*-Diamino-*p*-xylol **43** in 3 mL CH_2Cl_2 (abs.) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Trennung (PE:EE / 1:2 → 1:3) konnten 130 mg (96%) des parasubstituierten divalenten Derivats Ac-**55** isoliert werden.

DC: R_f = 0.10 (PE:EE / 1:2)

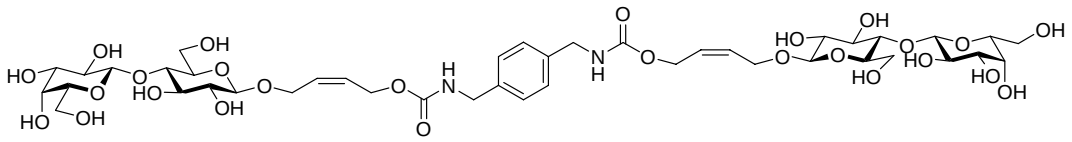
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 7.27 (s, 4 H, Ar), 5.75-5.64 (m, 4 H, Vinyl-H), 5.35 (d, *J* = 2.9 Hz, 2 H, H-4^{Gal}), 5.17 (t, *J* = 9.3 Hz, 2 H, H-3^{Glc}), 5.10 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 7.9 Hz, 2 H, H-2^{Gal}), 4.96 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 3.5 Hz, 2 H, H-3^{Gal}), 4.89 (dd, *J* = 9.4 Hz, *J* = 8.0 Hz, 2 H, H-2^{Glc}), 4.68 (dd, *J* = 12.6 Hz, *J* = 7.1 Hz, 2 H, Allyl-H), 4.57 (dd, *J* = 13.1 Hz, *J* = 5.8 Hz, 2 H, Allyl-H), 4.51-4.48 (m, 6 H, H-1^{Glc}, H-1^{Gal}, H-6^{Glc}), 4.35 (d, *J* = 5.9 Hz, 4 H, Benzyl-H), 4.32 (d, *J* = 6.3 Hz, 4 H, Allyl-H), 4.15-4.12 (m, 2 H, H-6^{Gal}), 4.10-4.07 (m, 4 H, H-6´^{Glc}, H-6´^{Gal}), 3.87 (bt, *J* = 6.7 Hz, 2 H, H-5^{Gal}), 3.79 (t, *J* = 9.5 Hz, 2 H, H-4^{Glc}), 3.62-3.60 (m, 2 H, H-5^{Glc}), 2.15 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.11 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.06 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.05 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 6 H, C(O)CH_3), 2.03 (s, 6 H, C(O)CH_3), 1.97 (s, 6 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.3, 170.3, 170.1, 170.0, 169.7, 169.6, 169.0 (*C*(O)CH_3), 156.7 (OC(O)N), 136.9 (Ar), 128.8, 128.5 (Olefin CH), 127.7 (Ar), 101.1 (C-1^{Gal}), 98.9 (C-1^{Glc}), 76.3 (C-4^{Glc}), 72.9 (C-3^{Glc}), 72.6 (C-5^{Glc}), 71.6 (C-2^{Glc}), 71.0 (C-3^{Gal}), 70.7 (C-5^{Gal}), 69.1 (C-2^{Gal}), 66.6 (C-4^{Gal}), 64.7 (Allyl CH_2), 62.0 (C-6^{Glc}), 60.8 (C-6^{Gal}), 60.5 (Allyl CH_2), 44.3 (CH_2^{Bn}), 20.8-20.5 (C(O)*C*H_3),

MALDI-MS:		$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$
	ber.:	m/z = 1623.5	m/z = 1639.5
	gef.:	m/z = 1623.4	m/z = 1639.4

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 52.50	H: 5.79	N: 1.75
	gef.:	C: 52.21	H: 5.72	N: 1.72

5.3.34. *N*,*N*'-Bis-(*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-*β*-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonyl)-*p*-xylylendiamin (55)



$C_{42}H_{64}N_2O_{26}$

1012.96 g/mol

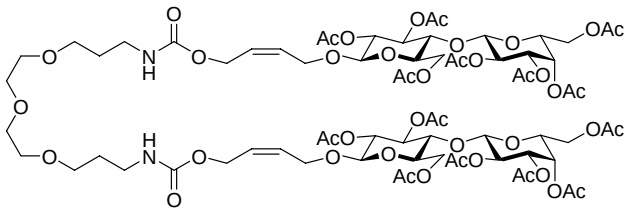
130 mg (0.081 mmol) der Verbindung Ac-**55** wurden entsprechend **AAV 3a** mit 500 µL 0.5 M NaOMe-Lösung in 2 mL Methanol (abs.) deacetyliert. Es konnten 79 mg (96%) des metasubstituierten divalenten Liganden **55** als weißes Lyophilisat erhalten werden.

^{1}H-NMR [600 MHz, D_2O]: δ = 7.21 (s, 4 H, Ar), 5.74-5.72 (m, 4 H, Vinyl-H), 4.60-4.53 (m, 4 H, Allyl-H), 4.39-4.29 (m, 8 H, H-1^{Glc}, H-1^{Gal}, Allyl-H), 4.20 (s, 4 H, Benzyl-H), 3.85-3.83 (m, 4 H, H-4^{Gal}, H-6^{Glc}), 3.71-3.66 (m, 6 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.65-3.61 (m, 2 H, H-5^{Gal}), 3.58-3.49 (m, 6 H, H-3^{Glc}, H-3^{Gal}, H-4^{Glc}), 3.46-3.43 (m, 4 H, H-2^{Gal}, H-5^{Glc}), 3.21 (t, J = 8.5 Hz, 2 H, H-2^{Glc}),

^{13}C-NMR [150 MHz, D_2O]: δ = 158.4 (OC(O)N), 135.4 (Ar), 128.9, 128.5 (Olefin CH), 127.9 (Ar), 102.9 (C-1^{Gal}), 100.9 (C-1^{Glc}), 78.3 (C-4^{Glc}), 75.4 (C-5^{Gal}), 74.8, 74.4, 72.8, 72.6, 71.0, 68.6, (C-2^{Glc}, C-2^{Gal}, C-3^{Gal}, C-3^{Glc}, C-4^{Gal}, C-5^{Glc}), 64.7 (Allyl CH_2), 61.0 (C-6^{Gal}), 61.0 (Allyl CH_2), 60.0 (C-6^{Glc}), 43.8 (CH_2^{Bn}),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 1035.4	m/z = 1051.3
	gef.:	m/z = 1034.9	m/z = -

5.3.35. *N*,*N*'-Bis-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-*β*-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin (Ac-56)



$C_{72}H_{104}N_2O_{43}$

1685.58 g/mol

140 mg (0.178 mmol) des *β*-Laktosylcarbonats **13** wurden entsprechend **AAV 2** mit 16 µl (0.073 mmol) 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin **42** in 3 mL CH_2Cl_2 (abs.) umgesetzt. Nach Flash-Chromatographie (PE:EE 1:3 → EE) und Trocknung im Ölpumpenvakuum konnten 120 mg (98%) des divalenten Derivats Ac-**56** als weißer Feststoff erhalten werden.

DC: R_f = 0.27 (EE)

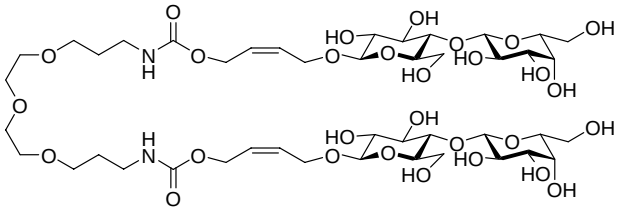
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 5.72-5.62 (m, 4 H, Vinyl-H), 5.35 (dd, *J* = 3.4 Hz, *J* = 0.8 Hz, 2 H, H-4^{Gal}), 5.18 (t, *J* = 9.3 Hz, 2 H, H-3^{Glc}), 5.10 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 7.9 Hz, 2 H, H-2^{Gal}), 4.95 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 3.5 Hz, 2 H, H-3^{Gal}), 4.89 (dd, *J* = 9.5 Hz, *J* = 8.0 Hz, 2 H, H-2^{Glc}), 4.63-4.47 (m, 10 H, H-1^{Glc}, H-1^{Gal}, H-6^{Glc}, Allyl-H), 4.33-4.26 (m, 4 H, Allyl-H), 4.15-4.12 (m, 2 H, H-6^{Gal}), 4.13-4.06 (m, 4 H, H-6´^{Glc}, H-6´^{Gal}), 3.87 (bt, *J* = 6.8 Hz, 2 H, H-5^{Gal}), 3.79 (t, *J* = 9.5 Hz, 2 H, H-4^{Glc}), 3.65-3.59 (m, 10 H, H-5^{Glc}, OC*H*$_2$CH$_2$, OCH$_2$C*H*$_2$), 3.55 (t, *J* = 5.8 Hz, 4 H, OC*H*$_2$C*H*$_2$CH$_2$), 3.29-3.26 (m, 4 H, CH$_2$C*H*$_2$NH), 2.15 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 2.12 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 2.06 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 2.05 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 2.04 (s, 12 H, C(O)CH$_3$), 1.96 (s, 6 H, C(O)CH$_3$), 1.79-1.75 (m, 4 H, CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.4, 170.3, 170.1, 170.0, 169.8, 169.7, 169.1 (*C*(O)CH$_3$), 156.2 (OC(O)N), 128.8, 128.5 (Olefin CH), 101.1 (C-1^{Gal}), 99.1 (C-1^{Glc}), 76.3 (C-4^{Glc}), 72.9 (C-3^{Glc}), 72.6 (C-5^{Glc}), 71.6 (C-2^{Glc}), 71.0 (C-3^{Gal}), 70.7 (C-5^{Gal}), 70.5 (OC*H*$_2$CH$_2$O), 70.2 (OCH$_2$C*H*$_2$O), 69.6 (OC*H*$_2$CH$_2$), 69.1 (C-2^{Gal}), 66.6 (C-4^{Gal}), 65.5 (Allyl CH$_2$), 62.0 (C-6^{Glc}), 60.8 (C-6^{Gal}), 60.2 (Allyl CH$_2$), 39.3 (CH$_2$*C*H$_2$NH), 29.4 (CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$), 20.9-20.5 (C(O)*C*H$_3$),

MALDI-MS:		$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$
	ber.:	m/z = 1707.6	m/z = 1723.6
	gef.:	m/z = 1707.2	m/z = 1723.2

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 51.30	H: 6.22	N: 1.66
	gef.:	C: 51.38	H: 5.96	N: 1.83

5.3.36. *N*,*N*'-Bis-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)- β-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamin (56)



$C_{44}H_{76}N_2O_{29}$

1097.07 g/mol

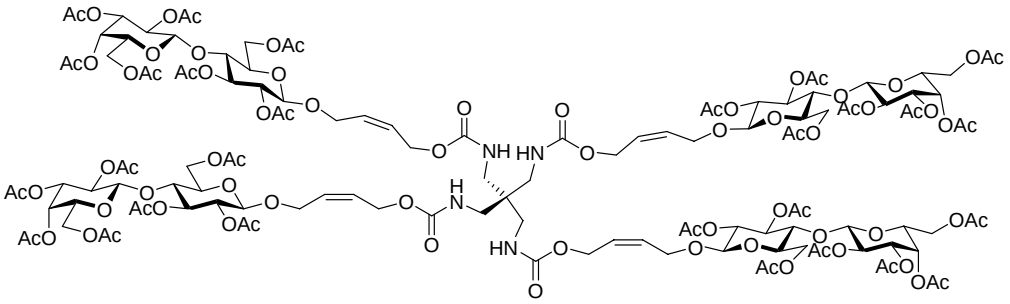
Das acetylierte Derivat Ac-**56** (120 mg, 0.071 mmol) wurde nach **AAV 3a** mit 500 µL 0.5 M NaOMe-Lösung in 2 mL Methanol (abs.) umgesetzt. Die Ausbeute der divalenten Verbindung **56** betrug 77 mg (99%).

^{1}H-NMR [600 MHz, D_2O]: δ = 5.72 (bs, 4 H, Vinyl-H), 4.60-4.53 (m, 4 H, Allyl-H), 4.41 (d, J = 8.0 Hz, 2 H, H-1^{Glc}), 4.38-4.29 (m, 6 H, H-1^{Gal}, Allyl-H), 3.87 (dd, J = 12.4 Hz, J = 1.5 Hz, 2 H, H-6^{Glc}) 3.82 (d, J = 2.9 Hz, H-4^{Gal}), 3.73-3.61 (m, 8 H, H-5^{Gal}, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal},), 3.56-3.52 (m, 14 H, H-3^{Gal}, OC*H*$_2$CH$_2$, OCH$_2$C*H*$_2$, OCH$_2$C*H*$_2$O), 3.49-3.42 (m, 8 H, H-2^{Gal}, H-3^{Glc}, H-4^{Glc}, H-5^{Glc}), 3.22 (t, J = 8.4 Hz, 2 H, H-2^{Glc}), 3.01 (t, J = 6.2 Hz, 4 H, CH$_2$C*H*$_2$NH), 1,69 (p, J = 6.3 Hz, 4 H, CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$),

^{13}C-NMR [150 MHz, D_2O]: δ = 158.2 (OC(O)N), 128.8, 128.6 (Olefin CH), 102.9 (C-1^{Gal}), 101.0 (C-1^{Glc}), 78.3 (C-4^{Glc}), 75.4 (C-5^{Gal}), 74.8, 74.5, 72.8, 72.6, 71.0, 69.6 68.6 (C-2^{Glc}, C-2^{Gal}, C-3^{Gal}, C-3^{Glc}, C-5^{Glc}, O*C*H$_2$CH$_2$), 68.4 (C-4^{Gal}), 68.3 (O*C*H$_2$CH$_2$), 64.8 (Allyl CH$_2$), 61.0 (C-6^{Gal}), 61.0 (Allyl CH$_2$), 60.8, 60.0 (C-6^{Glc}), 37.6 (CH$_2$*C*H$_2$NH), 28.7 (CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 1119.4	m/z = 1135.4
	gef.:	m/z = 1119.3	m/z = 1135.3

5.3.37. Tetrakis-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-*β*-D-glukopyranosyloxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonylamino-methyl)-methan (Ac-57)



$C_{129}H_{176}N_4O_{80}$

3062.76 g/mol

Es wurden 8 mg (0.056 mmol) des Tetraamins **44** entsprechend **AAV2** mit 240 mg (0.275 mmol) des Butenspacer-modifizierten Laktosylcarbonats **13** in 2 mL CH_2Cl_2 zur Reaktion gebracht. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie (PE : EE / 1:2 → 1:3 → 1:4) konnten 70 mg (53%) des tetravalenten Derivats Ac-**57** als weißes Lyophilisat erhalten werden.

DC: R_f = 0.20 (PE:EE / 1:3)
R_f = 0.05 (PE:EE / 1:2)

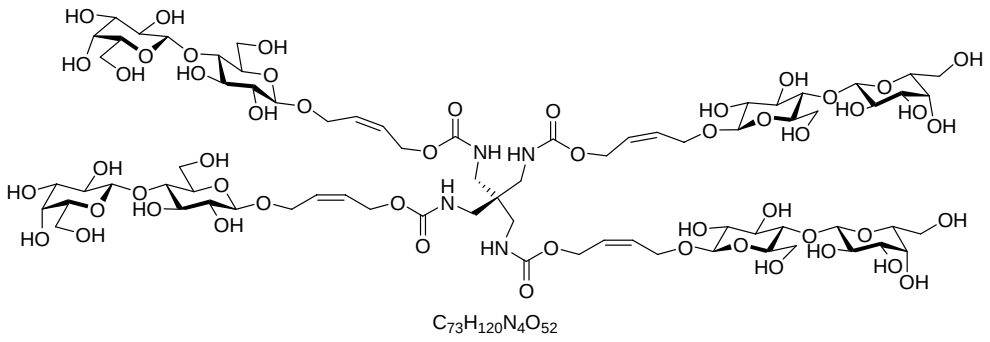
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 6.36 (t, J = 6.6 Hz, 4 H, NH), 5.73-5.65 (m, 8 H, Vinyl-H), 5.34 (d, J = 3.3 Hz, 4 H, H-4^{Gal}), 5.18 (d, J = 9.3 Hz, 4 H, H-3^{Glc}), 5.09 (dd, J = 10.4 Hz, J = 7.9 Hz, 4 H, H-2^{Gal}), 4.95 (dd, J = 10.4 Hz, J = 3.4 Hz, 4 H, H-3^{Gal}), 4.89 (dd, J = 9.4 Hz, J = 8.0 Hz, 4 H, H-2^{Glc}), 4.62-4.56 (m, 8 H, Allyl-H), 4.51-4.48 (m, 12 H, H-1^{Glc}, H-1^{Gal}, H-6^{Glc}), 4.34 (dd, J = 12.8 Hz, J = 5.2 Hz, 4 H, Allyl-H), 4.22 (dd, J = 12.8 Hz, J = 6.2 Hz, 4 H, Allyl-H), 4.14-4.06 (m, 12 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal})), 3.87 (bt, J = 6.9 Hz, 4 H, H-5^{Gal}), 3.80 (t, J = 9.4 Hz, 4 H, H-4^{Glc}), 3.60 (ddd, J = 9.7 Hz, J = 4.9 Hz, J = 2.0 Hz, 4 H, H-5^{Glc}), 2.81 (d, J = 4.2 Hz, 8 H, CCH_2NH), 2.15 (s, 12 H, C(O)CH_3), 2.12 (s, 12 H, C(O)CH_3), 2.06 (s, 12 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 24 H, C(O)CH_3), 2.03 (s, 12 H, C(O)CH_3), 1.96 (s, 12 H, C(O)CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.3, 170.3, 170.1, 170.0, 169.7, 169.6, 169.0 (C(O)CH_3), 157.8 (OC(O)N), 128.7, 128.2 (Olefin CH), 101.1 (C-1^{Gal}), 99.4 (C-1^{Glc}), 76.2 (C-4^{Glc}), 72.9 (C-3^{Glc}), 72.7 (C-5^{Glc}), 71.6 (C-2^{Glc}), 71.0 (C-3^{Gal}), 70.7 (C-5^{Gal}), 69.1 (C-2^{Gal}), 66.6 (C-4^{Gal}), 64.7 (Allyl CH_2), 62.0 (C-6^{Glc}), 61.0 (Allyl CH_2), 60.8 (C-6^{Gal}), 39.8 (CCH_2NH), 20.8-20.5 (C(O)CH_3),

MALDI-MS:		$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$
	ber.:	m/z = 3084.0	m/z = 3100.0
	gef.:	m/z = 3083.9	m/z = 3099.9

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 50.59	H: 5.79	N: 1.83
	gef.:	C: 50.77	H: 5.94	N: 1.79

5.3.38. Tetrakis-(β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-β-D-glukopyranosyloxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonylamino-methyl)-methan (57)



$C_{73}H_{120}N_4O_{52}$

1885.73 g/mol

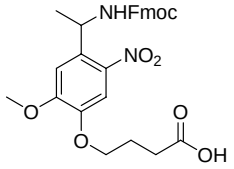
78 mg (25 mmol) des tetravalenten Derivats Ac-**57** wurden nach **AAV 3a** mit 500 µL 0.5 M NaOMe-Lösung in 2 mL Methanol (abs.) umgesetzt. In quantitativer Ausbeute konnten 48 mg des tetravalenten Liganden **57** erhalten werden.

^{1}H-NMR [600 MHz, D_2O]: δ = 5.77-5.72 (m, 8 H, Vinyl-H), 4.61-4.56 (m, 8 H, Allyl-H), 4.43-4.30 (m, 16 H, H-1^{Glc}, H-1^{Gal}, Allyl-H), 3.88 (d, J = 8.3 Hz, 4 H, H-6^{Glc}), 3.83 (d, J = 3.0 Hz, 4 H, H-4^{Gal}), 3.73-3.62 (m, 16 H, H-5^{Gal}, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.58-3.53 (m, 12 H, H-3^{Glc}, H-3^{Gal}, H-4^{Glc}), 3.49-3.43 (m, 8 H, H-2^{Gal}, H-5^{Glc}), 3.23 (t, J = 8.3 Hz, 4 H, H-2^{Glc}), 2.95 (bs, 8 H, CC*H*$_2$NH),

^{13}C-NMR [150 MHz, D_2O]: δ = 158.3 (OC(O)N), 128.8, 128.5 (Olefin CH), 102.9 (C-1^{Gal}), 100.9 (C-1^{Glc}), 78.4 (C-4^{Glc}), 75.4 (C-5^{Gal}), 74.8 (C-5^{Glc}), 74.4 (C-3^{Glc}), 72.8 (C-3^{Gal}), 72.5 (C-2^{Glc}), 71.0 (C-2^{Gal}), 68.5 (C-4^{Gal}), 64.7 (Allyl CH_2), 61.1 (Allyl CH_2), 61.0 (C-6^{Gal}), 60.0 (C-6^{Glc}), 38.8 (C*C*H$_2$NH),

MALDI-MS:		[M+Na$^+$]	[M+K$^+$]
	ber.:	m/z = 1907.7	m/z = 1923.7
	gef.:	m/z = 1908.4	m/z = -

5.3.39. 4-(4-(1-(9-Fluorenylmethoxycarbonylamino)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)-butansäure (58)



$C_{28}H_{28}N_2O_8$

520.53 g/mol

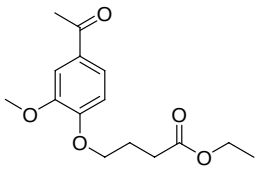
5.92 g (14 mmol) des TFA geschützten Amids **64** wurden in 100 mL Methanol suspendiert und 50 mL 1 N NaOH zugegeben. Anschließend wurde während 3 h bei Rückflusstemperatur gerührt, wobei sich bereits beim leichten Erwärmen der Niederschlag auflöste. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer auf 50 mL eingeengt, 80 mL Dioxan und 50 mL H_2O zugegeben und mit 4N HCl ein pH-Wert von 8-9 eingestellt. Nach Zugabe von 4.5 g (17 mmol) Fmoc-Cl gelöst in 50 mL Dioxan wurde durch Zugabe von 1 N NaOH für 40 Minuten der pH-Wert auf 8-9 gehalten. Es wurde noch 2 h gerührt, der Niederschlag abfiltriert und mit H_2O und MeOH gewaschen. Man erhielt 6.95 g (95%) des Fmoc-geschützten photolabilen Linkers **58**.

DC: R_f = 0.25 (PE:EE / 1:1)

^{1}H-NMR [600 MHz, DMSO-d_6]: δ = 8.07 (d, J = 8.1 Hz, 1 H, NHC(O)), 7.87 (d, J = 7.3 Hz, 2 H, Fmoc), 7.64 (d, J = 7.3 Hz, 2 H, Fmoc), 7.48 (s, 1 H, Ar), 7.40-7.38 (m, 2 H, Fmoc), 7.30-7.25 (m, 3 H, Fmoc, Ar), 5.20 (p, J = 7.2 Hz, 1 H, C*H*NHC(O)), 4.31-4.25 (m, 2 H, OCH_2CH), 4.17 (t, J = 6.3 Hz, 1 H, OCH$_2$C*H*), 4.05 (t, J = 6.0 Hz, 2 H, OCH_2CH$_2$), 3.87 (s, 3 H, OCH$_3$), 2.38 (t, J = 6.9 Hz, 2 H, CH_2C(O)OH), 1.95 (p, J = 6.7 Hz, 2 H, CH$_2$CH_2CH$_2$), 1.42 (d, J = 6.7 Hz, 3 H, CHNCH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, DMSO-d_6]: δ = 174.1 (CH$_2$*C*(O)O), 155.2 (NHC(O)O), 153.3, 146.2 (Ar), 143.8, 143.5, 140.7, 140.6 (Fmoc), 139.9, 135.3 (Ar), 127.5, 126.9, 126.8, 124.9, 120.0, 120.0 (Fmoc), 109.3, 108.1 (Ar), 67.8 (O*C*H$_2$CH$_2$), 65.1 (O*C*H$_2$CH), 56.1 (OCH$_3$), 46.6 (OCH$_2$*C*H), 45.9 (*C*HNHC(O), 30.0 (*C*H$_2$C(O)O), 24.0 (CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$), 21.8 (*C*H$_3$CNH),

5.3.40. 4-(4-Acetyl-2-methoxyphenoxy)-butanethylester (61)



$C_{15}H_{20}O_5$

280.32 g/mol

Die Synthese erfolgte entsprechend der Vorschrift von Holmes[86].

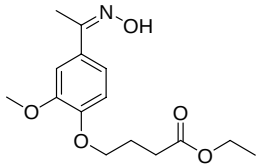
Es wurde eine Suspension bestehend aus 5 g (30 mmol) Acetovanillon **59** und 6.2 g (45 mmol) K_2CO_3 in DMF hergestellt. Hierzu wurden 4.8 mL (33 mmol) Ethyl-4-bromobutyrat **60** gegeben. Nach 20 h wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser (200 mL) beendet und die wässrige Phase 2 x mit EE (je 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt **63** (quant.) wurde direkt weiter umgesetzt.

DC: R_f = 0.47 (PE:EE / 1:1)
R_f = 0.39 (PE:EE / 1:1) (Edukt)

^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 7.47 (dd, J = 8.3 Hz, J = 1.9 Hz, 1 H, Ar), 7.44-7.43 (m, 1 H, Ar), 6.82 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, Ar), 4.06 (q, J = 7.1 Hz, 2 H, OC*H*$_2$CH$_3$), 4.05 (t, J = 6.2 Hz, 2 H, OC*H*$_2$CH$_2$), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 2.47-2.45 (m, 5 H, C(O)C*H*$_3$), $CH_2C(O)O$), 2.13-2.08 (m, 2 H, $CH_2CH_2CH_2$), 1.18 (t, J = 7.3 Hz, 3 H, OCH_2CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 196.5 *C*(O)CH_3), 172.7 (CH_2*C*(O)O), 152.4, 149.0, 130.2, 123.0, 111.1, 110.2 (Ar), 67.6 (O*C*H$_2$CH$_2$), 60.2 (O*C*H$_2$CH$_3$), 55.7 (OCH_3), 30.3 (*C*H$_2$C(O)O), 26.0 (*C*H$_3$C(O)), 24.1 (CH_2*C*H$_2$CH$_2$), 14.0 (OCH_2*C*H$_3$),

5.3.41. 4-(4-(1-(Hydroxyimino)ethyl)-2-methoxyphenoxy)-butanethylester (62)



$C_{15}H_{21}NO_5$

295.33 g/mol

Die Synthese erfolgte entsprechend der Vorschrift von Holmes[86].

Das Keton **61** (8.41 g, 30 mmol) wurde in 30 mL Pyridin/H_2O (2:1) gelöst und 2.5 g (36 mmol) Hydroxylammoniumchlorid zugegeben. Nach 15 Minuten wurde die Lösung trüb und nach 3.5 h war die Reaktion beendet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in EE und ges. NaCl-Lösung (je 200 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde erneut mit EE (200 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man das Oxim **62** als weiß-kristallinen Feststoff in quantitativer Rohausbeute.

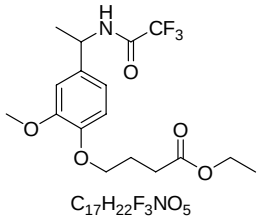
DC: R_f = 0.47 (PE:EE / 1:1)

(Färbereagenz: 2,4-Dinitrophenylhydrazin 5 mM in EtOH, selektive Anfärbung von Aldehyden gegenüber Oximen möglich, da sonst Unterscheidung des Edukts vom Produkt nicht möglich ist)

^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 7.54-7.52 (m, 1 H, Ar), 7.50-7.49 (m, 1 H, Ar), 6.82 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, Ar), 4.14-4.10 (m, 4 H, OCH_2CH$_3$, OCH_2CH$_2$), 3.89 (s, 3 H, OCH$_3$), 2.47-2.45 (m, 5 H, C(NOH)CH_3, CH$_2$C(O)O), 2.17 (p, J = 6.8 Hz, 2 H, CH$_2$CH_2CH$_2$), 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, OCH$_2$CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 197.0 (CNOH), 172.6 (CH$_2$*C*(O)O), 153.0, 149.2, 130.4, 123.2, 111.2, 110.4 (Ar), 67.7 (O*C*H$_2$CH$_2$), 60.5 (O*C*H$_2$CH$_3$), 55.9 (OCH$_3$), 30.5 (*C*H$_2$C(O)O), 26.1 (*C*H$_3$C(O)), 24.2 (CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$), 14.1 (OCH$_2$*C*H$_3$),

5.3.42. 4-(2-Methoxy-4-(1-(trifluoracetamido)ethyl)-phenoxy)-butanethylester (64)



$C_{17}H_{22}F_3NO_5$

377.36 g/mol

Es wurden 17.9 g (60 mmol) des Oxims **62** in 200 mL Eisessig aufgenommen, 1.5 g Pd/C (5%) zugegeben und anschließend unter H_2-Atmosphäre gesetzt. Nach 25 h wurde die Reaktion beendet, da bei längeren Reaktionszeiten vermehrt Nebenprodukte entstanden sind. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, durch Zugabe von ca. 50 mL Pyridin pH 8 eingestellt und erneut das am Rotationsverdampfer eingeengt. Anschließend wurde das entstandene Amin **63** in Wasser und EE aufgenommen (je 100 mL), mit 1 N HCl pH 1 eingestellt und die organische Phase erneut mit 1 N HCl gewaschen. Die pH-Wert der vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 2N NaOH auf 11 eingestellt, es wurde 3 x mit EE (je 200 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

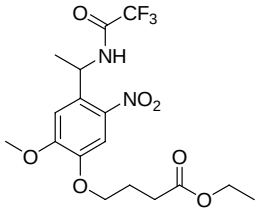
12 g (43 mmol) des braunen Öls wurden in 60 mL Pyridin (abs.) gelöst und 8.9 mL (64 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid zugetropft. Die Reaktion war nach wenigen Minuten beendet. Die Reaktionslösung wurde in EE und ges. NaCl-Lösung aufgenommen, die wässrige Phase 2 x mit EE extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Durch Umkristallisation aus CH_2Cl_2 und PE konnten 14.2 g (88%) des Amids **64** als schwach gelber Feststoff erhalten werden.

DC: $R_f = 0.56$ (PE:EE / 1:1)

^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 6.88-6.82 (m, 3 H, Ar), 6.46 (bd, J = 5.8 Hz, 1 H, NHC(O)), 6.87 (s, 1 H, Ar), 5.08 (p, J = 7.0 Hz, 1 H, C*H*NHC(O)), 4.13 (q, J = 7.1 Hz, 2 H, OC*H*$_2$CH$_3$), 4.05 (t, J = 6.3 Hz, 2 H, OC*H*$_2$CH$_2$), 3.86 (s, 3 H, OCH$_3$), 2.52 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, CH$_2$C(O)O), 2.14 (p, J = 6.7 Hz, 2 H, CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$), 1.57 (d, J = 6.9 Hz, 3 H, CHNC*H*$_3$), 1.25 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, OCH$_2$C*H*$_3$),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 173.2 (CH_2C(O)O), 156.4 (q, J = 37 Hz, C(O)CF_3), 149.8, 148.2, 133.7, 118.2 (Ar), 115.7 (q, J = 288 Hz, C(O)CF_3), 113.4, 110.5 (Ar), 68.0 (OCH_2CH_2), 60.4 (OCH_2CH_3), 56.0 (OCH_3), 49.2 (CHNHC(O), 30.7 (CH_2C(O)O), 24.5 ($CH_2CH_2CH_2$), 20.8 (CH_3CNH), 14.2 (OCH_2CH_3),

5.3.43. 4-(2-Methoxy-5-nitro-4-(1-(trifluoracetamido)-ethyl)-phenoxy)-butanethylester (65)



$C_{17}H_{21}F_3N_2O_7$

422.35 g/mol

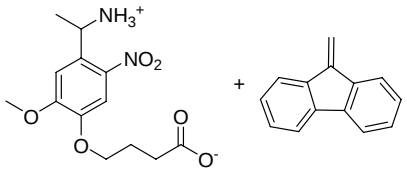
Zu 100 mL einer auf 0°C gekühlten HNO_3-Lösung (65%) wurden 7 g (18.5 mmol) der Verbindung **64** innerhalb weniger Minuten portionsweise zugeben. Der Niederschlag der entstandenen gelben Suspension wurde nach 5 Minuten abfiltriert und mit H_2O gewaschen. Der schwach gelbe Niederschlag wurde in Methanol (200 mL) gelöst und durch Zugabe von Wasser (300 mL) gefällt. Nach erneutem Abfiltrieren und Waschen mit Wasser konnten 6.2 g (81%) des nitrierten Derivats **65** erhalten werden.

DC: $R_f = 0.50$ (PE:EE / 1:1)
(Produkt im UV intensiv mit Mostain schwach sichtbar, für das Edukt vice versa)

^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 7.61 (s, 1 H, Ar), 7.38 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, NHC(O)), 6.87 (s, 1 H, Ar), 5.50 (p, J = 7.2 Hz, 1 H, C*H*NHC(O)), 4.15 (q, J = 7.1 Hz, 2 H, OC*H*$_2$CH$_3$), 4.12 (t, J = 6.3 Hz, 2 H, OC*H*$_2$CH$_2$), 3.95 (s, 3 H, OCH_3), 2.53 (t, J = 7.2 Hz, 2 H, $CH_2C(O)O$), 2.18 (p, J = 6.7 Hz, 2 H, $CH_2CH_2CH_2$), 1.62 (d, J = 7.1 Hz, 3 H, CHNC*H*$_3$), 1.26 (t, J = 7.2 Hz, 3 H, OCH_2CH_3),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 172.8 ($CH_2C(O)O$), 156.4 (q, J = 37 Hz, $C(O)CF_3$), 154.0, 147.7, 140.6, 130.7 (Ar), 115.7 (q, J = 288 Hz, $C(O)CF_3$) (111.4, 110.4 (Ar), 68.4 (OCH_2CH_2), 60.6 (OCH_2CH_3), 56.4 (OCH_3), 48.7 (*C*HNHC(O), 30.5 ($CH_2C(O)O$), 24.2 ($CH_2CH_2CH_2$), 20.0 (CH_3CNH), 14.2 (OCH_2CH_3),

5.3.44. 4-(4-(1-Aminoethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)-butansäure und Dibenzofolven (68)



$C_{13}H_{18}N_2O_6$

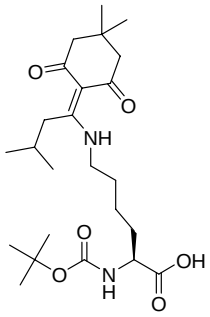
298.29 g/mol

Die quantitative Abspaltung der Fmoc-Gruppe vom geschützten photolabilen Linker **58** wurde nach 72 h, **58** gelöst in DMSO-d_6, im NMR-Röhrchen beobachtet. Wird hingegen DMF-d_7 verwendet, so ist der Fmoc-geschützte photolabile Linker **58** über mehrere Tage stabil.

^{1}H-NMR [600 MHz, DMSO-d_6]: δ = 7.88 (d, J = 7.5 Hz, 2 H, Fulven), 7.83 (d, J = 7.5 Hz, 2 H, Fulven), 7.73 (bd, J = 7.1 Hz, 1 H, NHC(O)) 7.48 (s, 1 H, Ar), 7.47 (s, 0.6 Ar), 7.41 (dt, J = 7.5 Hz, J = 0. Hz, 2 H, Fulven), 7.34 ((dt, J = 7.4 Hz, J = 0.8 Hz, 2 H, Fulven), 7.29 (s, 0.4 H, Ar), 6.27 (s, 2H, Vinyl), 5.18 (p, J = 7.3 Hz, 0.4 H, C*H*NHC(O)), 4.57 (q, J = 6.4 Hz, 0.6 H, C*H*NHC(O)), 4.04 (t, J = 6.5 Hz, 2 H, OCH_2CH$_2$), 3.90 (s, 1.7 H, OCH$_3$), 3.88 (s, 1.3 H, OCH$_3$), 2.34 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, CH_2C(O)OH), 1.94 (p, J = 6.9 Hz, 2 H, CH$_2$CH_2CH$_2$), 1.37 (d, J = 7.0 Hz, 1.3 H, CHNCH_3), 1.35 (d, J = 6.6 Hz, 1.7 H, CHNCH_3)

^{13}C-NMR [150 MHz, DMSO-d_6]: δ = 174.5 (CH$_2$*C*(O)O), 153.4, 153.1, 146.1 (Ar), 142.5 (Fulven), 140.0, 139.7 (Ar), 139.3, 137.3 (Fulven), 136.4, 136.1 (Ar), 128.8, 127.2, 121.3, 119.9 (Fulven), 109.7 (Ar), 109.6 (Fulven), 109.5, 108.3, 108.1 (Ar), 68.0 (O*C*H$_2$CH$_2$), 56.1 (OCH$_3$), 45.7, 45.6 (*C*HNH$_2$), 30.4 (*C*H$_2$C(O)O), 24.2, 24.0 (CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$), 22.3 (*C*H$_3$CNH),

5.3.45. Boc-D-Lys-(Ddv)-OH (69)



$C_{24}H_{40}N_2O_6$

452.58 g/mol

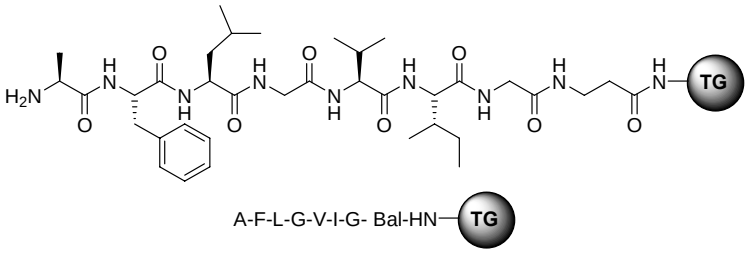
Zu einer Lösung aus 1 g (4.5 mmol) Ddv-OH[63] (**71**) in 20 mL Ethanol wurden 550 mg (2.2 mmol) Boc-Lys-OH (**70**) gegeben. Die Suspension wurde während 24 h bei Rückflusstemperatur gerührt wobei bereits nach 1 h der Niederschlag gelöst war. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH_2Cl_2:MeOH / 9:1 +0.3% AcOH) und 5 x mit Toluol zur Entfernung der Essigsäure koevaporiert. Die Ausbeute der Aminosäure Boc-D-Lys(Ddv)-OH **69** betrug 850 mg (85%).

DC: R_f = 0.43 (CH_2Cl_2:MeOH / 9:1 +0.3% AcOH)
R_f = 0.21 (CH_2Cl_2:MeOH / 9:1 +0.1% AcOH)

^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 5.29 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, C(O)NH), 4.33-4.30 (m, 1 H, NHC*H*C(O)), 3.45-3.43 (m, 2 H, C$^{\varepsilon}$H, C$^{\varepsilon}$H´), 2.96 (bs, 2 H, Allyl-CH_2), 2.36 (s, 4 H, CCH_2C(O)), 1.97-1.89 (m, 2 H, C*H*$(CH_3)_2$, C$^{\beta}$H), 1.73-1.67 (m, 4 H, C$^{\beta}$H´, C$^{\gamma}$H, C$^{\gamma}$H´, NH), 1.54-1.50 (m, 2 H, C$^{\delta}$H, C$^{\delta}$H´), 1.42 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 1.00 (s, 6 H, $C(CH_3)_2$), 0.97 (s, 3H, $CH(CH_3)_2$), 0.95 (s, 3 H, $CH(CH_3)_2$),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 198.1 (CH_2C(O)C),176.8 (COOH), 175.0 (CH_2*C*NH), 156.6 (OC(O)NH), 106.9 (C(O)*C*C(O)), 79.9 ($C(CH_3)_3$), 53.0, 52.7 (C*C*H_2C(O)), 43.6 (C$^{\varepsilon}$H), 37.5 (Allyl-CH_2), 32.2 (C$^{\beta}$H), 29.9 (*C*H$(CH_3)_2$), 29.0 (C$^{\gamma}$H), 28.7 (*C*$(CH_3)_2$), 28.3 ($C(CH_3)_3$), 28.1 ($C(CH_3)_2$), 22.6 (C$^{\delta}$H), 22.6 ($CH(CH_3)_2$).

5.3.46. A-F-L-G-V-I-G-Bal-NH-TG (77)

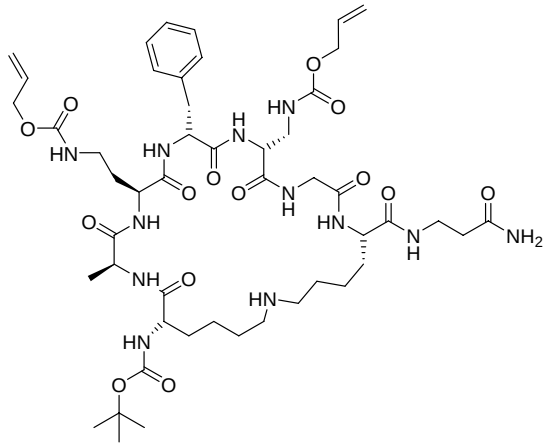


$C_{36}H_{58}N_9O_8^{\bullet}$

Die Synthese des Oktapeptids **77** (20 µmol) erfolgte am Synthesizer A433 von Applied Biosystems auf 67 mg aminofunktionalisiertem TentaGel (Beladungsdichte 0.3 mmol/g) unter Verwendung der FastMoc-Chemistry-Datei.

Durch erfolgreiche Edman-Sequenzierung (siehe Anhang) konnte zum einen die Zuverlässigkeit des Edman-Sequenzierers der AG Przybylski als auch die gelungene Synthese des Peptids gezeigt werden.

5.3.47. cyclo[Boc-K-A-Dab(Alloc)-D-Phe-D-Dpr(Alloc)-G-E]-Bal-NH_2 (c-82)



cyclo[Boc-K-A-Dab(Alloc)-D-Phe-D-Dpr(Alloc)-G-E]-Bal-NH_2

$C_{49}H_{76}N_{12}O_{14}$

1057.20 g/mol

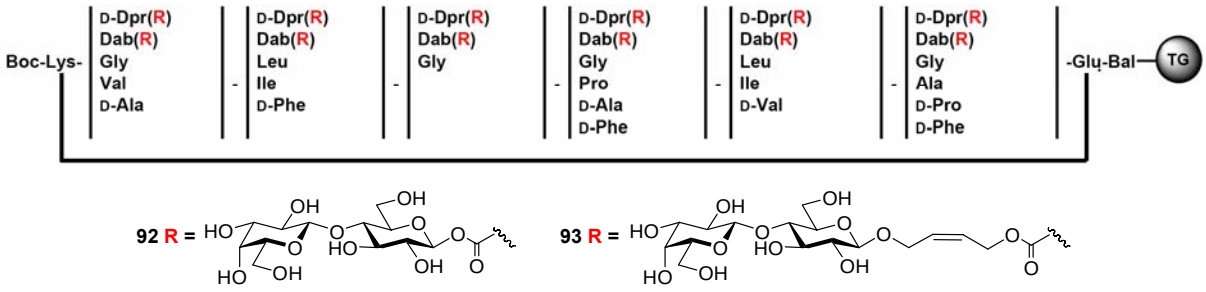
Die Synthese des linearen Peptides **81** erfolgte unter Verwendung von 200 mg Sieberamid-funktionalisiertem Harz **80** (Beladungsdichte 0.12 mmol/g) entsprechend **AAV 4**. Die Abspaltung der Schutzgruppen Ddv und Dmab erfolgte analog **AAV 7** (**82**). Nach Cyclisierung mit verschiedenen Aktivierungsreagenzien (PyBOP **84**, PyAOP **85**)

entsprechend **AAV 8** und Abspaltung vom Harz (**AAV 12**) erhielt man Cyclopeptid **c-82**. Weitere Cyclisierungsversuche führten entweder zu quantitativem Capping des N-Terminus (HBTU **83**) oder zu keiner Cyclisierung (PyBrOP **86**).

HPLC: t_R = 14.12 (20-80% B in 30 min, 4 mm, 1 mL/min, cyclisch)
t_R = 11.35 (20-80% B in 30 min, 4 mm, 1 mL/min, linear)

MALDI-MS:		$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$
	ber.:	m/z = 1079.6	m/z = 1095.6
	gef.:	m/z = 1079.3	m/z = -

5.3.48. Split&Mix-Bibliotheken 92 und 93

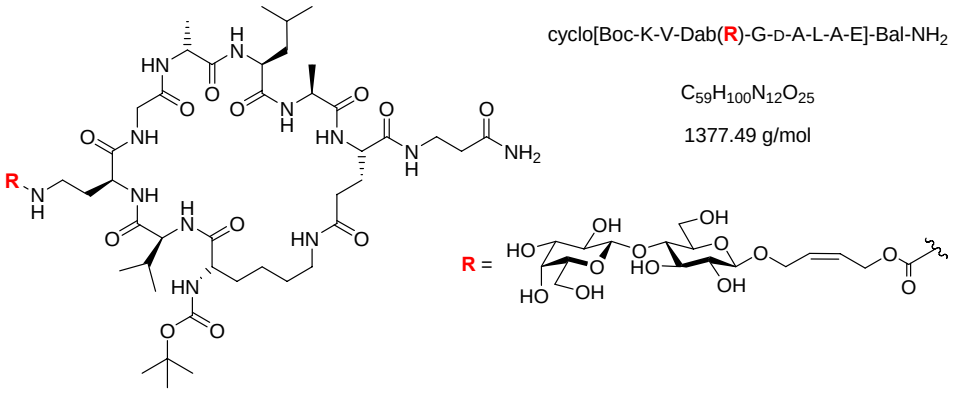


Entsprechend **AAV 4** wurde durch Kupplung über Nacht die Beladungsdichte (0.32 mmol/g) von 6 g aminofunktionalisiertem TentaGel unter Verwendung einer Mischung von Fmoc-Bal-OH:Boc-Bal-OH / 2:3 auf 0.09 mmol/g reduziert. Die Split&Mix-Synthese wurde wie in der Literatur[68] beschrieben durchgeführt. Für die einzelnen Kupplungsschritte wurde nach **AAV 4** verfahren (**89**). Die Ddv/Dmab-Schutzgruppen wurden entsprechend **AAV 7** abgespalten. Die Cyclisierung erfolgte nach **AAV 8** (**91**). Nach Abspaltung der Alloc-Schutzgruppen (**AAV 9**), Anknüpfung des Carbonat-funktionalisierten Laktosederivats *β*-**12** bzw. **13** (**AAV 10**) wurde abschließend nach **AAV 11** deacetyliert. Man erhielt die one-bead-one-compound Bibliotheken **92** und **93** bestehend aus (theoretisch) 13500 Neoglycopeptiden unterschiedlicher Valenz (0-6 Zucker).

5.3.49. Synthese der VAA-Liganden 111-113

Die Synthese der linearen Peptide erfolgte unter Verwendung von 400 mg Sieberamid-funktionalisiertem TentaGel (Beladungsdichte 0.20 mmol/g) am Peptidsynthesizer A433 von Applied Biosystems nach der FastMoc-Chemistry-Routine. Es wurde lediglich die Reaktionszeit pro Kupplungsschritt von 20 Minuten auf 1 h erhöht. Durch Online-Monitoring (Messung der Leitfähigkeit) und einem TNBS-Test konnte der Erfolg der Synthese überprüft werden. Die Abspaltung der Schutzgruppen Ddv und Dmab erfolgte analog **AAV 7**. Die Cyclisierung wurde entsprechend **AAV 8** durchgeführt. Von 200 mg des Harzes wurden die Alloc-Schutzgruppen abgespalten (**AAV 9**), das Carbonat-funktionalisierte Laktosederivat **3** angeknüpft (**AAV 10**) und schließlich nach Abspaltung vom Harz **(AAV 12)** nach **AAV 3a** deacetyliert. Man erhielt die cyclischen Neoglycopeptide **111-113**.

5.3.50. cyclo[Boc-K-V-Dab(R)-G-D-A-L-A-E]-Bal-NH_2 (111)

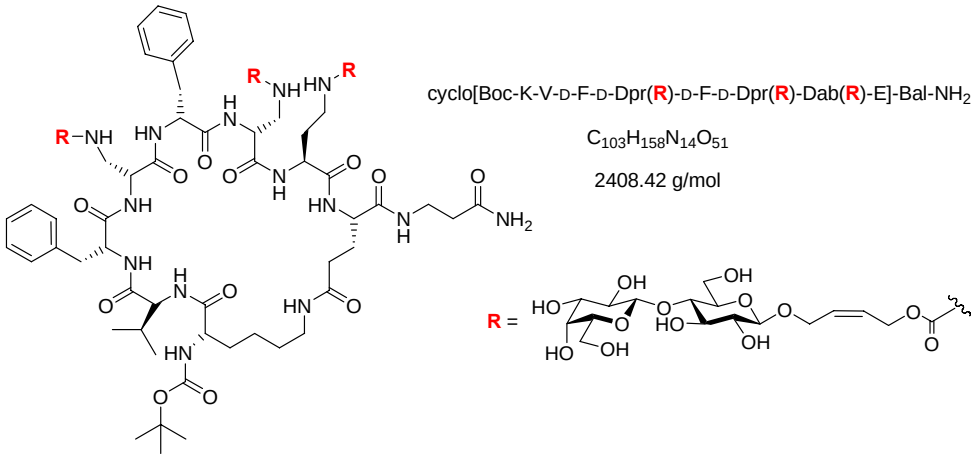


HPLC: t_R = 11.39 (20-50% B in 30 min, 4 mm, 1 mL/min)

t_R = 17.85 (20-80% B in 30 min, 4 mm, 1 mL/min, acetyliert)

MALDI-MS:		$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$
	ber.:	m/z = 1399.7	m/z = 1415.7
	gef.:	m/z = 1400.1	m/z = 1416.1

5.3.51. cyclo[Boc-K-A-Dab(R)-D-F-D-Dpr(R)-Dab(R)-E]-Bal-NH_2 (112)



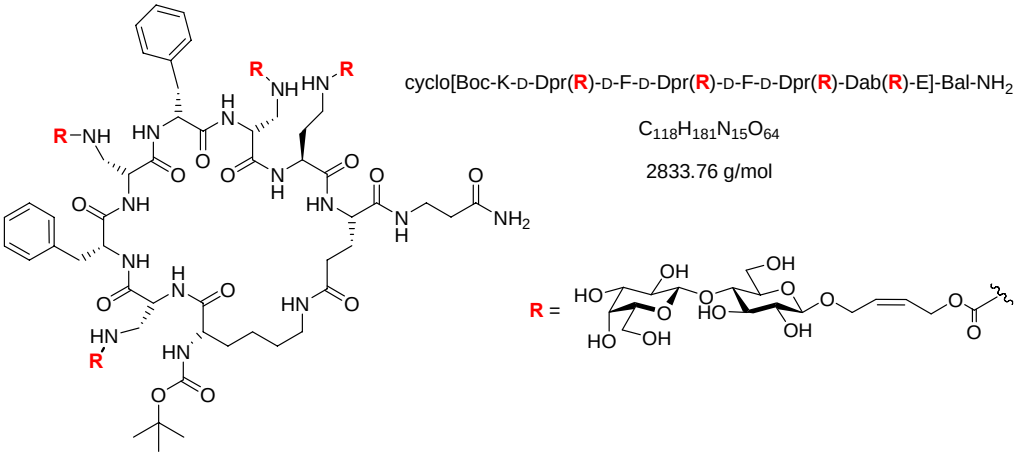
Bei der chromatographischen Reinigung konnten zwei Peaks gleicher Masse isoliert werden. Es ist davon auszugehen, dass ein stereogenes Zentrum (evtl. unter den basischen Bedingungen der Acetyl-Schutzgruppenabspaltung) racemisierte. Da beide Derivate eine vergleichbare Affinität zum Lektin zeigten, wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet.

HPLC: t_R = 14.30, 14.66 (20-50% B in 30 min, 4 mm, 1 mL/min)
t_R = 25.41 (20-80% B in 30 min, 4 mm, 1 mL/min, acetyliert)

ESI-MS (pos. Modus):		$[M+H^+ + Na^+]$	$[M+2Na^+]$	$[M+Na^+ + K^+]$
	ber.:	m/z = 1215.5	m/z = 1226.5	m/z = 1234.5
	gef.:	m/z = 1216.0	m/z = 1227.0	m/z = 1235.0

ESI-MS (neg. Modus):		$[M-2H^+]$
	ber.:	m/z = 1202.5
	gef.:	m/z = 1202.5

5.3.52. cyclo[Boc-K-D-Dpr(R)-D-F-D-Dpr(R)-D-F-D-Dpr(R)-Dab(R)-E]-Bal-NH_2 (113)



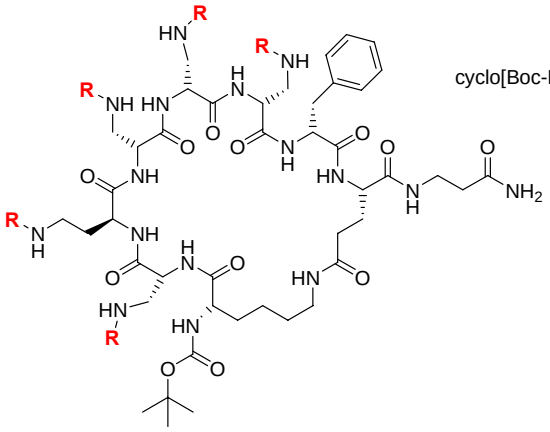
Bei der chromatographischen Reinigung konnten zwei Peaks gleicher Masse isoliert werden. Es ist davon auszugehen, dass ein stereogenes Zentrum (evtl. unter den basischen Bedingungen der Acetyl-Schutzgruppenabspaltung) racemisierte. Da beide Derivate eine vergleichbare Affinität zum Lektin zeigten, wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet.

HPLC: t_R = 12.33, 12.59 (20-50% B in 30 min, 4 mm, 1 mL/min)
t_R = 25.86 (20-80% B in 30 min, 4 mm, 1 mL/min, acetyliert)

ESI-MS (pos. Modus):		$[M+3Na^+]$	$[M+2Na^+]$
	ber.:	m/z = 967.0	m/z = 1439.1
	gef.:	m/z = 967.5	m/z = 1439.5

ESI-MS (neg. Modus):		$[M-3H^+]$	$[M-2H^+]$
	ber.:	m/z = 943.0	m/z = 1415.1
	gef.:	m/z = 943.5	m/z = 1416.0

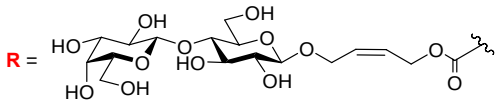
5.3.53. cyclo[Boc-K-D-Dpr(R)-Dab(R)-D-Dpr(R)-D-Dpr(R)-D-Dpr(R)-D-F-E]-Bal-NH_2 (114)



cyclo[Boc-K-D-Dpr(R)-Dab(R)-D-Dpr(R)-D-Dpr(R)-D-Dpr(R)-D-F-E]-Bal-NH_2

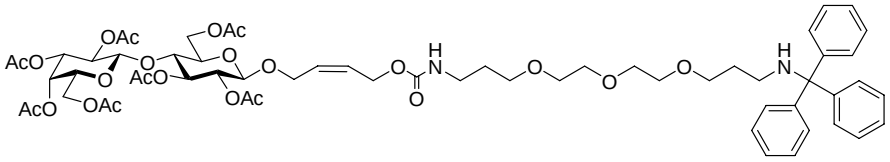
$C_{129}H_{204}N_{16}O_{77}$

3211.06 g/mol



Auf Stufe des acetylierten Derivats wurde durch HPLC ein Hauptpeak im erwarteten Bereich (siehe Tetramer) isoliert. Durch Massenspektrometrie konnte die Masse jedoch nicht bestimmt werden. Nach Deacetylierung konnte nur noch ein Produktgemisch identifiziert werden (HPLC), das nicht weiter untersucht wurde.

5.3.54. *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*β*-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-*β*-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonyl)-3-(2-(2-(3-(tritylamino)-propoxy)-ethoxy)-ethoxy)-propylamin (122)



$C_{60}H_{78}N_2O_{23}$

1195.26 g/mol

Es wurden 2.26 g (2.59 mmol) **13** in CH_2Cl_2 gelöst, 452 µl (2.59 mmol) DIEA zugegeben und zügig 1.0 g (2.16 mmol) 3-(2-(2-(3-(Tritylamino)propoxy)ethoxy)ethoxy)-propan-1-amin **121** gelöst in 3 mL CH_2Cl_2 zugetropft. Nach 15 Minuten wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie gereinigt (PE:EE / 1:1 → 1:2 → 1:3). Man erhielt das Laktosederivat **122** in einer Ausbeute von 2.47 g (96%).

DC: R_f = 0.31 (PE:EE / 1:3)

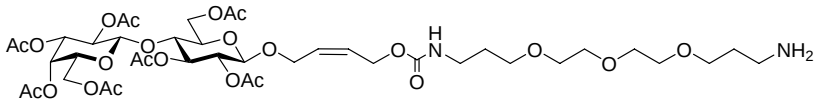
^{1}H-NMR [600 MHz, $CDCl_3$]: δ = 7.46-7.45 (m, 6 H, Ar), 7.27-7.24 (m, 6 H, Ar), 7.17-7.15, m, 3 H, Ar), 5.71-5.60 (m, 2 H, Vinyl-H), 5.35 (bs, 1 H, NH), 5.34 (d, *J* = 3.3 Hz, 1 H, H-4^{Gal}), 5.18 (d, *J* = 9.3 Hz, 1 H, H-3^{Glc}), 5.10 (dd, *J* = 10.3 Hz, *J* = 8.0 Hz, 1 H, H-2^{Gal}), 4.95 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 3.4 Hz, 1 H, H-3^{Gal}), 4.89 (dd, *J* = 9.3 Hz, *J* = 8.2 Hz, 1 H, H-2^{Glc}), 4.62-4.47 (m, 3 H, Allyl-H, H-6^{Glc}), 4.51 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, H-1^{Glc}), 4.48 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H, H-1^{Gal}), 4.32-4.26 (m, 2 H, Allyl-H), 4.14-4.06 (m, 3 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 1 H, H-5^{Gal}), 3.79 (t, *J* = 9.4 Hz, 1 H, H-4^{Glc}), 3.64-3.50 (m, 13 H, H-5^{Glc}, OC*H*$_2$), 3.25 (q, *J* = 5.8 Hz, 2 H, C(O)NHC*H*$_2$), 2.21-2.19 (m, 2 H, NHC*H*$_2$), 2.13 (s, 3 H, C(O)CH$_3$), 2.11 (s, 3 H, C(O)CH$_3$), 2.05 (s, 3 H, C(O)CH$_3$), 2.04 (s, 3 H, C(O)CH$_3$), 2.03 (s, 3 H, C(O)CH$_3$), 2.02 (s, 3 H, C(O)CH$_3$), 1.95 (s, 3 H, C(O)CH$_3$), 1.77-1.73 (m, 4 H, CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$),

^{13}C-NMR [150 MHz, $CDCl_3$]: δ = 170.3, 170.2, 170.0, 169.9, 169.7, 169.5, 169.0 (*C*(O)CH$_3$), 156.1 (OC(O)N), 146.1 (Ar), 128.8 (Olefin CH), 128.5 (Ar), 128.3 (Olefin CH), 127.6, 126.0 (Ar), 101.0 (C-1^{Gal}), 99.6 (C-1^{Glc}), 76.2 (C-4^{Glc}), 72.8 (C-3^{Glc}), 72.5 (C-5^{Glc}), 71.5 (C-2^{Glc}), 70.9 (C-3^{Gal}), 70.7 (*C*Ph$_3$), 70.6 (C-5^{Gal}), 70.5, 70.4, 70.1, 70.0, 69.9, 69.5 (O*C*H$_2$), 69.0 (C-2^{Gal}), 66.5 (C-4^{Gal}), 64.3 (Allyl CH$_2$), 61.9 (C-6^{Glc}), 60.7 (C-6^{Gal}), 60.0 (Allyl CH$_2$), 40.9 (NH*C*H$_2$), 39.2 (C(O)NH*C*H$_2$), 30.5, 29.2 (CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$), 20.7-20.4 (C(O)*C*H$_3$),

MALDI-MS:		$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$
	ber.:	m/z = 1217.5	m/z = 1233.5
	gef.:	m/z = 1217.3	m/z = 1233.3

Elementaranalyse:				
	ber.:	C: 60.29	H: 6.58	N: 2.34
	gef.:	C: 60.12	H: 6.52	N: 2.37

5.3.55. *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-β-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonyl)-3-(2-(2-(3-(amino)-propoxy)-ethoxy)-ethoxy)-propylamin (Ac-123)

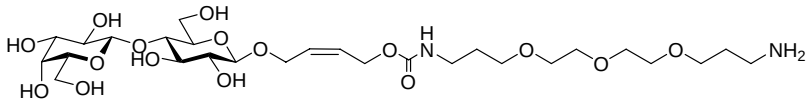


$C_{41}H_{64}N_2O_{23}$

952.95 g/mol

In 20 mL CH_2Cl_2 wurden 2.47 g (2.07 mmol) des Laktosederivats **122** gelöst. Hierzu wurden 0.6 mL (3.01 mmol) TIS und 2.3 mL (30 mmol) TFA gegeben. Nach Beendigung der Reaktion (ca. 1 h) wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, anschließend chromatographisch (MeOH:$CHCl_3$ / 1:4) gereinigt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

5.3.56. *N*-(*β*-D-Galaktopyranosyl-(1→4)-*β*-D-glukopyranosyl-oxy-(Z)-but-2-en-oxy-carbonyl)-3-(2-(2-(3-(amino)-propoxy)-ethoxy)-ethoxy)-propylamin (123)



$C_{27}H_{50}N_2O_{16}$

658.69 g/mol

500 mg (0.52 mmol) der acetylierten Verbindung Ac-**123** wurden entsprechend **AAV 3a** mit 500 µL 0.5 M NaOMe-Lösung in 3 mL Methanol (abs.) umgesetzt. Es wurde über Nacht gerührt, da nach 3 bzw. 6 h gemäß MALDI-MS im Reaktionsgemisch noch partiell acetylierte Derivate detektiert wurden. Anschließend wurde mit schwach saurem Ionentauscher neutralisiert der Ionentauscher gründlich mit MeOH und Wasser gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt 275 mg (62%) des aminofunktionalisierten Laktosylderivats **123**.

^{1}H-NMR [600 MHz, D_2O]: δ =, 5.74-5.72 (m, 2 H, Vinyl-H), 4.57-4.54 (m, 2 H, Allyl-H), 4.42 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, H-1^{Glc}), 4.39-4.30 (m, 2 H, Allyl-H), 4.36 (d, J = 7.8 Hz, H-1^{Gal}), 3.88 (dd, J = 12.1 Hz, J = 1.3 Hz, 1 H, H-6^{Glc}), 3.83 (d, J = 3.1 Hz, 1 H, H-4^{Gal}), 3.74-3.67 (m, 3 H, H-6´^{Glc}, H-6^{Gal}, H-6´^{Gal}), 3.65-3.44 (m, 18 H, H-2^{Gal}, H-3^{Glc}, H-3^{Gal}, H-4^{Glc}, H-5^{Glc}, H-5^{Gal}, CH_2CH_2O), 3.23 (t, J = 8.4 Hz, 1 H, H-2^{Glc}), 3.10 (bt, J = 6.4 Hz, 2 H, C(O)NHCH_2), 3.02 (t, J = 7.1 Hz, 2 H, NHCH_2), 1.89-1.85 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2$), 1.69 (p, J = 6.4 Hz, 2H, $CH_2CH_2CH_2$),

^{13}C-NMR [150 MHz, D_2O]: δ = 158.3 (OC(O)N), 128.7, 128.6 (Olefin CH), 102.9 (C-1^{Gal}), 100.9 (C-1^{Glc}), 78.3 (C-4^{Glc}), 75.3 (C-5^{Gal}), 74.8, 74.4, 72.7, 72.5, 70.9, 69.5, 69.5, 69.4, 69.2, 68.5, 68.3, 68.3 (C-2^{Glc}, C-2^{Gal}, C-3^{Gal}, C-3^{Glc}, C-4^{Gal}, C-5^{Glc}, OCH_2), 64.7 (Allyl CH_2), 61.0 (C-6^{Gal}), 60.8 (Allyl CH_2), 60.0 (C-6^{Glc}), 37.7 (C(O)NHCH_2), 37.5 (NHCH_2), 28.7, 26.5 ($CH_2CH_2CH_2$),

5.4. Biologische Tests

5.4.1. Zusammensetzung der Puffer für das Festphasen-Screening

Alkalische-Phosphatase (AP)-Puffer

100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM TRIS, pH 9.5

Zur Herstellung des AP-Puffers wurden 1.46 g NaCl (25mmol), 254.1 mg $MgCl_2$ x 6 H_2O (1.25 mmol) und 3.94 g TRIS x HCl (25 mmol) in einen 250 mL Messkolben eingewogen, in 150-200 mL Wasser gelöst und durch Zugabe von 1 N NaOH der pH-Wert auf 9.5 eingestellt und bis zur Markierung aufgefüllt.

PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

150 mM NaCl, 10 mM Phosphat, pH 7.2

Zur Herstellung des PBS-Puffers wurden 8.76 g NaCl (150 mmol), 2.61 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O (7.3 mmol) und 0.42 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O (2.7 mmol) in einen 1 L Messkolben eingewogen, in 900 mL Wasser gelöst, der pH-Wert durch NaOH-Zugabe auf 7.2 eingestellt und auf einen Liter aufgefüllt.

PBST-Puffer

Zusatz von 0.05% Tween 20 zum PBS-Puffer.

TBS-Puffer (TRIS-gepufferte Salzlösung)

500 mM NaCl, 20 mM TRIS, pH 7.5

Zur Herstellung des TBS-Puffers wurden 29.22 g NaCl (500 mmol) und 3.15 g TRIS-HCl (20 mmol) in einen 1 L Messkolben eingewogen, in 900 mL Wasser gelöst, der pH-Wert durch NaOH-Zugabe auf 7.5 eingestellt und zur Markierung aufgefüllt.

TBST-Puffer

Zusatz von 0.05% Tween 20 in TBS-Puffer.

EDTA-Lösung

20 mM EDTA, pH 7.4

Zur Herstellung einer 20 mM EDTA-Lösung wurden 3.72 g EDTA-Dinatriumsalz x 2 H_2O (10 mmol) in einen 500 mL Messkolben eingewogen, in 400 mL Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7.4 eingestellt und bis zur Marke aufgefüllt.

Allgemeiner Lektin-Puffer (TRIS-gepuffert; Phosphat-gepuffert ist nicht möglich, da Calciumphosphat ausfällt!)

150 mM NaCl, 50 mM TRIS, 2.1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, pH 7.6

1.97 g TRIS x HCl (12.5 mmol), 2.18 g NaCl (37.5 mmol), 0.108 g $MgCl_2$ x 6 H_2O (0.52 mmol), 0.037 g $CaCl_2$ x 2 H_2O (0.25 mM) wurden in einen 250 mL Messkolben eingewogen, in 200 mL Wasser gelöst, auf pH 7.6 eingestellt und bis zur Markierung aufgefüllt.

Lektin-Puffer (HEPES-gepuffert)

150 mM NaCl, 20 mM HEPES, 2.1 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, pH 7.0

1.19 g HEPES (5 mmol), 2.19 NaCl (37.5 mmol), 0.108 g $MgCl_2$ x 6 H_2O (0.52 mmol), 0.074 g $CaCl_2$ x 2 H_2O (0.5 mmol) wurden in einen 250 mL Messkolben eingewogen, in 200 mL Wasser gelöst, der pH-Wert mit 1 N NaOH-Lösung auf 7.0 eingestellt und mit Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Färbelösung

Es wurde eine Tablette BCIP/NBT (Sigma, SigmaFast® B-5655) in 10 mL MilliQ gelöst. Die Lösung wurde vor Gebrauch frisch hergestellt.

5.4.2. Festphasen-Screening

Das Screening der Bibliothek **92** erfolgte mit 50 mg Harz (ca. 40 000 Kugeln; 3 Kugeln gleicher Sequenz) in einer PE-Spritze nach folgendem Schema:

1 x 15 min	Wasser (quellen)
3 x 5 min	PBST-Puffer
1 x 30 min	PBST-Puffer + 2% BSA
3 x 5 min	Lektin-Puffer
1 x 3 h	**1 mL** biotinyliertes Lektin **20 µg/mL,** Lektin-Puffer + **10 mM Laktose**
3 x 5 min	TBST-Puffer
1 x 1h	Anti-Biotin-AP-Lösung in **TBS-Puffer 1:1000**
5 x 5 min	TBST-Puffer
3 x 5 min	AP-Puffer
1 x 10 min	Färbelösung
3 x 2 min	Wasser
2 x 5 min	EDTA-Lösung

Nach erfolgtem Screening wurden 36 der am stärksten gefärbten Kugeln unter dem Stereomikroskop aussortiert und zur Entfernung der gebundenen Proteine (Lektin, Anti-Biotin-AK-Konjugat) wie folgt behandelt:

5 x 5 min	100 mM AcOH / 8 M Harnstoff
5 x 1 min	H_2O
2 x 1 min	MeOH
1 x 5 min	CH_2Cl_2
2 x 30 min	CH_2Cl_2
1 x 5 min	CH_2Cl_2
2 x 1 min	MeOH
2 x 1 min	H_2O
5 x 5 min	100 mM AcOH / 8 M Harnstoff
5 x 1 min	H_2O

Anschließend erfolgte die Edmansequenzierung. Die Harzkugeln wurden einzeln zwischen zwei PVDF-Membranen platziert. Am Edman-Sequenzierer (Model 494 Procise Sequencer)

der Arbeitsgruppe Przybylski wurde unter Anwendung der Standard-Sequenzierungssoftware die Sequenzanalyse durchgeführt. Durch Edman-Sequenzierung von 12 Harzkugeln wurden 12 Sequenzen bestimmt.

Da es beim Screening von Bibliothek **93** bei Verwendung des Anti-Biotin/Alkalische Phosphatase-Konjugats zu falsch-positiven Hits kam, wurde hierfür ein Streptavidin/Alkalische Phosphatase-Konjugat verwendet.

5.4.3. Verwendete Puffer und Lösungen

Anti-Biotin-Antikörper/Peroxidase-Konjugat (Verdünnung = 1 : 1000)

Die kommerziell erhältliche Stammlösung (Sigma, A-1888) wurde mit PBS-Puffer 1:1000 verdünnt.

BSA-Lösung

250 mg Rinderserumalbumin (BSA) (1% (w/v)) wurden in PBS-Puffer gelöst und mit diesem auf 25 mL aufgefüllt. Die Lösung wurde jeweils frisch hergestellt.

Carbonat-Puffer

100 mM Carbonat, pH 10.1

1.33 g (12.5 mmol) Na_2CO_3 und 1.05 g $NaHCO_3$ (12.5 mmol) wurden in 200 mL Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit HCl (1 M) auf 10.1 eingestellt und der Puffer auf 250 mL aufgefüllt. Der Puffer wurde immer unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

Citrat-Phosphat-Puffer

200 mM Citrat-Phosphat, pH 4.0

38.68 g (108 mmol) Na_2HPO_4 x 12 H_2O sowie 17.67 g (92 mmol) wasserfreie Citronensäure wurden in Reinstwasser gelöst und die Lösung auf 1 L aufgefüllt. Der pH-Wert betrug pH 4.0.

PBS-Puffer

150mM NaCl, 10 mM Phosphat, pH 7.3

362 mg (2.32 mmol) NaH_2PO_4 x 2 H_2O, 2.75 g (7.68 mmol) Na_2HPO_4 x 12 H_2O und 8.75 g (150 mmol) NaCl wurden in 900 mL Reinstwasser gelöst. Die Lösung wurde mit NaOH (1 M) auf pH 7.3 eingestellt und auf 1 L aufgefüllt.

PBST-Puffer (PBS + 0, 05% (v/v) Tween 20)

0.5 mL Tween 20 wurden mit PBS-Puffer auf 1 L aufgefüllt.

ABTS-Lösung, pH 4.0 mit 0.015% H_2O_2

10 mg (18.2 µmol) ABTS wurden in Citrat-Phosphat-Puffer gelöst, mit 20 µL 30%iger H_2O_2 versetzt und auf 40 mL aufgefüllt. Die Lösung wurde jeweils frisch hergestellt und im Dunkeln aufbewahrt.

PDC-Lösung

100 mg (0.52 mmol) 1,4-Phenylendiisothiocyanat wurden in DMSO gelöst, mit 80 µL DIEA versetzt und mit DMSO auf 20 mL aufgefüllt. Die Lösung wurde jeweils frisch hergestellt.

VAA-Biotin-Lösung

Man erhielt die VAA-Biotin-Stammlösung (500 µg/mL) indem 100 µg VAA-Biotin in 200 µL PBS-Puffer gelöst wurden. Hiervon wurden 20 µL entnommen und auf 100 µL aufgefüllt um eine Konzentration von 10 µg/mL zu erhalten.

Lösung von 123

15 mg (0.023 mmol) **123** wurden in 22 mL Carbonat-Puffer gelöst.

5.4.4. Enzyme-Linked Immunosorbent Lektin Assay (ELISLA)

Immobilisierung von Laktose

In jedes well einer Covalink NH Mikrotiterplatte (**124**) wurden 100 µL der frisch hergestellten PDC-Lösung gegeben. Nach 3 h bei RT wurden die wells geleert, ausgeklopft und je 2 x mit Isopropanol, Reinstwasser und Carbonat-Puffer (je 300 µL) gewaschen (**126**). Anschließend wurden je well 100 µL einer frischen Lösung von **123** gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei RT wurden die wells geleert, ausgeklopft und 1 x mit Isopropanol (je 300 µL) und 4 x mit PBST (je 300 µL) gewaschen. Man erhielt Laktose-funktionalisierte Mikrotiterplatte **127**.

Blocken mit BSA

In jedes well wurden 150 µL 1%ige BSA-Lösung gegeben und die Platte 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die wells wurden geleert, ausgeklopft und 5 x mit PBST gewaschen.

Erstellung der Inhibitor-Verdünnungsreihen

Um die Stammlösungen der Inhibitoren zu erhalten, wurde eine entsprechende Menge derselben in PBS-Puffer gelöst. Je 120 µL dieser Lösungen wurden in ein well (Einfachbestimmung) bzw. zwei wells (Doppelbestimmung) einer Polypropylen-Platte gegeben. Für eine Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsfaktor von zwei wurden aus diesen je 60 µL entnommen und in die jeweils nachfolgenden wells mit je 60 µL PBS-Puffer gegeben. Aus diesen wurden nach Durchmischen erneut 60 µL entnommen und in die folgenden wells gegeben. Dieser Vorgang wurde 11 x wiederholt. Um eine Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsfaktor von vier zu erhalten, wurden analog je 30 µL entnommen und mit 90 µL PBS-Puffer gemischt.

Inkubation der Inhibitoren mit VAA-Biotin

Zu den Inhibitorverdünnungsreihen auf der Polypropylen-Platte wurden jeweils 60 µL (Verdünnungsfaktor von zwei) bzw. 90 µL (Verdünnungsfaktor von vier) der frisch hergestellten VAA-Lösung gegeben. Zur Bestimmung der Absorption ohne Farbreaktion (Blindwert) wurden vier wells mit je 120 µL PBS gefüllt. Zur Bestimmung der maximalen Absorption ohne Inhibitorzusatz wurden in vier wells je 60 µL PBS und 60 µL VAA-Biotin-Lösung gegeben.

Anschließend wurden die Platten 60 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Inkubation der Laktose-funktionalisierten Platten mit VAA-Biotin/Inhibitor

Je 100 µL der Inhibitor/VAA-Biotin-Lösungen von der Polypropylen-Platte wurden in die mit dem Laktose-Derivat funktionalisierte Platte überführt und 1.5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die wells geleert, ausgeklopft und 5 x mit PBST gewaschen.

Inkubation mit Anti-Biotin-Antikörper/Peroxidase Konjugat

In jedes well wurden nun 100 µL der Anti-Biotin-Antikörper/Peroxidase-Lösung gegeben und die Platten 1.5 h bei RT inkubiert. Die wells wurden geleert, ausgeklopft und 5 x mit PBST gewaschen.

Farbreaktion und Absorptionsmessung

In jedes well der Laktose-funktionalisierten Platte wurden 100 µL ABTS-Lösung gegeben und die Platten im Dunkeln 30 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zugabe von je 100 µL 1 M Schwefelsäure wurde die Farbreaktion abgestoppt. Nach weiteren 5 Minuten im Dunkeln erfolgte mit einem Plate-Reader die Absorptionsmessung bei 405 nm, wobei die Absorption jedes wells dreimal gemessen wurde.

Auswertung

Für jedes well wurde der Mittelwert der drei Messungen berechnet, bei Mehrfachbestimmungen wurden auch diese Werte gemittelt. Von den so erhaltenen Werten wurden jeweils die gemittelten Absorptionswerte der Blindprobe abgezogen. So wurde jeweils $A_{(mitInhibitor)}$ erhalten. Zur Berechnung von $A_{(ohneInhibitor)}$ wurde vom Mittelwert der maximalen Absorptionen der Mittelwert der Blindproben subtrahiert. Die prozentuale Inhibition (% I) wurde über Gleichung 4.1 ermittelt. Diese wurde nun gegen den dekadischen Logarithmus (log (c/mmol)) der Inhibitorkonzentration c aufgetragen. Mit Hilfe des Programms SigmaPlot 8.02 wurde ein Kurvenfitting durchgeführt (sigmoidal dose response, variable slope). Hierbei wurde den Messwerten iterativ eine sigmoidale Kurve der folgenden Form angenährt:

$$\%I(\log c) = \frac{\%I_{\max} - \%I_{\min}}{1 + 10^{\log(EC50) - \log c}}$$

In dieser Gleichung steht EC50 für den Wendepunkt der Kurve. Als IC_{50}-Wert wurde die Konzentration c, bei der eine Inhibition von 50% vorliegt, angegeben.

6. Literaturverzeichnis

[1] Titelbild, *Science* **2001**, *291*.

[2] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**; D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 477-488.

[3] H. Rüdiger, H.-C. Siebert, D. Solis, J. Jimenez-Barbero, A. Romero, C.-W. von der Lieth, T. Diaz-Maurino, H.-J. Gabius, *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 389-416; H. Ruediger, H.-J. Gabius, *Glycoconjugate J.* **2002**, *18*, 589-613.

[4] E. Rutenber, B. J. Katzin, S. Ernst, E. J. Collins, D. Mlsna, M. P. Ready, J. D. Robertus, *Proteins* **1991**, *10*, 240-250.

[5] F.-T. Liu, R. J. Patterson, J. L. Wang, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 263-273.

[6] J. D. Schrag, D. O. Procopio, M. Cygler, D. Y. Thomas, J. J. M. Bergeron, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 49-57.

[7] G. A. Rabinovich, N. Rubinstein, M. A. Toscano, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 274-284.

[8] E. Mizoguchi, A. Mizoguchi, *Immunol. Res.* **2007**, *37*, 47-60.

[9] B. G. Davis, N. R. Cameron, M. Ambrosi, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1593-1608; E. Köttgen, W. Reutter, R. Tauber, *Med. Klin. (Munich)* **2003**, *98*, 717-738.

[10] H.-J. Gabius, *Crit. Rev. Immunol.* **2006**, *26*, 43-79.

[11] K. J. Mengerink, V. D. Vacquier, *Glycobiology* **2001**, *11*, 37R-43R.

[12] D. C. Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 187-197.

[13] S. W. Mitchell, **1860**, S. 89–90.

[14] W. C. Boyd, in *The Proteins Band 2* (Hrsg.: K. B. H. Neurath), Academic Press, New York, **1954**, S. 756-844.

[15] H. Stillmark, *Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinuscomm.L. und einigen anderen Euphorbiaceen*, Schnakenburg's Buchdruckerei, Dorpat, **1888**.

[16] W. T. J. Morgan, W. M. Watkins, *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 501-530; W. M. Watkins, *Transfus. Med.* **2001**, *11*, 243-265.

[17] J. Huskens, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 537-543.

[18] M. K. Steuer-Vogt, V. Bonkowsky, P. Ambrosch, M. Scholz, A. Neiss, J. Strutz, M. Hennig, T. Lenarz, W. Arnold, *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 9-11.

[19] T. Hajtó, K. Hostanska, T. Berki, L. Pálinkás, F. Boldizsár, P. Németh, *Evidence-based Compl. Alt. Medicine* **2005**, *2*, 59-67.

[20] G. S. Kienle, *Die Mistel in der Onkologie - Fakten und konzeptionelle Grundlagen*, Schattauer Verlag, Stuttgart, **2003**.

[21] T. Hajtó, K. Hostanska, H. J. Gabius, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4803-4808.

[22] J. B. Dietrich, G. Ribereau-Gayon, M. L. Jung, H. Franz, J. P. Beck, A. R., *Anticancer Drug* **1992**, *3*, 507-511.

[23] M. H. Soler, S. Stoeva, C. Schwamborn, S. Willhelm, T. Stiefel, W. Voelter, *Lett. Pept. Sci.* **1996**, *399*, 153-157; M. H. Soler, S. Stoeva, W. Voelter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *246*, 596–601.

[24] R. Mikeska, R. Wacker, R. Arni, T. P. Singh, A. Mikhailov, A. Gabdoulkhakov, W. Voelter, C. Betzel, *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2005**, *F61*, 17-25.

[25] L. Barbieri, M. G. Battelli, F. Stirpe, *Biochem. Biophys. Acta* **1993**, *1154*, 237-282.

[26] H. Niwa, A. G. Tonevitsky, I. I. Agapov, S. Saward, U. Pfueller, R. A. Palmer, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 2739-2749.
[27] J. D. Robertus, A. F. Monzingo, *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 477–486.
[28] M. Jimenez, S. Andre, H.-C. Siebert, H.-J. Gabius, D. Solis, *Glycobiology* **2006**, *16*, 926-937.
[29] R. J. Pieters, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 721-728.
[30] G. A. Rabinovich, *Br. J. Cancer* **2005**, *92*, 1188-1192.
[31] L. Ballell, M. van Scherpenzeel, K. Buchalova, R. M. J. Liskamp, R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4387-4394; A. Danguy, I. Camby, R. Kiss, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 285-293; V. L. J. L. Thijssen, F. Poirier, L. G. Baum, A. W. Griffioen, *Blood* **2007**, *110*, 2819-2827.
[32] A. Raz, R. Lotan, J. C. Byrd, P.-S. Yan, R. S. Bresalier, *Cancer* **1997**, *80*, 776-787.
[33] R. Meromsky, R. Lotan, A. Raz, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 5270– 5275.
[34] M. T. Elola, M. E. Chiesa, A. F. Alberti, J. Mordoh, N. E. Fink, *J. Biomed .Sci.* **2005**, *12*, 13-29.
[35] I. Camby, M. Le Mercier, F. Lefranc, R. Kiss, *Glycobiology* **2006**, *16*, 137R-157R.
[36] A. Villalobo, A. Nogales-Gonzalez, H.-J. Gabius, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2006**, *18*, 1-37.
[37] E. Leyden, *Arch. Pathol. Anat.* **1872**, *54*, 324-344; J. M. Charcot, C. Robin, C. R. Mem, *Soc. Biol.* **1853**, *5*, 44-50.
[38] S. Andre, C. E. P. Maljaars, K. M. Halkes, H.-J. Gabius, J. P. Kamerling, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 793-798.
[39] K. R. Oldenburg, D. Loganathan, I. J. Goldstein, P. G. Shultz, M. A. Gallop, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 5393-5397; J. K. Scott, D. Loganathan, R. B. Easley, X. Gong, I. J. Goldstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 5398-5402.
[40] H. Ideo, A. Seko, K. Yamashita, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21081-21089.
[41] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908-2953.
[42] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.
[43] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2408-2429.
[44] Y. C. Lee, C. P. Stowell, M. J. Krantz, *Biochemistry* **1976**, *15*, 3956-3963.
[45] O. M. T. Pearce, K. D. Fisher, J. Humphries, L. W. Seymour, A. Smith, B. G. Davis, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1081-1085.
[46] D. D. Manning, L. E. Strong, X. Hu, P. J. Beck, L. L. Kiessling, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 11937-11952; M. Kanai, K. H. Mortell, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9931-9932; D. D. Manning, X. Hu, P. Beck, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3161-3162.
[47] K. H. Mortell, R. V. Weatherman, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2297-2298.
[48] G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3789-3800.
[49] S. André, R. J. Pieters, I. Vrasidas, H. Kaltner, I. Kuwabara, F.-T. Liu, R. M. J. Liskamp, H.-J. Gabius, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 822-830.
[50] S. André, P. J. C. Ortega, M. A. Perez, R. Roy, H.-J. Gabius, *Glycobiology* **1999**, *9*, 1253-1261.

[51] P. M. Rendle, A. Seger, J. Rodrigues, N. J. Oldham, R. R. Bott, J. B. Jones, M. M. Cowan, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4750-4751.
[52] R. J. Pieters, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2004**, *16*, 243-254; R. Roy, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, *15*, 291-310.
[53] J. J. Garcia-Lopez, F. Hernandez-Mateo, J. Isac-Garcia, J. M. Kim, R. Roy, F. Santoyo-Gonzalez, A. Vargas-Berenguel, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 522-531; C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1982-1990.
[54] A. Nelson, J. M. Belitsky, S. Vidal, C. S. Joiner, L. G. Baum, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11914-11922.
[55] J. M. Belitsky, A. Nelson, D. Hernandez, L. G. Baum, J. F. Stoddart, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1091-1198.
[56] T. Ooya, H. Utsunomiya, M. Eguchi, N. Yui, *Bioconj. Chem.* **2005**, *16*, 62-69.
[57] R. Roy, D. Pagé, S. Figueroa Perez, V. Verez Bencomo, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 251-263.
[58] T. Kimmerlin, D. Seebach, *J. Pept. Res.* **2005**, *65*, 229-260; C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
[59] V. Wittmann, S. Seeberger, H. Schägger, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9243-9246.
[60] K. Eckart, *Mass Spectrom. Rev.* **1994**, *13*, 23-55.
[61] V. Wittmann, S. Seeberger, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 918-921.
[62] E. Kolomiets, E. M. V. Johansson, O. Renaudet, T. Darbre, J.-L. Reymond, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1465-1468.
[63] S. Seeberger, *Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften*, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main 2004, p. 285.
[64] D. Specker, V. Wittmann, *Top. Curr. Chem.* **2007**, *267*, 65-107.
[65] V. Wittmann, S. Seeberger, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4508-4512.
[66] W. Koenigs, E. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957-982.
[67] R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 212-235.
[68] Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487-493.
[69] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmeiersky, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82-84.
[70] H. P. Nestler, P. A. Bartlett, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4723-4724; J. J. Baldwin, J. J. Burbaum, I. Henderson, M. H. J. Ohlmeyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5588-5589; M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 10922-10926.
[71] R. Takeda, S. Y. Ryu, J. H. Park, K. Nakanishi, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 5533-5542.
[72] J. Zhang, P. Kovac, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 461-469.
[73] R. G. G. Leenders, H. W. Scheeren, P. H. J. Houba, E. Boven, H. J. Haisma, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2975-2980.
[74] W. Klotz, R. R. Schmidt, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 1093-1101; R. R. Schmidt, *Front. Nat. Prod. Res.* **1996**, *1*, 20-54.
[75] A. Lubineau, S. Escher, J. Alais, D. Bonnaffé, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4087-4090.
[76] T. Immel, *Masterarbeit, Fachbereich Chemie*, Universität Konstanz, Konstanz 2007, p. 158.
[77] C. Maierhofer, *Diplomarbeit, Fachbereich Chemie*, Universität Konstanz, Konstanz 2004, p. 131.

[78] K. Bock, C. Pedersen, *j. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1974**, 293-297.
[79] K. S. Feldman, K. M. Masters, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8945-8947.
[80] S. Andre, persönl. Mitteilung, München 2006.
[81] S. Brenner, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 5381-5383; M. C. Needels, D. G. Jones, E. H. Tate, G. L. Heinkel, L. M. Kochersperger, W. J. Dower, R. W. Barrett, M. A. Gallop, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 10700; L. Ying, R. Liu, J. Zhang, K. Lam, C. B. Lebrilla, J. Gervay-Hague, *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 372-384.
[82] R. S. Youngquist, G. R. Fuentes, M. P. Lacey, T. Keough, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3900-3906.
[83] P. M. St. Hilaire, M. Meldal, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1210-1228.
[84] P. Li, P. P. Roller, J. Xu, *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 411-440.
[85] A. Semmler, *Diplomarbeit, Naturwissenschaftliche Sektion*, Universität Konstanz, Konstanz 2005, p. 78.
[86] C. P. Holmes, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2370-2380.
[87] S. R. Chhabra, B. Hothi, D. J. Evans, P. D. White, B. W. Bycroft, W. C. Chan, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1603-1606.
[88] B. W. Bycroft, W. C. Chan, S. R. Chhabra, N. D. Hone, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 778-779.
[89] Novabiochem, Poster, 2000; Novabiochem, Poster, 2001.
[90] B. Kellam, B. W. Bycroft, S. R. Chhabra, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4849-4852.
[91] B. Rohwedder, Y. Mutti, P. Dumy, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1175-1178.
[92] T. Johnson, M. Liley, T. J. Cheeseright, F. Begum, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 2811-2820.
[93] S. B. H. Kent, M. Riemen, M. LeDoux, R. B. Merrifield, *Humana Press, New York, Methods in Protein Sequence Analysis (Hrsg.: M. Elzinga)* **1982**, 205-213; M. L. Kochersperger, R. Blacher, P. Kelly, L. Pierce, D. H. Hawke, *Am. Biotech. Lab.* **1989**, *7*, 26-37.
[94] P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2107-2110.
[95] S. C. Story, J. V. Aldrich, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 292-296.
[96] J. Coste, D. Le-Neguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
[97] F. Albericio, M. Cases, J. Alsina, S. A. Triolo, L. A. Carpino, S. A. Kates, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4853-4856.
[98] I. R. Marsh, M. Bradley, S. J. Teague, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6199-6203.
[99] W. S. Hancock, J. E. Battersby, *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 260-264.
[100] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
[101] R. Quarrell, T. D. W. Claridge, G. W. Weaver, G. Lowe, *Mol. Diversity* **1996**, *1*, 223-232.
[102] E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 117-133.
[103] P. Sörme, P. Arnoux, B. Kahl-Knutsson, H. Leffler, J. M. Rini, U. J. Nilsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1737-1743.
[104] R. Liang, J. Loebach, N. Horan, M. Ge, C. Thompson, L. Yan, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 10554-10559; R. Liang, L. Yan, J. Loebach, M. Ge, Y. Uozumi, K. Sekanina, N. Horan, J. Gildersleeve, C. Thompson, A. Smith, K. Biswas, W. C. Still, D. Kahne, *Science* **1996**, *274*, 1520-1522.
[105] M. B. Biskup, J. U. Mueller, R. Weingart, R. R. Schmidt, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1007-1015.

[106] C. Maierhofer, K. Rohmer, V. Wittmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7661-7676.
[107] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578; J. B. Corbell, J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 95-111.
[108] K. Rohmer, *Bachelorarbeit, Naturwissenschaftliche Sektion*, Universität Konstanz, Konstanz 2005, p. 61.
[109] J. R. Crowther, in *The ELISA Guidebook, Band 149*, Humana Press, **2001**.
[110] C. F. Brewer, *Glycoconjugate J.* **2004**, *19*, 459-465.
[111] K. Takeo, K. Shinmitsu, *Carbohydr. Res.* **1984**, *133*, 135-145.
[112] P. Dumy, O. Renaudet, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7575-7578.

7. Anhang

7.1. Ausgewählte NMR-Spektren

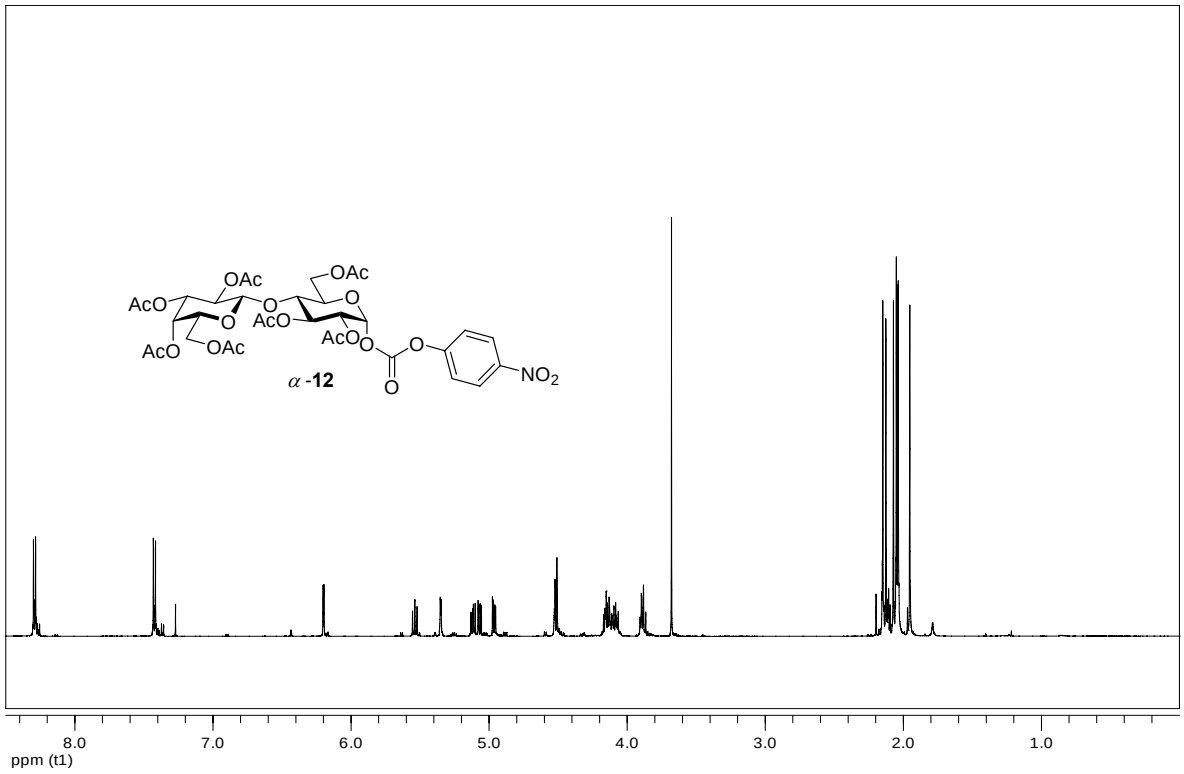


Abb. 80 ^{1}H-NMR-Spektrum von α-**12** (600 MHz, $CDCl_3$)

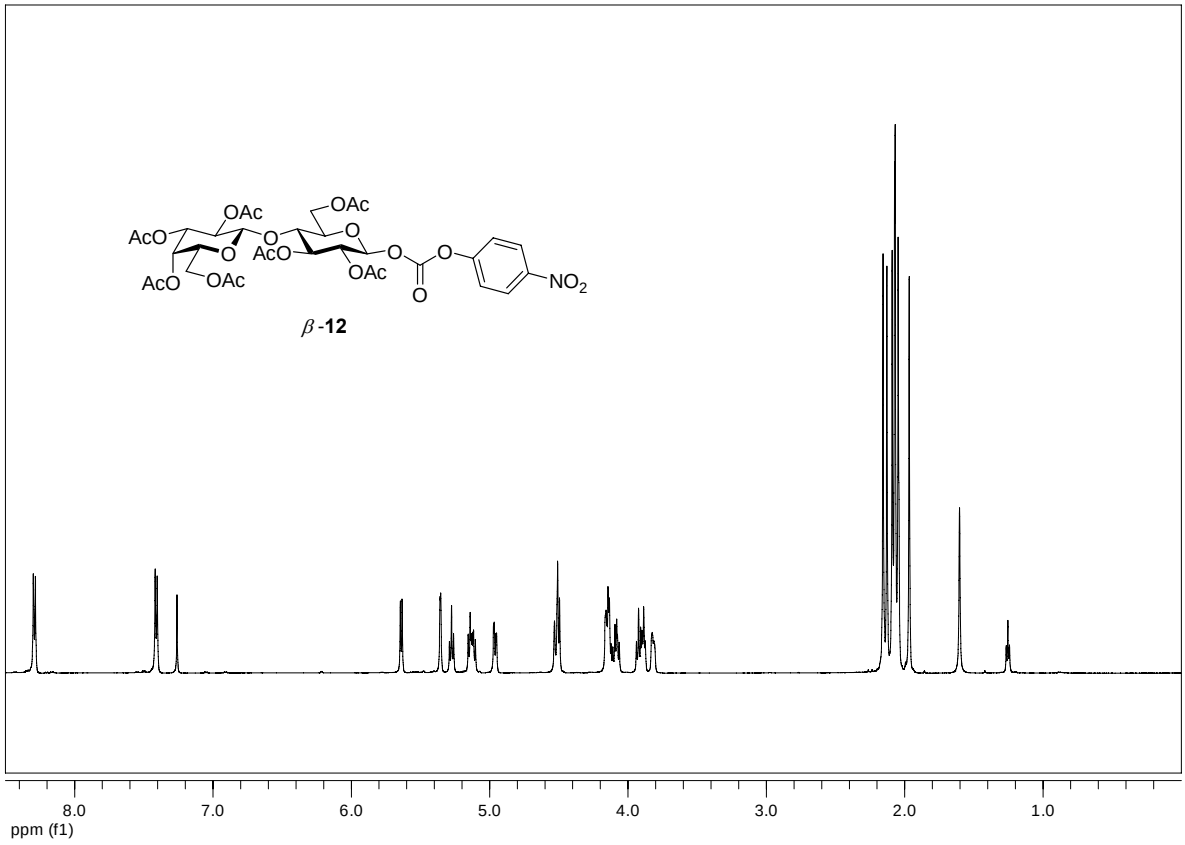


Abb. 81 ^{1}H-NMR-Spektrum von β-**12** (600 MHz, $CDCl_3$)

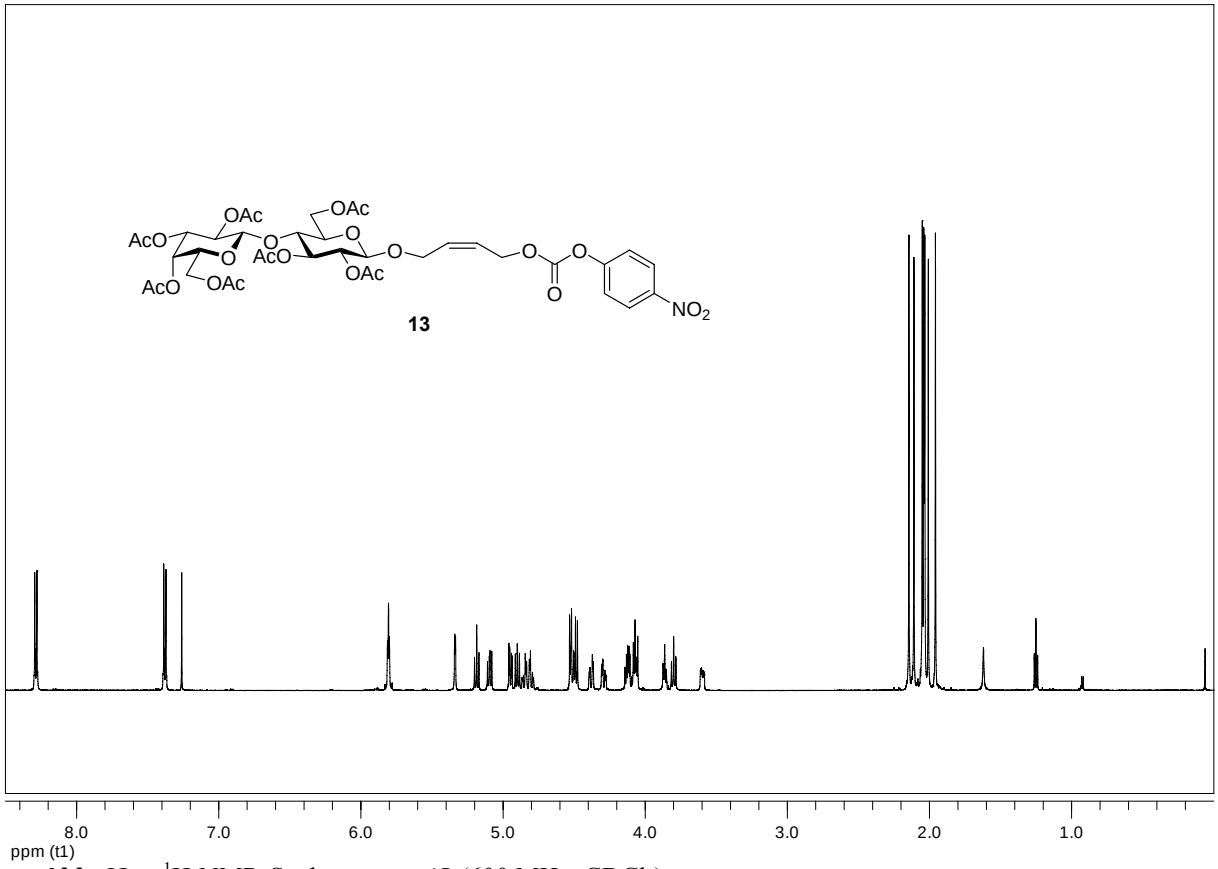


Abb. 82 ^{1}H-NMR-Spektrum von **13** (600 MHz, $CDCl_3$)

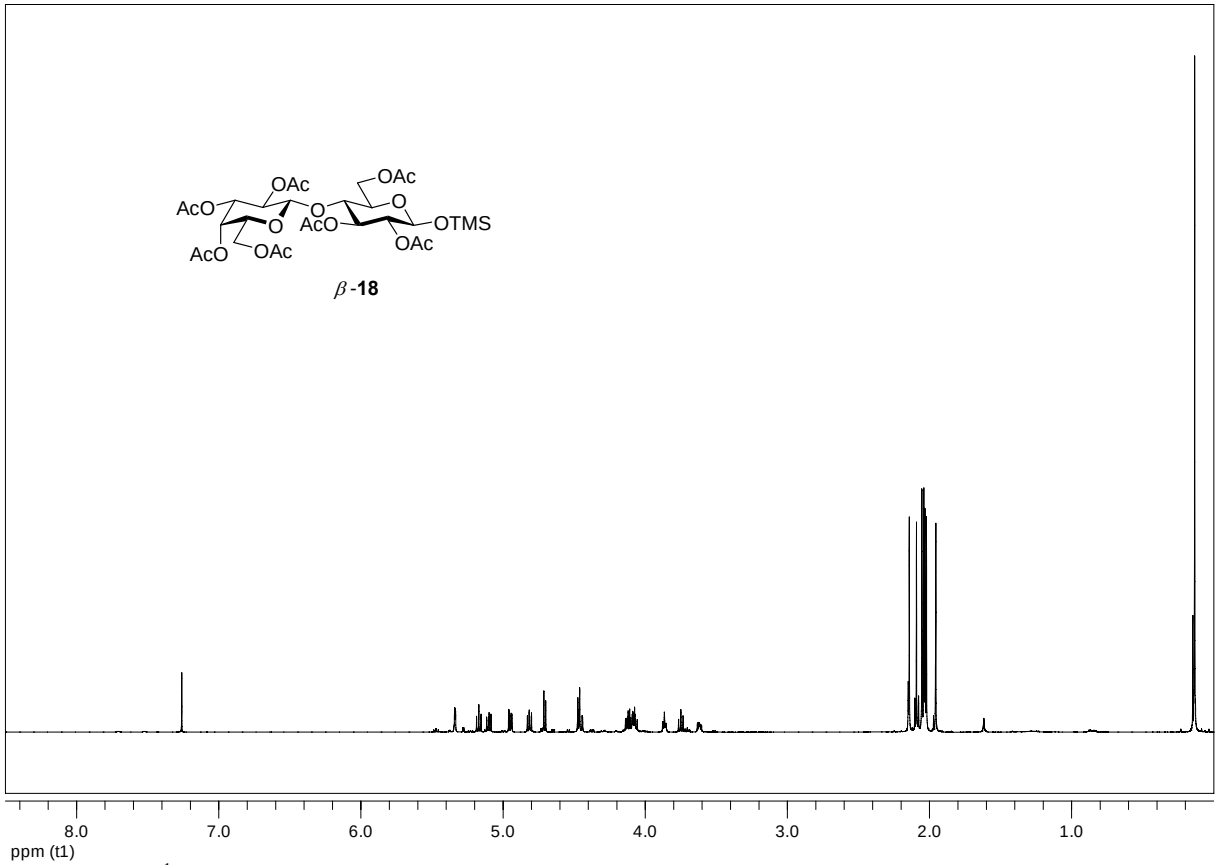


Abb. 83 ^{1}H-NMR-Spektrum von β-**18** (600 MHz, $CDCl_3$)

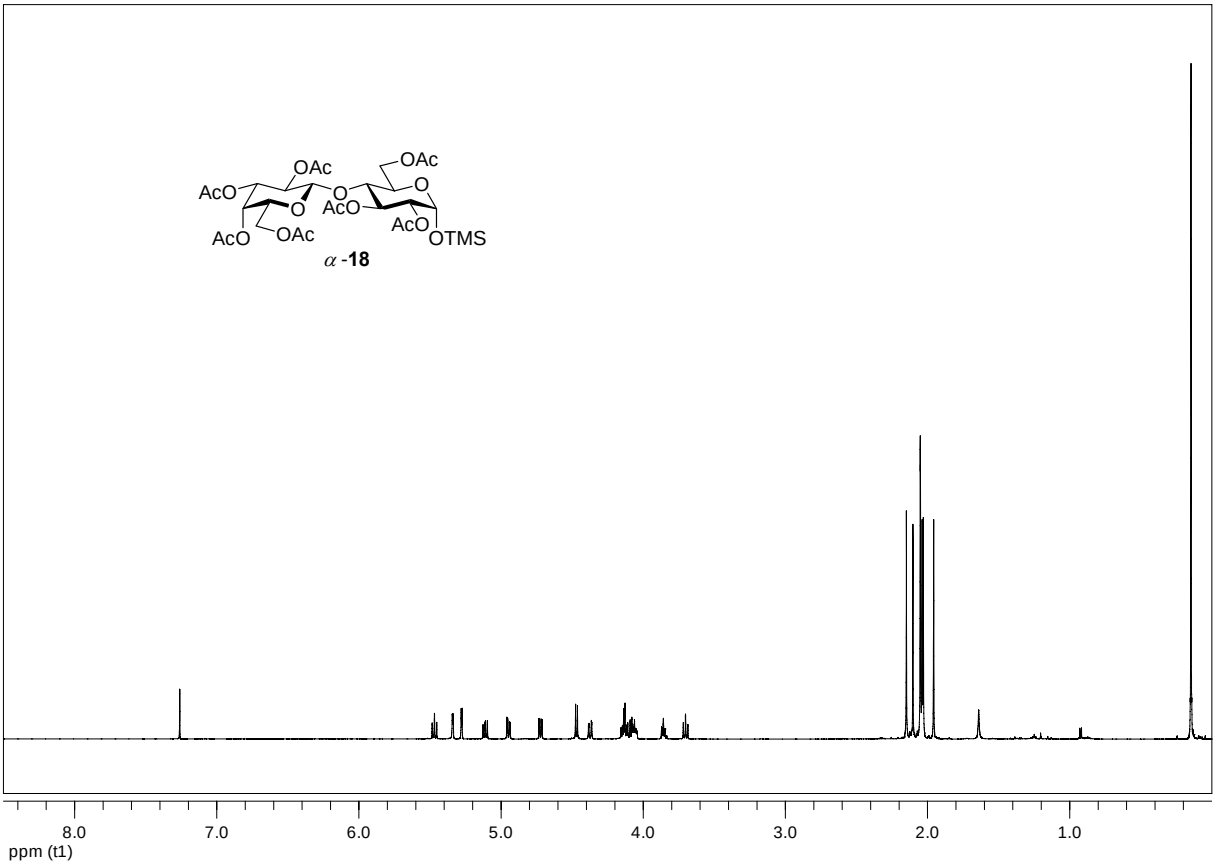


Abb. 84 ^{1}H-NMR-Spektrum von α-**18** (600 MHz, $CDCl_3$)

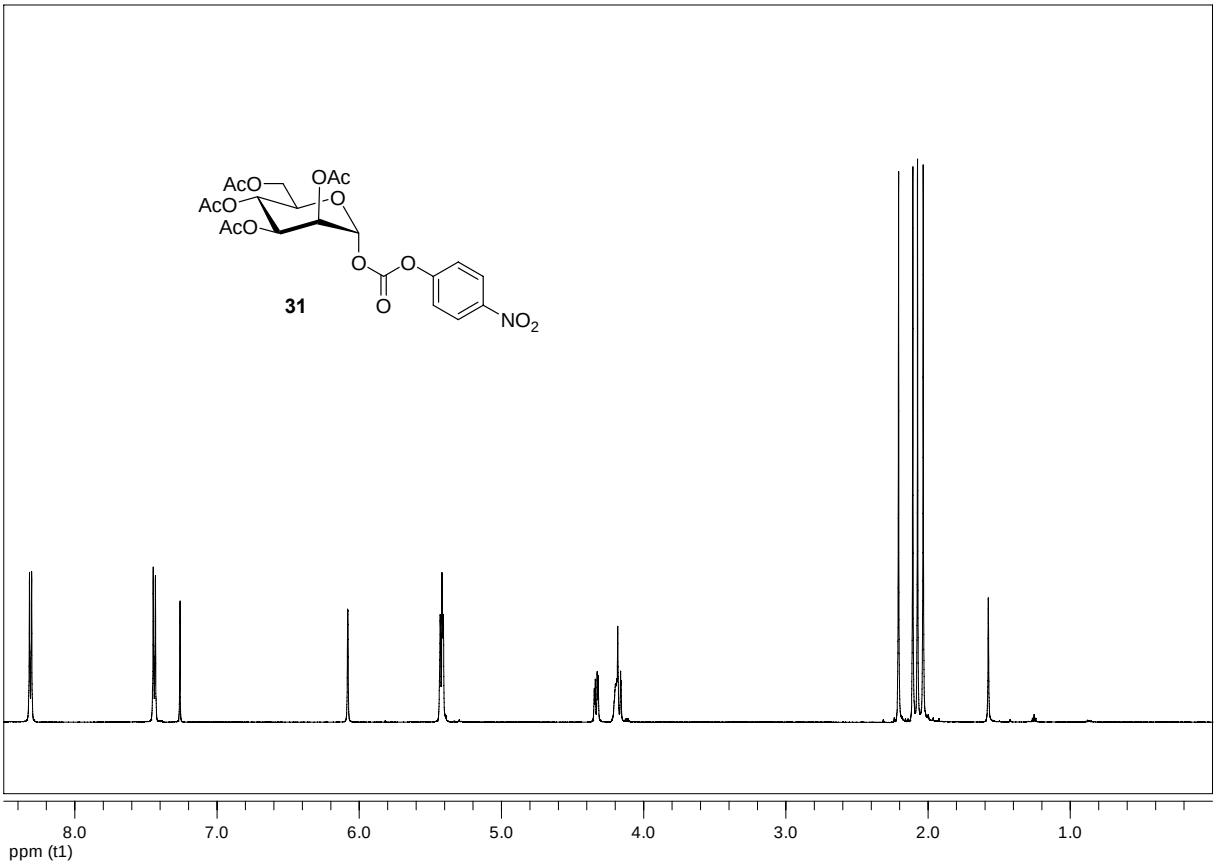


Abb. 85 ^{1}H-NMR-Spektrum von **31** (600 MHz, $CDCl_3$)

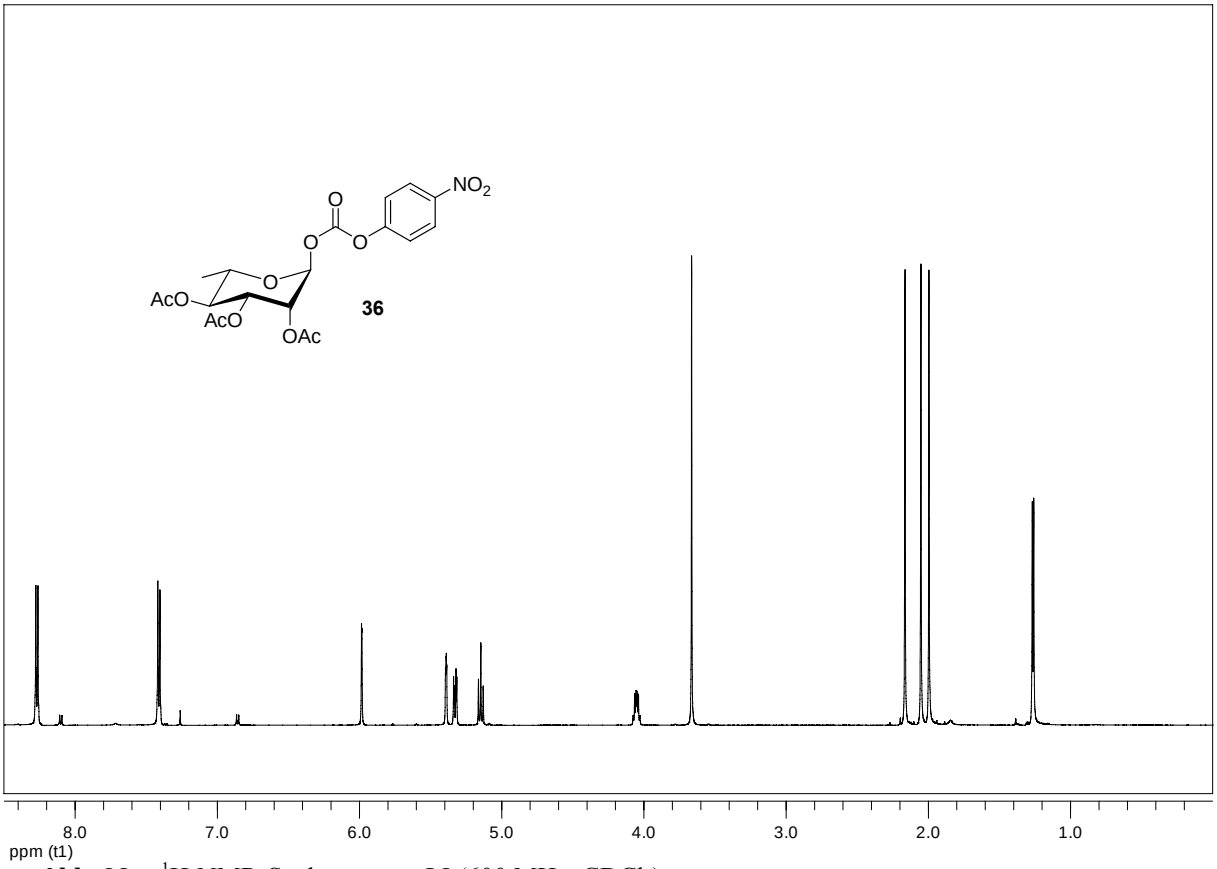


Abb. 86 ^{1}H-NMR-Spektrum von **36** (600 MHz, $CDCl_3$)

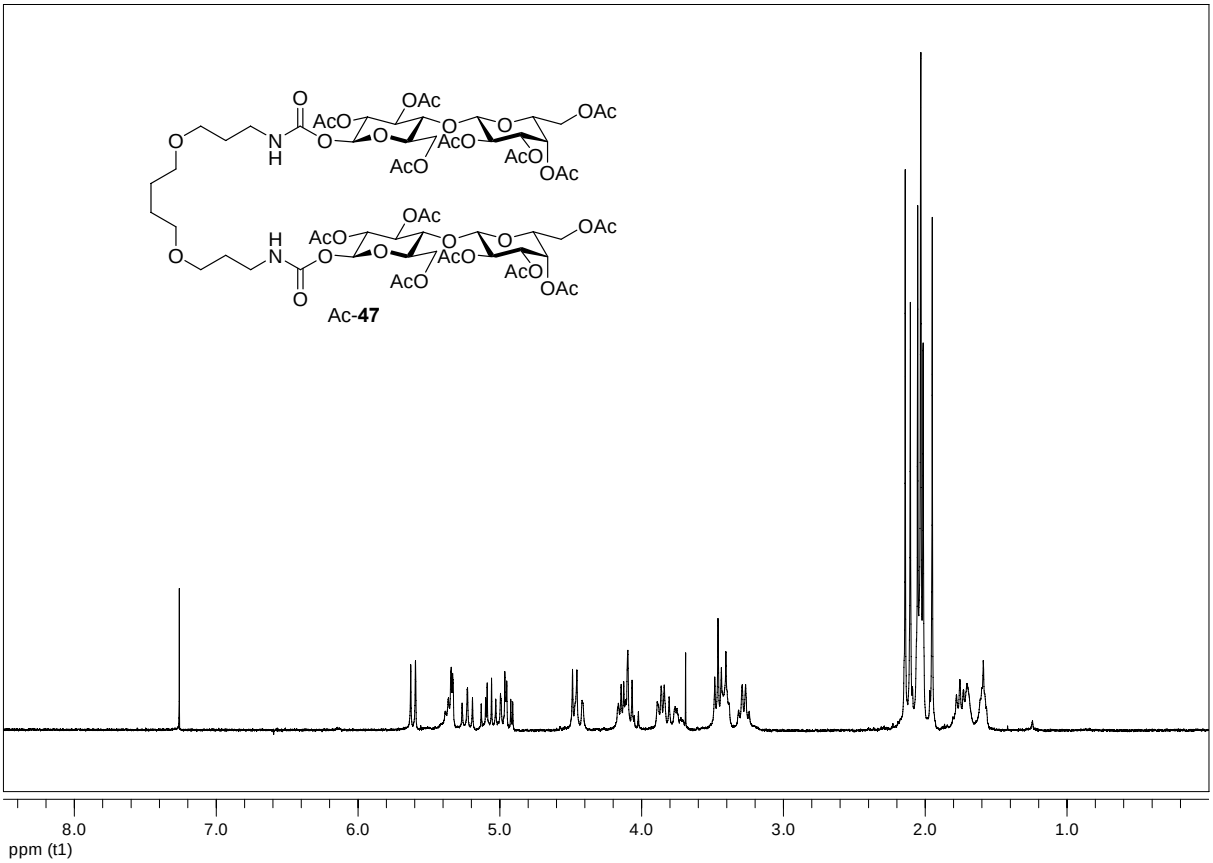


Abb. 87 ^{1}H-NMR-Spektrum von Ac-**47** (250 MHz, $CDCl_3$)

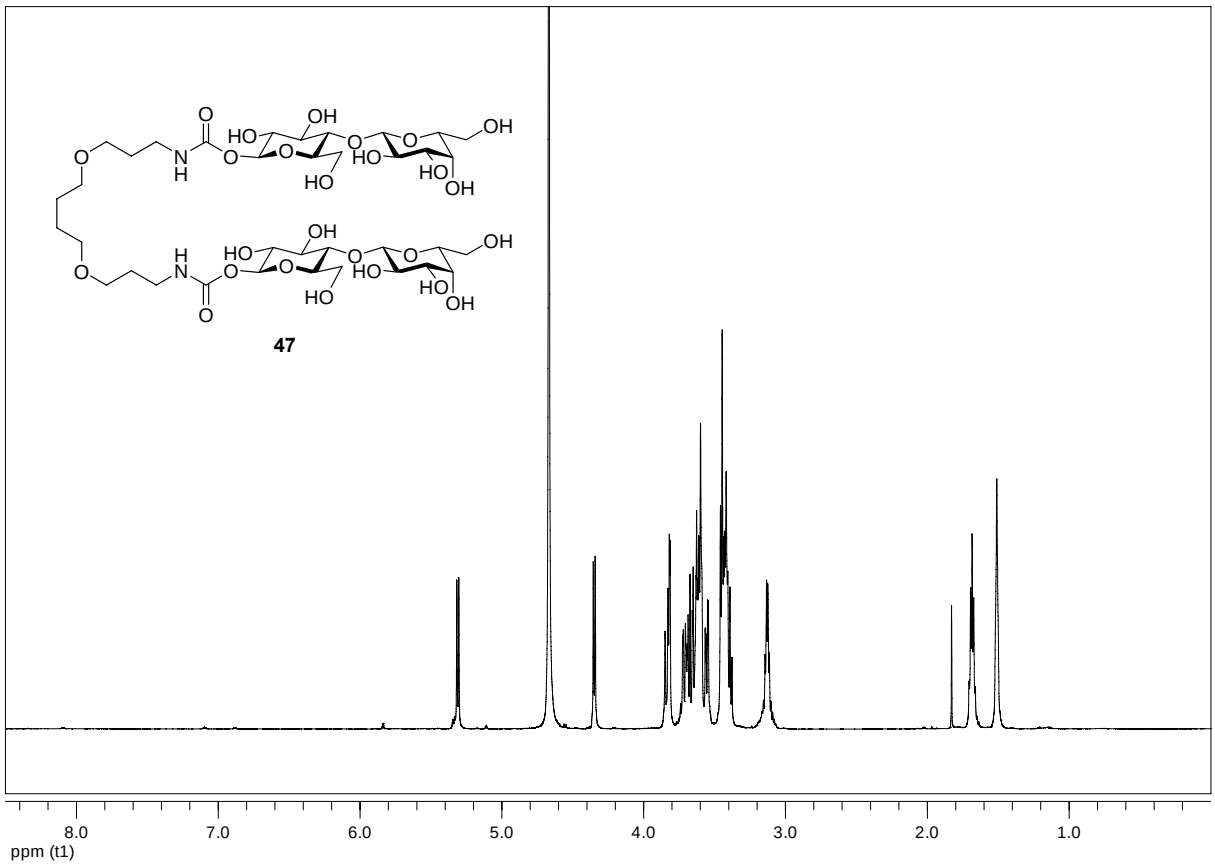


Abb. 88 ^{1}H-NMR-Spektrum von **47** (600 MHz, D_2O)

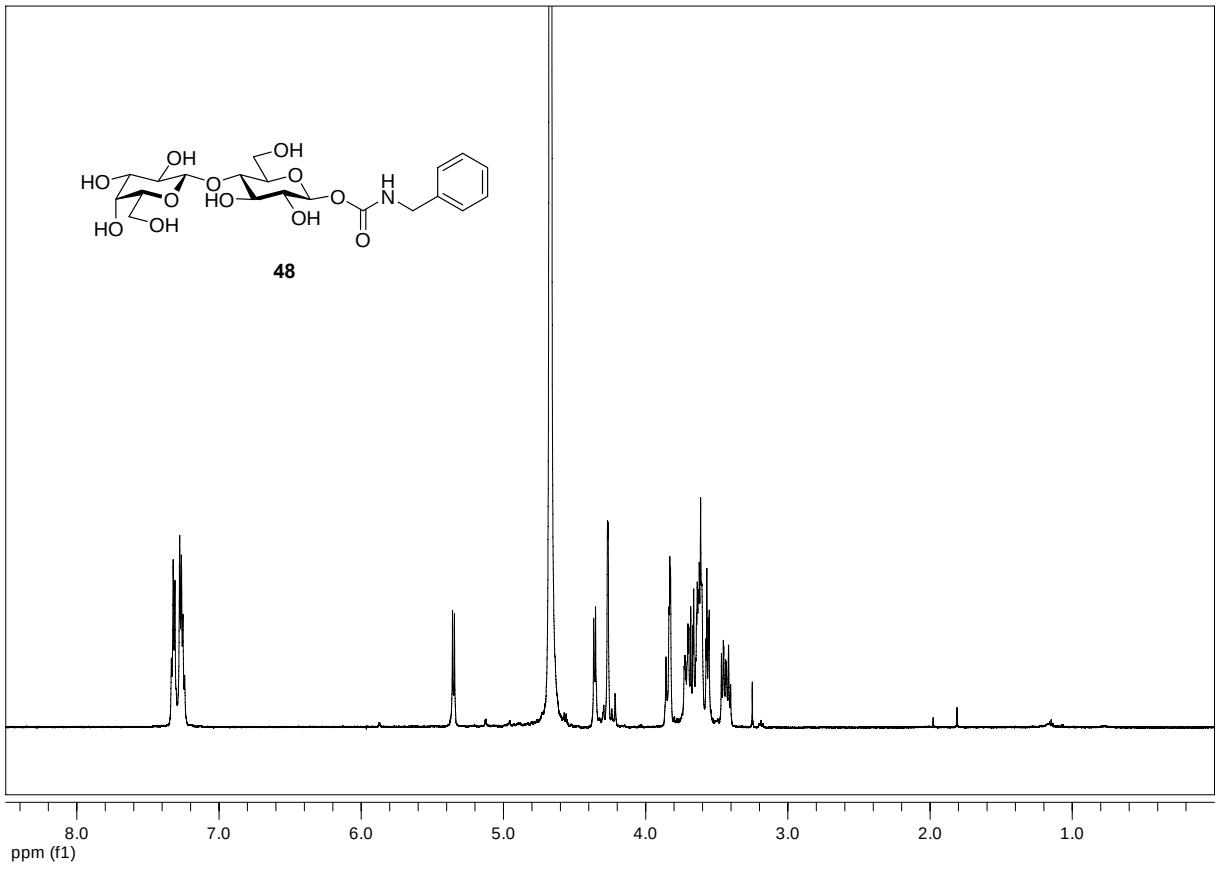


Abb. 89 ^{1}H-NMR-Spektrum von **48** (600 MHz, D_2O)

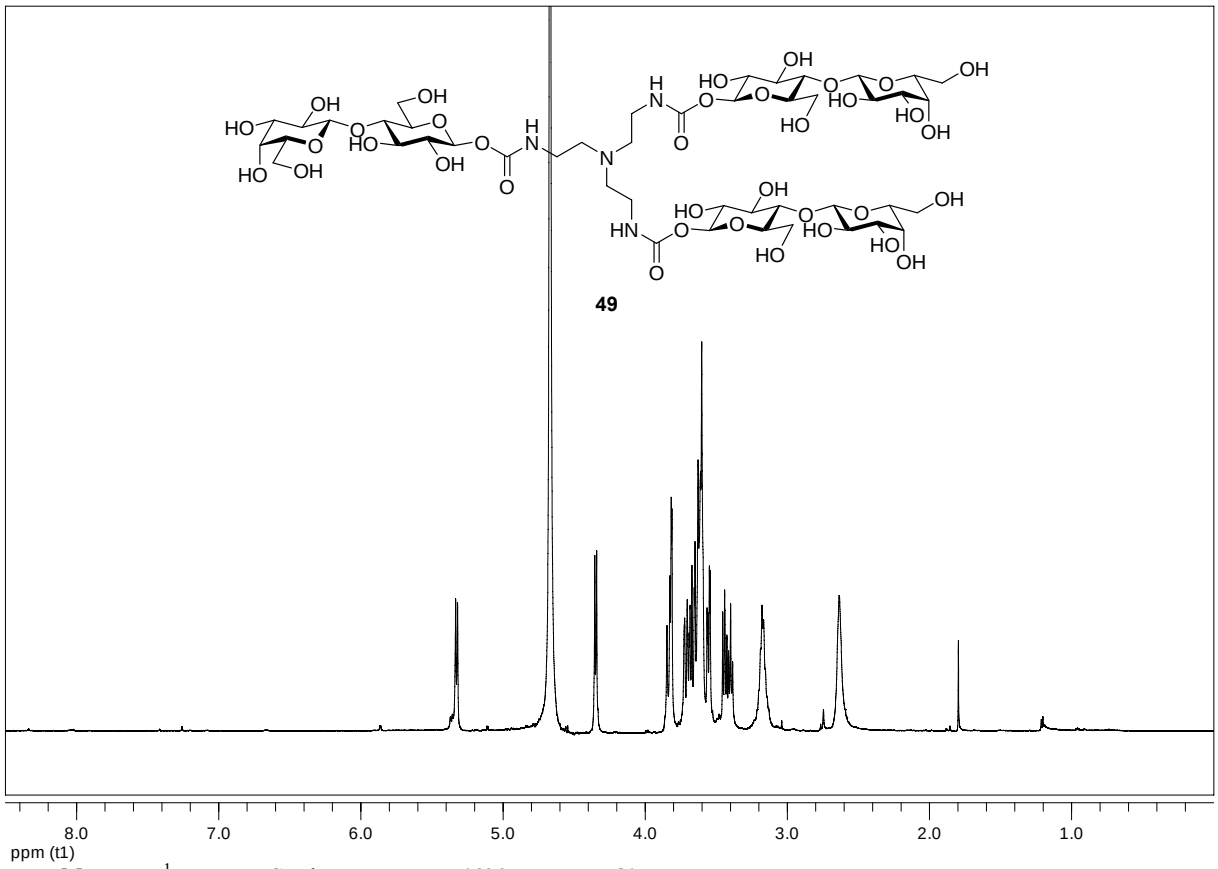


Abb. 90 ^{1}H-NMR-Spektrum von **49** (600 MHz, D_2O)

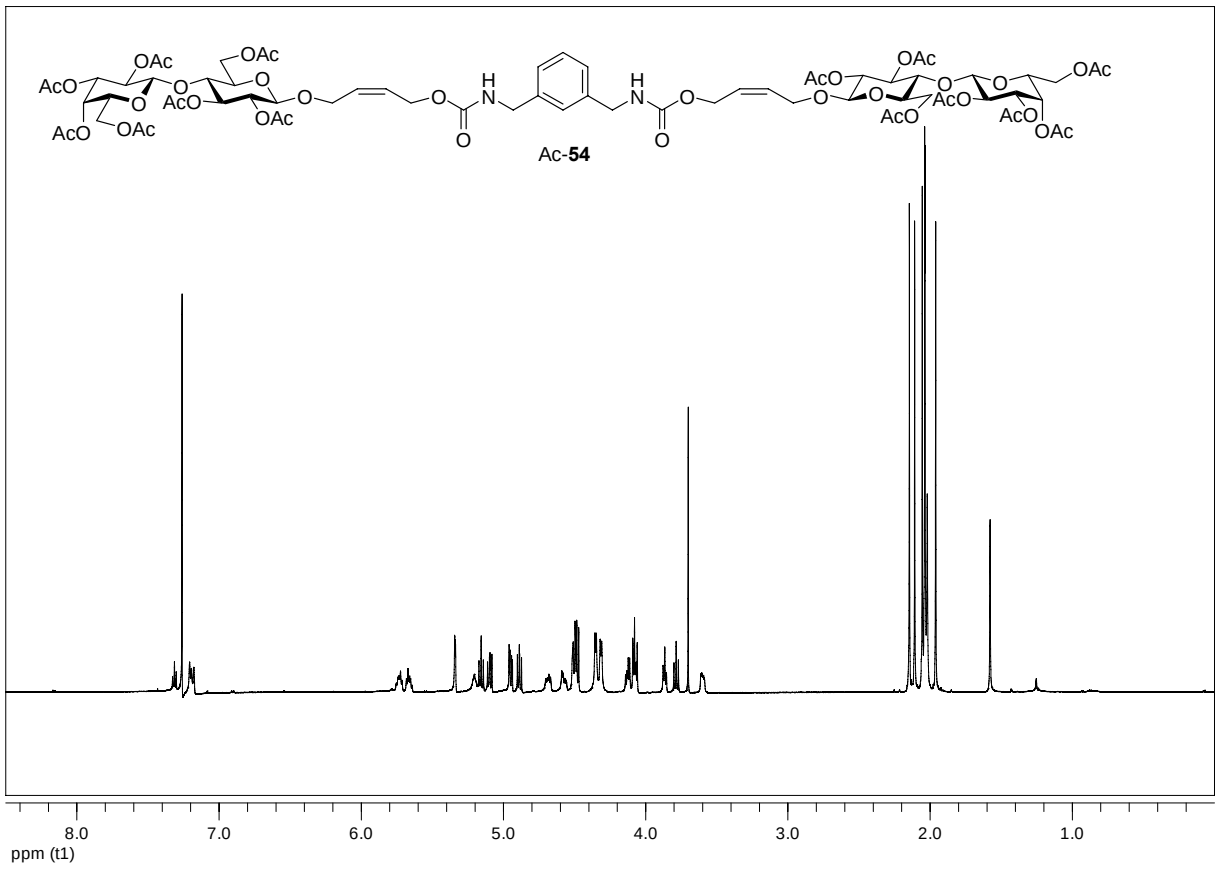


Abb. 91 ^{1}H-NMR-Spektrum von Ac-**54** (600 MHz, $CDCl_3$)

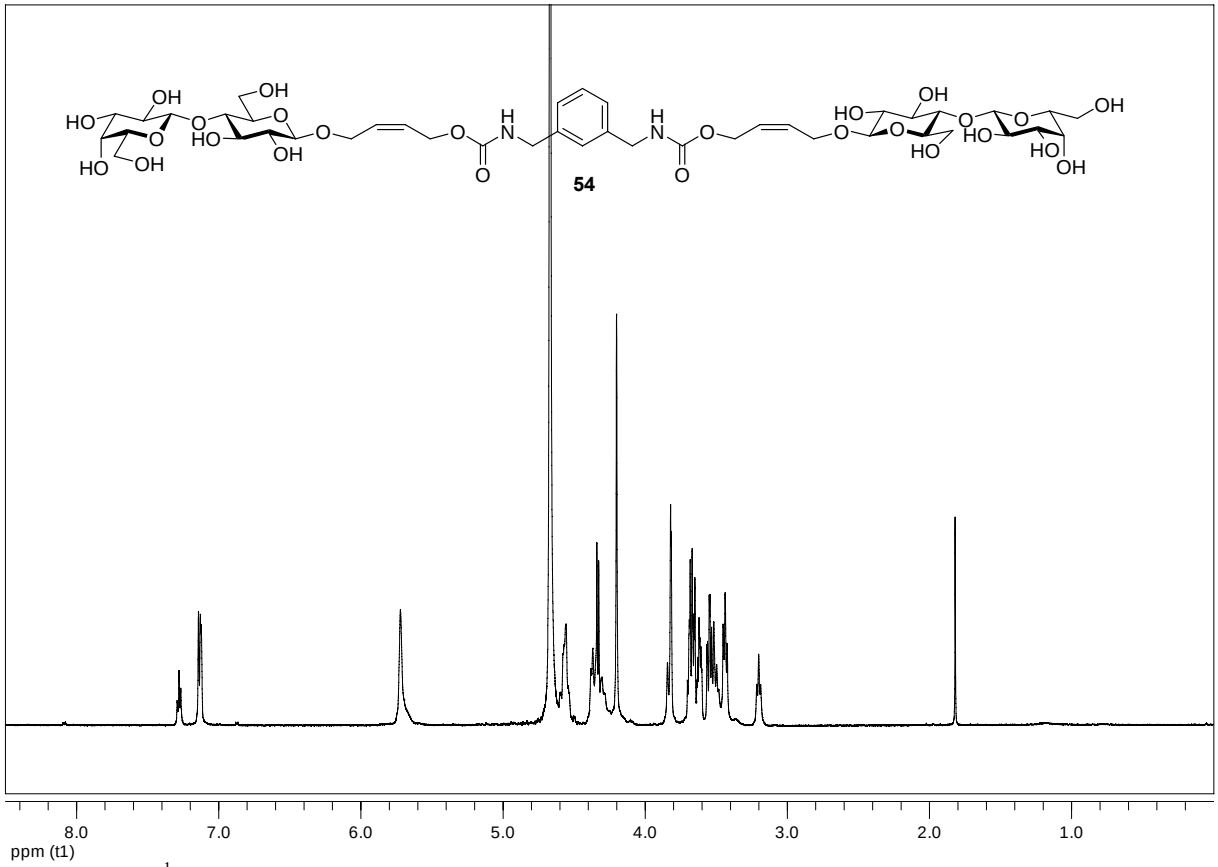


Abb. 92 ^{1}H-NMR-Spektrum von **54** (600 MHz, D_2O)

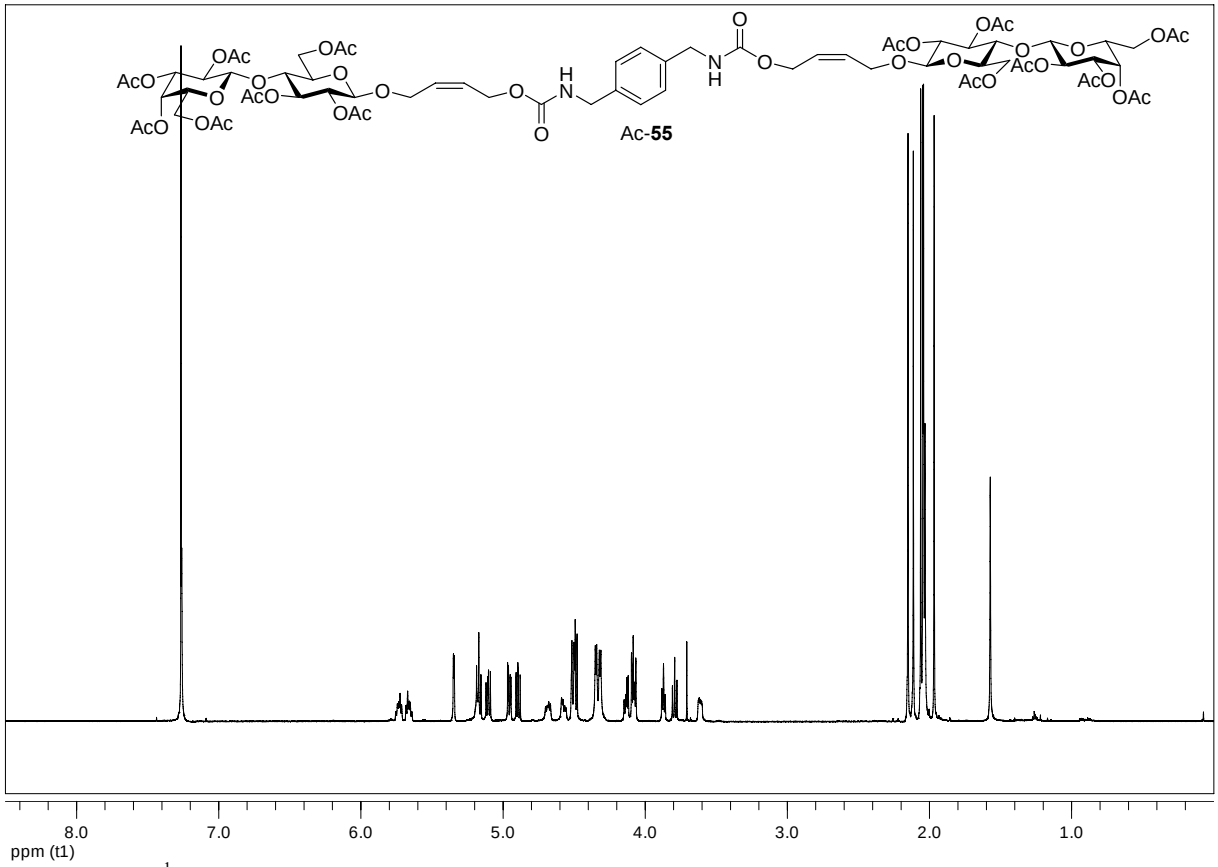


Abb. 93 ^{1}H-NMR-Spektrum von Ac-**55** (600 MHz, $CDCl_3$)

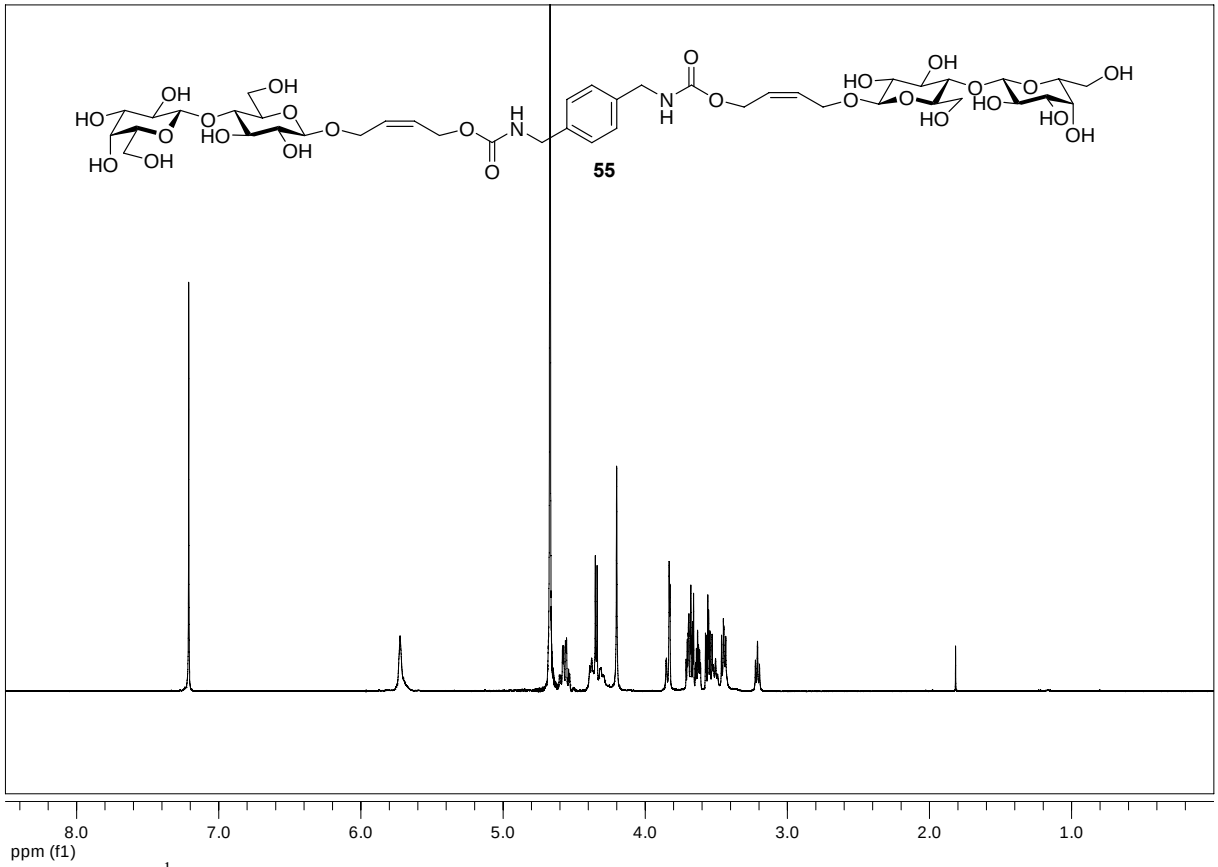


Abb. 94 ^{1}H-NMR-Spektrum von **55** (600 MHz, D_2O)

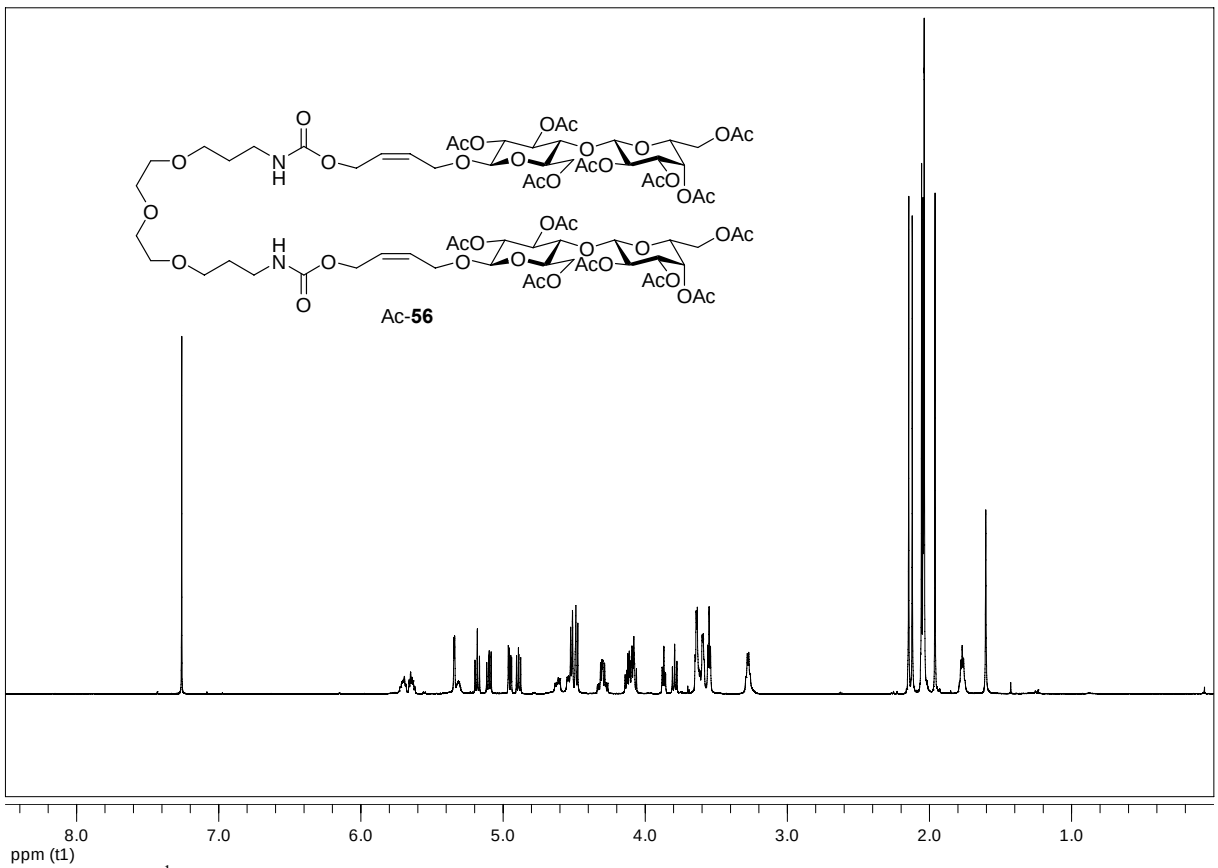


Abb. 95 ^{1}H-NMR-Spektrum von Ac-**56** (600 MHz, $CDCl_3$)

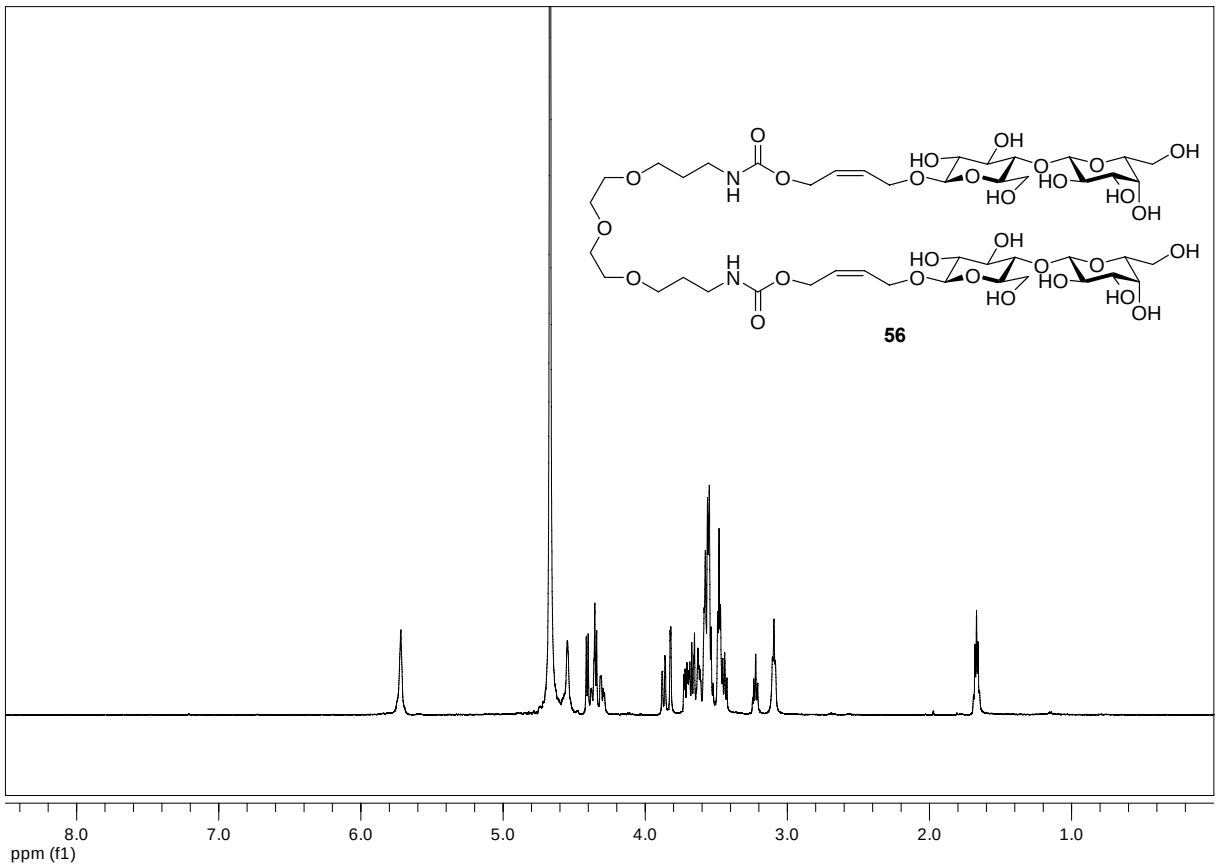


Abb. 96 ^{1}H-NMR-Spektrum von **56** (600 MHz, D_2O)

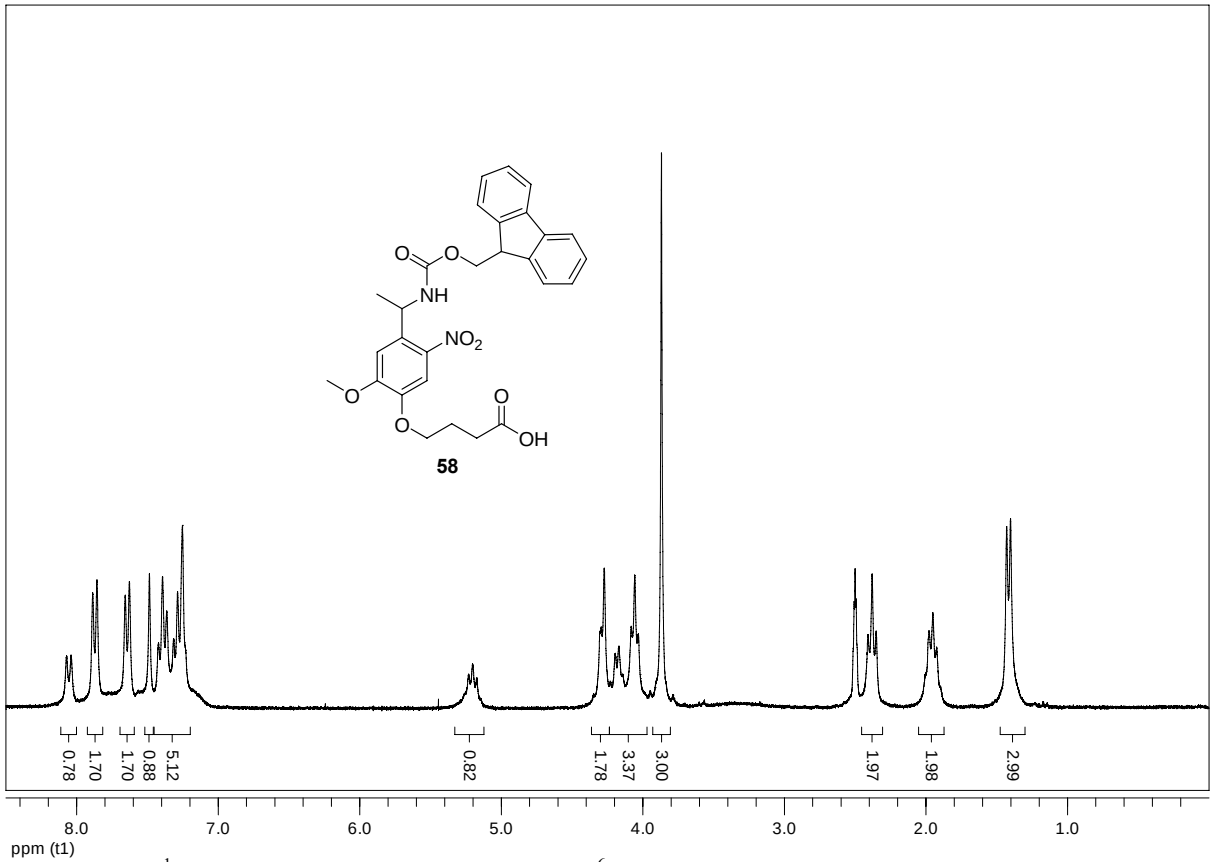


Abb. 97 ^{1}H-NMR-Spektrum von **58** (250 MHz, d^6-DMSO)

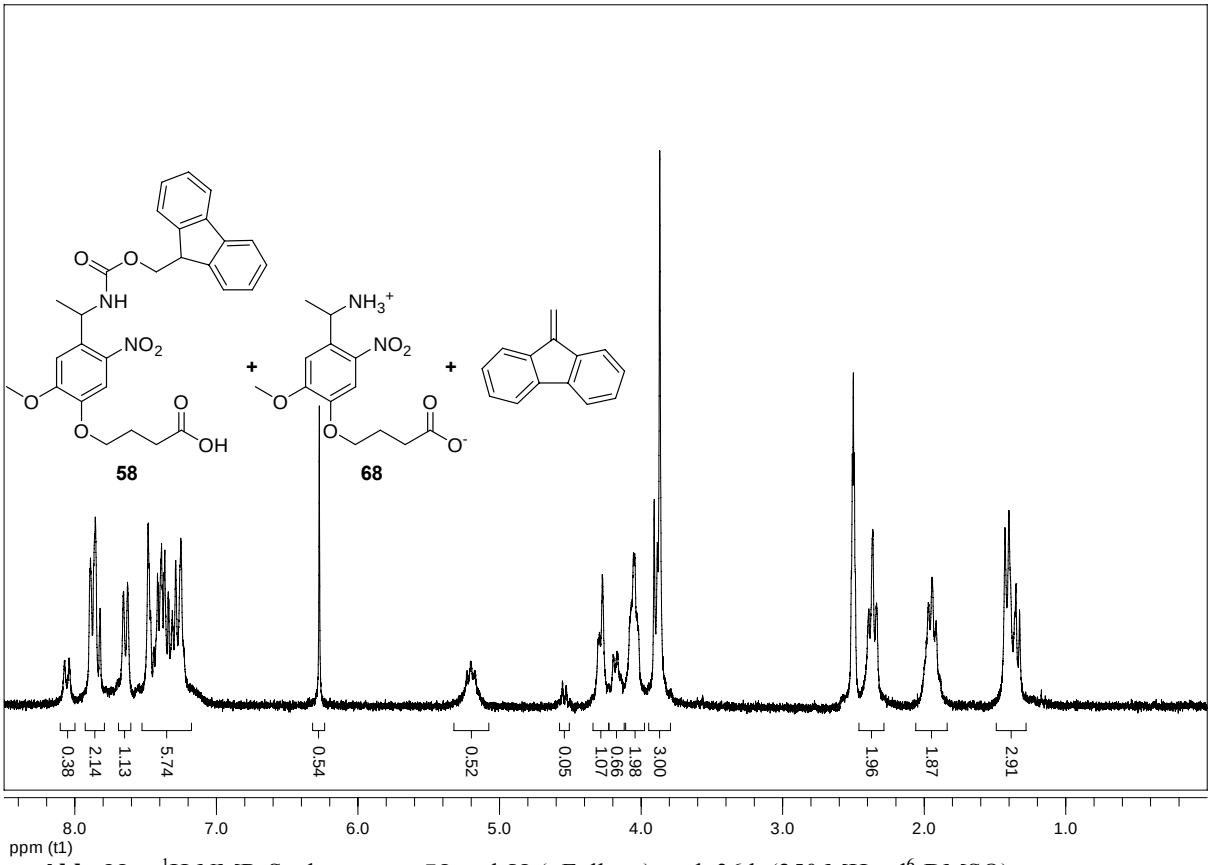


Abb. 98 ^{1}H-NMR-Spektrum von **58** und **68** (+Fullven) nach 36 h (250 MHz, d^{6}-DMSO)

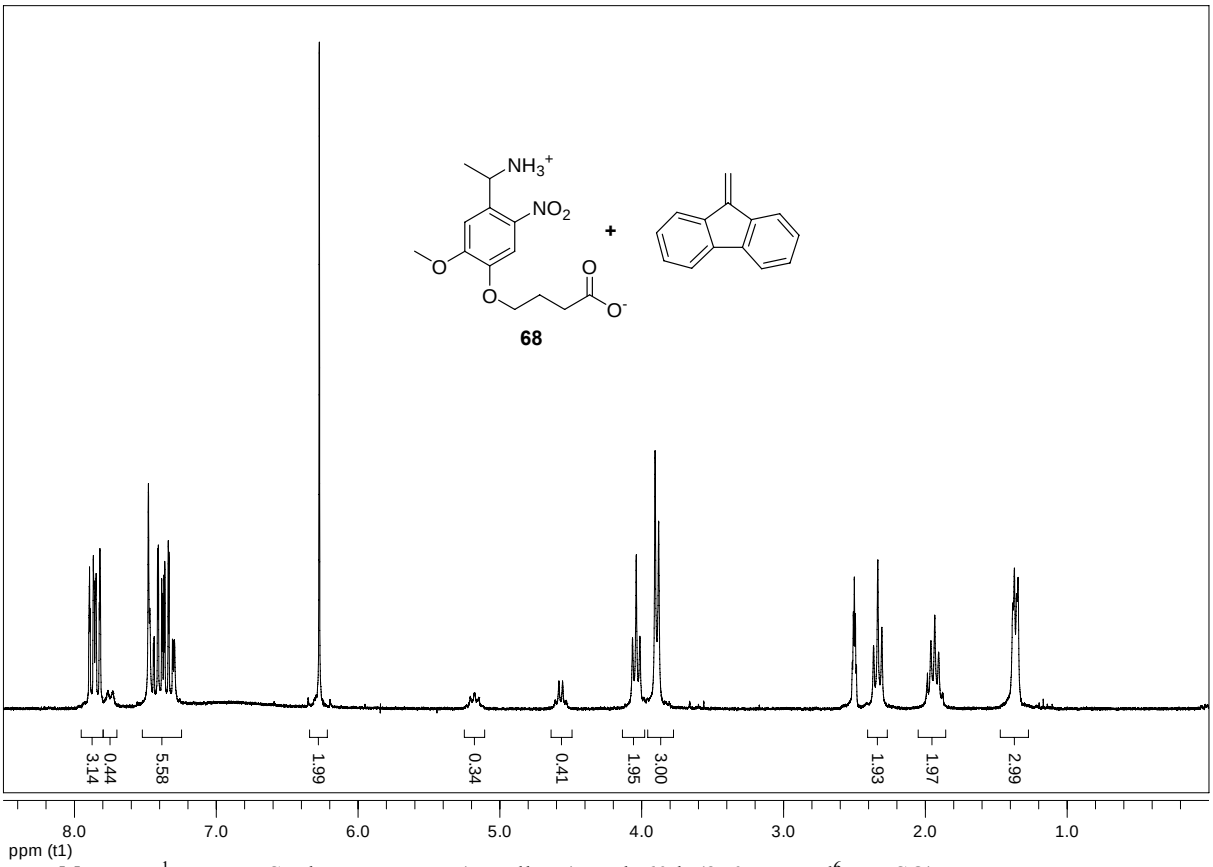


Abb. 99 ^{1}H-NMR-Spektrum von **68** (+ Fullven) nach 60 h (250 MHz, d^{6}-DMSO)

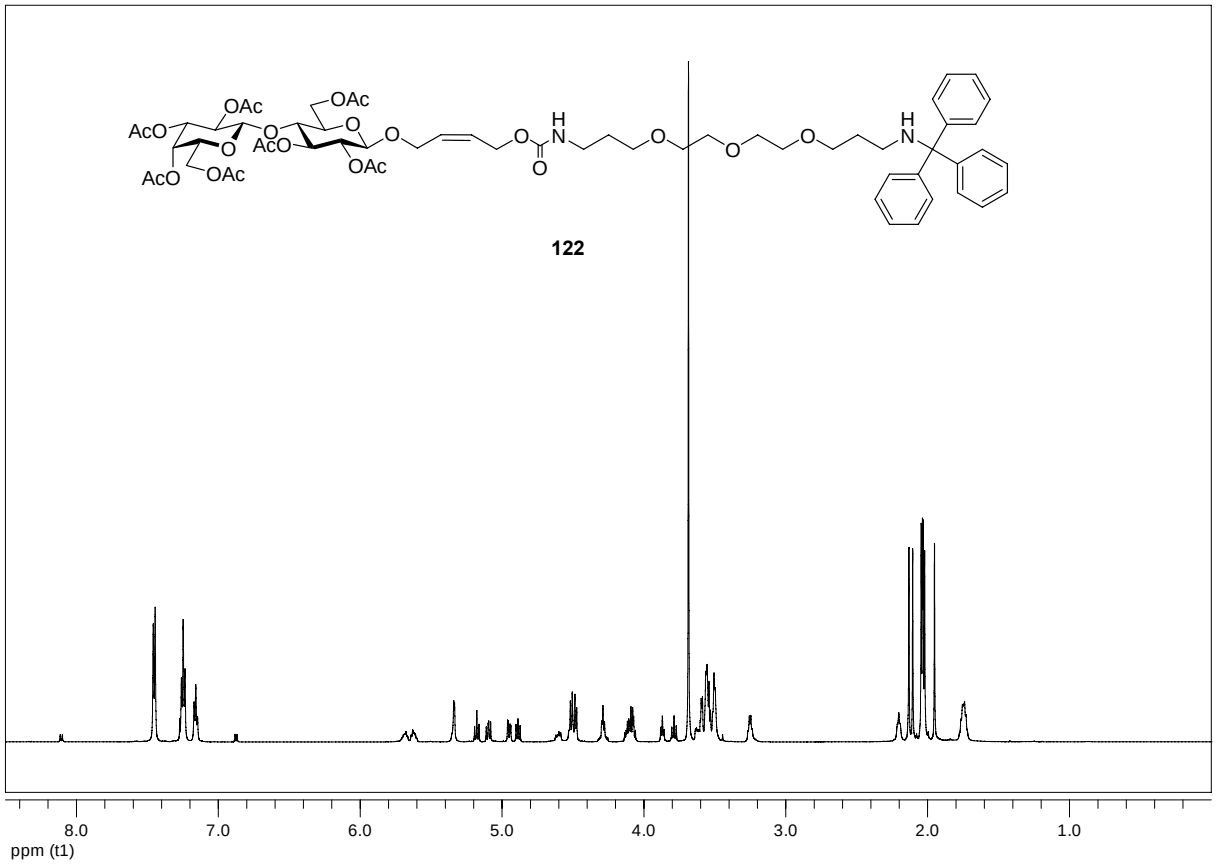


Abb. 100 ^{1}H-NMR-Spektrum von **122** (600 MHz, $CDCl_3$)

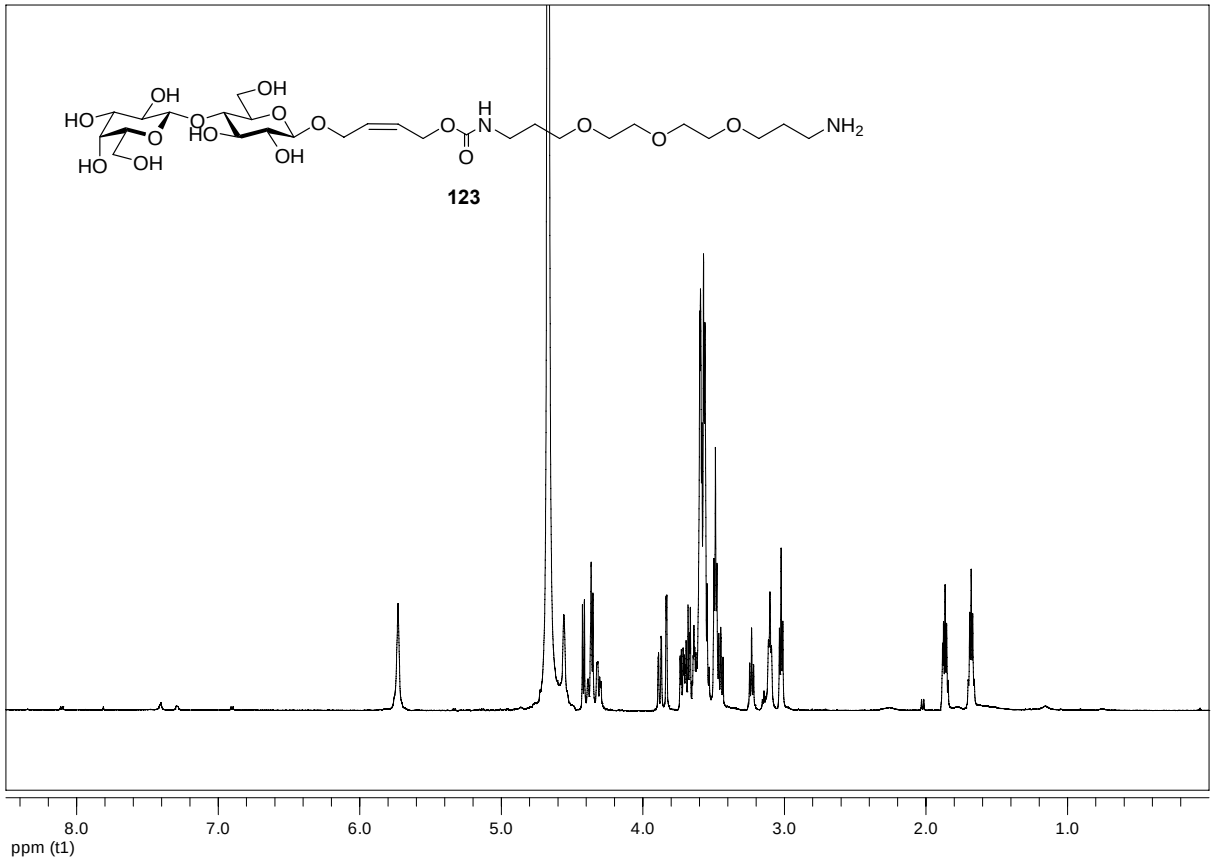
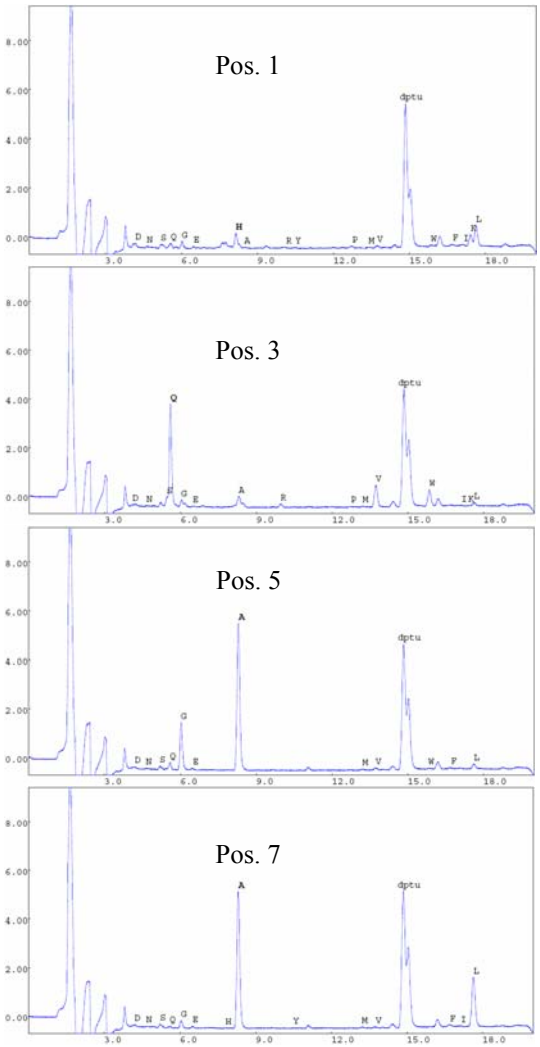


Abb. 101 ^{1}H-NMR-Spektrum von **123** (600 MHz, D_2O)

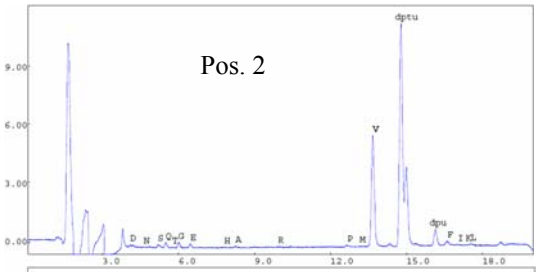
7.2. Ausgewählte Sequenzierungen

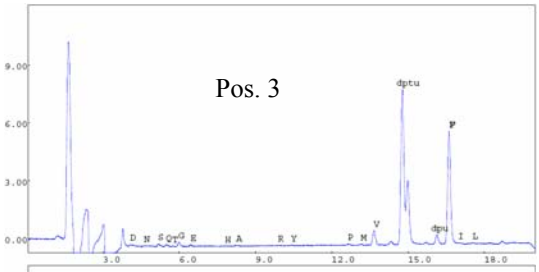
Sequenzierung **99**

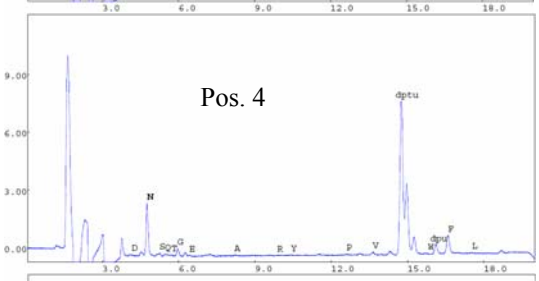


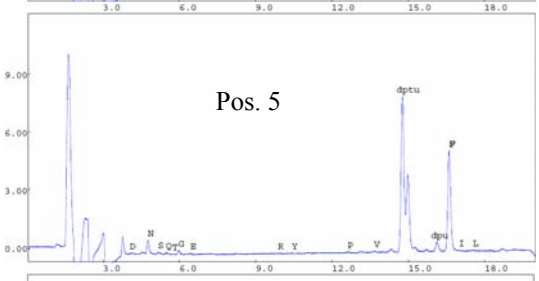
Anmerkung:
Q entspricht Dab (inkl. Butenolrest)

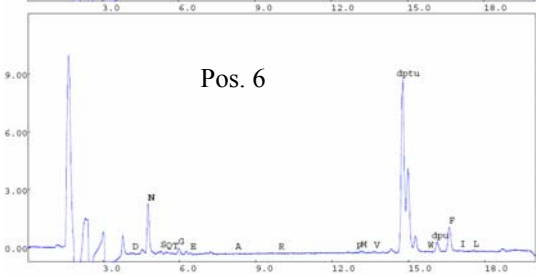
Sequenzierung **100**

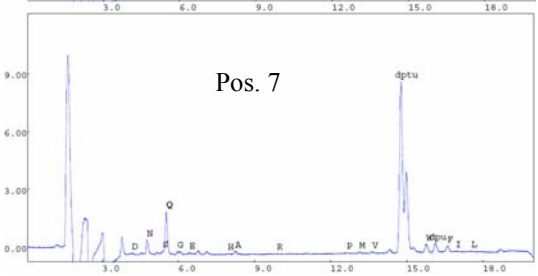






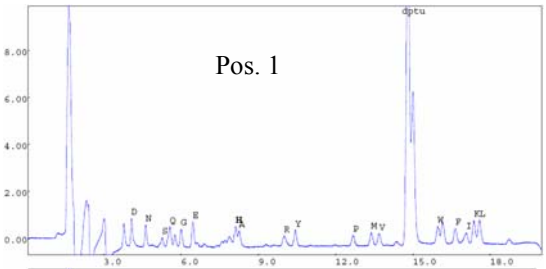


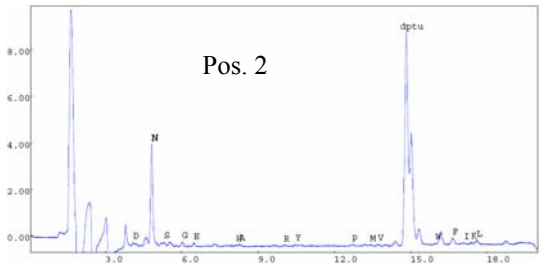


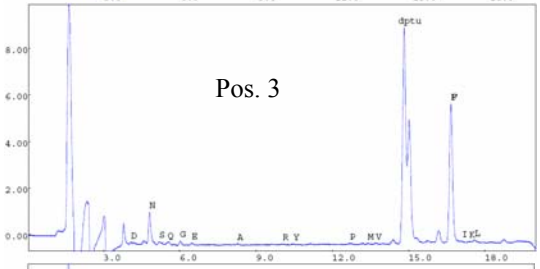


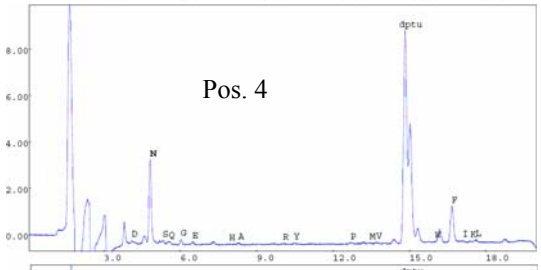
Anmerkung:
Q entspricht Dab (inkl. Butenolrest)
N entspricht Dpr (inkl. Butenolrest)

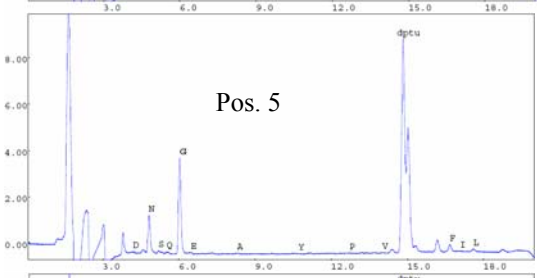
Sequenzierung **103**

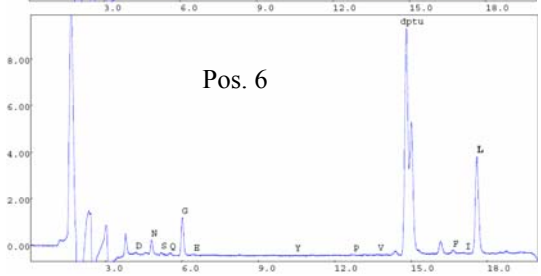


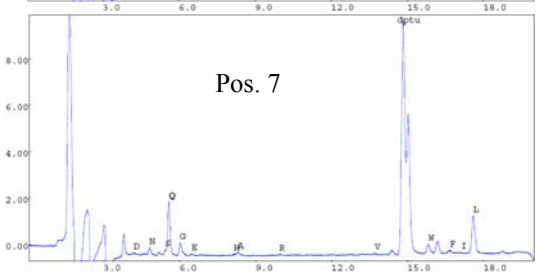






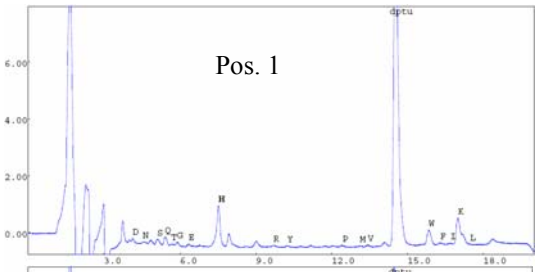


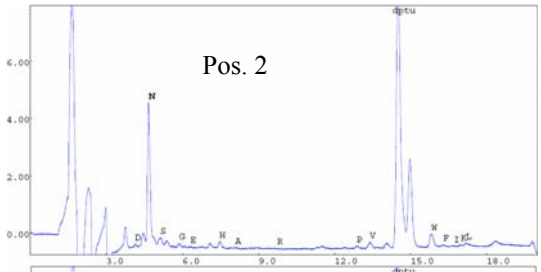


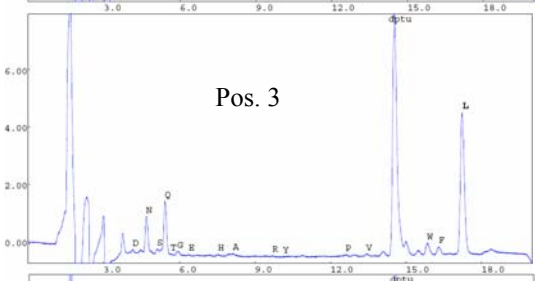


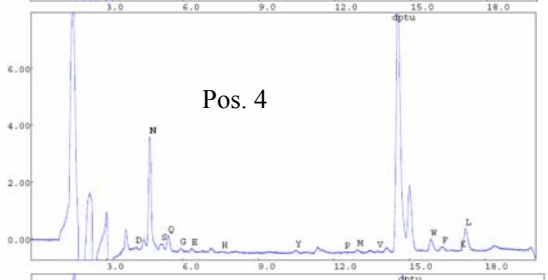
Anmerkung:
Q entspricht Dab (inkl. Butenolrest)
N entspricht Dpr (inkl. Butenolrest)

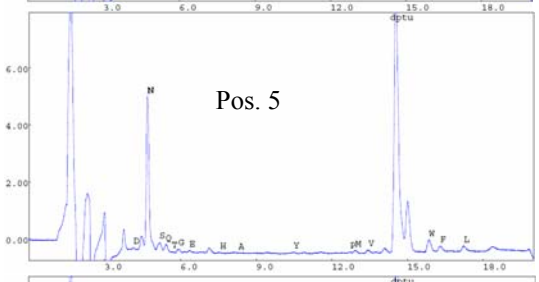
Sequenzierung **105**

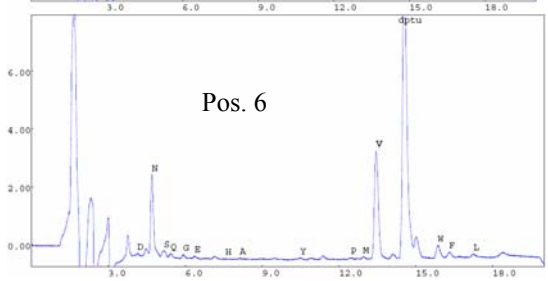


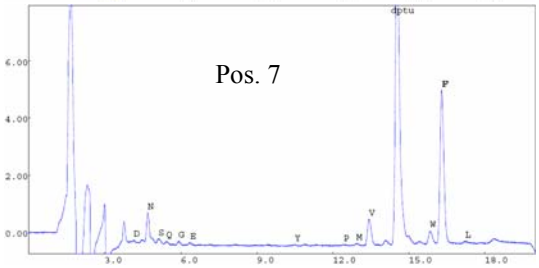






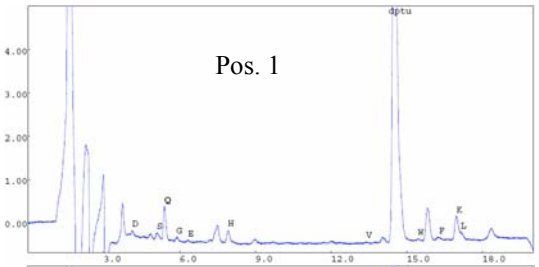


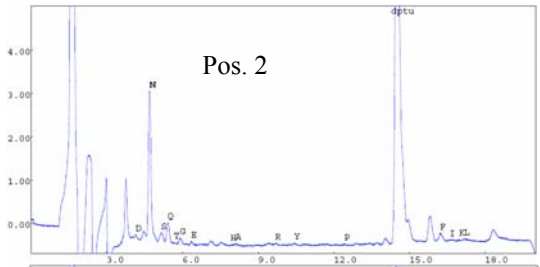


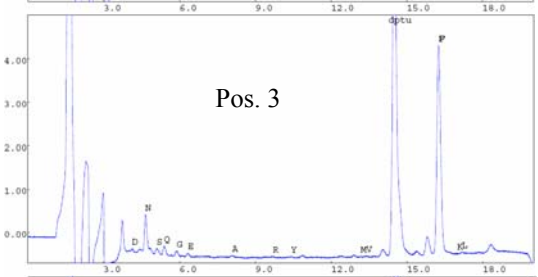


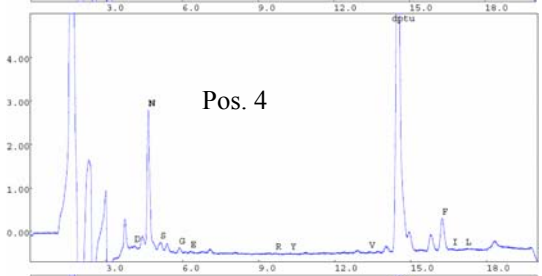
Anmerkung:
Q entspricht Dab (inkl. Butenolrest)
N entspricht Dpr (inkl. Butenolrest)

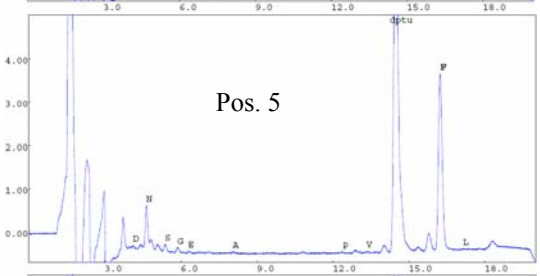
Sequenzierung **108**

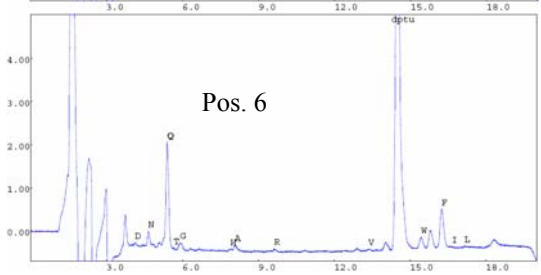


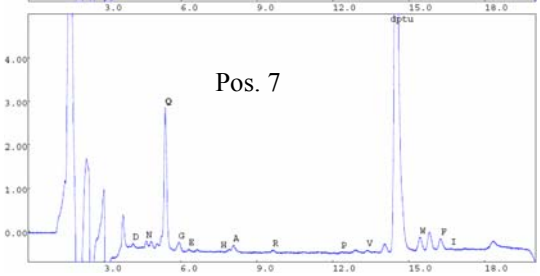






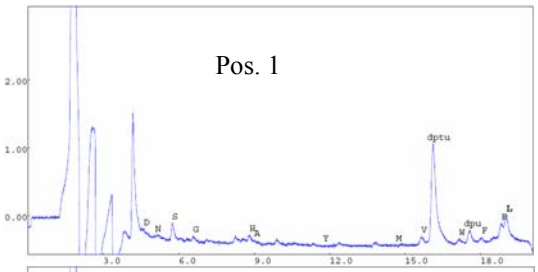


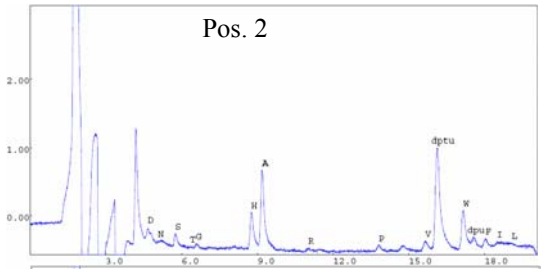


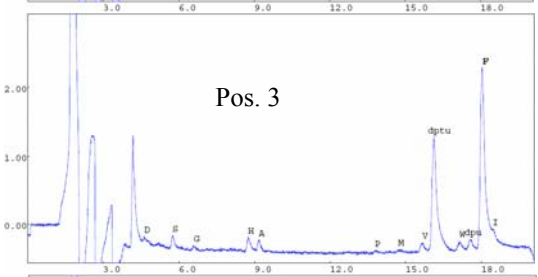


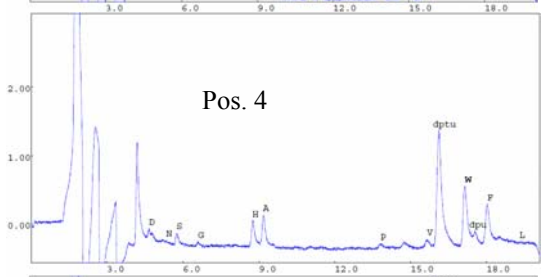
Anmerkung:
Q entspricht Dab (inkl. Butenolrest)
N entspricht Dpr (inkl. Butenolrest)

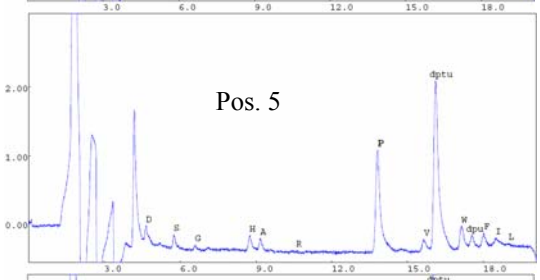
Sequenzierung **128**

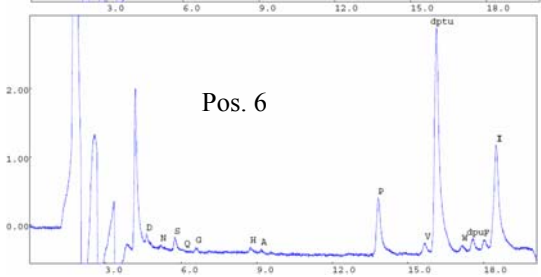


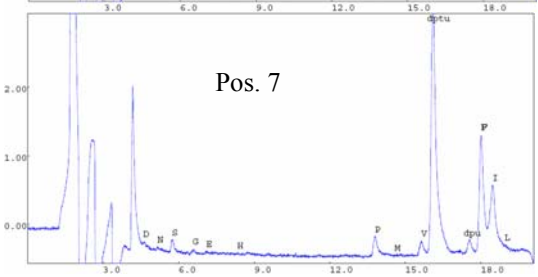






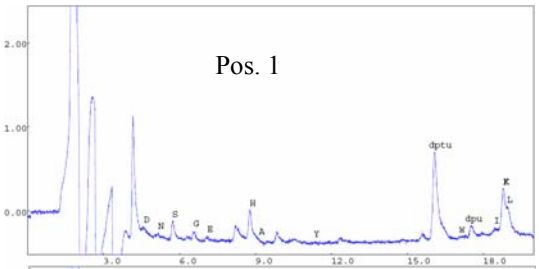


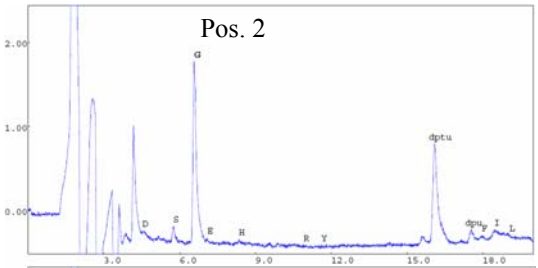


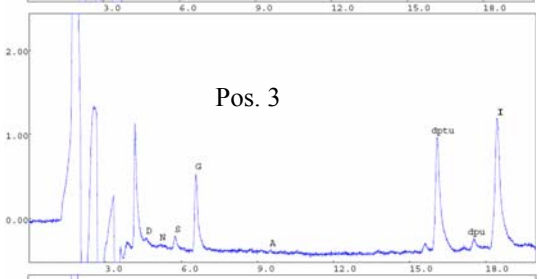


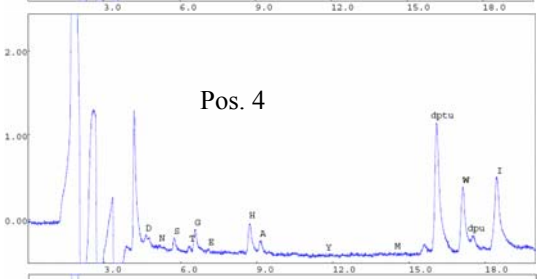
Anmerkung:
W entspricht Dab

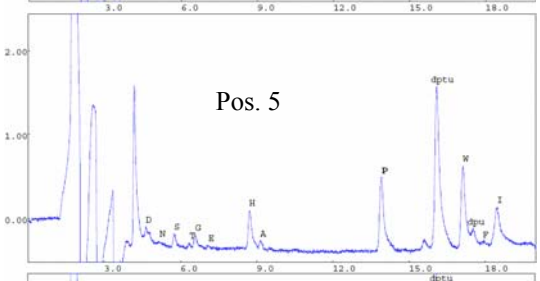
Sequenzierung **129**

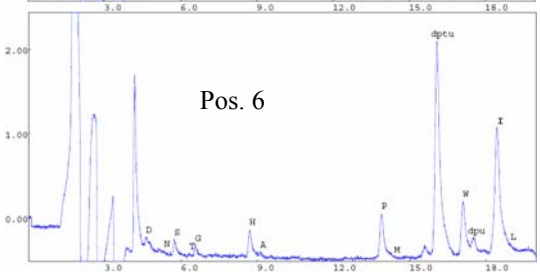


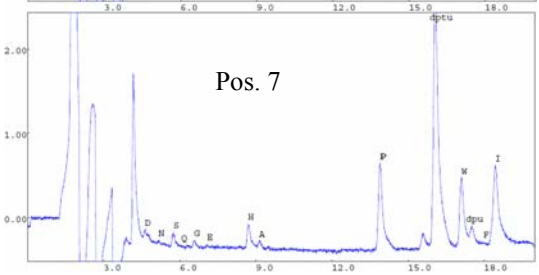






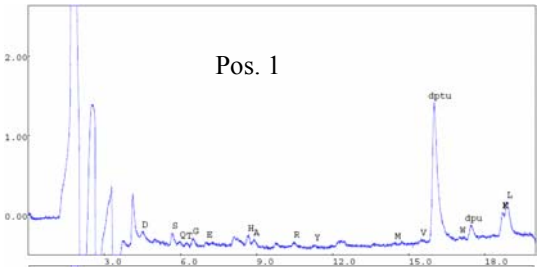


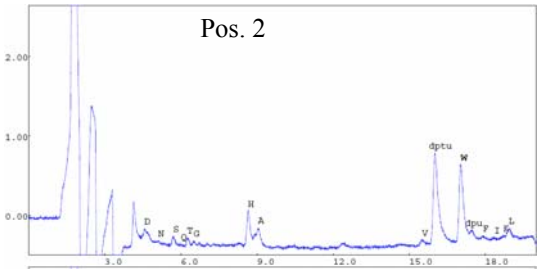


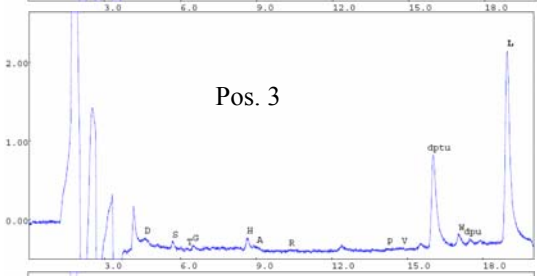


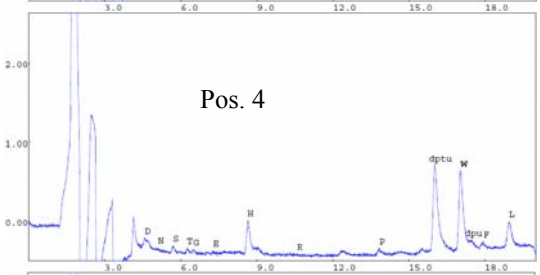
Anmerkung:
W entspricht Dab

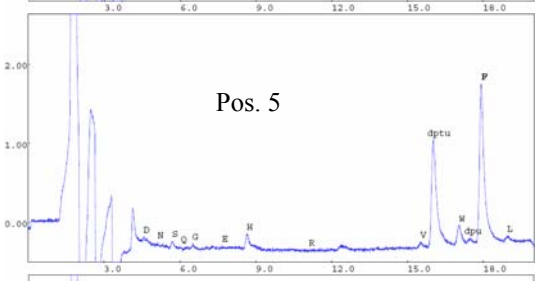
Sequenzierung **135**

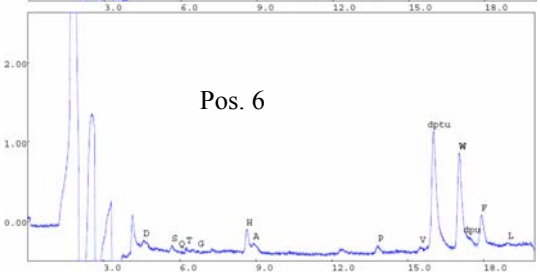


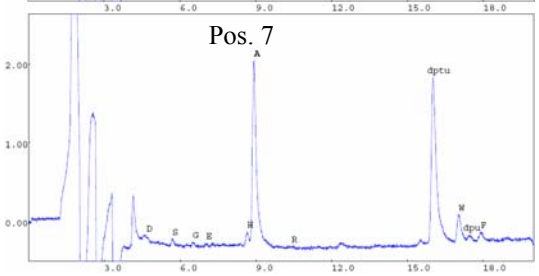












Anmerkung:
W entspricht Dab