

Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

Synthese von Zuckeraminosäure/Peptid- und PNA/DNA- Hybriden zur NMR-spektroskopischen Strukturuntersuchung

Christian P. Mang

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender Univ.-Prof. Dr. St. Glaser

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
2. Univ.-Prof. Dr. W. Hiller

Die Dissertation wurde am 14.04.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 16.05.2000 angenommen

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München in der Zeit von Januar 1996 bis April 2000 unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kessler angefertigt.

Herrn Prof. Kessler danke ich für die große Freiheit in der Ausgestaltung der vielseitigen Themen und die Unterstützung in allen Belangen. Neben der Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen war es vor allem die große wissenschaftliche Freiheit die zum Gelingen dieser Arbeit führte.

Mein weiterer Dank gilt:

- Meinen Laborkollegen Martin Kantlehner, Dr. Tom Bayer, Dr. Ludwig Käsbeck, Dr. Henrik Kuhn, Thorsten Arndt und Dirk Weber für das gute Laborklima.
- Dr. Elisabeth Lohof für die Einführung in die Thematik der Zuckeraminosäuren, sowie die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen,
- Dr. Eduardo Lioy für die Einführung in die Thematik der PNA,
- Birgit Heilig, Daniel Weicherding, Dirk Gottschling und Dr. Elisabeth Lohof für das Korrekturlesen des Manuskripts dieser Arbeit,
- Elisabeth Lohof, Daniel Weicherding, Dirk Gottschling, Markus Born, Niko Schmiedeberg und Christoph Gibson für die ständige Diskussionsbereitschaft und den wissenschaftlichen Austausch.
- Monika Goede, Eckart Planker und Dr. Rainer Haeßner für einzigartige Hilfe bei allen NMR-, Hardware- und Softwarefragen und die DG-Rechnungen der Cyclopeptide,
- Prof. Dr. E. Uhlmann für die Zusammenarbeit auf dem PNA-Gebiet,
- Markus Urzinger und Burghard Coords für die Anfertigung der Massenspektren,
- Christoph Gibson für die Vermittlung der Literaturrecherche,
- Daniel Weicherding, Martin Kantlehner, Dr. Christian Musewald, Niko Schniedelzweg, Uli Hersel und Gabor Sulyok für zahlreiche äußerst entspannende Kickerrunden,
- Prof. Dr. Ulf Diederichsen für die Bereitstellung des UV-Spektrometers und den Postdoc-Tip,

- Prof. Dr. A. Eschenmoser für ein inspirierendes Gespräch,
- Allen anderen, namentlich nicht genannten wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern, die dem Arbeitskreis das hervorragende Arbeitsklima verleihen.

Vor allem aber danke ich Birgit Heilig und meiner Familie herzlich für die einzigartige Unterstützung.

INHALT

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
2 ZUCKERAMINOSÄUREN.....	5
2.1 NATÜRLICHE ÄQUIVALENTE VON ZUCKERAMINOSÄUREN	5
2.2 VERWENDUNG VON ZUCKERAMINOSÄUREN.....	7
3 SYNTHESSEN DER ZUCKERAMINOSÄUREN	9
3.1 SYNTHESE DER AMINODERIVATE VON SAA2.....	9
3.1.1 β -SAA2-4N	9
3.1.2 β -SAA2-2N	19
3.2 SYNTHESE DER DERIVATE VON SAA2-gal	24
3.2.1 SAA2-gal.....	24
3.2.2 Benzylgeschützte SAA2-gal.....	26
4 EINBAU VON ZUCKERAMINOSÄUREN IN PEPTIDE	29
4.1 SOMATOSTATIN-ANTAGONISTEN	33
4.1.1 <i>Natürliche Bedeutung und strukturelle Aspekte</i>	33
4.1.2 <i>Zuckeraminosäuren in Somatostatin-Antagonisten</i>	36
4.1.3 <i>Synthese der Peptide</i>	38
4.2 INTEGRINANTAGONISTEN	42
4.2.1 <i>Integrine</i>	42
4.2.2 $\alpha_v\beta_3$ -selektive Antagonisten	45
4.2.3 <i>Zuckeraminosäuren in RGD-Peptiden</i>	46
5 ZUCKERAMINOSÄUREOLIGOMERE.....	55
5.1 ALLGEMEINE BEMERKUNGEN	55
5.2 VERSUCHE ZUR SYNTHESE EINES VERZWEIGTEN ZUCKERAMINOSÄUREHETEROOLIGOMEREN.....	58
6 SYNTHESE, EIGENSCHAFTEN UND ANWENDUNGEN VON PNA.....	64
6.1 BINDUNGSEIGENSCHAFTEN DER PNA	65
6.1.1 <i>PNA-haltige Duplexe</i>	66
6.1.2 <i>(PNA)₂DNA-Triplexe</i>	66
6.1.3 <i>Bis-PNAs</i>	69
6.1.4 <i>Reine PNA-Paarungskomplexe</i>	69
6.2 BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN UND ANWENDUNGEN	69
6.3 SYNTHESE VON PNA	74
6.4 STRUKTUR	77
6.4.1 <i>Struktur von PNA-DNA-Duplexen</i>	77
6.4.2 <i>Struktur von PNA-RNA-Duplexen</i>	78
6.4.2 <i>PNA₂-DNA-Triplexe</i>	79
7 SYNTHESE EINES ISOTOPENMARKIERTEN PNA ₂ DNA-TRIPLEXES FÜR	
NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	81
7.1 PROJEKTBSCHREIBUNG	81

7.2 SYNTHESSEN DER PNA-MONOMERE.....	85
7.2.1 <i>Synthese des isotopenmarkierten Cytosin-Monomeren</i>	85
7.2.2 <i>Synthese des ψ-iso-Cytosin-Monomeren</i>	88
7.3 SYNTHESSEN DER PNA-OLIGOMERE.....	89
7.4 PRÄPARATION DER PROBEN FÜR DIE NMR-UNTERSUCHUNG	91
7.5 UNTERSUCHUNG DER PAARUNGSEIGENSCHAFTEN DER ψ -ISO-CYTOSINHALTIGEN SEQUENZ.....	92
8 ZUSAMMENFASSUNG	96
9. EXPERIMENTELLER TEIL.....	99
9.1 SYNTHETISCHE, ANALYTISCHE UND SPEKTROSKOPISCHE METHODEN	99
9. 2 LISTE DER SYNTHETISIERTEN VERBINDUNGEN	102
9.3 SYNTHESSEN DER ZUCKERAMINOSÄUREN	106
10 LITERATUR.....	163

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
abs.	absolutiert
Ac	Acetyl
Äquiv.	Äquivalent(e)
<i>br</i>	breit
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung
DC	Dünnschichtchromatographie/-chromatogramm
dd	Doppeldublett
dest.	destilliert
DG	Distanzgeometrie
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPA	Diphenylphosphorsäureazid
EE	Essigsäureethylester
ESI	<i>electrospray ionization</i>
Et	Ethyl
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fmoc-ONSu	(<i>N</i> -Fluorenylmethoxycarbonyloxy)- <i>N</i> -succinimid
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HMQC-COSY	<i>heteronuclear multiple quantum coherence mit Cosy-Sequenz</i>
HOAc	Essigsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol

HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>
HV	Hochvakuum (Ölpumpenvakuum)
IC	<i>inhibitory capacity</i>
konz.	konzentriert
m	Multipllett
M	Molar
MD	Moleküldynamik
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
${}^nJ_{X,Y}$	skalare Kopplungskonstante zwischen den Kernen X und Y über n Bindungen
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
Ph	Phenyl
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett
R	Rest, meist: Alkylrest
R_f	Retentionsfaktor
R_t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Saa	Zuckeraminosäure(n)
SAR	<i>structure activity relationship</i> , Struktur-Wirkungsbeziehung
SG	Schutzgruppe
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatinrezeptor
t	Triplett
TBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> , - tetramethyluronium-

	hexafluoroborat
tBu	<i>tert.</i> -Butyl
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol-Harz
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	1,1,1-Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TMS	Trimethylsilyl
TMSCl	Trimethylsilylchlorid
TMSI	Trimethylsilyliodid
TOCSY	<i>total correlated spectroscopy</i>
verd.	verdünnt
Z	Benzyloxycarbonyl

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den von *Chemical Abstracts* (Chemical Abstracts, "Index Guide", 77, 210.) und den *IUPAC-IUB*-Kommissionen (IUPAC, *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 455-477; IUPAC, *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 1919; IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), *Biochemistry* **1974**, 10, 3983; IUPAC-IUB (JCBN), *Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 9-37) empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke, die aus dem Englischen übernommen wurden, sind *kursiv* geschrieben.

1 Einleitung und Zielsetzung

Das Verständnis biologischer Vorgänge auf molekularer Ebene ist von zentraler Bedeutung für die Entwicklung neuer therapeutischer Angriffspunkte. Gerade Krankheiten wie Krebs, AIDS, das Alzheimer Syndrom oder das Phänomen der zunehmenden bakteriellen Antibiotikaresistenz, für die bislang noch keine befriedigende pharmakologische Lösungen gefunden wurden, bilden die Motivation, physiologische Prozesse begreifen und vor allem auch gezielt beeinflussen zu können.

Zur Entwicklung neuer Pharmaka stehen prinzipiell verschiedene Strategien zur Verfügung. In den 80er Jahren wurde zu diesem Zweck das *rational drug design* entwickelt, dessen Grundlage die Vorhersage aktiver Verbindungen allein aufgrund der strukturellen Analyse des Rezeptors ist.[1,2] Auf dieser Basis sollte auch ein *de novo design* pharmakologisch relevanter Moleküle möglich sein, was sich in der Praxis aber nur in Ausnahmefällen verwirklichen liess.[3] Mit Beginn des letzten Jahrzehnts erschien der Weg der Kombinatorik zunehmend erfolgversprechend,[4-9] um so eine möglichst große Anzahl verschiedener Verbindungen zu herzustellen und diese wiederum in effizienten *screening*-Verfahren (*high throughput screening*, HTS) auf ihre biologische Aktivität zu überprüfen. Doch auch der Trend die Wirkstoffsuche allein auf der Basis kombinatorischer Methoden durchzuführen, ist wieder rückläufig. Inzwischen werden beide Wege als gleichberechtigte Hilfsmittel zum Erreichen des gleichen Ziels angesehen.[10-13]

Vorraussetzung für eine erfolgreiche Kombination dieser beiden Methoden zur Entwicklung neuer Medikamente ist aber zweifellos das Auffinden neuer Leitstrukturen, die es aufgrund neuer Wirkprinzipien möglich machen, neue pharmakologische Ziele ins Auge zu fassen. Ein interessanter Weg des *drug designs* ist deshalb der Entwurf völlig neuer Systeme, um bestimmte Fragestellungen angehen zu können. Dieser Ansatz, der hauptsächlich auf die synthetische Beherrschbarkeit komplexer natürlicher Systeme zurückzuführen ist, beruht zum größten Teil auf dem Verständnis molekularer Erkennungsmechanismen. Oft bedient man sich dabei der Möglichkeit zwei Stoffklassen chemisch zu kombinieren, indem typische Strukturelemente verschiedener Biomoleküle in einer neuen Struktur vereinigt werden. Das Bestreben

dieses Ansatzes liegt darin, die gewünschten Eigenschaften eines Systems zu übernehmen und die nachteiligen Eigenschaften durch den strukturellen Übergang zu einem anderen System zu eliminieren (Abb. 1.1).

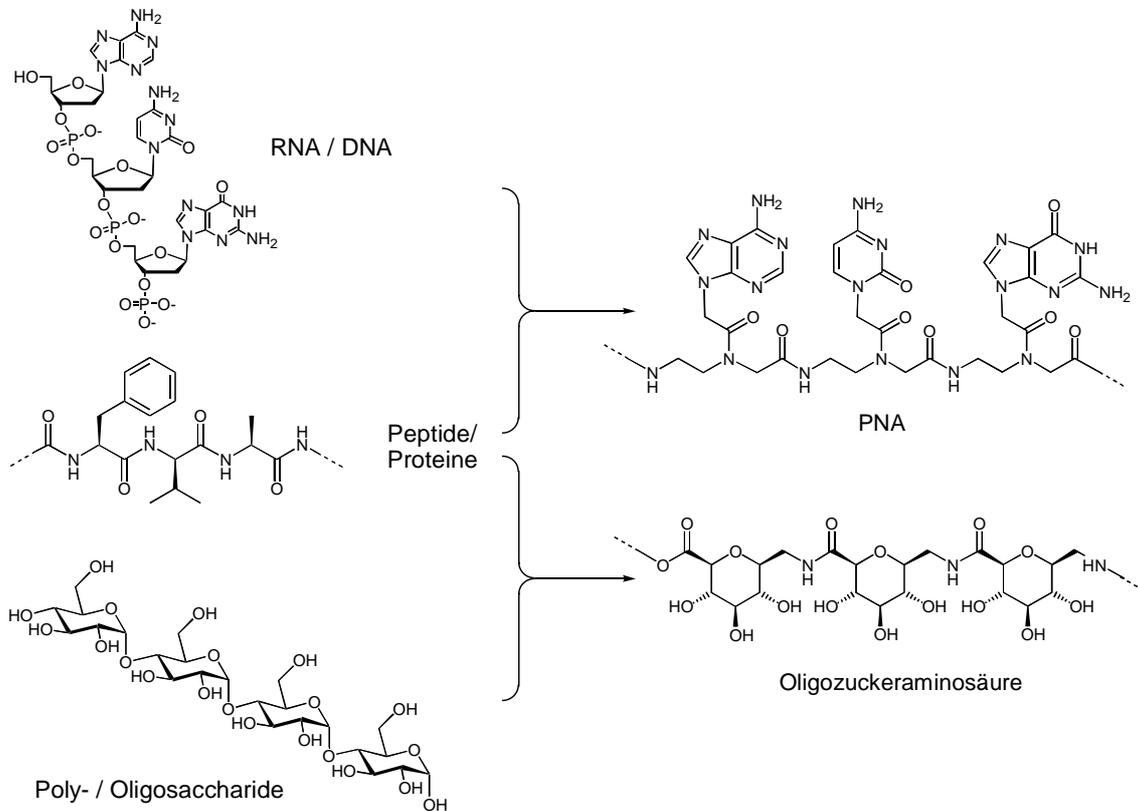


Abb. 1.1: Design neuartiger Biopolymere aus natürlichen Oligomeren.

Zuckeraminosäuren (SAA) und Peptidnukleinsäuren (PNA) sind die in den jeweiligen Grenzbereichen der klassischen Biopolymeren der DNA, Proteine und Oligosaccharide (s. Abb. 1.1) liegenden Substanzklassen, mit denen sich diese Arbeit beschäftigt.

Das Konzept der Zuckeraminosäuren führte in unserem Arbeitskreis bis jetzt zur Synthese von SAA1-4 (Abb. 1.2) und von einigen ihrer Derivate. Die vom biologischen Standpunkt interessanteste Zuckeraminosäure ist SAA2. Diese konnte bereits in relevante Cyclopeptide unter Erhalt der biologischen Aktivität eingebaut werden (s. spätere Kapitel). Diese Erkenntnisse, gemeinsam mit der Klarheit über die strukturelle Rolle von SAA2 in den Cyclen, bilden ein stabiles Fundament für weitergehende Studien. Die bisherigen Arbeiten beschränken sich im Wesentlichen auf

die Strukturuntersuchung mittels NMR-Methoden und die Überprüfung der Tragfähigkeit des Konzepts des Strukturerhalts von Cyclopeptiden nach Einbau von Zuckeraminosäuren.

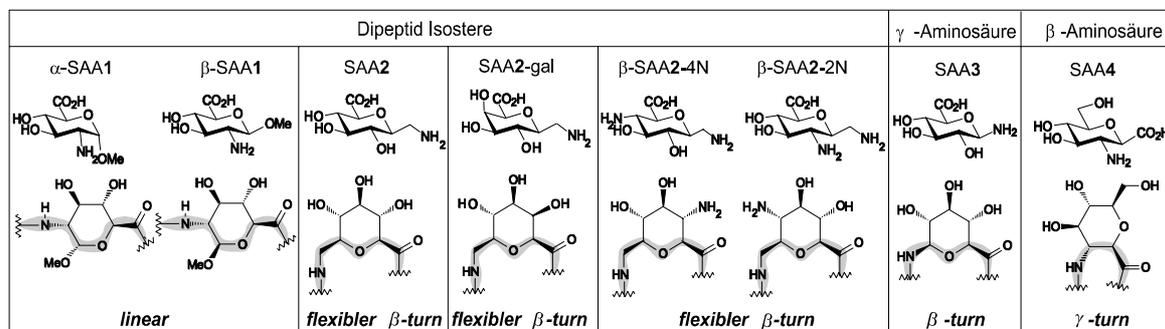


Abb. 1.2: Bisher in unserer Gruppe synthetisierte Zuckeraminosäuren.

Das Potential der SAA reicht aber weiter. Ein Aspekt, der in bisherigen Studien nur unzureichend untersucht wurde, ist die Variabilität der Zuckeraminosäuren bezüglich ihrer Derivatisierungen. Diese sollten relativ einfach und selektiv einführbar sein. Außerdem erscheint die Möglichkeit, komplexe Strukturen wie Cyclopeptide durch einfache Modifikationen in vielen Eigenschaften, wie biologischer Aktivität oder pharmakokinetischer und –dynamischer Parameter, grundlegend verändern zu können, außerordentlich attraktiv. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit „seitenkettenfunktionalisierte“ Derivate von SAA2 hergestellt werden, die in einfacher Weise selektiv modifiziert werden können. Als Zielstrukturen wurden zwei Aminoderivate von SAA2 gewählt, die exemplarisch derivatisiert und in biologisch relevante Cyclopeptide eingebaut werden sollten. Anschließende strukturelle Untersuchungen und biologische Tests sollten zeigen, ob das Konzept der Zuckeraminosäuren in der vorgestellten Weise verwendbar ist. Darüber hinaus wurde nach Möglichkeiten gesucht, den bisher vorgestellten „Baukasten“ der Zuckeraminosäuren in sinnvoller Weise mit Galactose-Derivaten zu erweitern.

Ein weiteres Beispiel, bei dem die Kombination zweier Substanzklassen zur Lösung von Problemen des *drug designs* eingesetzt wurde, ist PNA. Sie eignet sich konzeptionell vor allem zum Einsatz in der *Antisense*- oder der *Antigene*-Strategie. Der therapeutische Einsatz ist jedoch aus verschiedenen Gründen gegenwärtig noch

äusserst problematisch (s. Kapitel 6). Strukturuntersuchungen könnten Wege zur Lösung dieses Problems weisen. Deshalb wurde in unserem Arbeitskreis in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Uhlmann (Aventis AG) ein Projekt zur Strukturaufklärung (PNA)₂DNA-tripelhelikaler Systeme mit NMR-Methoden konzipiert. Im Rahmen dieses Vorhabens sollte eine im Rückgrat vollständig isotopenmarkierte PNA-Sequenz hergestellt werden. Deshalb war das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit die Synthese eines entsprechend modifizierten PNA-Bausteins, dessen Einbau in die gewünschte Sequenz und schließlich die Herstellung der (PNA)₂DNA-Tripelhelix.

Im Vorgriff auf mögliche NMR-technische Probleme sollte darüber hinaus ein basenmodifiziertes Hilfssystem erarbeitet werden.

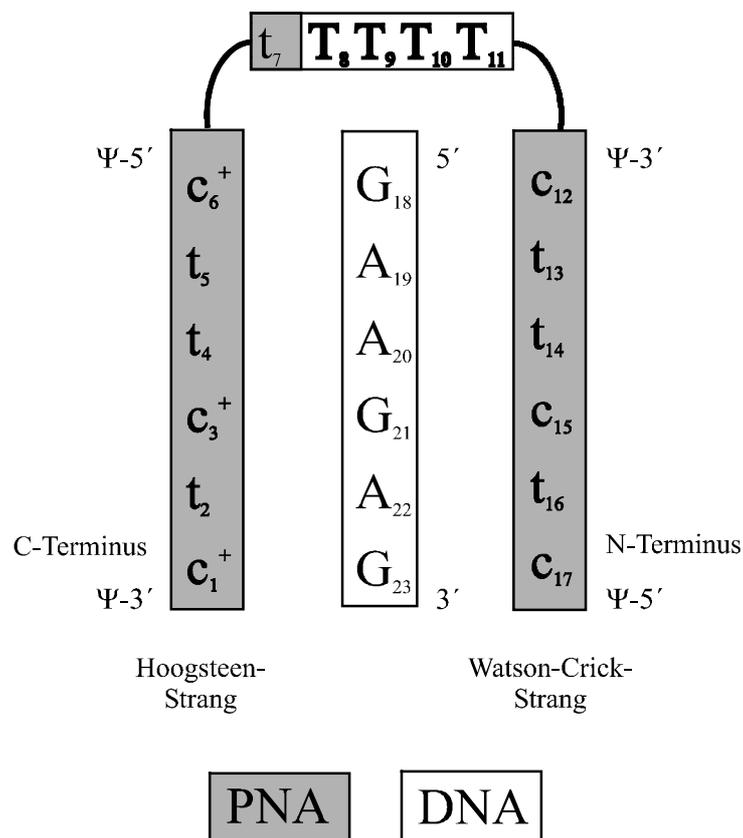


Abb. 1.3: Darstellung der tripelhelikalen Zielstruktur.

2 Zuckeraminosäuren

Zuckeraminosäuren stellen eine Stoffklasse dar, die in den Grenzbereich zwischen Sacchariden und Aminosäuren einzuordnen ist. Gemeinsam ist allen Vertretern die gleichzeitige Anwesenheit sowohl einer Amino- als auch einer Carboxylfunktion, sowie ein, durch die Präsenz meist mehrerer optional funktionalisierter Hydroxylgruppen, zuckerähnliches, überwiegend pyranoides oder furanoides, Grundgerüst. Der Terminus „Zuckeraminosäure“ (*sugar amino acid*) wurde in der Arbeitsgruppe um Kessler geprägt[14,15] und findet auch in der entsprechenden Literatur Verwendung,[16-18] Es sind weitere Bezeichnungen wie *saccharo amino acid*,[19] *glycosylamino acid*[20] oder *sugar like amino acid*[21] im Gebrauch.

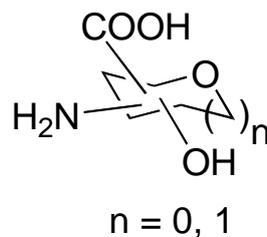


Abb. 2.1: Allgemeine Darstellung von Zuckeraminosäuren.

2.1 Natürliche Äquivalente von Zuckeraminosäuren

Auch aus der Natur ist das Vorkommen von Zuckeraminosäuren bekannt. Hierbei werden ihre einzigartigen Eigenschaften auf vielfältige Art und Weise genutzt. Neuraminsäure **1** wird als Endpunkt vieler Saccharidsequenzen von Glycoproteinen höherer Organismen gefunden.[22,23] Die Uronsäuren des Galactos- Glucos- und Mannosamins können in verschiedenen bakteriellen Zellwänden nachgewiesen werden.[24,25] Glucosaminuronsäure **2** wurde darüber hinaus als Bestandteil des dem Vancomycin verwandten antibiotisch wirksamen Naturstoffes A40926 nachgewiesen.[26] Schliesslich weist auch Gougerotin **3**, eine ebenfalls antibiotisch wirksame Substanz, große strukturelle Gemeinsamkeiten mit Zuckeraminosäuren auf.[27]

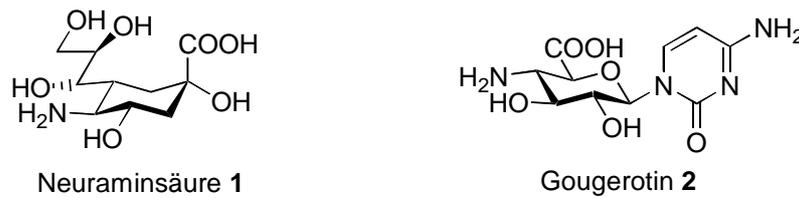


Abb. 2.2: Natürlich vorkommende Zuckeraminosäuren.

2.2 Verwendung von Zuckeraminosäuren

Schon sehr früh wurden synthetische Zugänge zur strukturell relativ komplexen Stoffklasse der Zuckeraminosäuren gesucht. 1955 gelang erstmals in der Gruppe um Heyns und Paulsen die Synthese der Glucosaminuronsäure **2** als Strukturbeweis von aus bakteriellen Zellwänden isolierten Komponenten.[28] Trotz diesem frühen Interesse fanden Zuckeraminosäuren jahrelang nur sporadisch Verwendung, wie z. B. 4-Amino-4-desoxyglucosuronsäure zur Darstellung von Nucleosidantibiotika[29] oder eines Derivats von SAA4 als potentiell Photoaffinitätsreagens.[30] Erst Anfang der 90er Jahre wurde die Forschungstätigkeit auf diesem Gebiet wieder lebhafter, ein Umstand, der vor allem aus der Vielzahl der seitdem veröffentlichten Strukturen deutlich wird.

Eine der ersten systematischen Verwendungsmöglichkeiten von Zuckeraminosäuren wurde 1996 von E. Roedern mit dem Einbau in Peptide beschrieben. Die Zielsetzung bestand darin eine neue Klasse von Peptidomimetika zu etablieren.[14] Die vorgestellten Systeme sollten in der Lage sein, je nach Struktur, verschiedene Sekundärstrukturelemente in Peptiden nachzubilden. Vorteilhaft erschien vor allem der Einsatz von gluco-konfigurierten Zuckern, da sie aufgrund der all-äquatorialen Anordnung der Substituenten über eine sehr starre Sesselkonformation verfügen, die auf die Gesamtkonformation der Peptide einen stabilisierenden Einfluss ausüben sollte. Dieser neue Ansatz im Design von *turn*-Mimetika erwies sich als außerordentlich erfolgreich, so daß es in der Folgezeit zur Entwicklung einer Vielzahl analoger Strukturen kam (Abb. 2.3).

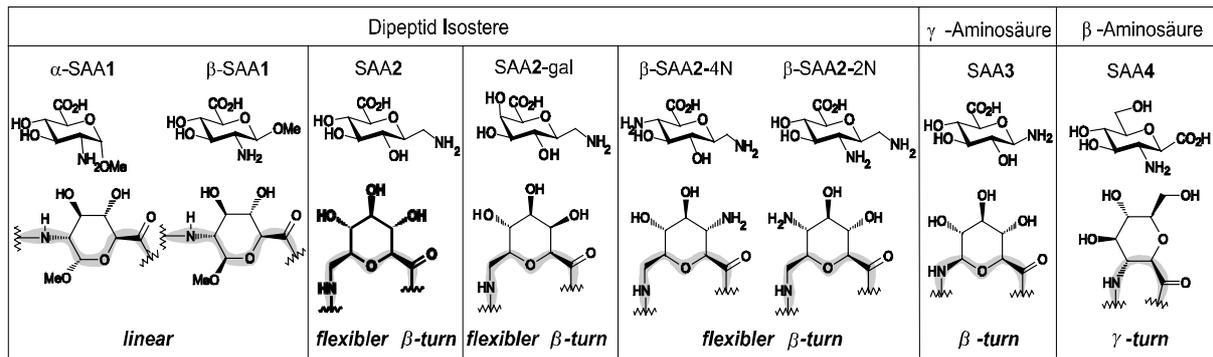


Abb. 2.3: Ausschnitt des „Baukastens“ der in unserem Arbeitskreis bisher dargestellten Zuckeraminosäuren.

Durch die Möglichkeit der Derivatisierbarkeit vergrößert sich die Vielfalt der erreichbaren Strukturen erheblich, so daß das Konzept der Zuckeraminosäuren als Peptidomimetika sehr variabel auf verschiedene Problemstellungen angewendet werden kann. Die pharmakologische Relevanz des Einbaus von Zuckeraminosäuren in biologisch aktive Peptide wurde, in den ursprünglichen Arbeiten nachfolgenden Studien, durch die Inkorporation in verschiedene bioaktive Sequenzen (Somatostatin, RGD-Peptide, Substanz P, Neurokinine) gezeigt.[15,31-34]

Das Potential der SAA ist mit dem Einbau in Peptide aber noch nicht erschöpft. In jüngerer Zeit wurden zwei Ansätze zu deren Verwendung in der Kombinatorik beschrieben. Lansbury et al publizierten 1996 einen Satz verschiedener SAA (größtenteils in Form verschiedener Derivate), die für den Einsatz in der kombinatorischen Chemie bestimmt sind.[20] Alternativ dazu beschrieben Sofia et al. die Verwendung zweier Zuckeraminosäuren zur Herstellung von Gerüstmimetika-Bibliotheken zum *mapping* der räumlichen Orientierung pharmakophorer Gruppen.[35-37]

Das Spektrum der Anwendungsmöglichkeiten von Zuckeraminosäuren wird in den letzten Jahren verstärkt durch die Publikation dimerer und oligomerer SAA-Strukturen erweitert. Die Komplexität der natürlichen Vorbildstrukturen – den Oligosacchariden – konnte bisher jedoch nur im Ansatz erreicht werden. Dieser Aspekt wird in Kapitel 5 eingehender diskutiert.

3 Synthesen der Zuckeraminosäuren

Ausgangspunkt der Synthesen der hier vorgestellten Zuckeraminosäuren war der Erhalt der biologischen Aktivität relevanter Cyclopeptide nach Einbau von SAA2 und einigen seiner Derivate. Auf dieser Basis sollte nach selektiv modifizierten Strukturen gesucht werden, die es erlauben, weitergehende Struktur-Wirkungsbeziehungen der untersuchten Cyclen durchzuführen.

Aus diesem Grund wurden Synthesen für die beiden SAA2-Derivate SAA2(2N) und SAA2(4N) konzipiert. Diese Strukturen sollten dann in geeigneter Weise modifiziert werden, um die gewünschten Eigenschaften der Cyclopeptide zu beeinflussen. Weiterhin sollten die Substanzen für die Verwendung in der Standardpeptidsynthese nach der Fmoc/*t*Bu-Strategie geeignet sein.

3.1 Synthese der Aminoderivate von SAA2

3.1.1 β -SAA2-4N

Zur Herstellung des 4-Aminoanalogons von SAA2 musste ein, verglichen mit dem der Ursprungsverbindung, völlig neuer Syntheseweg entworfen werden. Die dazu nötige retrosynthetische Analyse liefert vier hervorstechende Merkmale der Zielstruktur:

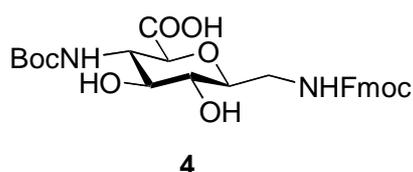


Abb. 3.1: Darstellung der Zielstruktur *Fmoc- β -SAA2(4NBoc)-OH* 4.

- a) Das zuckeranaloge Grundgerüst, dessen Substituenten die β -Glucokonfiguration einnehmen.
- b) Die Fmoc-geschützte Aminomethylengruppierung an der „anomeren Position“, die das Zielmolekül als C-Glykosid ausweist.
- c) Die Boc-geschützte Aminogruppe in 4-Position.
- d) Die uronsäureähnliche Carbonsäurefunktionalität.

Die retrosynthetische Zerlegung ergibt als ersten Schritt die Transformation der Carboxylfunktion in die entsprechende primäre Hydroxylfunktion. Diese Umwandlung wurde gewählt, da mit der TEMPO-Oxidation eine zuverlässige in guten Ausbeuten verlaufende Methode zur Verfügung steht. Sie vermag ohne Chemoselektivitätsprobleme primäre OH-Funktionen in Gegenwart von sekundären zu oxidieren, was den Verzicht auf die sonst nötige Schutzgruppentechnik möglich macht.[38,39] Dieser Schritt vereinfacht die Struktur auf ein konventionelles C-Glycosid.

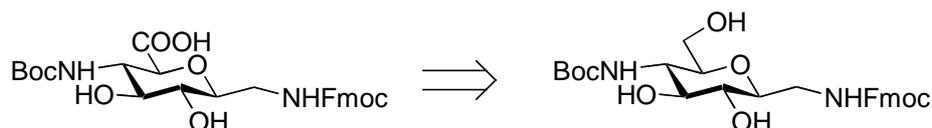


Abb. 3.2: *Erster Schlüsselschritt der Retrosynthese.*

Als zweite retrosynthetische Zerlegung wurde die Entfernung der Aminogruppe in Position 4 des Pyranoseringes gewählt. Augenfällig ist die Möglichkeit, diese Funktionalität durch die Substitution einer axialständigen Abgangsgruppe unter Inversion des Stereozentrums mit einem Stickstoffnucleophil zu erreichen. Dies führt zur Erzeugung einer Galactose-konfigurierten Struktur. Aus der Literatur ist eine Vielzahl ähnlicher Umwandlungen bekannt. Als vorteilhaft erweist sich die Tatsache, daß S_N2 -Reaktionen an dieser Position in Galactosederivaten bevorzugt ablaufen.[40]

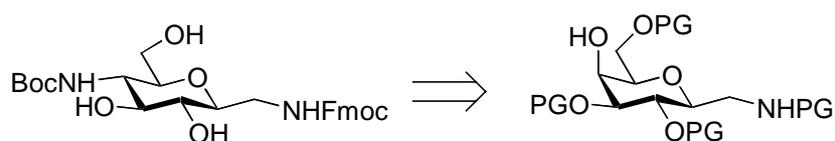


Abb. 3.3: *Zweiter Schritt der retrosynthetischen Zerlegung.*

Da die beschriebene Vorgehensweise auf der selektiven Aktivierung einer Hydroxylgruppe beruht, muß im Vorfeld der Reaktionssequenz zur Einführung der Aminogruppe die Differenzierung durch die sorgfältige Selektion der OH-Gruppe in Position 4 von den beiden anderen sekundären (in Position 2 und 3) und der primären in 6-Stellung erfolgen. Die dazu nötige aufwendige Schutzgruppentechnik ist aus der konventionellen Saccharidchemie bekannt.[40]

Als letzter Schlüsselschritt der retrosynthetischen Zerlegung bleibt die Rückführung der C-glykosidischen Struktur auf ein einfaches und in großem Maßstab zugängliches Zuckerderivat. Die β -Stellung der Aminogruppe legt dabei eine Ausnutzung des anchimeren Effekts nahe. Die Wahl der zu verwendenden Schutzgruppen ist somit auf nachbargruppenaktive Substituenten einengt.

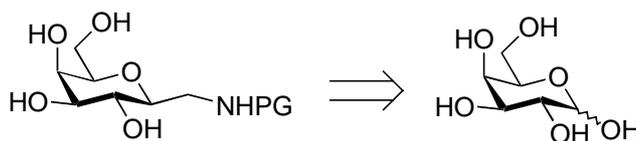


Abb. 3.4: *Letzter Schlüsselschritt der Retrosynthese.*

Entsprechend der retrosynthetischen Analyse wurde Galactose **5** als käufliches und preiswertes Ausgangsmaterial gewählt. Der erste Schritt bestand in der Umsetzung zur Pentaacetyl- β -D-galactopyranose **6** mit Acetanhydrid und Natriumacetat, einer Methode, die einfach in großem Maßstab durchführbar ist, und hauptsächlich das für die nachfolgende Aktivierung der anomeren Position geeignete β -Acetat liefert.[41] Die Reinigung erfolgt in einfacher Weise durch Kristallisation. Das in geringeren Mengen ebenfalls entstehende α -Anomere ist nur schwer aktivierbar und liefert bei der nachfolgenden Umsetzung hauptsächlich Zersetzungsprodukte. Die Acetylgruppe bietet neben der zwingend geforderten Bedingung der Nachbargruppenaktivität die Vorteile der einfachen Einführ- und Abspaltbarkeit. Die nächste Stufe besteht in der Einführung der Cyanogruppe in die anomere Position der Galactose durch Umsetzung der Pentaacetylgalactose **6** mit Trimethylsilylcyanid unter lewissaurem Katalyse nach einer modifizierten Vorschrift, basierend auf den Arbeiten von Heras et al.[42] Die Umsetzung ist sehr leicht im großen Maßstab möglich und liefert normalerweise in Ausbeuten von etwa 80 % das gewünschte β -konfigurierte Substitutionsprodukt **7**. Interessanterweise verläuft die analoge Reaktion mit β -Pentaacetylglucose (der einzige Unterschied der beiden Zuckerderivate besteht in der Stereochemie an C4) nur in schlechten Ausbeuten und unter hauptsächlichlicher Bildung des Cyanethylen-derivates.[31,43] Dieses überraschende Verhalten kann durch die Auswirkung des *gauche*-Effekts plausibel gemacht werden (Abb. 3.5).[44-49]

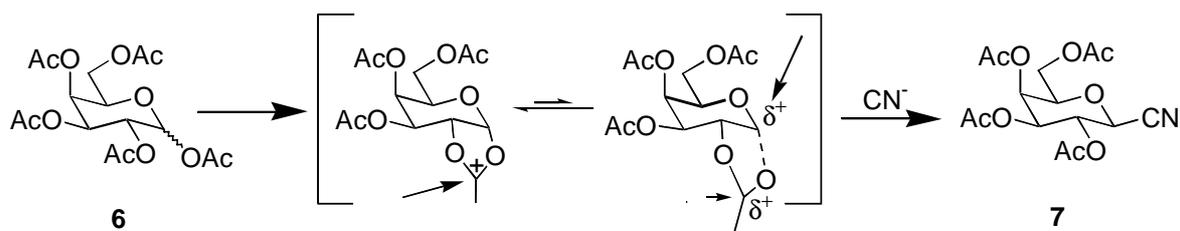


Abb. 3.5: Der überraschende Reaktivitätsunterschied der Pentaacetylglucose und – galactose kann durch die Berücksichtigung des gauche-Effekts plausibel gemacht werden. Hierbei wird angenommen, daß durch Wechselwirkungen vom Typ $H-C-C-OR \leftrightarrow H^+ C=C^-OR$ die Nucleophilie des endocyclischen Sauerstoffatoms des Galaktosepyranoseringes erhöht wird. Daraus resultiert, daß die positive Ladung des Acetoxoniumions in höherem Umfang am anomeren Zentrum stabilisiert wird, wodurch wiederum der nucleophile Angriff des Cyanid-Anions an dieser Position bevorzugt stattfindet.

Die Reaktionssequenz zur Einführung der geschützten Aminomethylengruppe am anomeren Zentrum der Galactose wird durch die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid abgeschlossen, wobei es simultan zur Entfernung der Acetylenschutzgruppen kommt.[50] Die Blockierung der entstandenen Aminogruppe erfolgt ohne weitere Aufreinigung desamins mit der sehr robusten Z-Schutzgruppe.

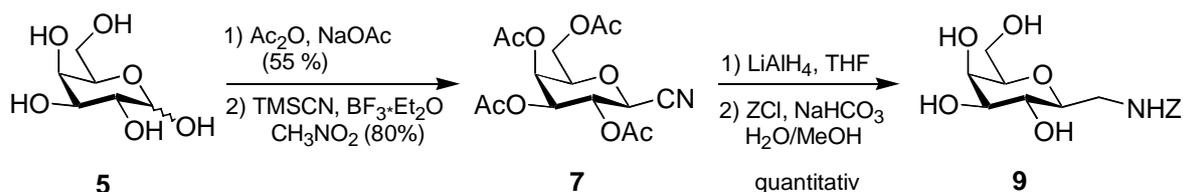


Abb. 3.6: Reaktionssequenz zur Einführung der Aminomethylengruppe am anomeren Zentrum der Galactose.

Der ursprünglich geplante Weg über die Nitrozuckeroute stellt theoretisch zwar durchaus eine vernünftige Alternative dar, [51] scheitert aber in der Praxis an der schwierigen Durchführung und den schlechten Ausbeuten bei der Herstellung des Galactosylnitromethans **10**, was diese Reaktionsfolge als Startsequenz einer vielstufigen Synthese ungeeignet macht.

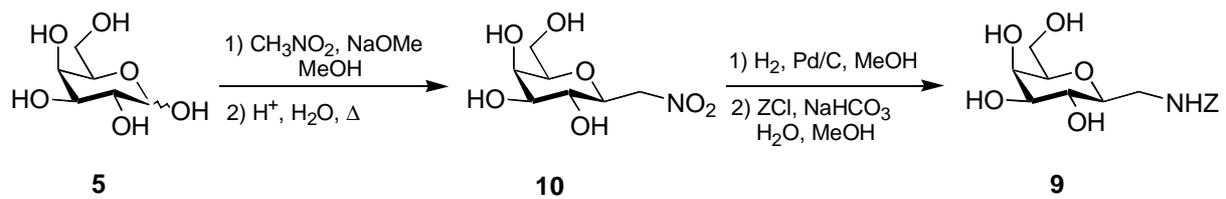


Abb. 3.7: Die Nitrozuckerroute als Alternative zur Einführung der Aminomethyleinheit am anomeren Zentrum.

Das nächste strategische Ziel der Synthese stellt die Einführung der Aminogruppe an der C4-Position des Zuckergerüsts dar. Da dabei die axiale Hydroxylgruppe an C4 selektiv angesprochen werden muss, ist eine Schutzgruppenstrategie zur Differenzierung der vier verschiedenen OH-Gruppen (drei sekundäre und eine primäre) zwingend erforderlich.[40]

Am Beginn der Sequenz steht die Selektion der axialen Hydroxylgruppe gegenüber den äquatorialen in 2- und 3-Position durch Umsetzung des *Z*-geschützten Galactosylmethylamins **9** mit Benzaldehyddimethylacetal unter Säurekatalyse. Das dabei bevorzugt entstehende 4,6-Benzylidenacetal **11** kann chromatographisch aus der, aufgrund der Bildung zahlreicher isomerer Verbindungen komplexen, Reaktionsmischung isoliert werden. Die Ausbeute liegt mit 60 % im Rahmen der bei Galactosederivaten üblicherweise erreichbaren Größenordnung. Die in den Nebenreaktionen entstanden isomeren Benzylidenacetale können durch schonende Acetalspaltung fast quantitativ zum Edukt **9** rückgeführt werden. Durch die nachfolgende Acetylierung der noch freien Hydroxylgruppen und die im Anschluss durchgeführte Debenzyldienierung wird die Differenzierung der sekundären OH-Funktionen abgeschlossen. Die anschließende Tritylierung, die wegen des extremen sterischen Anspruchs der Triphenylmethylgruppierung nur an der 6-Position stattfinden kann, lässt als einzige unblockierte Hydroxylfunktion diejenige an C4 frei.

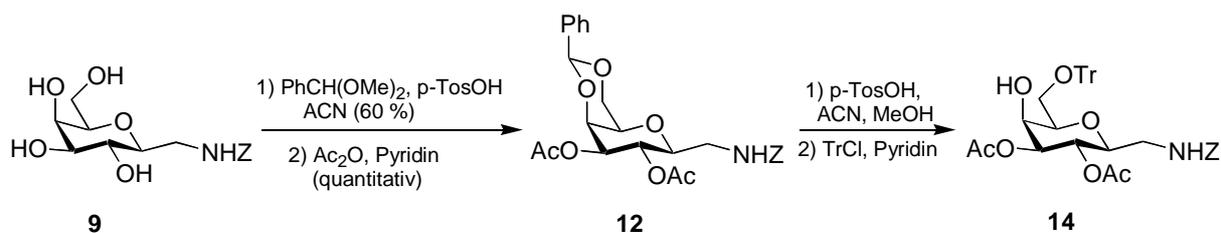


Abb. 3.8: Schutzgruppenoperationen zur Differenzierung der Hydroxylgruppen.

Die zwangsläufig mäßige Ausbeute bei der Einführung der 4,6-Benzylidengruppe gab Anlaß zu dem Versuch, diesen Schritt an den Anfang der Synthese zu stellen, d. h. die Reaktionssequenzen zur Installation der anomeren Aminomethylfunktion und der Differenzierung der sekundären Hydroxylgruppen zu vertauschen. Es zeigte sich aber, daß das Benzylidenacetal **16** unter den lewissauren Bedingungen, die zur Synthese des anomeren Nitrils nötig sind, nicht stabil ist. Weitere Versuche mit der Ethylidenschutzgruppe, die gegen milde Lewissäuren stabil sein sollte, blieben ebenfalls ohne Erfolg (Abb. 3.9).

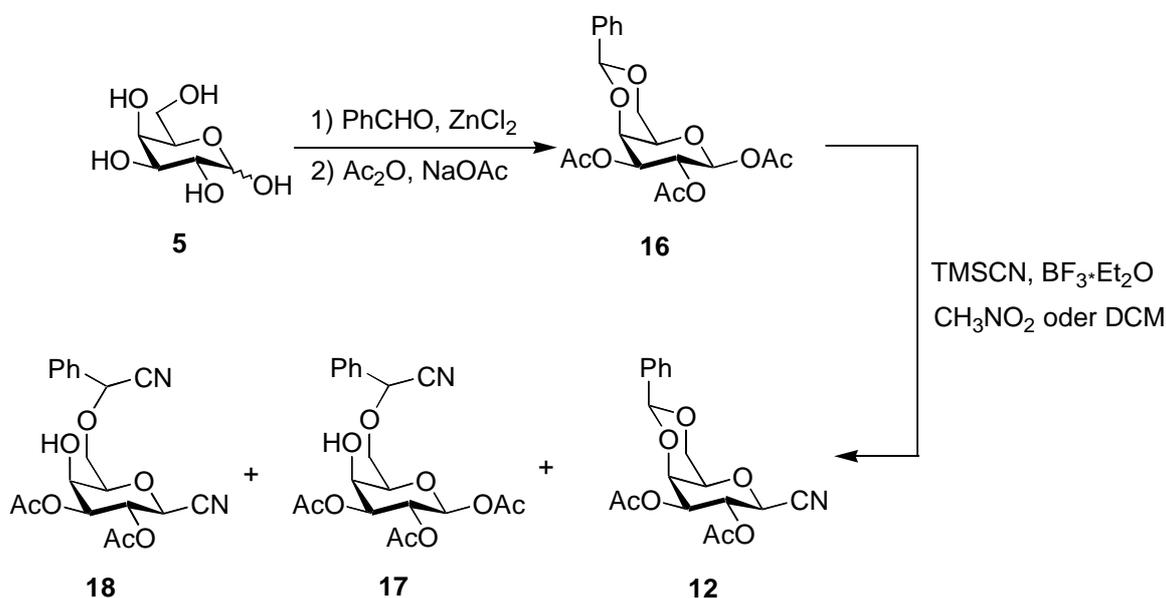


Abb. 3.9: Der Versuch der Vertauschung der Reaktionssequenzen zur Einführung der anomeren Aminomethyleneinheit und der Differenzierung der sekundären Hydroxylgruppen führt fast ausschliesslich zu unerwünschten Nebenprodukten.

Nach diesen relativ aufwendigen Schutzgruppenoperationen sind die Voraussetzungen für die Einführung der Aminogruppe an der Position der einzig ansprechbaren

Hydroxylgruppe geschaffen. Dazu wurde ein in der Saccharidchemie gebräuchliches Protokoll gewählt, nämlich die Überführung der OH-Funktion in eine Abgangsgruppe mittels Trifluormethansulfonsäureanhydrid und anschließender Substitution unter S_N2 -Bedingungen gegen die Azidgruppe.[52] Als vorteilhaft erweist sich der Umstand, daß solche Reaktionen an Galactosederivaten aufgrund der axialen Stellung der Abgangsgruppe bevorzugt ablaufen. Der S_N1 -Mechanismus, der bei Substitutionen an sekundären Zentren normalerweise zumindest in Konkurrenz steht, ist in Sacchariden durch die Carbeniumionen destabilisierenden, elektronenziehenden Sauerstoffsubstituenten energetisch stark benachteiligt.[40]

Überraschenderweise erwiesen sich die der Einführung der Azidogruppe folgenden Schritte, nämlich die Reduktion des Azids **20** und der anschließende Schutz der entstandenen Aminofunktion mit der Boc-Gruppe, als die problematischsten der ganzen Synthese. Die Hauptschwierigkeit dabei lag in der Notwendigkeit, die Azidreduktion unter Erhalt der anderen beiden reduktionsempfindlichen Funktionalitäten (Trityl und Benzyloxycarbonyl) umzusetzen. Es mußte einerseits die Differenzierung der beiden Aminogruppen erhalten werden, andererseits galt es, einen zu starken hydrophilen Charakter und die damit meist verbundenen Probleme bei der Reinigung zu vermeiden. Die ursprünglich geplante Reduktion der Azidfunktionalität mit Hilfe von Propandithiol [53] (wobei weder die Benzyloxycarbonyl- noch die Tritylgruppe gefährdet wären) erwies sich als nicht praktikabel, da selbst nach zehn Tagen Reaktionszeit und erhöhten Temperaturen lediglich ein Umsatz von ca. 30 % festgestellt werden konnte. Deshalb wurden mehrere andere Methoden zur Azidreduktion untersucht, vor allem dann, wenn sie aus Gesichtspunkten der Chemoselektivität geeignet erschienen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst

Methode	Grund des Scheiterns
Propandithiol, TEA, MeOH[51]	Langsame, unvollständige Reaktion
Acetylaceton[52]	Keine Reaktion
PPh_3 /THF/ H_2O (ohne Acetylsplaltung) [53, 54]	O,N-Acetylwanderung

$\text{PPh}_3/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ [55]	Aziridinbildung
NaBH_4 [56-58]	Zersetzung
Raney-Nickel, H_2 [59-61]	Zu geringe Chemoselektivität
NaBH_4 , NiCl_2 , EtOH [60, 62]	Zersetzung
TMSCl , NaI , ACN [63]	Verlust der Tritylgruppe
$\text{NaBH}_4/\text{B}(\text{OH})_3/\text{NiCl}_2$ [64] (Charlie Brown Reduktion)	Langsame Reaktion Zu geringe Chemoselektivität
SnCl_2 , Boc_2O , TEA , MeOH [65, 66]	Laut DC vollständige Umsetzung, aber weder Isolierung noch weitere Umsetzung möglich
H_2 , Pd/C [67]	Keine Chemoselektivität
NaBH_4 , Pd/C [68]	Zersetzung
HSnBu_3 , Benzol, 80°C [69]	Zersetzung
Zn , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, THF [70]	Keine Reaktion
Et_3SiH , Boc_2O , $\text{Pd}(\text{OH})_2$, EtOH [71]	Keine Reaktion
DIBAL, THF	Keine Reaktion
LiAlH_4 , THF	Schlechte Ausbeute, schwierige Reinigung

Tabelle 3.1: Versuchte Methoden der Azidreduktion und Gründe ihres Scheiterns (mit Ausnahme der ersten Staudinger-Reaktion (3. Eintrag) wurden alle Ansätze nach vorheriger Abspaltung der beiden Acetylgruppen in Stellung 2 und 3 des Pyranoserings durchgeführt).

Als einzige der konventionellen Methoden zur Azidreduktion erwies sich die Behandlung mit Lithiumaluminiumhydrid als, zumindest bedingt, erfolgreich. Diese Reaktion unterliegt allerdings den erheblichen praktischen Einschränkungen der aufwendigen chromatographischen Abtrennung des Bisbocderivates sowie der unbefriedigenden Ausbeute nach Einführung der Boc-Schutzgruppe von 43 % (trotz ihrer Robustheit ist die Z-Schutzgruppe nicht vollkommen inert gegen LiAlH_4 ; aus diesem Grund entsteht in der nachfolgenden Umsetzung das zwei Boc-Gruppen

tragende Derivat). Deshalb wurde, nach der Abspaltung der Acetylgruppen (zur Verhinderung einer O,N-Acylwanderung), auf die exotisch anmutende, von Vilarrasa beschriebene, Reduktion mit Benzolselenol[54] zurückgegriffen, die als einzige der getesteten Methoden mit sehr guten Ausbeuten bei gleichzeitigem vollständigem Erhalt der anderen Schutzgruppen verlief.[55]

Unerwartet problematisch gestaltete sich ebenfalls die nachfolgende Einführung der Boc-Gruppe an die neu gebildete Aminofunktion in **22**. Mit dem normalerweise gebräuchlichen Reagens Boc-Anhydrid konnte auch unter verschärften Bedingungen keine Reaktion beobachtet werden (die Umsetzung in Pyridin unter Mitwirkung des Acylierungskatalysators DMAP führt zur simultanen Reaktion an der Z-geschützten Aminofunktion). Erfolg brachte erst der Einsatz des alternativ zu verwendenden *tert*-Butyloxycarbonylsuccinimid, allerdings erst nach Erhitzen der Reaktionsmischung und erheblich verlängerten Reaktionszeiten. Die überraschend geringe Tendenz der Aminogruppe sogar unter verschärften Standardbedingungen zu reagieren, wird durch Beobachtungen bestätigt, wonach in allen Glucosederivaten die Hydroxylgruppe in Position 4 diejenige mit der niedrigsten Nucleophilie ist.[40,56] Trotz der anfänglichen Schwierigkeit bei diesen zwei konsekutiven Umsetzungen überhaupt eine Reaktion zu beobachten, konnte die Sequenz – Acetylsplaltung, Azidreduktion und Einführung der Boc-Schutzgruppe – nach der Optimierung mit einer Ausbeute von über 90 % realisiert werden (Abb. 3.10).

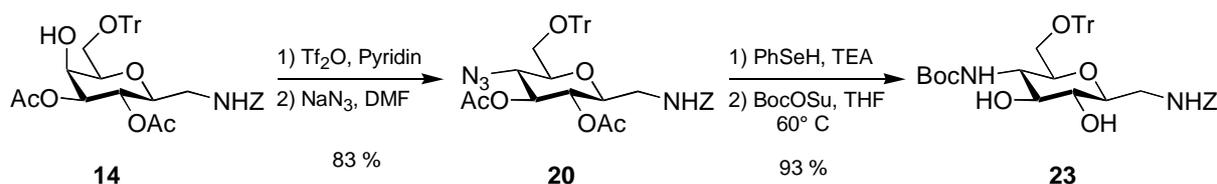


Abb. 3.10: Reaktionsfolge zur Etablierung der geschützten Aminogruppe in 4-Position der Pyranoseringes.

Die letzten Schritte der Synthese bargen, nachdem es sich lediglich um unter Standardbedingungen verlaufende Schutzgruppenoperationen handelte, nur noch geringe Schwierigkeiten. Sowohl die hydrogenolytische Spaltung der Benzoyloxycarbonylgruppe als auch die Einführung der Fmoc-Gruppe verliefen nach

Optimierung problemlos und mit Ausbeuten >95 %. Die Detritylierung erfolgte, nachdem Versuche mit lewissauren Metallsalzen erhebliche Mengen an Nebenprodukten mit sich brachten,[57] durch Umsetzung mit 2% TFA in Methylenechlorid (Triethylsilan und Methanol als *scavenger*). Ähnlich zuverlässig und mit der erwarteten Ausbeute von 65-70% verlief auch die abschließende TEMPO-Oxidation zum Zuckerderivat **27**. [39]

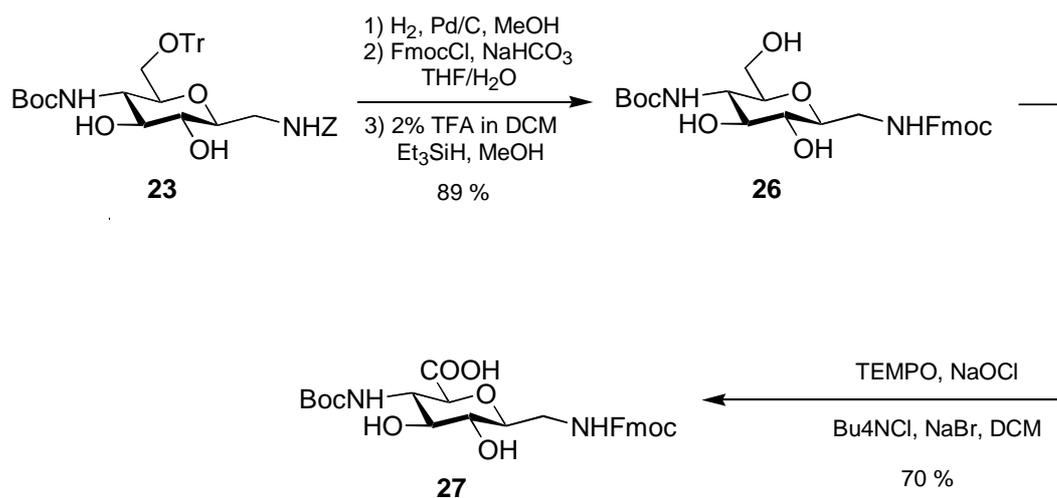


Abb. 3.11: Abschließende Schritte der Synthese von Fmoc-SAA2(4NBoc)-OH **27**.

Der somit hergestellte allgemeine Zugang zur 4-aminofunktionalisierten SAA2 **27** ist noch nicht der Endpunkt der vorgestellten Synthese. Für das Ziel – die Mimifizierung einer Phenylalaninseitenkette der durch die Zuckeraminosäure ersetzten Dipeptid-einheit des anvisierten Cyclopeptides – sollte Position 4 durch die Einführung einer aromatischen Funktionalität modifiziert werden. Die dazu nötige Freisetzung der Aminogruppe durch Boc-Abspaltung zu **28** verläuft in der erwarteten Effektivität. Probleme ergeben sich erst im folgenden Schritt insbesondere aus den folgenden Gründen: einerseits sind mit der Aminogruppe, den beiden sekundären Hydroxyl-funktionalitäten und der Carbonsäure im Molekül drei Funktionen vorhanden, die unter basischen Bedingungen (die zur Deprotonierung der bei der sauren Abspaltung der Boc-Gruppe entstehenden Ammoniumfunktion nötig sind) reaktiv sind. Andererseits weist die 4-Aminogruppe eine vergleichsweise geringe Reaktivität auf, was die normalerweise völlig unkomplizierte Selektion problematisch macht.

Weiterhin ist im Molekül die gegenüber basischen Bedingungen labile Fmoc-Gruppe vorhanden.

Zur Lösung des Problems wurden verschiedene Möglichkeiten erprobt. Die von Seebach et al. vorgestellte Monobenzilylierung sterisch gehinderter Amine mit Benzylbromid/Natriumhydrogencarbonat in DMF bei 50° C scheiterte, obwohl massenspektroskopisch eine Umsetzung zum gewünschten Produkt festgestellt werden konnte, an der zu starken Bildung mehrfach benzylierter Nebenprodukte. Die Umsetzung desamins mit Benzylbromid in Methanol in Anwesenheit von DIPEA wurde aus dem gleichen Grund verworfen. Als letztendlich erfolgreichste Methode erwies sich die Sequenz der reduktiven Aminierung, bei der zuerst durch Zugabe von Benzaldehyd zuerst das Imin gebildet wurde, das anschließend mit Natriumcyanoborhydrid zum sekundären Amin **29** reduziert wurde (Abb. 3.12).[58]

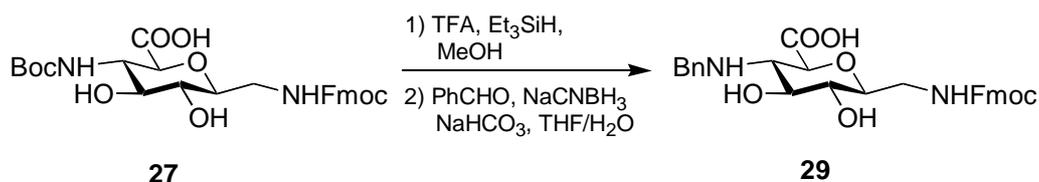


Abb. 3.12: Abschließende Schritte der Synthese von *FmocSAA2(4NBn)OH* **29**.

3.1.2 β -SAA2-2N

Der ursprünglich geplante Syntheseweg orientierte sich in weiten Teilen an einer von Wang et al. publizierten Vorschrift.[59] Dabei wird ausgehend von Glucosaminhydrochlorid **30** nach Einführung der Phthalimidogruppe, simultaner Acetylierung und der Installation der Cyanogruppe an der anomeren Position das gewünschte Grundgerüst **31** erreicht (Abb. 3.13). Die Durchführung dieser Sequenz scheiterte in der Praxis aus ungeklärten Gründen an den nachfolgenden Schritten (unabhängig von der Anwesenheit der Acetylgruppen), der Hydrierung der anomeren Cyanidfunktion und der Einführung der Schutzgruppe an der neu entstandenen Aminogruppe zu **32**. Der Versuch vor der Reduktion den Phthalimidschutz zu entfernen, scheiterte ebenfalls und zwar aufgrund der mangelnden Stabilität der anomeren Cyanidfunktion

gegenüber den Entschützungsbedingungen.[60] Die Maskierung des Nitrils als Tetrazol **33** ermöglichte zwar die Spaltung des Phthalimids und den Schutz der freigesetzten Aminogruppe, scheiterte aber an den sehr drastischen Bedingungen, die die Reduktion der Tetrazolfunktion erfordert (mehrere Stunden Erhitzen unter Rückfluss in Anwesenheit eines Überschusses von Lithiumhydrid[61]).

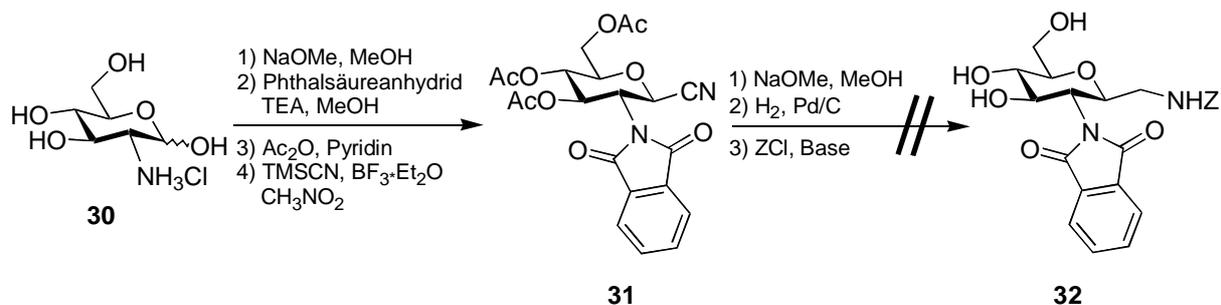


Abb. 3.13: Versuchter Alternativweg nach Wang et al.[59]

Der Versuch die Nitrilfunktion unter Verzicht einer Aminoschutzgruppe durch Umsetzung des 3,4,6-Tri-*O*-Acetylglucosaminbromids **34** mit verschiedenen Cyanidsalzen[62] führte ausschließlich zur Zersetzung des Eduktes.

Um die in 1,3-Stellung befindlichen Aminogruppen in das Zuckergerüst einzuführen, wurde noch ein weiterer Weg getestet, und zwar die 1,3-dipolare Cycloaddition eines Diazomethanderivates[63] an ein entsprechend geschütztes Glucalderivat **35**. Obwohl durch die anhand von analogen Substraten abgeschätzten Orbitalkoeffizienten die richtige Orientierung einer eventuellen Reaktion angezeigt wurde,[64] konnte in verschiedenen Experimenten (Kombination verschiedener Zuckerschutzgruppen und 1,3-Dipole) keine Umsetzung beobachtet werden (Abb. 3.14). Auch die Verwendung des benzylgeschützten Glucals (*armed* Zuckerderivat) führte nicht zum Erfolg.

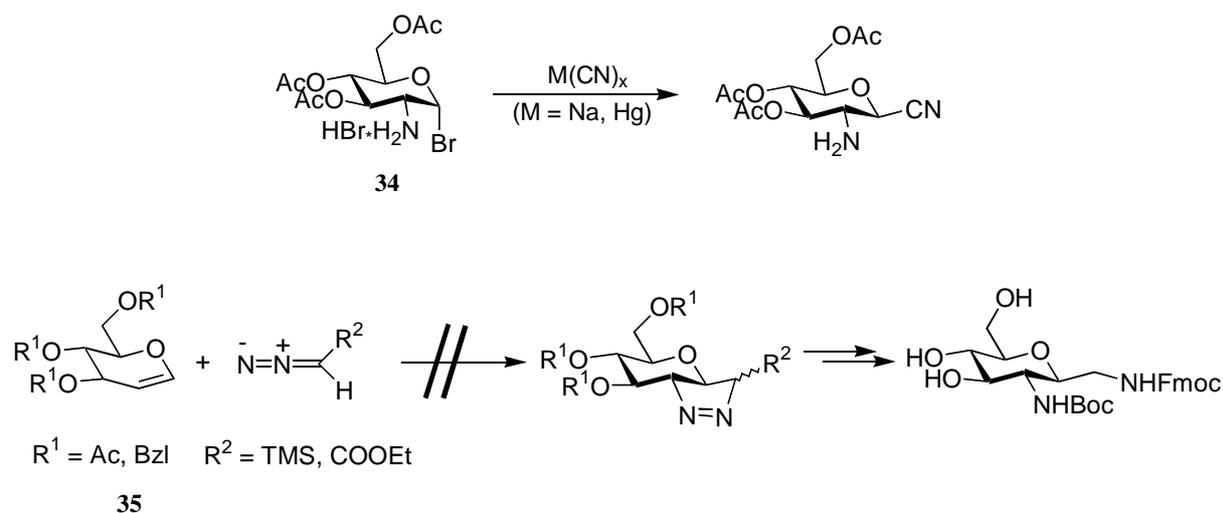


Abb. 3.14: Verschiedene nicht zum Erfolg führende Syntheserouten.

Aufgrund der Erfolglosigkeit der untersuchten Routen wurde eine Modifikation der ursprünglichen Herstellungsweise von SAA2 in Betracht gezogen. Obwohl die Möglichkeit der Einführung der Aminomethylengruppe über eine Nitroaldolreaktion an ungeschützten Zuckerderivaten wegen der schlechten Ausbeuten und des hohen Arbeitsaufwandes vom synthetischen Standpunkt aus eher als minderwertig zu betrachten ist, liefert sie den einzig zuverlässigen gefundenen Zugang zur gewünschten Zielstruktur. Als vorteilhaft gegenüber der schon diskutierten Synthese von SAA2-4N erweist sich der Umstand, dass die Nitroaldolreaktion mit N-Acetylglucosamin **36** aus der Literatur bekannt ist und deswegen auf die arbeitsintensive Einführung der Aminogruppe verzichtet werden kann.[65]

Ausgehend von D-Glucosaminhydrochlorid **30** kann nach N-Acetylierung zu **36**, Darstellung des Nitrozuckers **37** und nachfolgender Hydrierung die Methylaminofunktion unter Bildung eines Anomerengemisches **38** eingeführt werden. Versuche diese Reaktionssequenz ohne den Acetylschutz der 2-Aminofunktion durchzuführen, schlugen fehl. Der folgende Schutz der neu gebildeten Aminogruppe mit der wiederum aufgrund ihrer Robustheit gewählten Benzyloxycarbonylschutzgruppe zu **39** komplettiert die Startsequenz (Abb. 3.15).

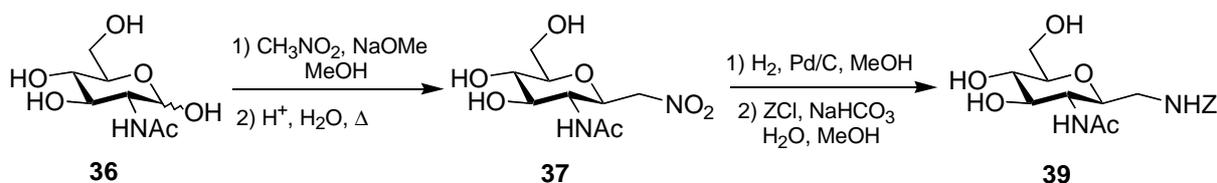


Abb. 3.15: Startsequenz zur Einführung der geschützten Aminomethylenfunktion in *N*-Acetylglucosamin **36**.

Als gewichtiges Problem erwies sich die Entfernung der Acetylgruppe. Sowohl die saure als auch die basische Hydrolyse schlugen fehl (unabhängig von der Anwesenheit der Z-Gruppe), teils aufgrund von Zersetzung, teils aus unbekanntem Gründen. Einen interessanten Ausweg bot in diesem Zusammenhang eine Veröffentlichung von Burk et al. [66]. Dabei wird die relative Instabilität tertiärer Amide in Gegenwart von Basen ausgenutzt. Nach der erschöpfenden Einführung der Boc-Gruppe durch Umsetzung mit Bocanhydrid und Dimethylaminopyridin in siedendem Tetrahydrofuran (wobei neben beiden geschützten Aminogruppen auch alle Hydroxylfunktionen umgesetzt werden) kann mit Natriumhydroxid die *N*-Acetylfunktion mit verhältnismässig hoher Chemoselektivität abgespalten werden. Bemerkenswert hierbei ist die sehr viel höhere Tendenz der β -Verbindung diese Reaktion einzugehen, die wohl auf die geringere sterische Hinderung zurückzuführen ist.

Die Sequenz zur Differenzierung der Aminogruppen wird durch die Abspaltung der Boc-Gruppe an der Aminomethyleinheit des anomeren Zentrums unter Bildung von **42** komplettiert. Da sich die beiden Boc-Funktionen bezüglich ihrer Reaktivität nur graduell unterscheiden, wurde dazu auf die sehr milde, wenn auch zeitaufwendige Umsetzung mit Magnesiumperchlorat zurückgegriffen.[67]

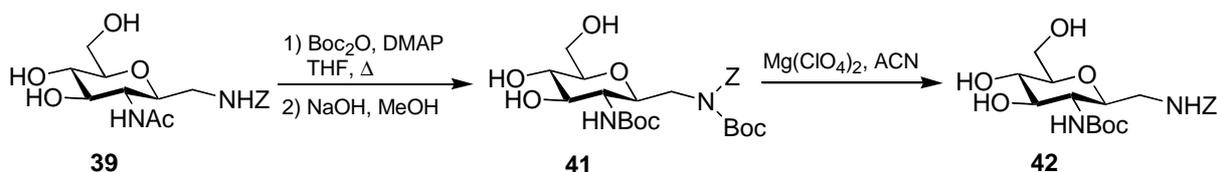


Abb. 3.16: Differenzierung der Aminogruppen.

Die folgenden Umsetzungen – die Komplettierung der Synthese der Boc/Fmoc-geschützten Zuckeraminosäure **45** – erfolgten wie erwartet durch Anwendung von Standardprotokollen und in den entsprechenden Ausbeuten. Sowohl die hydrogenolytische Abspaltung der Z- als auch die Einführung der Fmoc-Gruppe zu **44** unter Standardbedingungen verlaufen quantitativ. Die TEMPO-Oxidation vollzieht sich im Bereich der erwarteten Ausbeuten (Abb. 3.17).[39]

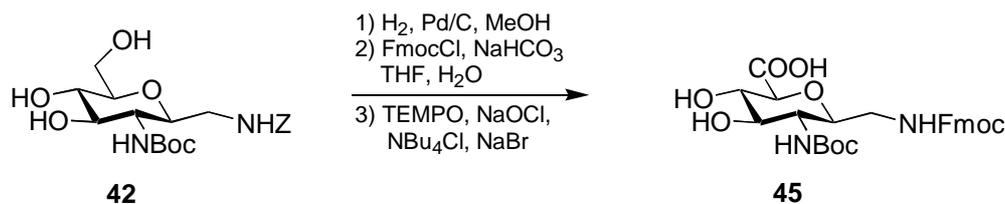


Abb. 3.17: Komplettierung der Synthese von *Fmoc-SAA2(2N-Boc)-OH* **45**.

Die analog zur Synthese von β -SAA2-4N durchgeführte Einführung der Benzylgruppe an die Stelle der Boc-Gruppe erfolgte wie oben beschrieben durch die Umsetzung mit Trifluoressigsäure gefolgt von der reduktiven Aminierung zu **47**, die schon bei der Herstellung von *Fmoc-SAA2(4NBn)-OH* **29** beschrieben wurde. Überraschenderweise wurde in diesem Fall aber das verstärkte Auftreten einer Nebenreaktion, unter Bildung eines N,O-bisbenzylierten Produktes **48** (Nachweis durch massenspektroskopische Fragmentierungsversuche), beobachtet. Der vorgeschlagene Mechanismus macht das Auftreten des beobachteten zweifach benzylierten Nebenproduktes plausibel (Abb. 3.18). Der Versuch das Substanzgemisch durch die selektive hydrogenolytische Spaltung des Benzylethers in die Zielverbindung zu überführen scheiterte, da überraschenderweise unter den getesteten Bedingungen auch die an das Amin gebundene Benzylgruppe abgespalten wurde.

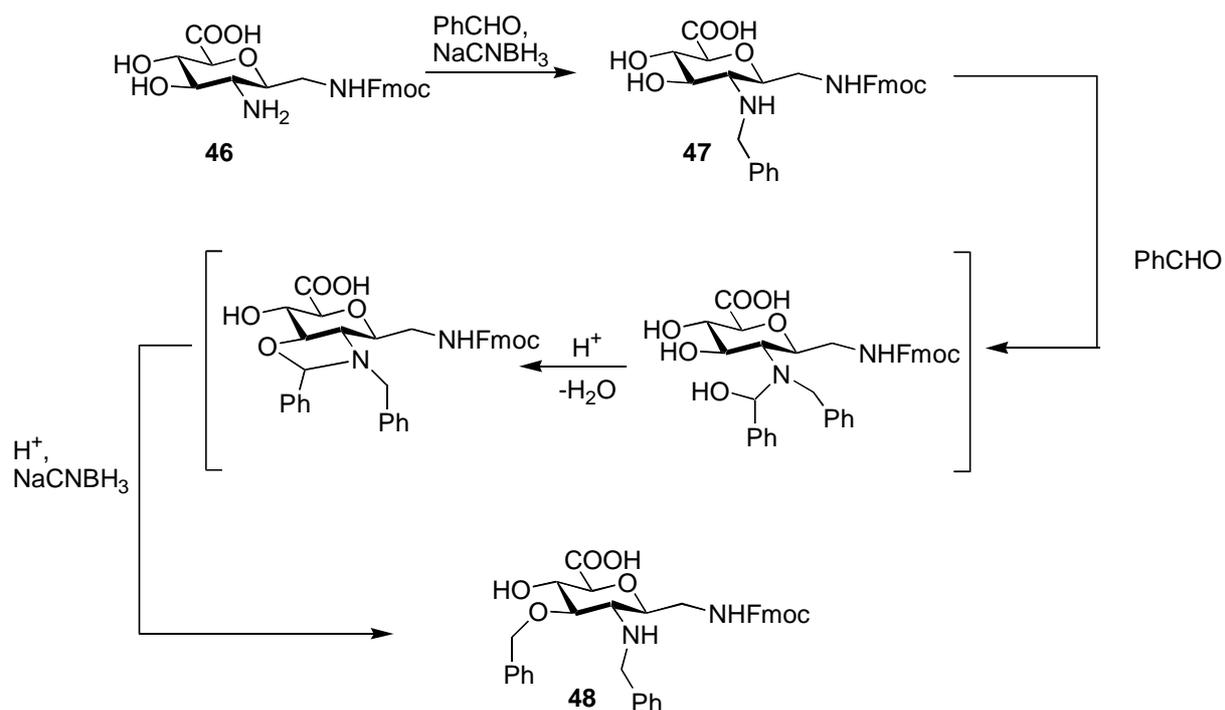


Abb. 3.18: Vermutlicher Mechanismus der Bildung des bis-benzylierten Nebenproduktes (die sauren Bedingungen entstehen während der Aufarbeitung). Auf den Nachweis, daß es sich bei dem gebildeten O-benzylierten Nebenprodukt wirklich um den 3-O-benzylierten Zucker **48** handelt, wurde aufgrund der geringen Substanzmengen und Separationsprobleme verzichtet.

3.2 Synthese der Derivate von SAA2-gal

3.2.1 SAA2-gal

Da sich aus dem Verlauf der Herstellung von β -SAA2-4N eine einfache und effektive Möglichkeit zur Herstellung ergab und die Gelegenheit zur Ergänzung des Baukastens der Zuckeraminosäuren (Abb. 2.3) genutzt werden sollte, wurde sowohl die Fmoc- als auch die Boc-geschützte Form von SAA2-gal synthetisiert.

SAA2-gal ist schon seit 1975 durch Lehmann et al. literaturbekannt.[68] Die beschriebene Darstellungsmethode ist allerdings aus heutiger Sicht umständlich und erbringt schlechte Ausbeuten.

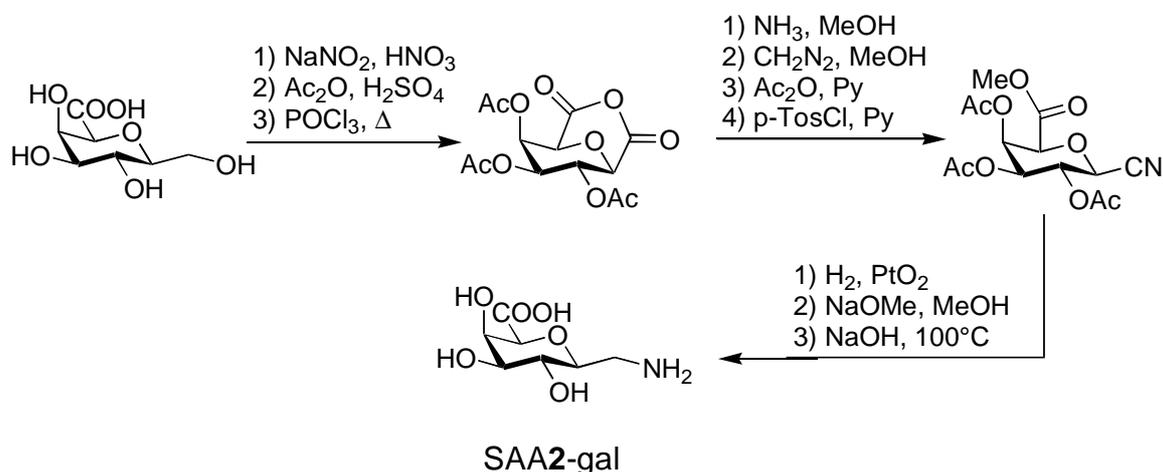


Abb. 3.19: Von Fuchs und Lehmann publizierter Syntheseweg zu SAA2-gal. [68]

Die ersten drei Schritte (zu **8**) der in dieser Arbeit durchgeführten fünfstufigen Synthese sind direkt aus der Darstellung von β -SAA2-4N entnommen, die folgenden – Einführung der Fmoc- bzw. Boc-Schutzgruppe und die abschliessende TEMPO-Oxidation (**51** und **52**) – verlaufen mit der erwarteten Zuverlässigkeit (Abb. 3.20). Probleme ergeben sich lediglich bei der Reinigung der Boc-geschützten Zuckeraminosäure **51**, da der stark überwiegende hydrophile Charakter der Verbindung die Reinigung stark erschwert.

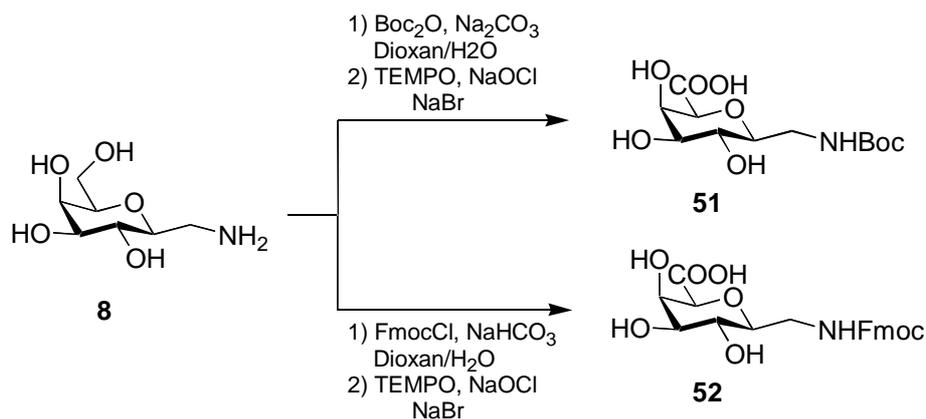


Abb. 3.20: Darstellung der Boc- (**51**) und Fmoc-geschützten (**52**) Derivate von SAA2-gal.

SAA2-gal stellt somit das bei weitem am einfachsten zugängliche, bekannte SAA2-Derivat dar.

3.2.2 Benzylgeschützte SAA2-gal

Die Synthese der benzylgeschützten SAA2-gal orientiert sich über weite Strecken an der von E. Lohof vorgestellten Darstellungsmethode für Fmoc-SAA2(Bn)₃OH.

Ausgehend von β -D-Pentaacetylgalactose[41] **6** konnte durch die lewissauer katalysierte Einführung der Ethylthiogruppierung und Acetylsplaltung unter Zemplen-Bedingungen[69] (katalytische Mengen Natriummethylat in absolutem Methanol) das am anomeren Zentrum thiogeschützte Zuckerderivat in fast quantitativer Ausbeute erhalten werden.[70] Nach der selektiven Blockierung der primären Hydroxylfunktion an Position 6 durch Tritylierung (**54**) wurde das benzylgeschützte Galactosederivat durch Reaktion mit Natriumhydrid und Benzylbromid in DMF und der nachfolgenden Detritylierung in 52 % Ausbeute isoliert. Die unerwartet schlechte Ausbeute dieser Reaktionssequenz wurde in erster Linie den Ausbeuteverlusten, die durch die bekannten *tailing*-Effekte benzylgeschützter Zuckerderivate bei chromatographischen Trennungen, zugeschrieben. Die nun freie Hydroxylgruppe wurde durch Acetylierung blockiert (**57**, Abb. 3.21).

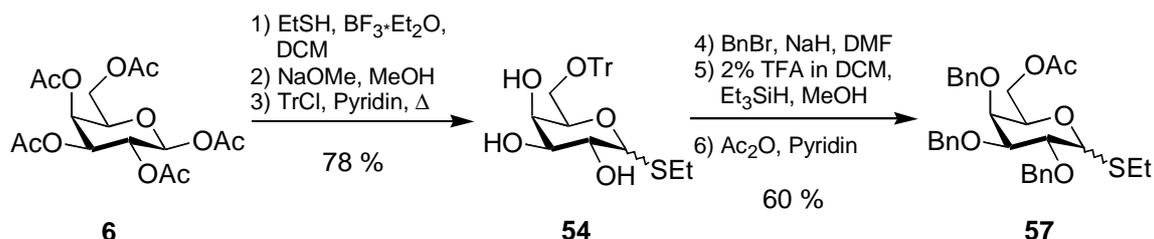


Abb. 3.21: Synthese des Ethyl-6-O-Acetyl-2,3,4-tri-O-benzyl-1-thio-galactopyranosids **57**.

Basierend auf den Vorarbeiten von E. Lohof war bekannt,[31] daß die Einführung der Cyanogruppierung am anomeren Zentrum durch Aktivierung der Ethylthiogruppe, den Schlüsselschritt der Synthese darstellt. Die von Igarashi vorgestellte Methode der direkten Konversion durch Aktivierung mit Trifluormethansulfonsäuremethylester in Gegenwart von Trimethylsilylcyanid ergab allerdings nur unbefriedigende Ausbeuten (20-30% des Anomerengemisches) von **59**. [71] Auch die Verlängerung der Reaktionszeit führte nicht zur Bildung größerer Produktmengen sondern ausschließlich zur Zersetzung des Edukts. Deshalb wurde der Umweg der Herstellung des Galactosylfluorides **58** und dessen Umsetzung unter mild lewissaurem Katalyse mit Trimethylsilylcyanid gewählt, da einerseits die Einführung des Fluorids an die anomere Position schnell und in ausgezeichneten Ausbeuten verläuft und weiterhin Glycosylfluoride sehr einfach aktivierbar sind. [40]

Im Gegensatz zur analogen benzylierten Glucoseverbindung verläuft die Einführung der Cyanogruppe an die anomere Position der Galactose in diesem Fall sehr schnell und effektiv (Abb. 3.22). Eine Erklärung dieses Phänomens ist möglicherweise wiederum in den Auswirkungen des *gauche*-Effektes zu suchen. Es ist bekannt, daß durch die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels das Anomerenverhältnis des Produktgemisches dieser Reaktion in relativ weiten Grenzen gesteuert werden kann. [71] Deshalb wurde, um sowohl die α - als auch die β -Form der gewünschten Zuckeraminosäure herzustellen, Acetonitril als Solvens gewählt. Die im Verhältnis α/β 1:2 gebildeten Anomere **59** konnten auf dieser Stufe durch Flash-Chromatographie getrennt werden.

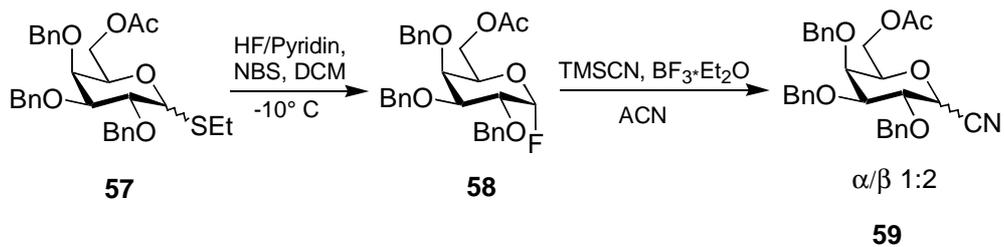


Abb. 3.22: Synthese der anomeren Nitrile **59 α** und **59 β** über das Galactosylfluorid **58**.

Die folgenden Stufen verlaufen mit bekannten und zuverlässigen Methoden. Der Reduktion der Cyanofunktion mit simultaner Acetylsplaltung folgte die Einführung der Fmoc-Gruppe an der neu geschaffenen Aminogruppe. Das Ende der Sequenz stellt die abschließende Zweiphasen-TEMPO-Oxidation dar, deren Ausbeuten mit 65-70 % im Rahmen der Erwartungen lagen (Abb. 3.23).[39]

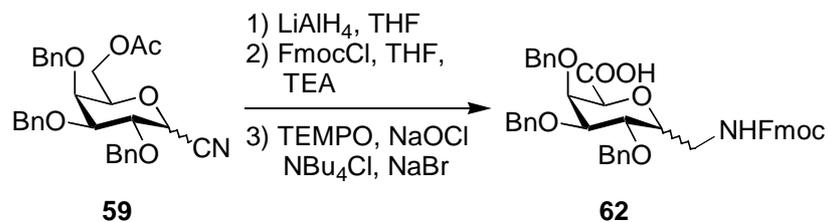


Abb. 3.23: Abschließende Schritte bei der Synthese der benzylierten SAA2-gal **62**.

4 Einbau von Zuckeraminosäuren in Peptide

Peptide und Proteine sind durch ihre vielfältigen Rollen als Hormone, Enzyme, Rezeptoren oder Inhibitoren, von zentraler Bedeutung bei nahezu allen Prozessen der Kontrolle oder Modulation von biologischen Funktionen. Der rasante Fortschritt in den Bereichen der Molekularbiologie, der Peptidsynthese, der Strukturaufklärung (NMR und Röntgenstrukturanalyse) und des *molecular modeling* hat das Verständnis der Beziehungen zwischen Peptid- und Proteinstruktur auf der einen Seite und der biologischen Funktion auf der anderen Seite dramatisch verbessert. Dieser Umstand und der Fortschritt der letzten Jahre bei der Synthese und dem *screening* großer Peptidbibliotheken hat verstärkt die Aufmerksamkeit auf kleine Peptide als wichtige Leitstrukturen für die Entwicklung potentieller therapeutischer Substanzen gelenkt. Die Probleme der metabolischen Instabilität und der schlechten oralen Bioverfügbarkeit schränken allerdings die Verwendung von Peptiden selbst zum therapeutischen Nutzen stark ein und unterstreichen die Wichtigkeit synthetischer Strategien, um die in ihrer biologischen Wirksamkeit potenten Peptide durch Peptidomimetika zu ersetzen oder anders zu modifizieren, so daß die pharmakokinetischen Nachteile der Ursprungsverbindung nicht mehr auftreten.

Ein Ansatz im Design von Peptidomimetika besteht in dem Versuch, eine biologisch relevante Konformation des jeweiligen Peptids zu bestimmen und dann ein nichtpeptidisches Gerüst zu konstruieren, das die vorher ermittelten essentiellen funktionellen Gruppen in der richtigen dreidimensionalen Orientierung präsentiert – der Synthese eines Gerüstmimetikums. Dieser Weg erfordert das Design einer völlig neuen Grundstruktur für jedes interessierende Peptid, wobei die Ursprungsverbindung ganz oder nur teilweise ersetzt werden kann (Abb. 4.1).

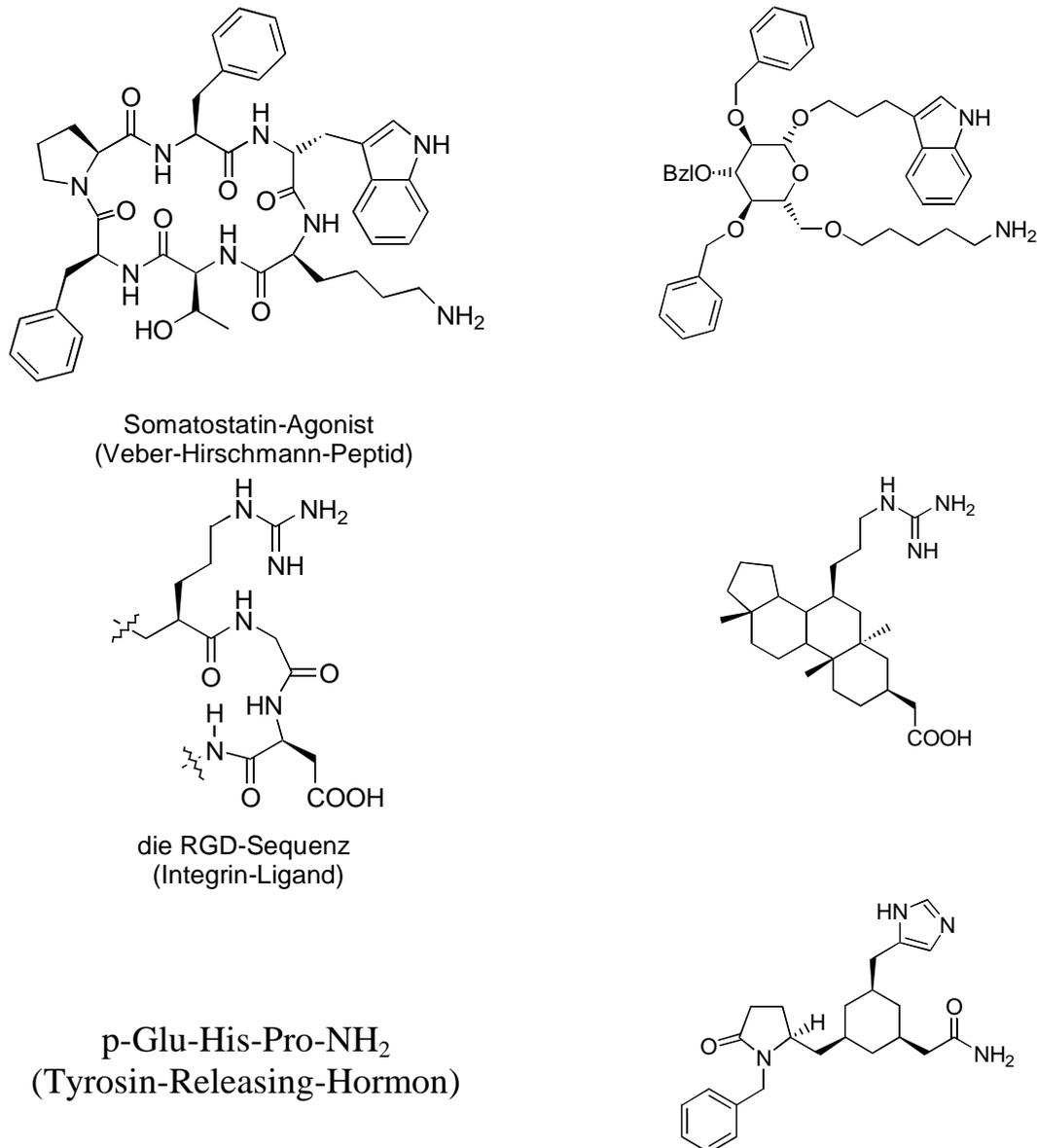


Abb. 4.1: *Verschiedene natürliche Vorbilder und dafür entworfene Gerüst-mimetika.*[72-74]

Eine andere Zielsetzung beim Design von Peptidomimetika besteht darin, durch deren Einbau die konformationelle Flexibilität der aktiven Verbindung einzuschränken und somit die bioaktive Konformation gegenüber anderen, in der Ursprungsverbindung energetisch gleichwertigen, zu favorisieren. Gelingt es beispielsweise durch optimale Einschränkung der Konformationspopulation die räumliche Orientierung des Moleküls in Richtung des spezifisch bindenden Konformeren zu beeinflussen, können auch Bindungseigenschaften wie die Selektivität zu einem bestimmten Rezeptor verbessert werden. Da offenkettige Peptide in der Regel über ein sehr hohes Maß an Flexibilität

verfügen, kann dieses Konzept allerdings nur mit von vornherein räumlich eingeschränkten Sequenzen greifen. Die Wahl der relevanten Zielstrukturen beschränkt sich daher auf relativ starre Moleküle wie z. B. Cyclopeptide. Ein Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, daß es durch Modifikation des meist nicht pharmakophoren Peptidomimetikums möglich ist andere wichtige Eigenschaften wie die Löslichkeit oder andere pharmakokinetische Parameter zu modulieren.

Zuckeraminosäuren eignen sich ideal für den Einsatz als rigidifizierende und so die aktive Konformation stabilisierende Peptidomimetika. Speziell SAA2 **63** und seine Derivate erscheinen aufgrund der räumlichen Orientierung der funktionellen Gruppen prädestiniert dazu, einen β -turn nachzubilden, wie die Arbeiten von E. Roedern zeigten.[14,15]

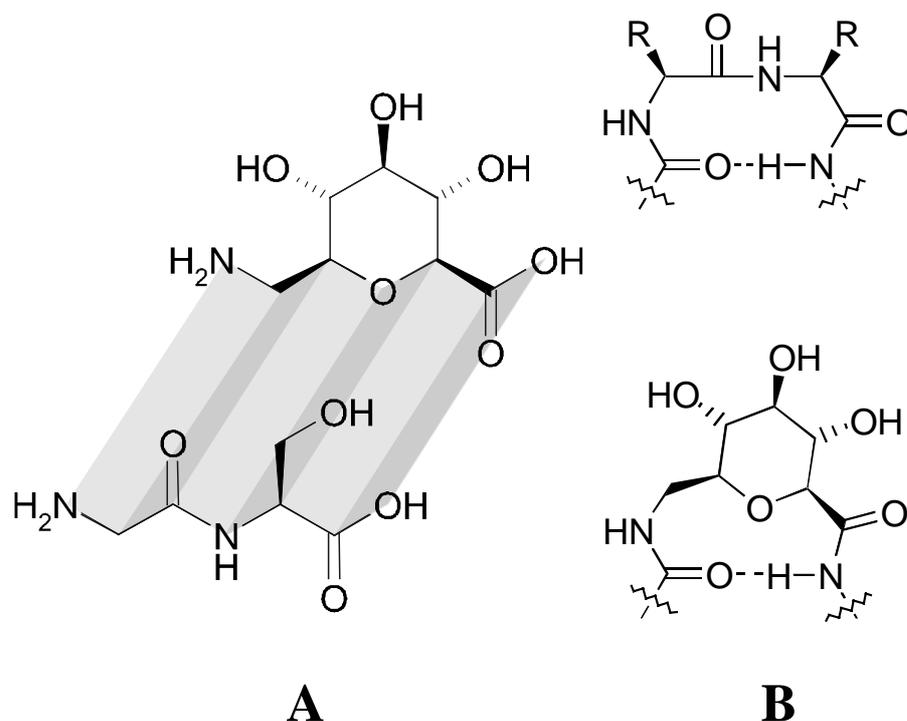


Abb. 4.2: SAA2 **63** ist ein dipeptidosteres (A) β -turn-Mimetikum (B).

Der Kohlenhydratgrundkörper weist durch die all-äquatoriale Orientierung der Substituenten, zumindest im Fall der Glucokonfiguration, eine große Starrheit auf und erschwert somit konformationelle Umwandlungen. Außerdem ist es, durch den hohen Funktionalisierungsgrad des Zuckergerüsts relativ einfach, zusätzliche Modifikationen einzuführen, um das Peptid flexibel den jeweiligen Anforderungen anpassen zu

können. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Zuckeraminosäuren SAA2-2N und SAA2-4N stellen Beispiele für diese Anpassung dar (siehe folgende Abschnitte).

Einen zweiten, von der Verwendung der SAA als *turn*-Mimetika unabhängigen, Aspekt stellt die Möglichkeit der Nachbildung von Peptid- und Proteinglykosylierungen dar. Interessant erscheint diese Modifikation peptidischer Strukturen vor allem vor dem Hintergrund der Glykosylierung als ubiquitär in Eukaryonten auftretendem Strukturmotiv. Ihre genaue biologische Funktion ist immer noch weitgehend ungeklärt, obwohl gerade diesem Gebiet in den letzten Jahren intensives wissenschaftliches Interesse zuteil wird. Verschiedene Untersuchungen deuten in diesem Zusammenhang neben der Funktion als molekulare Adresse auf eine Rolle der Saccharidstrukturen bei der Proteinfaltung hin. Ob es sich dabei um einen aktiven Einfluss des Zuckerteils auf die Faltung oder nur um eine Orientierungshilfe durch die extreme Hydrophilie der Kohlenhydrate handelt, ist unbekannt. Weiterhin wird vermutet, daß die Saccharidfunktion die biologische Halbwertszeit oder einfach nur die Hydrophilie der Peptide/Proteine erhöht. Hinweise darauf sind Effekte wie eine in vielen Fällen verbesserte Bioverfügbarkeit nach der Glykosylierung.

Vom Standpunkt der Synthese stellen zuckertragende Peptide immer noch eine gewisse Herausforderung dar. Während in früheren Arbeiten der Weg der Glykosylierung der fertigen Sequenzen beschränkt wurde (mit den Konsequenzen unselektiver Reaktionen und schlechter Ausbeuten), wird inzwischen der Einbau glycosylierter Aminosäuren zum Aufbau der Konjugate bevorzugt. Obwohl zur Synthese dieser Verbindungen in jüngerer Zeit eine Vielzahl von Zugängen gefunden wurde, bleibt deren Herstellung oft kompliziert. Weiterhin handelt es sich in den meisten Fällen um direkte Nachbildungen natürlicher Systeme mit O- (Modifizierung der Seitenketten von Ser oder Thr) oder N-glykosidischen Bindungen (Asn oder Gln) mit dem Nachteil der intrinsischen anomeren Labilität. Deshalb erscheint es vernünftig C-glykosidische Strukturen als Modellverbindungen zur Untersuchung der Peptidglykosylierung zu verwenden. Zuckeraminosäuren bieten, neben ihrer Variabilität (s. Baukasten) und der einfachen Zugänglichkeit verschiedener Modifikationsmöglichkeiten, außerdem den Vorteil, mit den normalen peptidchemischen Methoden vollständig kompatibel zu sein, so daß auf diese Weise ein einfaches, durch seine Stabilität sehr geeignetes Modellsystem der Peptidglykosylierung zur Verfügung steht.

4.1 Somatostatin-Agonisten

4.1.1 Natürliche Bedeutung und strukturelle Aspekte

Das Hormon Somatostatin **64** ist ein Cyclopeptid aus 14 Aminosäuren,[75,76] das hauptsächlich im Hypothalamus gebildet und zusammen mit seinem Vorläufer Somatostatin-28 **65** bei einer außerordentlichen Vielzahl natürlicher Prozesse des zentralen und peripheren Nervensystems, sowie der endokrinen und parakrinen Regulation eine Rolle spielt.[77] Somatostatin wirkt im Gehirn als Neurotransmitter und inhibiert unter anderem die Ausschüttung von Dopamin, Norephedrin, Insulin, Glucagon, Renin oder verschiedener Wachstumsfaktoren (IGF1, EGF, PDGF).[78-88] Darüber hinaus inhibiert es durch seinen antiproliferativen Effekt in vielen Fällen Tumorwachstum.

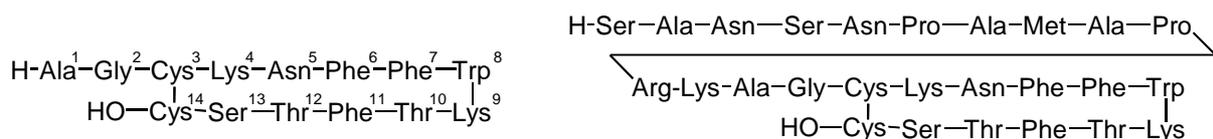


Abb. 4.3: Somatostatin 14 (**64**) und Somatostatin 28 (**65**).

Durch die Vielzahl an biologischen Vorgängen, an denen es beteiligt ist, erscheint es nicht verwunderlich, daß es mit einer Vielzahl von Rezeptorsubtypen interagieren kann. Seit der Postulierung der Rezeptorheterogenität 1984 konnte zwischen fünf Subtypen unterschieden werden.[89-92] Alle fünf sind sogenannte G-Proteingekoppelte Rezeptoren, liegen im Molmassenbereich zwischen 50 und 90 kDa und verfügen über verschiedene Effektor-Kopplungen (als *second messenger* Systeme sind unter anderem Adenylatcyclase, Ca^{2+} - und K^+ -Ionenkanäle, verschiedene Phospholipasen und Proteinphosphatasen bekannt).[86,93-96,97, Barber, 1989 #439,98] Konsequenzen für das Design biologisch aktiver Analoga ergeben sich der Korrelation hoher Subtyp-Spezifität und spezifischer physiologischer Effekte. So ist z. B. die Affinität für den SSTR2 Subtyp mit einer Inhibition der Ausschüttung des Wachstumshormon gekoppelt, genau wie die selektive SSTR5-Interaktion mit der Inhibition der Insulin-Ausschüttung korreliert. Auf dieser Basis scheint ein Potential für eine Behandlung von Tumoren zu existieren, die spezifische Somatostatin-

Rezeptorsubtypen exprimieren. Das Design nichtpeptidischer Liganden, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, verspricht außerdem neue Behandlungsmöglichkeiten für neurologische Phänomene wie der Epilepsie oder der Alzheimer-schen Krankheit.

Aufgrund der geringen Serumstabilität von Somatostatin wurden verschiedene Peptid-basierte Agonisten synthetisiert und auf ihre biologische Wirkung getestet. Aus umfangreichen Struktur-Aktivitäts-Studien unter Beibehaltung der cyclischen Natur der Peptide zeigte sich, daß der für die biologische Aktivität essentielle Teil, in dem eine β -turn ausbildende Teilsequenz Phe⁷-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰ liegt.[99-104,105]

Name	Struktur	
Somatostatin-14 (SRIF-14, SST-14)	H-Ala ¹ -Gly ² -Cys ³ -Lys ⁴ -Asn ⁵ -Phe ⁶ -Phe ⁷ -Trp ⁸ HO-Cys ¹⁴ -Ser ¹³ -Thr ¹² -Phe ¹¹ -Thr ¹⁰ -Lys ⁹	64
Somatostatin-28 (SRIF-28, SST-28)	H-Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro Arg-Lys-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp HO-Cys-Ser-Thr-Phe-Thr-Lys	65
Octreotide: (Sandostatin, SMS 201-995)	H-DPhe-Cys-Phe-DTrp Thr(ol)-Cys-Thr-Lys	66
Vapreotid (RC-160):	H-DPhe-Cys-Phe-DTrp H ₂ N-Trp-Cys-Val-Lys	67
Seglitid (MK678)	(NMe)Ala-Tyr-DTrp Phe-Val-Lys	68
Lanreotid (BIM23014)	H-D β Nal-Cys-Tyr-DTrp HO-Thr-Cys-Val-Lys	69
„Veber-Hirschmann-Peptid“	Pro-Phe-DTrp Phe-Thr-Lys	70
TT-248	H- β Asp(Ind)-Cys-Tyr-DTrp H ₂ N-Thr-Cys-Val-Lys	71
TT-232	H-DPhe-Cys-Tyr-DTrp H ₂ N-Thr-Cys-Lys	72
„Coy-Peptid“	H-DPhe-Cys-Phe-DTrp H ₂ N-Thr-Cys-Val-Lys	73

Tab. 4.1: Strukturen verschiedener Somatostatin-Analoga.

Um einerseits die β -turn-Struktur der aktiven Sequenz zu stabilisieren und andererseits enzymatische Angriffe zu erschweren, wurde bei allen aufgeführten Analoga die Stereochemie von Trp⁸ invertiert.[106,107] Überraschenderweise geht mit dieser Modifikation die Aktivität gegenüber SSTR1 fast vollständig verloren. Die erste gelungene Sequenzverkürzung gelang Veber et al. mit dem Peptid *cyclo*(-Phe-Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-) **70** (L-363,301), das ähnliche Aktivitätswerte aufweist wie Somatostatin selbst (diese Verbindung verursacht als Nebenwirkung allerdings Stearrhoe und kommt deshalb für einen klinischen Einsatz nicht in Betracht[108]).[109-111] Die Lösungsstruktur zeigt, daß das Hexapeptid zwei gegenüberliegende β -turns enthält (s. Abb. 4.5).[112]

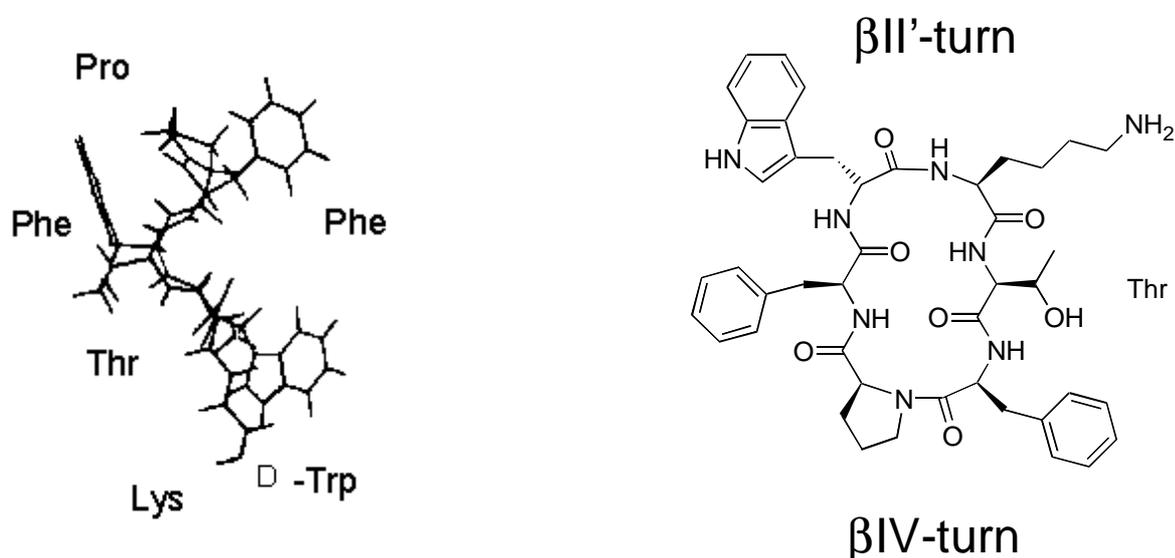


Abb. 4.5: Veber-Hirschmann-Peptid **70** mit Bezeichnung der wichtigsten Sekundärstrukturelemente.

Von besonderer Bedeutung ist der β II'-turn zwischen D-Trp und Lys, der auch in anderen Somatostatin-Analoga konserviert ist. Die räumliche Nähe der D-Trp und Lys-Seitenketten ist jedoch nicht ausreichend zum Erhalt der biologischen Aktivität. Wie Studien mit dem Einbau von α - und β -methylierten Aminosäuren zeigten, ist der Knick des Peptidrückgrates entlang der Achse zwischen Phe⁷ und Thr¹⁰ ebenfalls essentiell.[113-116]

4.1.2 Zuckeraminosäuren in Somatostatin-Agonisten

In ursprünglichen Untersuchungen zum Einbau von Zuckeraminosäuren, bei denen lediglich die Vorhersagbarkeit des Struktureinflusses in Cyclopeptiden überprüft werden sollte, wurden SAA2 und SAA3 anstelle der Dipeptideinheit Phe-Pro in die Sequenz des Veber-Hirschmann-Peptides eingebaut. NMR- und MD-Studien ergaben, daß die Konformation der biologisch wichtigen Tetrapeptidsequenz des Veber-Hirschmann-Peptids trotz der tiefgreifenden strukturellen Veränderung erhalten blieb.[14,15] Trotzdem erwiesen sich die Verbindungen als biologisch erstaunlich inaktiv (s. Abb. 4.6). Deshalb wurden, um mögliche hydrophobe Wechselwirkungen der „Rückseite“ der Ursprungssequenz mit dem Rezeptor in Betracht zu ziehen, entsprechende benzylierte Derivate hergestellt.[31,117] Durch den Einbau der hydrophob modifizierten α -SAA2 und SAA4 wurde weiterhin überprüft, ob die β IV-turn-Anordnung im „rückwärtigen“ Teil des Cyclopeptids essentiell ist.[118] Die Rezeptorsubtypselektivität wurde dabei durch Tests an SSTR2 und SSTR5 festgestellt (Abb. 4.6).

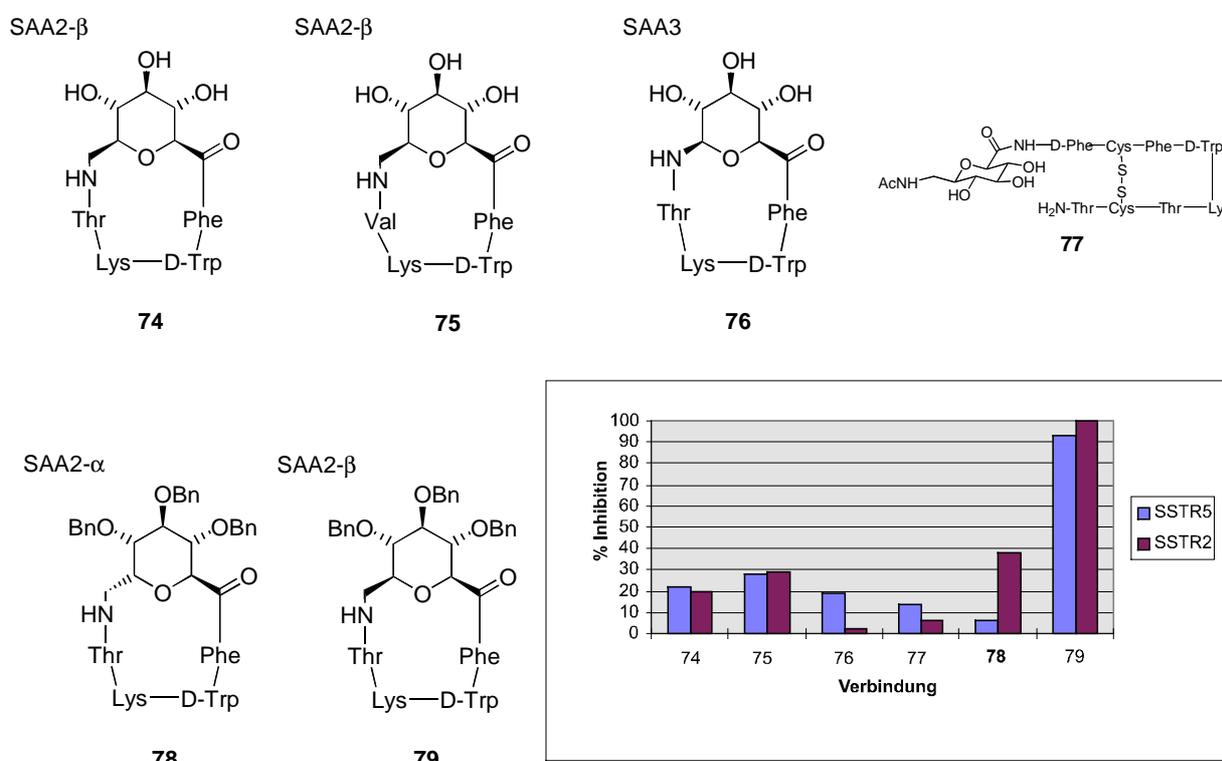


Abb. 4.6: Biologische Aktivität der bisher hergestellten Zuckeraminosäurehaltigen Somatostatinanaloga.

Die Ergebnisse der biologischen Tests lassen vor allem zwei Rückschlüsse zu:

- 1) die *cis*-Amidbindung (β IV-*turn*) zwischen Phe und Pro im „rückwärtigen“ Teil des Veber-Hirschmann-Peptids scheint essentiell zu sein, wie durch die Inaktivität der Peptide mit α -SAA2(Bn)₃ **78**[31] und SAA4(Bn)₃[32] gezeigt wurde.
- 2) Zum Erhalt der Aktivität scheint ein hydrophober Kontakt zwischen dem „rückwärtigen“ Teil der Sequenz mit dem Rezeptor wichtig zu sein, wie der Aktivitätsunterschied zwischen der benzylierten Form **79** und dem unbenzylierten Derivat **74** des SAA2-haltigen Peptids zeigt.[31]

Der Ersatz der Phe-Pro-Einheit in der Sequenz des Veber-Hirschmann-Peptids **70** durch SAA2-Derivate ist also geeignet, um eine gewisse biologische Aktivität zu erhalten. Dieser Erhalt gründet sich auf die Aufrechterhaltung der für die Wirkung essentiellen Sekundärstrukturelemente (β II'-*turn* der aktiven Sequenz, β IV-*turn* der „Rückseite“, gewölbte Gesamtkonformation). Die Aktivität der Verbindungen kann durch die hydrophobe Modifikation der Hydroxylgruppen der Zuckeraminosäuren bedeutend gesteigert werden.

Weiterführende Struktur-Aktivitäts-Studien, vor allem mit dem Ziel die Selektivität der Cyclen zu verbessern, scheinen erfolgversprechend. An diesem Punkt stellt sich vor allem die Frage, in wie weit die selektive Modifizierung der Hydrophobizität der Hydroxylgruppen durch Derivatisierung zu einem nutzbaren Effekt führen kann. Hier kommt eine der Stärken des Konzepts der Zuckeraminosäuren als *turn*-Mimetika zum Tragen, nämlich die relativ einfache, selektive Funktionalisierbarkeit der OH-Funktionen. Auf diese Weise sollte es möglich sein, weiterreichende Aussagen bezüglich der Strukturanforderungen für selektive SSTR-Bindung zu machen. Darüber hinaus können eventuell sogar über das bisher Bekannte hinaus Hinweise über die Struktur- bzw. Bindungsmechanismen der Rezeptorsubtypen gefunden werden.

Aufgrund dieser Überlegungen wurden die einfach benzylierten SAA2-Derivate SAA2(4NBn) und SAA2(2NBn) hergestellt und analog zu den oben beschriebenen Peptiden an Stelle der Phe-Pro-Einheit in die Sequenz des Veber-Hirschmann-Peptids eingebaut.

4.1.3 Synthese der Peptide

In vorhergehenden, grundlegenden Arbeiten konnte gezeigt werden, daß sich SAA2 und einige seiner Derivate dazu eignen, nach Einbau in cyclische Peptide als Schleifenmimetikum zu fungieren.[14,15,31] Basierend auf diesen Ergebnissen sollten SAA2(2N-Benzyl) und SAA2(4N-Benzyl) als teilweise benzylierte Analoga in die gleichen Sequenzen eingebaut und sowohl bezüglich ihrer Struktur als auch ihres Aktivitäts- und Selektivitätsverhaltens untersucht werden, hauptsächlich um zu erfahren ob durch die selektive Benzylierung die zusätzliche Phenylalaninseitenkette der Ursprungssequenz mimifiziert werden kann und ob sich damit bezüglich der biologischen Relevanz der Peptide Konsequenzen ergeben.

4.1.3.1 Synthese von *cyclo(-SAA2(4NBn)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-)* **80** und *cyclo(-SAA2(2NBn)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-)* **81**

Die Synthese der linearen geschützten Sequenz am Harz erfolgte mit guten Ausbeuten. Aufgrund von Erfahrungen, die bei der Kupplung von Zuckeraminosäuren an andere Peptide gemacht worden waren, wurde mit dem System HATU/HOAt anstelle von TBTU/HOBt gekuppelt. Um die Reaktion möglichst zur Vollständigkeit zu bringen und so Komplikationen bei der Cyclisierungsreaktion und vor allem bei der abschließenden HPLC-Reinigung zu vermeiden, wurde der Kupplungsschritt der Zuckeraminosäure mit einer Doppelkupplung bewerkstelligt. Studien zur Bestimmung der optimalen Cyclisierungsstelle – ein zentrales Problem der Peptidcyclisierung – waren bereits in Vorarbeiten von E. Lohof durchgeführt worden. Hier konnte gezeigt werden, daß der N-terminale Einbau der Zuckeraminosäure nicht oder nur in sehr unbefriedigenden Ausbeuten zum gewünschten Cyclus führt. Dagegen ergab die Wahl der Schnittstelle zwischen D-Trp und Lys bei weitem bessere Ergebnisse, vermutlich aus dem Grund daß die Zuckeraminosäure bereits im linearen Peptid zumindest teilweise die Rolle eines β -turn-Bildners erfüllt und so die Termini in die nötige räumliche Nähe zwingt. Um zuverlässige Reaktionen zu erhalten wurde auch in dieser Arbeit diese Strategie verfolgt. Dennoch erscheint es sinnvoll in weitergehenden Arbeiten die Schnittstelle zwischen Lys und Thr in Betracht zu ziehen, da

vergleichende Arbeiten gezeigt haben, daß zumindest in Peptiden, die ausschließlich aus „normalen“ Aminosäuren bestehen, die beste Schnittstelle zwischen der i+2 und der i+3-Position eines β -turns liegen, während der Schnitt zwischen i+1 und i+2 meist schlechtere Ergebnisse erbringt (der aktive Teil der Sequenz, Phe-D-Trp-Lys-Thr, bildet einen β -turn).

Die Cyclisierung selbst wurde mit DPPA/NaHCO₃ durchgeführt, da dies die Methode der Wahl ist, um durch schonende Bedingungen möglichst racemisierungsfrei zum Produkt zu gelangen.

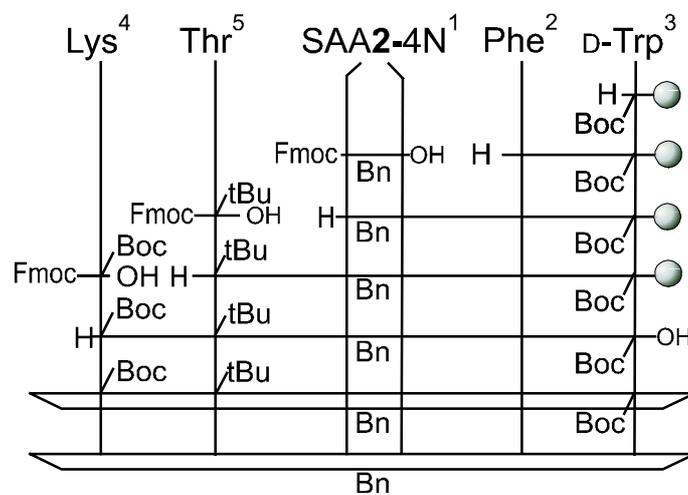


Abb. 4.7: Syntheschema für *cyclo(-SAA2(4NBn)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-)* **80** und *cyclo(-SAA2(2NBn)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-)* **81**. Die Synthese erfolgte an der Festphase, die Cyclisierung in Lösung mit DPPA/NaHCO₃. Da die verwendeten Zuckeraminosäuren Dipeptidisostere darstellen, werden sie durch zwei senkrechte Linien repräsentiert.

4.1.3.2 Synthese von *cyclo(- α -SAA2-gal(Bn)₃-Phe-D-Trp-Lys-Thr-)* **82** und *cyclo(- β -SAA2-gal(Bn)₃-Phe-D-Trp-Lys-Thr-)* **83**

Die Synthesen verliefen sowohl bei der Kupplung als auch bei der Cyclisierung nach den gleichen Überlegungen wie die von *cyclo(-SAA2(2NBn)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-)* **80** und *cyclo(-SAA2(2NBn)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-)* **81**. Der ursprünglich geplante Versuch die beiden Peptide zusammen herzustellen und erst danach auf der Stufe der Cyclen im

Verlauf der abschliessenden Reinigung zu trennen, scheiterte, genau wie der Versuch die Trennung auf der Stufe der linearen Sequenzen zu erreichen. Deshalb wurden die Peptide auf konventionellem Weg getrennt synthetisiert und cyclisiert. Bemerkenswert ist die ausgesprochen niedrige Cyclisierungstendenz dieser Peptide, vor allem vor dem Hintergrund, daß sowohl die einfach als auch die dreifach benzylierten SAA-Derivate in Glucokonfiguration ohne große Schwierigkeiten cyclisierbar waren. Es ist daher anzunehmen, daß die Probleme bei der Cyclisierung auf die invertierte Stereochemie an C4 des Galactoserings zurückzuführen ist.

Ergebnisse über die biologischen Tests liegen noch nicht vor.

4.1.4 NMR-Untersuchungen und Konformationsanalyse

Cyclo(- β -SAA2(4NBn)¹-Phe²-D-Trp³-Lys⁴-Thr⁵-) **80** zeigt genauso wie die analogen Verbindungen *cyclo*(- β -SAA2-Phe-D-Trp-Lys-Thr-) **74** und *cyclo*(- β -SAA2(Bn)₃-Phe-D-Trp-Lys-Thr-) **79** nur ein Konformer in den NMR-Spektren. Das Fehlen starker H ^{α} -H ^{α} -NOE Signale weist auf eine all-trans Konfiguration aller Amidbindungen hin. Die Zuordnung der Signale erfolgte anhand von TOCSY-, COSY-, HMQC- und HMBC-Experimenten, Abstandsinformationen wurden mit Hilfe von ROE-Daten gewonnen. Aufnahme und Auswertung der Spektren wurde von M. Goede und Dr. Rainer Haeßner durchgeführt.

Die aus Distanzgeometrierechnungen (durchgeführt von M. Goede) resultierende Struktur von *cyclo*(- β -SAA2(4NBn)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-) **80** (Abb. X oben) zeigt mit zwei gegenüberliegenden β -turns eine in vielen cyclischen Hexapeptiden gefundene Motiv von Sekundärstrukturelementen. D-Trp besetzt dabei die *i*+1-Position einer β II'-Schleife, während die Zuckeraminosäure die *i*+1- und *i*+2-Position eines pseudo β -turns einnimmt. Das Rückgrat liegt in einer gewölbten Konformation vor, die häufig mit der antisekretorischen Wirkung korreliert wird. Die ROE-Daten weisen darüber hinaus auf ein dynamisches Verhalten im Bereich der Amidbindungen zwischen SAA(4NBn)¹ und Thr⁵, sowie zwischen Phe² und D-Trp³. Der Vergleich dieser Struktur mit der von E. Lohof hergestellten Vorläuferverbindung *cyclo*(- β -

SAA2(Bn)₃-Phe-D-Trp-Lys-Thr-) **79** (Abb. X unten) zeigt wie erwartet weitgehende Übereinstimmung. Weiterreichende Aussagen, wie z. B. die Existenz eines in der Struktur des Vorläuferpeptides auftretenden γ -turns im Bereich zwischen der Zuckeraminosäure und Lys⁴, sind erst nach Durchführung von MD-Rechnungen möglich.

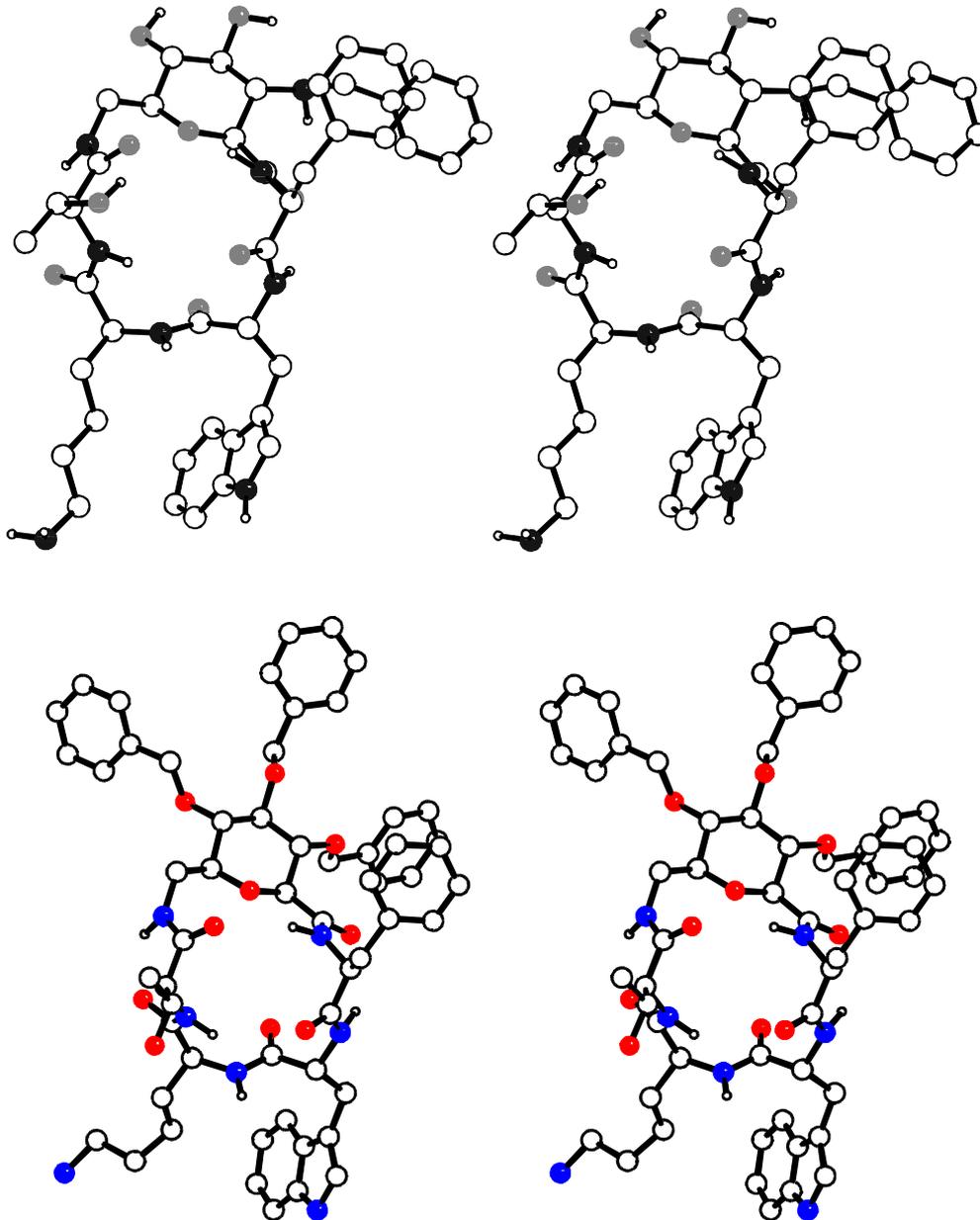


Abb. 4.8: Vergleich der Stereodarstellungen von *cyclo(-β-SAA2(4NBn)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-)* (oben, Distanzgeometrie-Struktur) und der Vorläuferverbindung *cyclo(-β-SAA2(Bn)₃-Phe-D-Trp-Lys-Thr-)* (Struktur gemittelt über eine 150 ps rMD-Trajektorie und minimiert).

4.2 Integrinantagonisten

4.2.1 Integrine

Die Kommunikation von Zellen ist eine der Grundlagen der Existenz vielzelliger Organismen. Adhäsive Prozesse spielen bei Vorgängen wie der Embryonalentwicklung, der Zelldifferenzierung, der Immunantwort oder der Wundheilung eine entscheidende Rolle. Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen werden von vier Arten von Oberflächenrezeptoren vermittelt:[119,120] den Cadherinen, den Selektinen, den Immunglobulinen sowie den Integrinen.

Strukturell weisen alle Mitglieder der Integrin-Familie[121], von denen inzwischen über 25 bekannt sind, große Gemeinsamkeiten auf. Sie stellen durchweg Heterodimere zweier transmembraner Glykoproteine dar.[122,123] Die beiden Untereinheiten (es wurden bis heute 16 verschiedene α - und 8 verschiedene β -Einheiten gefunden) sind über nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden. Die extrazelluläre Domäne der α -Untereinheit weist 3-4 Bindungsstellen für zweiwertige Kationen auf, was mit Beobachtungen korrespondiert, daß die Funktion der Integrine von der Anwesenheit zweifach positiv geladener Metallionen abhängig ist. Die Besonderheit der β -Einheit besteht darin, daß sie über intrazelluläre Proteine wie Talin oder Vinculin mit den Aktinfilamenten des Cytoskeletts verbunden ist.[124] Auf dieser Verknüpfung beruht auch die Signaltransduktionsfähigkeit der Integrine, da nach Ligandbindung an den extrazellulären Domänen und Vermittlung durch die transmembranen Einheiten im Inneren der Zelle eine konformationelle Umordnung des Cytoskeletts stattfindet, die dann phänotypische Veränderungen der Zelle bewirkt.

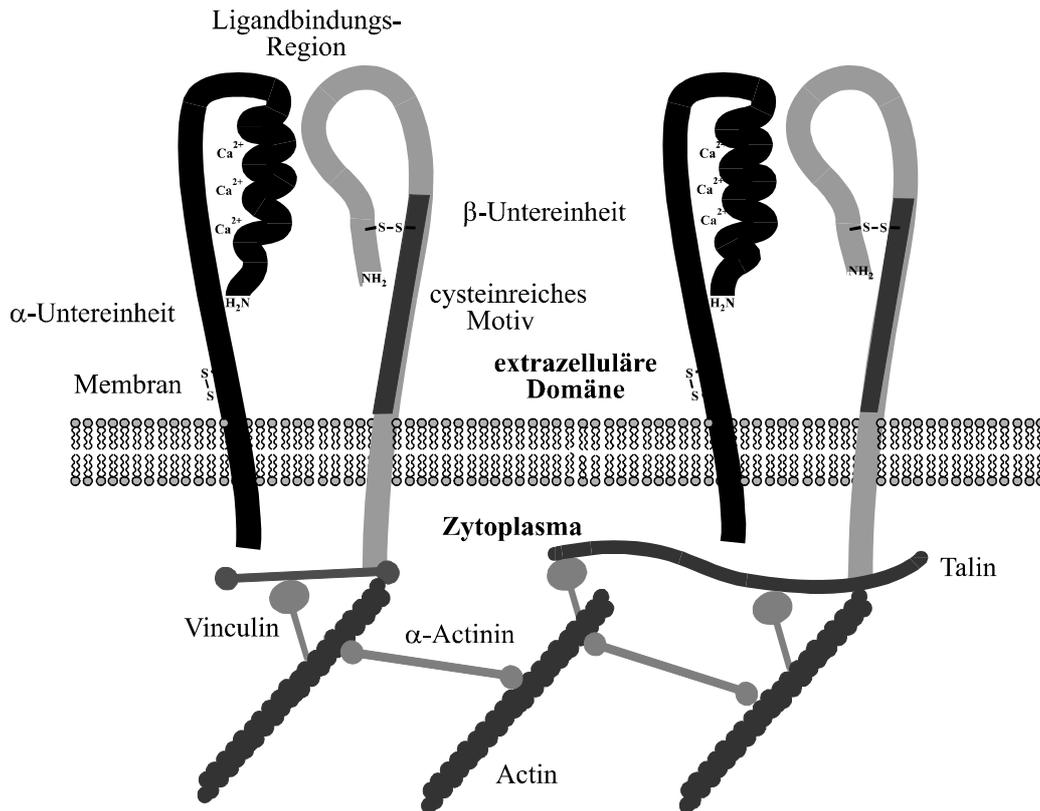


Abb. 4.9: Schematische Darstellung der Integrine bestehend aus α - und β -Untereinheit der Wechselwirkungen mit Komponenten des Cytoskeletts.

Die Bindung der Liganden erfolgt an beiden extrazellulären Domänen. Damit erklärt sich auch, daß die Ligandenspezifität gleichermaßen von beiden Untereinheiten abhängt. Interessanterweise erfolgt die Bindung sehr oft über die im Liganden enthaltene Tripeptidsequenz Arg-Gly-Asp (RGD). Da diese Aminosäureabfolge in vielen von Integrinen erkannten extrazellulären Matrixproteinen vorkommt, spricht man von der RGD-Sequenz als der universellen Zell-Erkennungssequenz.[125-127]

Ligand	Integrin
<i>bone-sialo</i> -Protein	$\alpha_v\beta_3$
Fibrinogen	$\alpha_M\beta_2$, $\alpha_x\beta_2$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$
Fibronectin	$\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$
ICAM-1-2-3	$\alpha_L\beta_2$
Kollagen	$\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$

Laminin	$\alpha_2\beta_1, \alpha_3\beta_1$
Osteopontin	$\alpha_v\beta_3$
Tenascin	$\alpha_v\beta_3$
Thrombin	$\alpha_v\beta_3$
Thrombospondin	$\alpha_{Iib}\beta_3, \alpha_v\beta_3$
VCAM-1	$\alpha_4\beta_1$
Vitronectin	$\alpha_v\beta_1, \alpha_{Iib}\beta_3, \alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5$
von Willebrand Faktor	$\alpha_{IIb}\beta_3$

Tabelle 4.2: Liganden der Integrine, die über die universelle Bindungssequenz -R-G-D- vom Rezeptor erkannt werden.[128]

Erstaunlich ist die hohe Selektivität mit der die Integrine ihre Liganden erkennen, ein Umstand, der auf zusätzliche Bindungsregionen oder auf unterschiedliche konformationelle Verhältnisse bei der Präsentation der pharmakophoren Gruppen von Asp und Arg hinweisen kann.[99] Untersuchungen mit Cyclopeptiden als Testsystemen, bei denen die konformationellen Verhältnisse in relativ weiten Grenzen selektiv variiert werden können, deuten auf letzteres (s. spätere Kapitel).

Die biologischen Funktionen der Integrine sind ausgesprochen vielfältig.[129] Neben der Gewebeorganisation und der Blutplättchenaggregation ($\alpha_{Iib}\beta_3$ -Integrin) spielen sie auch bei Entzündungen oder der Regulation des Immunsystems eine entscheidende Rolle. Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin ist außerdem an Knochenauf- und abbauprozessen beteiligt. Vom Standpunkt der Krebsmedizin aus gesehen, ist der Umstand, daß viele Integrine an der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert werden und vor allem an verschiedenen Stadien der Metastasierung beteiligt sind, äußerst interessant.[130,131] Aufgrund verschiedener Beobachtungen wird ein Zusammenhang zwischen verschiedenen Integrinen und der extrazellulären Proteolyse vermutet, ein wichtiger Schritt der am Anfang der Extravasation der Krebszellen steht.[132] Die Metastasenbildung selbst ist dann wiederum abhängig vom Expressionsgrad verschiedener Integrine. Solche die eine feste Anheftung der Zellen an Gewebeverbände und damit die Gewebeorganisation vermitteln, müssen im verminderten Maße auf der Zelloberfläche

vorliegen, diejenigen die an der Migration durch das Gewebe beteiligt sind dagegen verstärkt. So wird z. B. der $\alpha_v\beta_3$ - (Vitronectin) Rezeptor in Osteosarkomen, Neuro- und Glioblastomen, Lungen-, Brust-, Prostata- und Blasenkarzinomen sowie invasiven Melanomen überexprimiert.

Der Adhäsionsprozess kann durch kleine RGD-haltige Peptide, die mit den Integrinen wechselwirken, inhibiert werden. Als Wirkstoffziele sind Antagonisten potentielle Therapeutika für eine Vielzahl von Krankheiten mit abnormer extrazellulärer Matrixfunktion wie kardiovaskulären Fehlfunktionen, Krebs oder Entzündungen. Grundlegend für das Wirkstoffdesign ist, daß sowohl Aktivität als auch Selektivität entscheidend von der Konformation der RGD-Sequenz abhängen. Das Erreichen von Rezeptoraffinität und -selektivität ist von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung von Therapeutika auf diesem Gebiet.

4.2.2 $\alpha_v\beta_3$ -selektive Antagonisten

Der $\alpha_v\beta_3$ - (Vitronectin) Rezeptor, ist an vielen Zell-Matrix- und Zell-Adhäsions-Phänomenen beteiligt. Er wird verstärkt auf verschiedenen Tumorzellen,[133] Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert. Außerdem wird er auf der Oberfläche der glatten Muskulatur der Blutgefäße gefunden, auf Endothelzellen und verschiedenen Muskelzellen und spielt darüberhinaus bei der Angiogenese eine wichtige Rolle. Bei der tumorinduzierten Angiogenese binden invasive Endothelzellen über dieses Integrin an extrazelluläre Matrixkomponenten. Die Inhibition dieser Wechselwirkungen induziert Apoptose der proliferativen angiogenetischen Gefäßzellen und führt so zu einer ungenügenden Versorgung des Tumors. Der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor ist auch an der Zell-Migration beteiligt und wird während der vertikalen Wachstumsphase und der Metastasierung maligner Melanomzellen verstärkt exprimiert.

Cyclische RGD-Pentapeptide wurden in unserer Gruppe als hochaktive und selektive Liganden des $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptors entwickelt.[134] Die Methode des *spatial screening* führte zu *cyclo*(RGDfV) **84**,[135] dem ersten hochaktiven und selektiven $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten, der wiederum als Leitstruktur für die Entwicklung stereoisomerer

Bibliotheken diente.[136] Vergleichende Studien zeigten, daß die Anwesenheit einer hydrophoben aromatischen Aminosäure in Position 4, genau wie die H-Brückenbildung in der Region von Position 4, die Aktivität für den $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor steigern. Auf der anderen Seite hat der Einbau verschiedener Aminosäuren in Position 5 keinerlei erkennbaren Einfluss auf Aktivität und Selektivität.

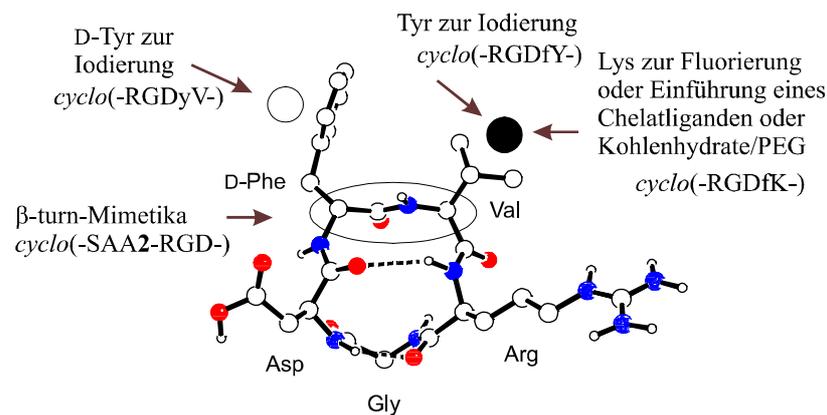


Abb. 4.10: Darstellung von $\text{cyclo}(-\text{Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val}-)$ **84** und der die Aktivität nicht beeinträchtigenden Modifikationsmöglichkeiten.[134]

Erste Untersuchungen über selektive $\alpha_v\beta_3$ -Cyclopeptide waren auf die Synthese von cyclischen Penta- und Hexapeptiden konzentriert. Die $\alpha_v\beta_3$ -Selektivität und Aktivität konnte dabei verschiedenen *turn*-Anordnungen zugeordnet werden. Es wurde festgestellt, daß es sich im Fall von $\text{cyclo}(\text{RGDfV})$ **84** um eine sehr flexible Struktur mit einer Vorzugskonformation um einen $\beta\text{II}'$ -*turn* um die D-Phe-Val-Sequenz und einen γ -*turn* um das im Cyclus gegenüberliegende Glycin handelt. Ähnliche Ergebnisse wurden bei cyclischen Hexapeptiden (z. B. $\text{cyclo}(\text{RGDSPG})$ **85**) mit Glycin in einer *turn*-Position des Cyclus gefunden. $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -selektive Peptide enthalten normalerweise das zentrale Glycin in einer gestreckten Anordnung.

4.2.3 Zuckeraminosäuren in RGD-Peptiden

Nach ersten erfolgreichen Versuchen, bei denen die D-Phe-Val-Einheit durch Dipeptid-*turn*-mimetika ersetzt worden war, wurde auch die dipeptidisostere SAA2 und seine Derivate $\alpha\text{-SAA2}(\text{Bn})_3$ und $\beta\text{-SAA2}(\text{Bn})_3$ in die Sequenz eingebaut und auf

Struktur-Wirkungs-Beziehungen geprüft (Abb. 4.9).[31] Die strukturellen Untersuchungen zeigten, daß die Inkorporation der Zuckeraminosäuren nicht zu gravierenden konformationellen Veränderungen im Bereich der aktiven Sequenz führte. Dementsprechend konnte ein beachtlicher Erhalt der biologischen Aktivität festgestellt werden, wenn auch zu Lasten der Selektivität. Ähnlich wie im Fall der Somatostatin-Antagonisten führte auch hier die Benzylierung der OH-Gruppen der SAA zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung.

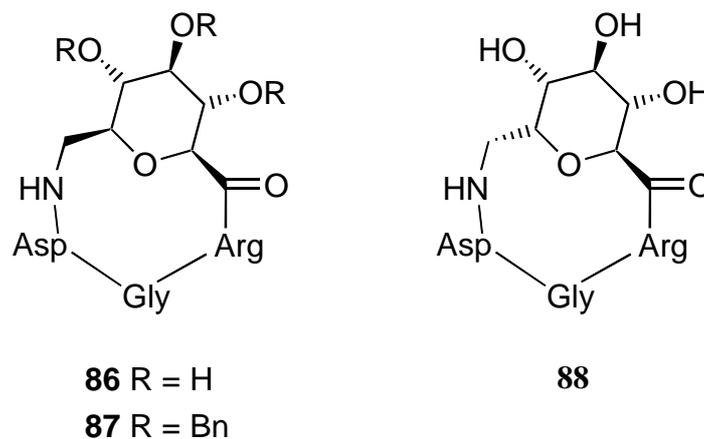


Abb. 4.11: Bisher synthetisierte zuckeraminosäurehaltige cyclische RGD-Peptide **86**, **87** und **88**. [15,31]

4.2.3.1 Glykosylierte RGD-Peptide

Die Leitstruktur *cyclo*(RGDfV) **84** bietet allerdings noch andere Möglichkeiten Zuckeraminosäuren zu inkorporieren. Da Position 5 (Valin in der Leitstruktur) in weiten Grenzen variabel ist, bietet sie sich an, Modifikationen in das Cyclopeptid einzuführen und so die Eigenschaften des Peptids in gewünschter Weise zu verändern. Im vorliegenden Fall war es das Ziel, die pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften zu modifizieren. Gerade was die Bioverfügbarkeit angeht, erscheint es zweckmässig an diese Position sehr hydrophile Reste einzuführen. Eine Möglichkeit hierfür besteht in der Anknüpfung eines Zuckerrestes. C-glykosidische Derivate sind vom pharmakologischen Standpunkt aus gesehen besonders interessant, da sie über eine extrem gesteigerte enzymatische Stabilität verfügen.

Um den Zucker am Peptid verankern zu können, wurde die variable Aminosäure Valin durch Lysin ersetzt. Die Verknüpfung erfolgte durch die Bildung einer Amidbindung (Abb. 4.10).

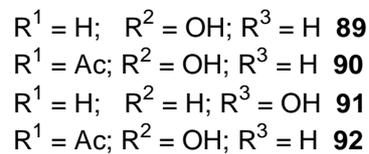
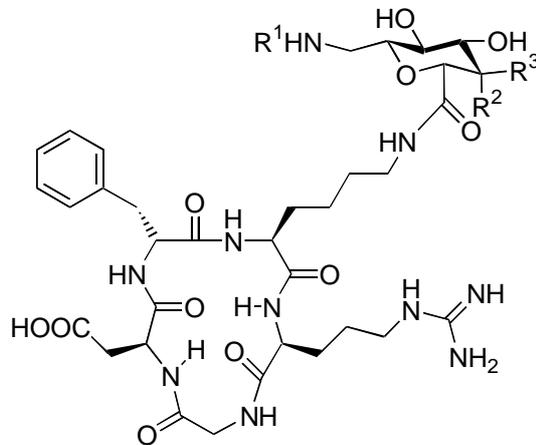


Abb. 4.12: Darstellung der glykosylierten RGD-Peptide. Die Galactosederivate **89** und **90** entstanden im Rahmen dieser Arbeit, die Verbindungen in der Glucokonfiguration **91** und **92** wurden von E. Lohof hergestellt.

Um mögliche hydrophobe Wechselwirkungen in Betracht zu ziehen, wurde die glykosylierte Sequenz auch mit acetylierter Aminogruppe der Zuckeraminosäure hergestellt.

4.2.3.2 Synthese der Peptide

Analog der von E. Lohof durchgeführten Untersuchungen und um die biologischen Tests vergleichen zu können, wurde *cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys-)* **93** als Modellcyclus gewählt. Die Darstellung des linearen Vorläufers erfolgte an der Festphase (TcP-Harz) nach der Fmoc-Strategie unter Kupplung mit TBTU/HOBt. Da im Falle von Glycin bei der Cyclisierung, dem schwierigsten Kupplungsschritt, bei der

Aktivierung keine Racemisierungsgefahr besteht, wurde es als C-terminale Aminosäure gewählt. Die Cyclisierung erfolgte mit DPPA/NaHCO₃.

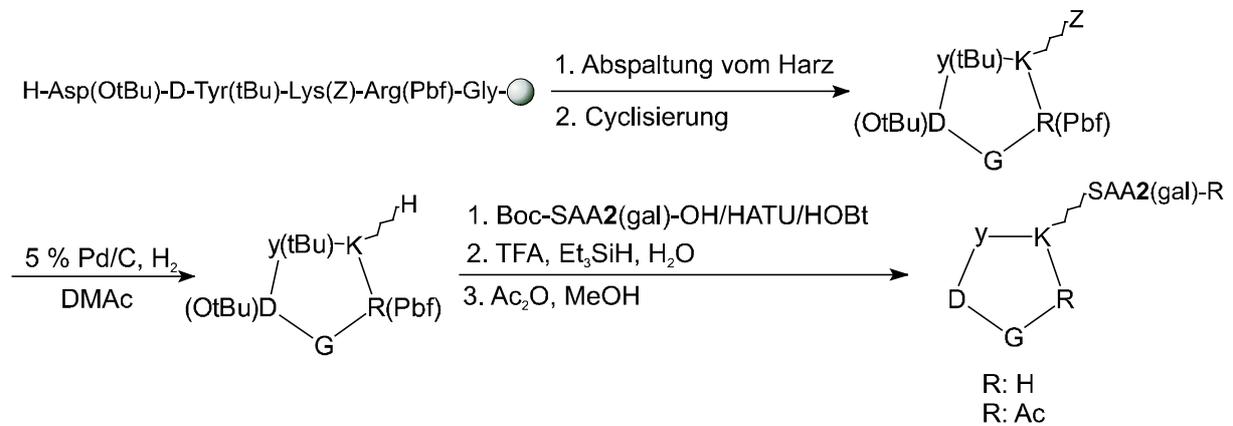


Abb. 4.13: Synthese der glykosylierten RGD-Peptide **89** (R = H) und **90** (R = Ac).

Da die Lysinseitenkette mit der Z-Schutzgruppe orthogonal geschützt war, konnte diese Aminogruppe selektiv entschützt werden. Die Anknüpfung der Zuckeraminosäure Fmoc-SAA2(gal)-OH **52** erfolgte mit HATU/HOAt. An dieser Stelle wurde das Reaktionsgemisch zweigeteilt. Aus der ersten Hälfte wurde nach Schutzgruppenabspaltung das Cyclopeptid **89** isoliert, die zweite Hälfte des Gemisches wurde mit einer Mischung aus Essigsäureanhydrid und Methanol acetyliert und **90** wiederum nach Schutzgruppenabspaltung mittels präparativer HPLC gereinigt.

4.2.3.3 Biologische Testergebnisse

Die biologischen Tests wurden von der Firma *E. Merck*, Darmstadt, durchgeführt. Dabei wurde die Inhibierung von isolierten, immobilisierten Rezeptoren $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ durch die Peptide im Vergleich zu ihren natürlichen Adhäsionsproteinen Vitronectin und Fibrinogen gemessen. Als Referenzverbindung diente das lineare Standardpeptid GRGDSPK und das Cyclopeptid *cyclo*(RGDfV).

Peptid	IC50[nM]		
	$\alpha_{IIb}\beta_3$	$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_v\beta_5$
H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-OH	1690	785	n.d.
<i>Cyclo</i> (-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) 84	830	2	320
<i>Cyclo</i> (-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(SAA2-)) 91	450	15	12700
<i>Cyclo</i> (-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(Ac-SAA2-)) 92	5000	21	970
<i>Cyclo</i> (-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(SAA2-gal-)) 89	10000	55	2750
<i>Cyclo</i> (-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(Ac-SAA2-gal-)) 90	1910	0.8	24.7

Tabelle 4.3: Inhibierungsverhalten der verschiedenen glykosylierten RGD-Peptide bzgl. der Bindung von Vitronectin an den isolierten $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Rezeptor, sowie der Bindung von Fibrinogen an den isolierten $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor im Vergleich gegen das Leitpeptid *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) **84**.

Der Vergleich der in dieser Arbeit hergestellten Cyclopeptide **89** und **90** mit dem Leitpeptid *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **84** zeigt, daß die Rezeptorselektivität von der Modifikation nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Die Aktivitätsmessungen ergeben im Fall der nicht acetylierten Verbindung deutliche Einbußen (Faktor 10-30), während der acetylierte Cyclus als einziger der glykosylierten RGD-Peptide um Faktor 2.5 aktiver ist. Dieser Trend wurde zusätzlichen hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Rezeptor zugeschrieben.

Sehr überraschend sind die Ergebnisse bezüglich des Vergleichs der in dieser Arbeit hergestellten Cyclen mit den schon vorher synthetisierten analogen Peptiden **91** und **92**. Während der Austausch des gluco- gegen den galactokonfigurierten Zucker im Fall der nicht acetylierten Verbindungen zu einem Aktivitätsabfall führt, ist mit der Acetylierung eine Umkehrung dieser Tendenz zu beobachten. Die Interpretation dieser Unterschiede, die ausschließlich auf der Inversion der Stereochemie an C4 des Zuckergerüsts beruhen, ist auf der Basis der momentan verfügbaren Ergebnisse nicht möglich. Es erscheint in diesem Zusammenhang sinnvoll, durch Variation der hydrophoben Modifikation weitere Derivate herzustellen und auf ihre Aktivität zu testen, um den genauen Einfluss auf die biologische Wirkung zu evaluieren.

4.2.3.4 Glykosylierte RGD-Peptide im Tumor *targeting*

Die veränderten Eigenschaften der glykosylierten Peptide eröffnen weitere Perspektiven. So können auf der Basis der verbesserten Bioverfügbarkeit (erzeugt durch die hydrophile Modifikation) weitere gezielte Veränderungen durchgeführt werden. Günstig wirkt sich im vorliegenden Fall aus, daß der Zuckeraminosäurerest durch die zahlreichen funktionellen Gruppen weiter derivatisiert werden kann. Dazu bietet sich in erster Linie die freie Aminogruppe an.

Eine Möglichkeit ist die Verwendung der $\alpha_v\beta_3$ -selektiven RGD-Peptide im Tumor *targeting*. Diese Gelegenheit ergibt sich, da in verschiedenen Tumoren wie Osteosarcomen, Neuroblastomen, Lungen-, Brust- oder Prostatakrebs oder invasiven Melanomen der $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor überexprimiert vorliegt. Für die erfolgreiche Therapie ist die Bestimmung des $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptorstatus der Tumorzellen und der umgebenden Endothelzellen der wachsenden Blutgefäße (Angiogenesestatus) deshalb überaus interessant. Die Entwicklung radiomarkierter $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten mit dem Ziel des Einsatzes der Positronenemissions-Tomographie (PET) könnte eine interessante neue Möglichkeit des *targetings* von $\alpha_v\beta_3$ -positiven Tumoren sein, die *in vivo*-Quantifizierung der Rezeptordichte zulassen und könnte so ein nützliches Instrument der Therapieplanung sein.[137] Auch die *in vivo*-Kontrolle der therapeutischen Erfolge sollte auf diese Weise möglich sein.

Basierend auf den in unserem Arbeitskreis gewonnenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen für cyclische RGD-Pentapeptide erscheint es erfolgversprechend, deren $\alpha_v\beta_3$ -Selektivität zu nutzen. Die biologischen Tests zeigen jedoch sehr ungünstige Biodistributionswerte, da schon wenige Minuten nach der Gabe das Peptid zum grössten Teil in den Ausscheidungsorganen lokalisiert ist. Um die Hydrophilie der Cyclopeptide zu erhöhen und damit die Verteilung positiv zu beeinflussen wurde Ac-SAA4 von R. Haubner kovalent in Position 5 von *cyclo*(RGDyK) **93** eingebaut (die Synthese verlief in völliger Analogie zu den in Kapitel 4.2.3.2 vorgestellten Methoden). Zur Evaluierung des Konzepts der Verwendung der glykosylierten Cyclopeptide als Radio-tracer wurde zuerst ein Vergleich zweier Sequenzen vorgenommen: *cyclo*(RGDyV) **94** und *cyclo*(RGDyK(Ac-SAA4)) **95**, jeweils mit ¹²⁵I-

Markierung im aromatischen Teil der Tyrosinseitenkette (Aufgrund der längeren Halbwertszeit eignet sich die Radiomarkierung mit ^{125}I am besten für die nötigen Voruntersuchungen bezüglich der Rezeptoraffinitäten und Biodistributionen). Die weiteren Versuche sollten aufgrund der geplanten Verwendung in der Positronen-Emissions-Tomographie mit ^{18}F -Markierung durchgeführt werden, da dadurch eine bessere Ortsauflösung der Aufnahme und so eine genaue Quantifizierung erreicht werden kann.

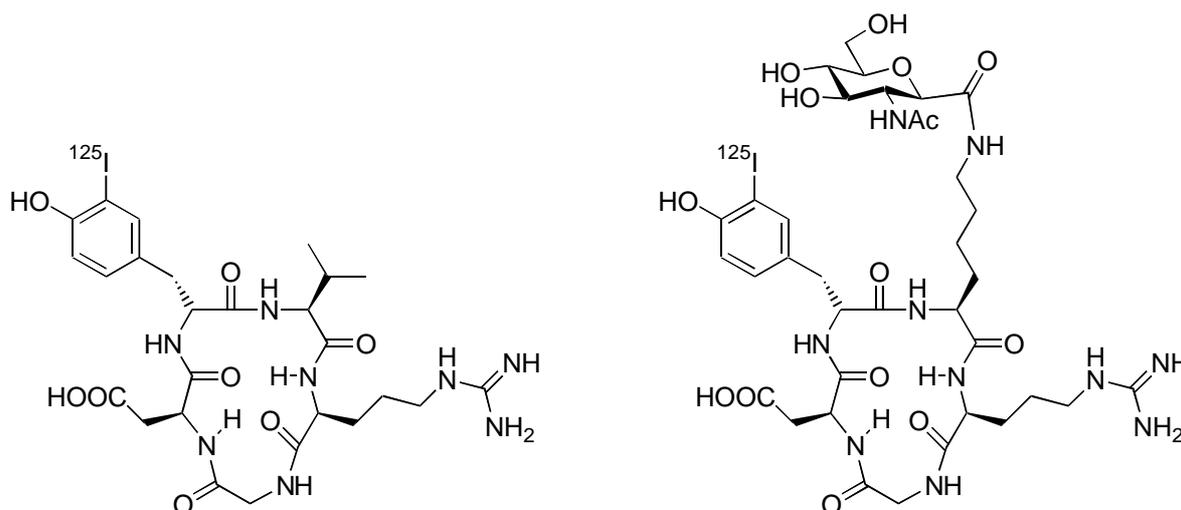


Abb. 4.14: Struktur von 3- ^{125}I iodo-D-Tyr⁴-cyclo(-RGDyV-) **94** und 3- ^{125}I iodo-D-Tyr⁴-cyclo(-RGDyK(Ac-SAA4)-) **95**. [33]

Die Ergebnisse zeigten, daß durch die Erhöhung der Hydrophilie die Konzentration im Blut wie auch im Tumor erhöht werden konnten, während die Werte für Ausscheidungsorgane wie Leber oder Niere deutlich gesenkt wurden. Dadurch erscheint eine konkrete Anwendung zumindest im diagnostischen Bereich als durchaus denkbar.

Auf der Grundlage dieser Vorarbeiten wurde Boc-SAA2(gal)-OH **51** mit Hilfe der in Kap. 4.2.3.2 beschriebenen Methoden an cyclo(RGDfK) **96** gekuppelt. Nach der vollständigen Entschützung wurde durch Anknüpfung von 2-Fluorpropionsäure (aktiviert als p-Nitrophenylester) die ^{18}F -Radiomarkierung eingeführt. Die so erhaltene Verbindung **97** wurde für die Biotests verwendet. Sowohl die Synthese als auch die biologischen Tests wurden von R. Haubner in der Gruppe von M. Schwaiger (Klinikum Rechts der Isar) durchgeführt.

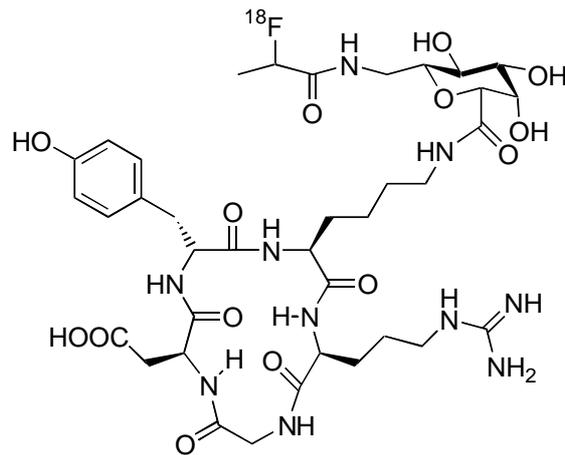


Abb. 4.15: Darstellung des ^{18}F -markierten cyclo(-RGDyK(SAA2-gal)-) **97**.

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Designs eines $\alpha_v\beta_3$ -selektiven ^{18}F -markierten Tracers sind in Tab. 4.4 aufgeführt.

	Blut	Muskel	Niere	Leber	Tumor
10 min	2.58 ± 0.41	0.80 ± 0.13	8.67 ± 0.52	5.47 ± 0.11	2.88 ± 0.32
60 min	0.27 ± 0.06	0.32 ± 0.06	3.11 ± 0.60	2.94 ± 0.26	1.33 ± 0.20
120 min	0.13 ± 0.03	0.28 ± 0.02	2.21 ± 0.46	1.97 ± 0.27	1.68 ± 0.49

Tab. 4.4: Ergebnisse der Untersuchung der Aktivitätsakkumulation von **97** in verschiedenen Gewebetypen von BALB/c Mäusen. Bei dem getesteten Tumor handelt es sich um ein Osteosarkom.

Demnach beträgt die Aufnahme in den Tumor 2.9%ID/g 10 min p. i. und 1.7%ID/g 2 h p. i. (das Ansteigen nach Auftreten eines Minimums von 1.3%ID/g 1 h p. i. wird sogenannten *reuptake*-Phänomenen zugeschrieben). Die blood-clearance ist schnell (Abfall von 2.6%ID/g 10 min p. i. auf 0.1%ID/g p. i.). Die Aktivitätsakkumulation in Knochen betrug 0.5%ID/g 2 h p. i. Nimmt man die Ausscheidungsorgane Nieren, Leber und Blase aus, zeigen alle Organe eine mindestens zweifach niedrigere Aufnahme als der Tumor (2 h p. i.). Die Verhältnisse Tumor/Blut und Tumor/Muskel lagen bei 13 und 6 (2 h p. i.).

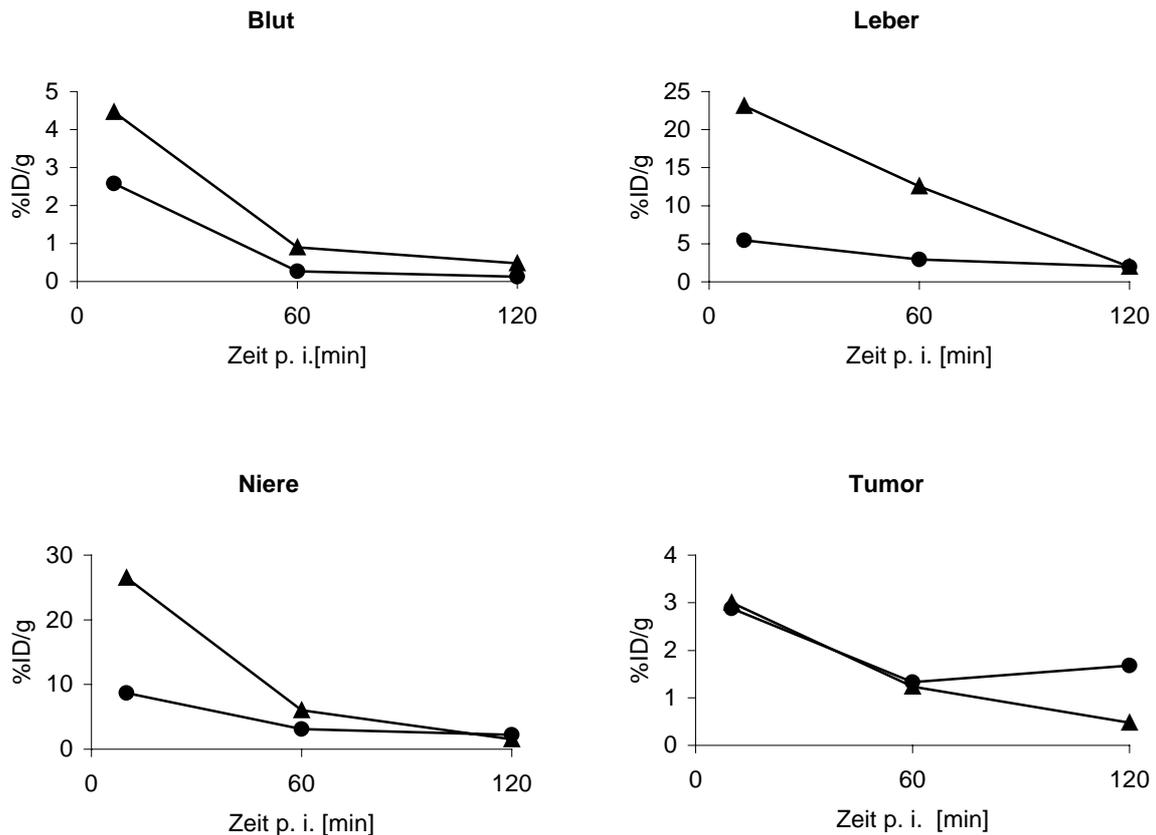


Abb. 4.16: Vergleich der Biokinetik der Verbindungen **94** und **97** für osteosarkomstragende Mäuse.

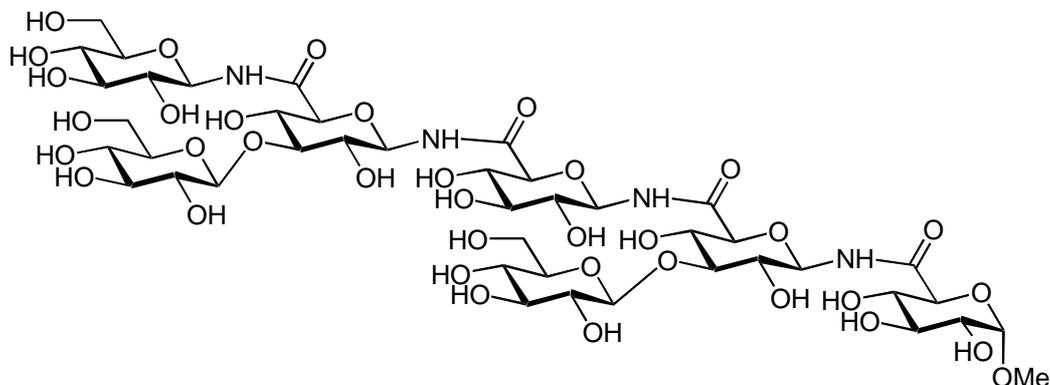
Die Daten von *cyclo(-RGDyK(2-Fluorpropionyl-SAA2gal)-)* **97** zeigen eine im Vergleich zu *cyclo(RGDyV)* **94** deutlich verbesserte und verglichen mit *cyclo(RGDyK(SAA4Ac))* **95** eine ähnliche Biodistribution. Auf der Grundlage dieser Daten erscheint die Verwendung des vorgestellten Systems als *tracer* in Tumordiagnostik und Therapiekontrolle als vielversprechend, wenn auch erhebliche synthetische Probleme einer routinemässigen Anwendung noch entgegenstehen.

5 Zuckeraminosäureoligomere

5.1 Allgemeine Bemerkungen

Neben der Verwendung zum Einbau in Peptide ist die Oligomerisierung die zweite wichtige systematische Anwendungsmöglichkeit der Zuckeraminosäuren. Meist ist die Motivation der Synthese dieser komplexen Strukturen die Nachahmung analoger Oligosaccharidstrukturen, normalerweise vor dem Hintergrund, daß Zuckeraminosäureoligomere als potentielle Antimetaboliten von schwer zugänglichen Oligosacchariden angesehen werden.

Die ersten Schritte auf diesem Gebiet wurden naturgemäß mit den einfachsten Vertretern dieser Stoffklasse, den Dimeren gemacht. Tsuchida gelang der synthetische Zugang durch die Verknüpfung verschiedener Aminozucker mit Uronsäuren,[138] später wurden in den Gruppen um Voelter und Sabesan weitere amidisch verknüpfte Disaccharide hergestellt.[139,140] Höhere Zuckeraminosäureoligomere wurden schon 1976 von Lehmann durch unselektive Polykondensation erzeugt.[68,141] Die ersten Arbeiten die die kontrollierte Verknüpfung von Zuckeraminosäuren beschreiben, erschienen erst knapp 20 Jahre später.[16,20,142-149] Meist handelt es sich dabei um Homooligomere jeweils eines Monomeren. Gemeinsames Merkmal aller Zuckeraminosäureoligomere ist es, daß ausschliesslich lineare Strukturen aufgebaut wurden. Nur vereinzelt wurden glycosylierte Zuckeraminosäuren verwendet, um verzweigte Strukturen zu erhalten.[150]

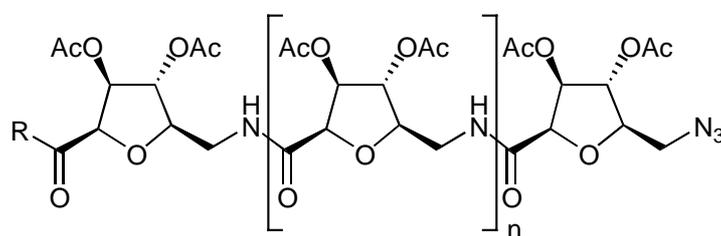


98

Abb 5.1: Glycosyliertes „verzweigtes“ Zuckeraminosäureoligomer 98.

Ein interessanter Aspekt der Oligomere, der über die bloße Verwendung als Oligosaccharidmimetikum hinausführt, ist die von Ichikawa et al. beschriebene Wirkung eines Tetramers von SAA4 sowie der sulfatierten Formen von Oligomeren verschiedener Kettenlängen von 4-Amino-SAA4 als potente Inhibitoren der HIV-Replikation.[151] Ungewöhnliche Oberflächeneigenschaften höherer Alkylglycoside der 2-Aminoglucuronsäure wurden von Nishimura et al. beschrieben.[152,153]

Strukturell ist die Stoffklasse der oligomeren Zuckeraminosäuren nur wenig erschlossen. Der Grund dafür liegt zum Teil in der strukturellen Komplexität, hauptsächlich aber an der mangelnden Tendenz der Oligomere stabile Konformationen auszubilden. Hier scheint sich das Fehlen des anomeren Effekts und speziell des, in Oligosacchariden entscheidend zur Rigidifizierung der Strukturen beitragenden, *exo-anomeren* Effekts auszuwirken.[40] Besonders die Gruppe um Ichikawa hat bei der Untersuchung verschiedener Oligomere von SAA4 festgestellt, daß sich die NMR-Spektren der Oligomere kaum von denen der Monomere unterscheiden, was darauf schließen lässt, daß es nicht zur Ausbildung von Tertiärstrukturen kommt.[154] Überraschend ist dieser Befund, da es sich hierbei um ein Konstrukt aus β -Aminosäuren handelt, von denen aus den Arbeiten von Seebach et al. und Gellman et al. bekannt ist, daß diese eine starke Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstrukturen haben.[155-159] Eines der wenigen Beispiele, bei denen Hinweise für eine Tertiärstrukturbildung gefunden werden konnten, sind Oligomere aus furanoiden Zuckeraminosäuren wie sie von Fleet et al. beschrieben wurden.[18,160-162] Genaue Strukturdaten wurden jedoch auch in diesem Fall nicht publiziert.



99

Abb. 5.2: Beispiel eines strukturbildenden Zuckeraminosäureoligomeren **99**.

Motivation für detaillierte Strukturuntersuchungen oligomerer Zuckeraminosäuren ist meist die Frage, in wie weit sich diese Strukturen dazu eignen, komplexe

Oligosaccharidstrukturen zu nachzuahmen. Aufgrund der momentan aber noch relativ geringen Zahl relevanter Publikationen kann diesbezüglich zwar erst ein vorläufiges und nur sehr eingeschränktes Bild gegeben werden, trotzdem ist die Möglichkeit der Nachbildung natürlicher Zuckerstrukturen mit großer Skepsis zu betrachten. Ein Beispiel hierfür gibt eine Arbeit von Timmers et al.[150] Im Rahmen der Synthese einer glycosylierten, pentameren Zuckeraminosäuresequenz wurden an vereinfachten, analogen Dimeren Strukturuntersuchungen durchgeführt, bei denen die natürliche β -(1 \rightarrow 6)-glycosidische Bindung **100** durch eine Amidbindung **101** ersetzt war. Es zeigte sich, daß sich die beiden Analoga bezüglich ihrer bevorzugten Konformationsräume entscheidend voneinander unterscheiden (Abb. 5.3). Der Hauptgrund für dieses abweichende Verhalten ist mit in den verschiedenartigen, die Konformation bestimmenden, Strukturprinzipien zu suchen. Während in der konventionellen Zuckerstruktur **100** der bestimmende Faktor der *exo*-anomere Effekt ist, scheint die Strukturtermination des amidisch verknüpften Dimers **101** eher auf der Delokalisation des freien Elektronenpaares des Amins mit der Peptidbindung zu beruhen, was zum „Ausschalten“ des *exo*-anomeren Effekts und so zu völlig verschiedenen Konformationsräumen führt.

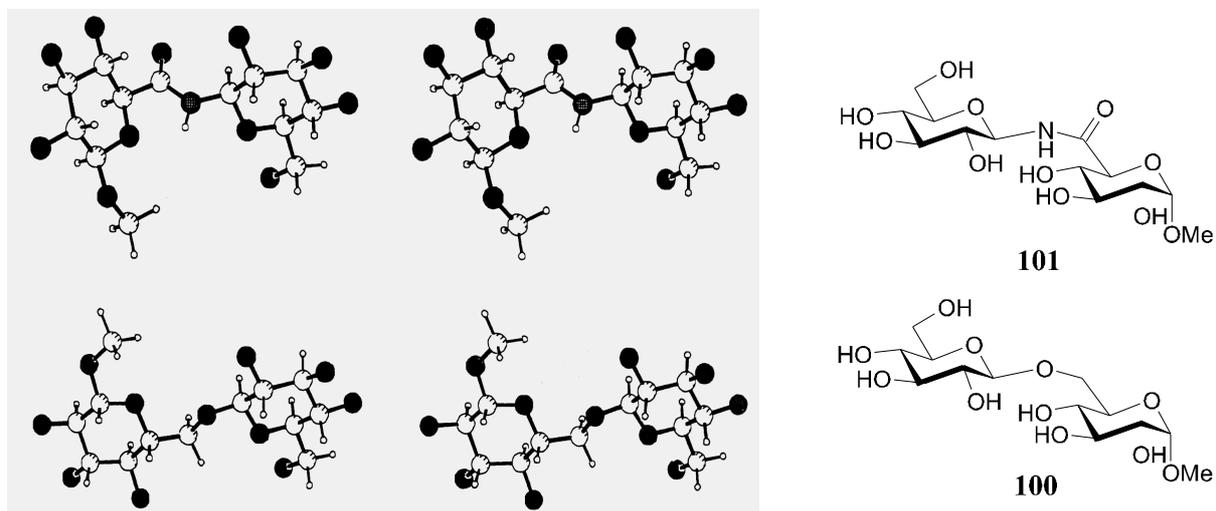


Abb. 5.3: Von Timmers et al. untersuchte dimere Strukturen **100** und **101** sowie Stereodarstellungen ihrer Vorzugskonformationen.

Angesichts dieser Ergebnisse und dem Umstand, daß in dieser Untersuchung bezüglich der Zuckerverknüpfung vergleichsweise eingeschränkte Systeme untersucht

wurden (die meisten Zuckeraminosäuren weisen in Nachbarschaft der Amino- oder Carboxylgruppe eine um ein Atom verlängerte Kette auf) erscheint es fraglich, ob mit gegenwärtig verfügbaren Zuckeraminosäuren überhaupt eine Mimifizierung komplexer Oligosaccharidstrukturen zu erreichen ist. Denkbar erscheint es in diesem Zusammenhang, daß dieses Ziel erst nach Einführung stärkerer konformationeller Einschränkungen wie z. B. Cyclisierung erreicht werden kann.

5.2 Versuche zur Synthese eines verzweigten Zuckeraminosäurehetero-oligomeren

Durch die synthetische Zugänglichkeit der Bausteine Fmoc-SAA2(4NBoc)-OH **27** und Fmoc-SAA2(2NBoc)-OH **45** sind zum ersten Mal die Voraussetzungen zur Herstellung verzweigter, reiner Zuckeraminosäureoligomere geschaffen, da sie durch ihre zusätzliche Aminofunktion die erste als Verzweigungselement verwendbare Zuckeraminosäure darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich Fmoc-SAA2(4N-Boc)OH **27** für Oligomerisierungsversuche verwendet, da nur sie in ausreichenden Mengen zur Verfügung stand.

Als Synthesziel wurde ein verzweigtes Tetramer gewählt, wobei an die zentrale Verzweigungseinheit Fmoc-SAA(4N-Boc)OH **27** drei verschiedene Zuckeraminosäuren geknüpft werden sollten. Die Nachbildung eines natürlich vorkommenden Oligosaccharidmotivs konnte aufgrund des Fehlens der entsprechenden relevanten Monomere nicht realisiert werden.^{a)} Deshalb fiel die Wahl auf zwei im Rahmen dieser Arbeit hergestellten (SAA2-gal und SAA2-gal(Bn)₃) und der schon seit längerem bekannten Zuckeraminosäure α -Ac-SAA1(Bn)-OH **102**.^[15]

^{a)} Die Verzweigungseinheiten natürlicher Oligosaccharide bestehen meist aus β -konfigurierten Mannose- oder N-Acetylglucosamineinheiten, die normalerweise in 1-, 3- und 6-Position glycosyliert sind. Entsprechende Verzweigungseinheiten stehen (noch) nicht zur Verfügung.

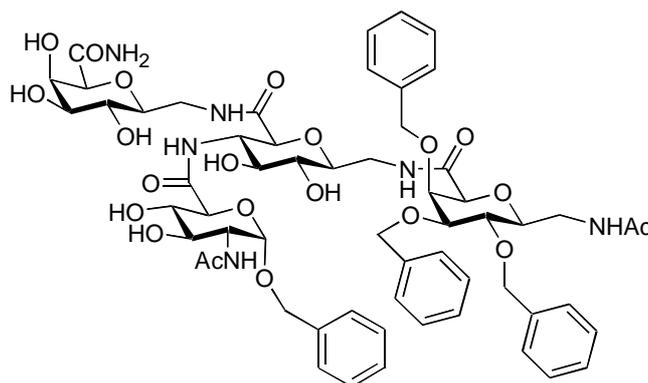


Abb. 5.4: Zielsequenz des Zuckeraminosäureheterooligomeren **103**.

Grundsätzlich sind mit dem Aufbau eines Zuckeraminosäureoligomers mehrere Schwierigkeiten verbunden. Generell ist die Reaktivität der Carboxylfunktion bei der Kupplung relativ niedrig, so daß mit großen Überschüssen der Monomeren und zusätzlich mit sehr starken Aktivierungsreagenzien gearbeitet werden muss um die Reaktion wenigstens annähernd zur Vollständigkeit zu bringen. Als zusätzliches Problem erweist sich die Tatsache, daß die meisten verfügbaren Zuckeraminosäuren außer dem Schutz der Aminofunktion keinerlei weitere Schutzgruppen aufweisen, so daß die Hydroxylfunktionen des Zuckergrundgerüsts in freier Form vorliegen, was besonders im vorliegenden Fall einer sehr langsamen Bildung der Amidbindung zur verstärkten Formierung von O-acylierten Nebenprodukten führen kann. Das voraussichtlich größte Problem beim Aufbau des verzweigten Oligomeren stellt die Einführung der Verzweigung dar, d. h. die Kupplung der letzten Zuckeraminosäure an das intermediär gebildete Trimere. Die Schwierigkeit dabei ist, daß hier an eine sterisch stark gehinderte sekundäre Aminogruppe der Fmoc-SAA2(4NBoc)-OH **27** (die ausgesprochen niedrige Reaktionstendenz dieser Aminogruppe ist schon aus der Synthese des Monomerbausteins bekannt und wurde in Kapitel 3 beschrieben) die relativ unreaktive Carboxylfunktion einer weiteren Zuckeraminosäure gekuppelt werden soll.

Um diesen Problemen zu begegnen, wurden die folgenden grundsätzlichen Überlegungen angestellt. Als Kupplungsreagens sollte das sehr stark aktivierende HATU eingesetzt werden, das zusätzlich den Vorteil bietet, relativ selektiv bei der Bildung von Amidinen gegenüber von Estern zu sein und darüber hinaus die Gefahr der

Guanylierung bei langen Kupplungszeiten gegenüber anderen Kupplungsreagenzien wie TBTU zu minimieren.[163] Trotzdem wurden bei der Synthese des Oligomeren die Kupplungszeiten der einzelnen Cyclen auf 16 Stunden ausgedehnt. Um der geringen Reaktionstendenz der sekundären Aminogruppe der Verzweigungseinheit Rechnung zu tragen, sollte zumindest die letzte Kupplung in Lösung bei erhöhten Temperaturen durchgeführt werden.

Gemäß diesen Überlegungen wurden die voraussichtlich relativ problemlosen Kupplungen zum Aufbau des Trimeren an der Festphase durchgeführt, da die Möglichkeit der Verwendung großer Überschüsse an umzusetzenden Monomeren und an Kupplungsreagens bei gleichzeitigem minimalen Aufwand bei der Produktisolierung große Vorteile aufweist. Als Harz-Linker-System wurde Rink-Amid-MBHA-Harz gewählt, da einerseits am C-Terminus eine unreaktive Amidgruppierung entsteht, die bei der Kupplung der letzten Zuckeraminosäure in Lösung inaktiv ist, und andererseits bei der Abspaltung vom Harz mit 95 % TFA simultan die Boc-Gruppe entfernt wird. Nach Beendigung der Sequenz zur Synthese des Trimeren sollte die N-terminale Aminogruppe mit Acetanhydrid *gcappt* werden. Um sicherzustellen, daß es im Verlauf der Cappingreaktion nicht zu einer O-Acetylierung kommt (N,O-Acylshift), sollte die Acetylierung in Anwesenheit von Methanol durchgeführt werden.

Am Beginn der Zuckeraminosäuresequenz steht SAA2-gal, da sie bezüglich der Zugänglichkeit die geringsten Probleme bereitet und es deshalb bei der Harzbelegung ohne weiteres möglich ist, mit sehr großen Überschüssen zu arbeiten. Als überraschend problematisch erwies sich, wie Vorversuche zeigten, die Kupplung von Fmoc-SAA2(4N-Boc)OH **27**. Deshalb wurde an dieser Stelle der Reaktionssequenz eine Doppelkupplung durchgeführt. Den Abschluss der Trimersynthese am Harz bildet die Anknüpfung der tribenzylierten Form von SAA2-gal **62** und das anschließende *Capping* mit Acetanhydrid in DMF und Methanol. Überraschenderweise zeigten Vorversuche, daß die Zugabe von 10 % Methanol zur Cappinglösung nicht ausreichten, um die O-Acetylierung zu vermeiden (ein höherer Prozentsatz an Methanol in der *Capping*lösung ist nicht zweckmässig, da sonst die Quelleigenschaften des Harzes negativ beeinflusst werden). Ein trotzdem durchgeführter Kupplungsversuch der so entstandenen Produktmischung führte konsequenterweise nur zu Spuren des Produktes. Deshalb wurden nach dem *Capping*-Schritt durch die Umsetzung mit

Natriummethylat (gelöst in einer Mischung aus DMF und Methanol) an der Festphase alle unerwünschten O-Acylierungsprodukte hydrolysiert.

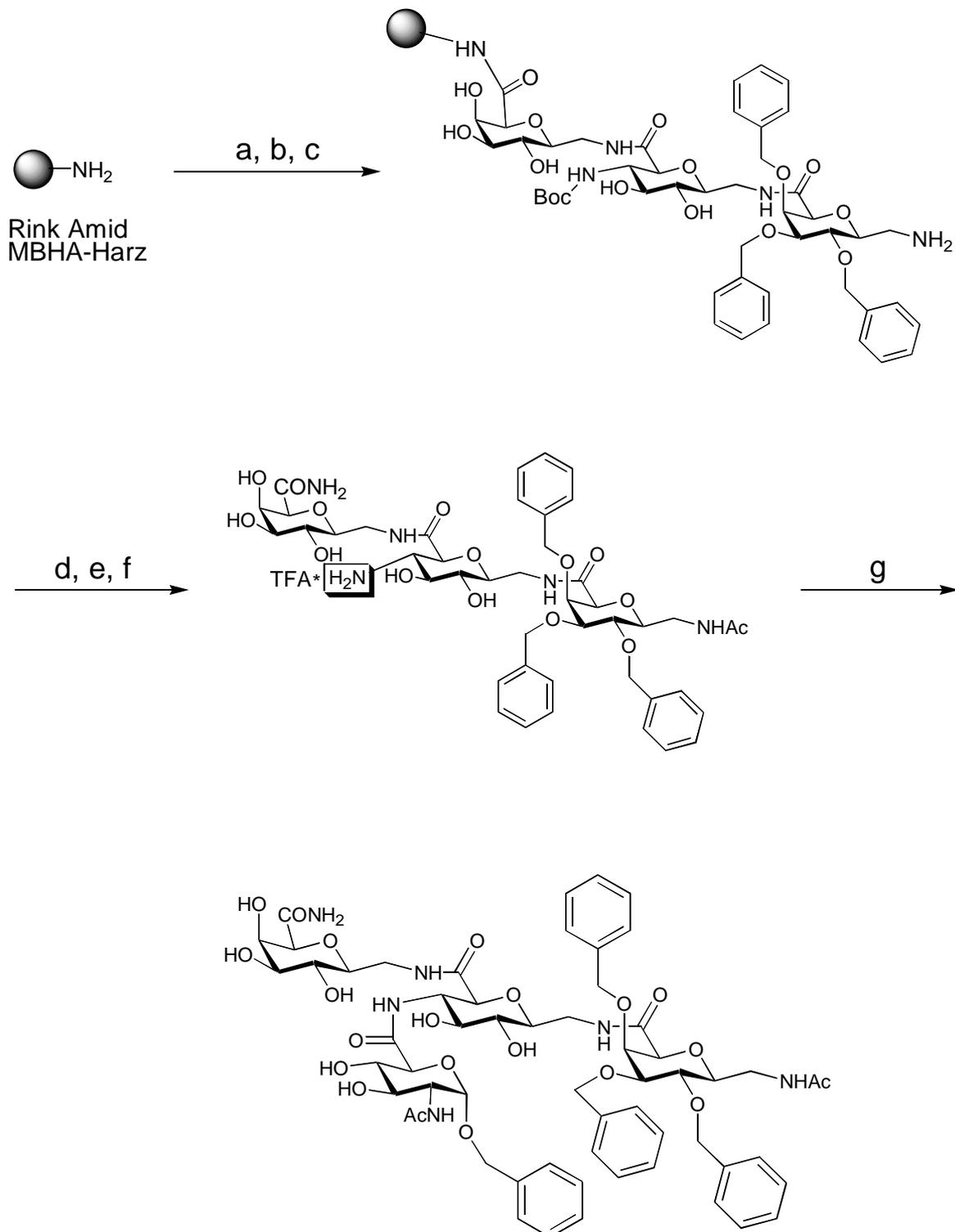


Abb. 5.5: Synthese des verzweigten Zuckeraminosäureheterooligomeren **103**. (a) (i) 5 eq. *Fmoc-SAA2-gal-OH* **52**, HATU, HOAt, Collidin, RT, 16 h (ii) 2*20 % Piperidin, DMF, 30 min (b) (i) 2*2.5 eq. *Fmoc-SAA2(4NBoc)-OH* **27**, HATU, HOAt, Collidin,

*RT, 16 h (ii) 2*20 % Piperidin, DMF, 30 min (c) (i)2.5 eq. Fmoc-SAA2-gal(Bn)₃-OH 62, HATU, HOAt, Collidin, RT, 16 h (ii) 2*20 % Piperidin, DMF, 30 min (d) Ac₂O, MeOH, DMF, RT, 2 h (e) NaOMe, MeOH, DMF, RT, 5 h (f) TFA, TIS, MeOH (95:2.5:2.5), RT, 30 min (g) 5 eq. Ac- α -SAA1(Bn)-OH 102, HATU, HOAt, Collidin, 60 °C, 48 h.*

Nach Abspaltung von Harz und der simultanen Boc-Entschützung mit 95 % TFA stand als letzter Schritt die Kupplung des α -SAA1-Derivates **102**. Die Reaktion wurde in Anwesenheit von fünf Äquivalenten der Zuckeraminosäure, wiederum mit HATU/HOAt/Collidin durchgeführt, allerdings in diesem Fall bei einer Temperatur von 60° C, da sich schon während des Verlaufs der Synthese von Fmoc-SAA2(4NBoc)-OH **27** gezeigt hatte, daß die Aminogruppe in 4-Position sogar von sehr aktiven Nucleophilen nur schwer angegriffen wird.

Die Aufreinigung des Oligomere erfolgte durch HPLC, die erfolgreiche Synthese der Verbindung konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

Die geplante NMR-technische Untersuchung der Verbindung konnte aufgrund der geringen Substanzmenge nicht durchgeführt werden.

6 Synthese, Eigenschaften und Anwendungen von PNA

Oligonucleotidanaloga stehen aufgrund ihres beträchtlichen Potentials, sowohl in Hinsicht auf die *Antisense*- als auch auf die *Antigene*-Strategie, schon seit einiger Zeit im Blickpunkt der Forschung.[164-166] Die überwiegende Mehrheit dieser Analoga ist sehr eng an die „Leitstruktur“ der natürlichen Oligonucleotide (DNA und RNA) angelehnt. So bleiben Paarungsverhalten und andere molekulare Eigenschaften (wie Zellgängigkeit oder Aktivierung der Rnase H) möglichst unbeeinflusst, trotzdem wird gezielt eine Veränderung anderer Eigenschaften wie z. B. der Nucleasestabilität erreicht.[167] Obwohl große Anstrengungen zum Design solcher Systeme unternommen wurden, konnten grundlegende Schwierigkeiten, wie die einfache Herstellung in großem Maßstab oder die Beibehaltung der Paarungseigenschaften nur in seltenen Fällen überwunden werden.

Ein grundsätzlich anderer Weg wurde 1991 von der Arbeitsgruppe um P. E. Nielsen beschritten. Mit Hilfe von *molecular modelling* Studien konnte ein Oligonucleotid-analogon entwickelt werden, das sich von bekannten Systemen dadurch unterschied, dass das gesamte Phosphat-Ribose-Rückgrat der DNA durch die achirale Peptid-basierte Aminoethylglycineinheit ersetzt wurde. Als DNA-ähnlich ist es nur noch durch das Auftreten der natürlichen Nucleobasen, in einem für die DNA-Bindung passenden Abstand, erkennbar.[168-171]

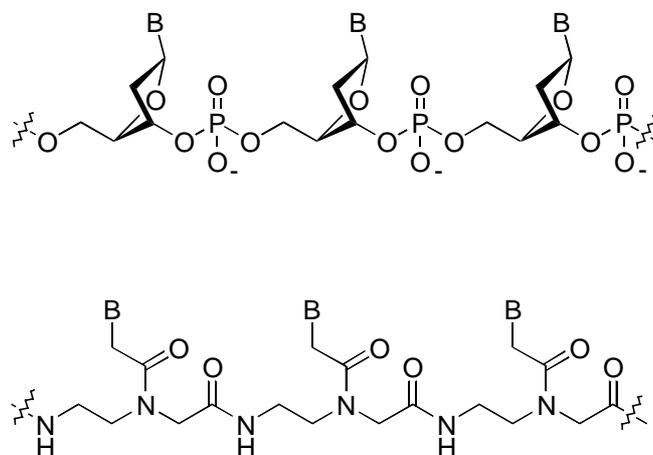


Abb. 6.1: Vergleich der repetitiven Einheiten von DNA und PNA.

Anlaß dieser gravierenden Modifikation der Grundstruktur waren einerseits das Bestreben den Abbau durch Nucleasen unmöglich zu machen und andererseits die synthetische Zugänglichkeit zu verbessern, da durch den peptidähnlichen Charakter des Rückgrates der Einsatz der sehr zuverlässigen Peptidchemie möglich wird. Dadurch sollte es auch gelingen, in einfacher Weise gezielte Veränderungen der PNA-Struktur bezüglich Ladung, Polarität oder Chiralität zu erreichen. Das ursprüngliche Ziel – das Design eines sequenzspezifischen Tripelhelixbildners, wobei die Bindung zur dsDNA durch *major groove binding* unter Ausbildung des bekannten Hoogsteen-Wasserstoffbrücken-Modus zustande kommen sollte – wurde jedoch nicht erreicht. Statt dessen zeigte die neue Struktur ausgesprochen ungewöhnliche und im Vergleich zu anderen Oligonucleotidanaloga ganz neue Bindungseigenschaften.[172,173]

Mit der Einführung der PNA begann auch eine rege Forschungstätigkeit auf diesem Gebiet, anfangs mit dem Ziel die Hybridisierungseigenschaften zu erforschen, später auch um das medizinische Potential zu ergründen oder um diagnostische und andere Möglichkeiten zu erschliessen.[174-177] Dazu wurden sowohl eine große Vielzahl ähnlicher Systeme entworfen als auch deren Bindungsverhalten und andere Eigenschaften im Detail untersucht (siehe spätere Kapitel). Diskutiert wird weiterhin eine eventuelle Beteiligung der PNA an präbiotischen Prozessen.[178-181] Es existieren mehrere ausgezeichnete Übersichtsartikel, die alle Aspekte von PNA detailliert erfassen.[176,182-187]

6.1 Bindungseigenschaften der PNA

Der Ersatz des Ribose-Phosphat-Rückgrats durch die achirale, ungeladene Aminoethylglycin-Einheit bringt tiefgreifende Veränderungen der Hybridisierungseigenschaften mit sich. Trotz der gravierenden strukturellen Andersartigkeit kann PNA noch so verschiedene Zielstrukturen wie ssDNA, dsDNA, RNA oder andere PNA-Stränge in sequenzspezifischer Weise binden.[176,186]

Die Paarungseigenschaften der PNA hängen im großen Ausmaß vom Verhältnis der Pyrimidinbasen zu den im Strang enthaltenen Purinen ab. PNA-Sequenzen, die überwiegend Pyrimidinbasen (Pyrimidinmotiv) tragen, binden DNA und RNA-

Zielsequenzen normalerweise unter Ausbildung eines Komplexes mit einer Stöchiometrie von 2:1. In PNA-Abschnitten, die vorwiegend Purinbasen (Purinmotiv) tragen, wird zunehmend auch eine Duplexbildung beobachtet.

6.1.1 PNA-haltige Duplexe

Die im Purinmotiv zu beobachtende Duplexbildung verläuft unter Ausbildung der kanonischen AT und GC-Basenpaarung (Watson-Crick-Paarungsmodus).[172,188] Dabei sind antiparallele^a Paarungskomplexe energetisch bevorzugt. Bemerkenswert ist die im Vergleich zu den korrespondierenden DNA-Komplexen deutlich erhöhte Schmelztemperatur (die thermische Stabilität der entsprechenden RNA-Komplexe liegt sogar noch etwas höher[189]). Antiparallele Duplexe bilden sich im Gegensatz zu parallelen sehr schnell.[190]

Die überraschend hohe thermische Stabilität der PNA-haltigen Duplexe (der Stabilitätsgewinn beträgt ca. 1 °C pro Basenpaar verglichen mit der entsprechenden dsDNA) wird vorwiegend dem Fehlen der elektrostatischen Repulsion zwischen den Strängen zugeschrieben. Diese Annahme wird gestützt durch Untersuchungen der Abhängigkeit der Paarung von der Ionenstärke. Während die Stabilität von DNA-DNA Duplexen in hohem Maße von niedrigen zu höheren Salzkonzentrationen geringer wird, bleibt die Schmelztemperatur der PNA-Komplexe in weiten Grenzen unverändert.[191]

Eine systematische Untersuchung auf die Auswirkungen von Fehlpaarungen in der Mitte eines pentadekameren PNA-DNA-Duplexes ergab, je nach Kombination, eine Verringerung der Schmelztemperatur zwischen 8 und 20°C pro *mismatch*. Damit wird die Beobachtung bestätigt, dass die Sequenzdiskriminierung von PNA im Vergleich zu DNA (und RNA) generell stärker ist.[172]

^a antiparallel bedeutet in diesem Fall, daß sich der Aminoterminus der PNA und das 3'-Ende der DNA gegenüberliegen

6.1.2 (PNA)₂DNA-Triplexe

Homopyrimidin PNA-Oligomere oder PNAs mit einem hohen Pyrimidin-Anteil binden komplementäre DNA unter Ausbildung von (PNA)₂DNA-Triplexen.[168-171,192] Die Paarung kommt durch die Formung der entsprechenden Watson-Crick- und Hoogsteen-Paarungsmodi zustande. Bei Anwesenheit eines Cytosins im Hoogsteen-Strang wird die zu erwartende pH-Abhängigkeit der Bindung beobachtet.[169] Entgegen der raschen Bildungstendenz von PNA-haltigen Duplexen scheint die Ausbildung der tripelhelikalen Struktur ein eher langsamer Prozess zu sein.[193,194] Eingehende kinetische Untersuchungen zeigten, dass sowohl Bindungseffizienz als auch Sequenzspezifität kinetisch kontrolliert sind. [195] Demnach beruht die Selektivität der Triplexbildung auf der intermediären Entstehung des PNA-DNA-Duplex. Die Komplexierung des dritten Stranges trägt nur wenig zur Selektivität bei.

Die ausnehmend hohe Stabilität von (PNA)₂DNA Triplexen eröffnet eine der ungewöhnlichsten Möglichkeiten von PNA. Dieses Strukturmotiv wird nämlich nicht nur durch Hybridisierung mit ssDNA gebildet, sondern auch beim Mischen von PNA-Oligomeren mit dsDNA unter Verdrängung des pyrimidinhaltigen Stranges.[171,173,196,197] Dabei ist die parallele Bindungsanordnung des Hoogsteen-Stranges gegenüber der antiparallelen leicht bevorzugt.

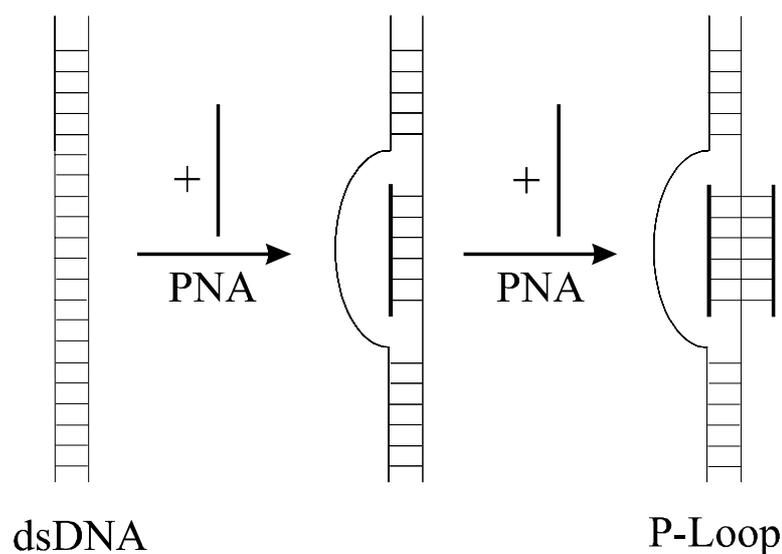


Abb. 6.2: Struktur eines Verdrängungskomplexes (P-Loop).

Das Auftreten der Strangverdrängung (auch *P-Loop* Bildung) wurde durch eine Vielzahl von Untersuchungen, wie. z. B. durch *Photo-Footprinting*-Experimente,[171] Abbau der ssDNA durch für Einzelstränge spezifische Nucleasen, Umsetzung mit Alkylantien (die im Doppelstrang beobachtbare Alkylierung der N-7-Positionen des purinhaltigen DNA-Stranges ist im Triplex nicht möglich)[196] oder der direkten Beobachtung des Komplexes mittels Elektronenmikroskopie.[173,198] Ein weiterer Hinweis auf die Ausbildung eines Triplexes ist die bevorzugte Bildung der Komplexe im sauren Medium.[169,196] In bis-PNAs (siehe unten) lässt sich die pH-Abhängigkeit der Triplexbildung mit dem Ersatz von Cytosin durch Pseudoisocytosin im Hoogsteen-Strang beseitigen,[193] wie schon in analogen reinen DNA-Systemen beobachtet werden konnte (durch die veränderte Donor-Akzeptorcharakteristik von ψ -iso-Cytosin (J) gegenüber Cytosin kann die Hoogsteen-Paarung auch ohne Protonierung erfolgen, Abb. 6.3).[199,200]

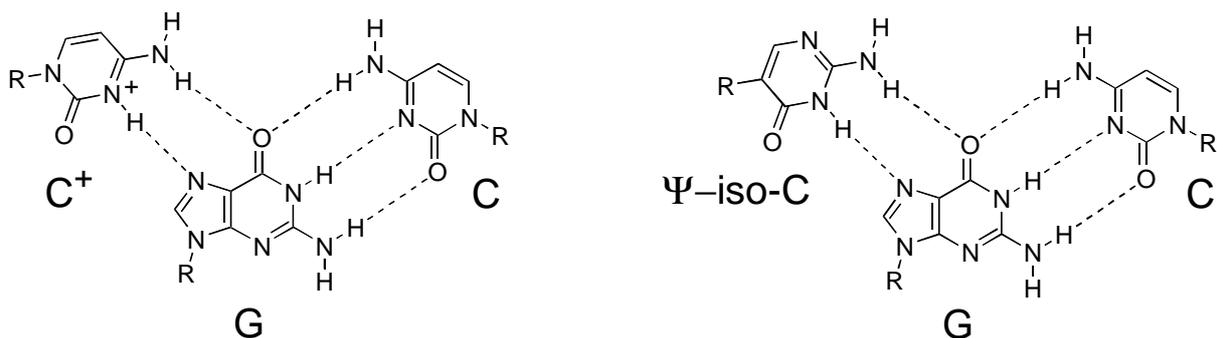


Abb. 6.3: Vergleich der Hoogsteen-Basentripel mit protoniertem Cytosin und Pseudoisocytosin.

Die Bildung des Verdrängungskomplexes ist, genau wie die des einfachen Triplexes, in hohem Maße von der verwendeten Salzkonzentration abhängig. Niedrige Ionenstärken fördern seine Bildung, bei hohem Salzgehalt wird die Bildungstendenz stark verringert. Trotzdem ist der Komplex einmal gebildet auch bei hohen Salzkonzentrationen stabil.[173,196,201]

Obwohl die kinetischen Verhältnisse der Verdrängung detailliert untersucht wurden (Reaktion erster Ordnung mit einer Ratenkonstante pseudoerster Ordnung), ist der genaue Mechanismus der Reaktion nicht bekannt.[195,202] Eine Möglichkeit bietet

das Modell der Hybridisierung mit Hilfe des „Atmens“ der dsDNA. Hierbei würde das kurzzeitige, auf kurze Sequenzabschnitte beschränkte Aufbrechen der doppelhelikalen Struktur der DNA zur Invasion eines Teils des PNA-Oligomers führen, was zur vollständigen Strangverdrängung führt. Den letzten Schritt stellt das Abfangen des Duplexes zum thermodynamisch sehr stabilen Triplex dar.

6.1.3 Bis-PNAs

Die Beobachtung, daß die Watson-Crick-Paarung mit antiparallelen, die Hoogsteen-Paarung dagegen mit parallelen Strängen die stabilsten Komplexe liefern, hat konsequenterweise zur Entwicklung der sogenannten bis-PNAs geführt, d. h. zur Verbindung der beiden PNA-Sequenzen durch einen Linker.[193,194,203] Diese Modifikation führt aus entropischen Gründen neben der schnelleren Bildung auch zur Ausbildung noch stabilerer Triplexe. Die für PNA ohnehin charakteristische starke Sequenzdiskriminierung ist im Fall der bis-PNA nochmals gesteigert. Einzelne Fehlpaarungen können zu einem Abfall der Schmelztemperatur von bis zu 30°C führen, was als Hinweis auf einen zweifachen Erkennungsprozess gewertet wurde.[193]

6.1.4 Reine PNA-Paarungskomplexe

Komplementäre PNA-Sequenzen, die alle vier Nucleobasen enthalten, bilden thermisch sehr stabile Paarungskomplexe mit einer hohen Sequenzspezifität.[204] Genau wie in PNA-DNA-Duplexen ist die antiparallele Anordnung bevorzugt. CD-spektroskopische Untersuchungen sprechen für eine helikale Struktur, wobei die Händigkeit der Helix durch die Wahl einer optional einzuführenden, terminalen Aminosäure bestimmt werden kann.

In jüngerer Zeit konnte auch die Bildung eines PNA-PNA-PNA Triplexes beobachtet werden.[205]

6.2 Biologische Eigenschaften und Anwendungen von PNA

Untersuchungen der PNA mit biologischem Hintergrund waren lange Zeit stark in Richtung potentieller Anwendungen als *Antisense*- oder *Antigene*-therapeutikum orientiert. Im Zuge dieser Experimente wurden, zur Verbesserung von Löslichkeits- und Bindungsverhalten, auch eine große Anzahl von PNA-Analoga hergestellt und untersucht, von denen aber nur wenige größere Bedeutung erlangt haben. Erst in jüngerer Zeit hat sich der Schwerpunkt der Zielsetzungen von direkten therapeutischen mehr zu diagnostischen Anwendungen verlagert

Schon kurz nach Entdeckung der PNA wurden erste grundlegende Untersuchungen ihres Verhaltens in biologischen Systemen durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass trotz der peptidähnlichen Struktur ein Abbau durch Peptidasen kaum stattfindet und PNA so über eine außergewöhnliche Serumstabilität verfügt.[188,206] Ein großes Problem, vor allem im Hinblick auf die Anwendung der PNA als *Antisense*- und *Antigene*-Therapeutikum stellt die fast nicht vorhandene Fähigkeit der PNA zur Penetration der Zellmembranen dar.[175,176,207] Zwar kann für entsprechende Experimente mit Hilfe von Mikroinjektion[208-210] oder Membranpermeabilisierung durch Zugabe von Detergentien[211,212] eine geeignete intrazelluläre Konzentration erreicht werden, normalerweise wird PNA jedoch durch einen Endocytosemechanismus in die Zelle gebracht, der eine gezielte Anwendung unmöglich macht.

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnten die molekularbiologischen Eigenschaften von PNA untersucht werden. So wurden für die Inhibierung der Genexpression erwartungsgemäß zwei Mechanismen festgestellt. Einerseits kann die Translation durch Hybridisierung der *mRNA* unterbunden werden (*Antisense*-Ansatz). Dieser Effekt ist allerdings hauptsächlich auf eine Blockierung der RNA-Matrize zurückzuführen (sterischer Blocker) und nicht wie in der *Antisense*-Technik gewünscht, auf die Aktivierung der RNase H^a. [186] Weiterhin ist das therapeutische

^a RNase H ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das in der Lage ist, RNA-Stränge in doppelhelikalen Oligonucleotiden zu erkennen und zu spalten. Ihre zentrale Bedeutung im *Antisense*-Ansatz besteht darin, dass durch den Abbau der komplexierten *mRNA* der zweite Strang für eine neue Komplexierung zur Verfügung steht und der Kreislauf neu durchlaufen werden kann. Auf diese Weise wird eine katalytische Aktivität des *Antisense*-Stranges erreicht.

Konzentrationsfenster von PNA sehr eng, da bereits unterhalb einer PNA-Konzentration von 0.5 μmol (*in vitro* werden Werte von ca. 100 nM erreicht) keine Translationshemmung mehr detektierbar ist, aber schon ab einer Konzentration von 5 μmol unspezifische Expressionshemmung eintritt.[208] Auf der anderen Seite ist es möglich, die Genexpression auf der Stufe der Transkription durch irreversible und sequenzspezifische Triplexbildung zu unterbrechen (*Antigene-Ansatz*). In den ersten Arbeiten auf diesem Gebiet wurden Homopyrimidin-PNA-Oligomere verwendet um Zielsequenzen auf dem Templatstrang zu blockieren (Abb. 6.4).[174,209,213] Dabei kommt es zu einer effizienten Blockade der Transkription. Interessanterweise resultiert ein gegenteiliger Effekt, wenn der PNA-DNA-Komplex auf dem nicht-Templatstrang entsteht. Es kommt zu einer Aktivierung der Transkription, da der DNA-Duplex aufgebrochen und der Templatstrang freiliegt, der dann durch RNA-Polymerasen erkannt wird. Dadurch wird der Transkriptionsvorgang initiiert. Solche PNA-Zielstrukturen können als künstliche Promotoren betrachtet werden (Abb. 6.4).[214]

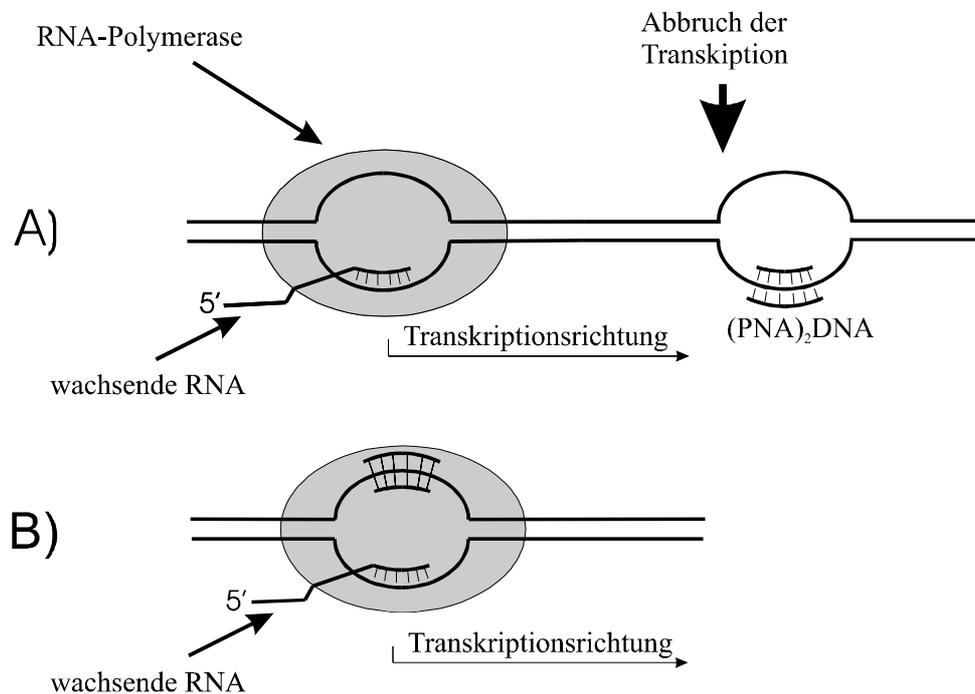


Abb. 6.4: Inhibition (A) bzw. Aktivierung (B) der Transkription durch Komplexbildung von dsDNA mit PNA.

Nach diesem Konzept konnte auch eine Inhibition der Genreplikation erzielt werden.

Die Tendenz der Anwendung der PNA geht seit einiger Zeit weg von der medizinischen Anwendung und mehr in Richtung Diagnostik und Verwendung als Werkzeug in der Biotechnologie. Ihre besondere Eignung gründet sich dabei in erster Linie auf ihre hohe Sensibilität gegenüber *mismatch*-Basenpaarungen, der Tendenz zur Strangverdrängung und der fehlenden Ladung des Rückgrats. So eignet sich PNA sehr gut zur Detektion von Krankheitsgenen oder Mutationen.[220] Das PCR-Clamping zum Nachweis von Punktmutationen beruht einerseits auf der stärkeren Hybridisierungstendenz von PNA gegenüber Oligonucleotiden, andererseits auf der Tatsache, dass PNA-Sequenzen nicht als Primer fungieren können.[221] Mit dieser Technik kann z. B. bei der Vervielfältigung zwischen zwei allelen Genabschnitten unterschieden werden.[222] Ein weiteres Anwendungsbeispiel stellt die Verwendung oberflächengebundener PNA als sequenzspezifischer DNA-Biosensoren dar.[223-225] Ein anderer Anwendungsbereich von PNA wurde in der Biochemie erschlossen, da auch hier die einzigartigen Hybridisierungseigenschaften vorteilhaft eingesetzt werden können. Interessante Beispiele finden sich v. a. beim Einsatz in der Modulation von Enzymreaktionen. So kann z. B. der bei der Strangverdrängung freigesetzte DNA-Strang selektiv durch Nuclease S1 gespalten werden.[197] Wenn zwei PNA-Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden wird aus der einzelstrangspezifischen Nuclease S1 ein künstliches Restriktionsenzym (also ein doppelstrangspaltendes Enzym), deren Sequenzspezifität durch die Wahl der PNA-Oligomere bestimmt wird (Abb. 6.6).[226]

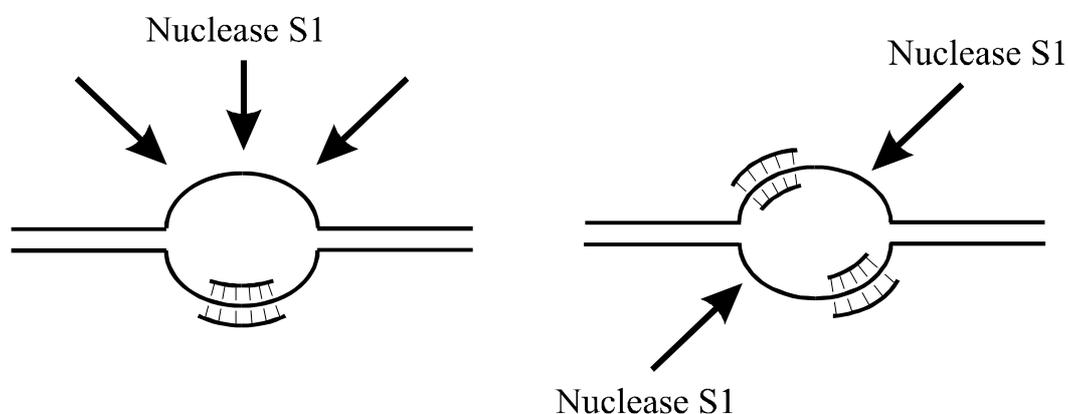


Abb. 6.6: Einzelstrang- und Doppelstrangspaltung mit Hilfe von PNA-Oligomeren.

Durch Blockierung der Erkennungssequenzen kann umgekehrt auch dsDNA vor der Spaltung durch Restriktionsenzyme geschützt werden. Weiterhin konnten durch den Einbau von PNA-Hilfssequenzen Ribozymaktivitäten gesteigert werden.[227] Andere Anwendungsmöglichkeiten sind z. B. die sequenzspezifische Reinigung von Oligonucleotiden[228] oder die Verwendung zur Isolierung aktiver Gene.[229]

6.3 Synthese von PNA

Für die Synthese der konventionellen PNA-Monomeren wurden aufgrund ihrer relativ einfachen Struktur ohne Chiralitätszentren verschiedene Synthesewege vorgeschlagen. Sie gliedern sich meist in folgende Schritte: Synthese des entsprechend geschützten Aminoethylglycin-Rückgrates, Herstellung des Nucleobasen-Essigsäure-Konjugats, Kupplung der beiden Fragmente und Einführung der gewünschten Schutzgruppe am N-Terminus.

Zur Darstellung des Aminoethylglycin-Rückgrates existieren grundsätzlich drei verschiedene und gut ausgearbeitete Methoden (Abb. 6.7).

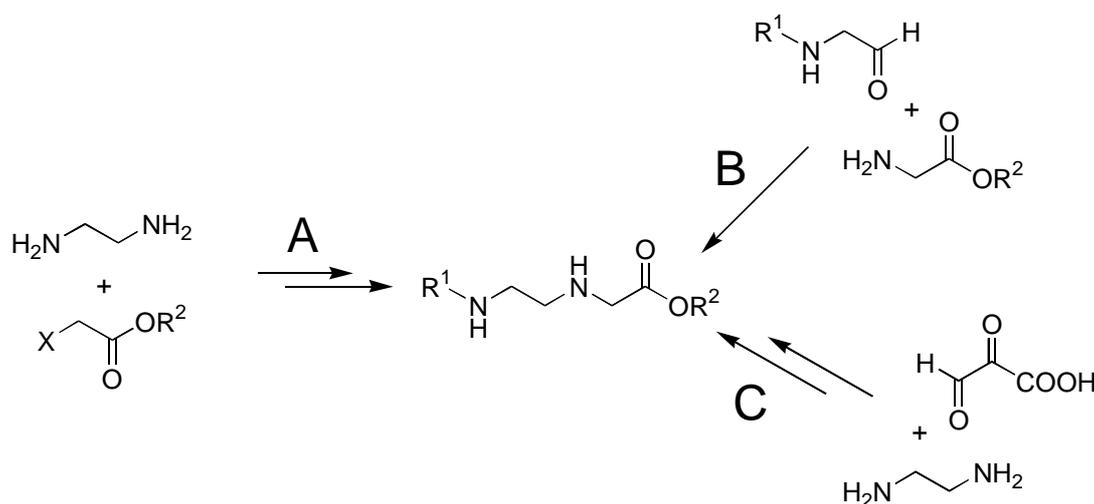


Abb. 6.7: Synthese von Aminoethylglycin-Derivaten über verschiedene Routen: (A) Alkylierung von Ethylendiaminderivaten mit α -Halogenessigsäureestern,[230-233] (B) Reduktive Aminierung eines Glycinesters mit einem adäquat geschützten 2-

Aminoacetaldehyd;[234,235] (C) *Reduktive Aminierung von Glyoxalsäure mit Ethylendiamin und anschließendem Schutz der reaktiven Funktionalitäten*. [236,237]

Die Herstellung der Nucleobasen-Essigsäure-Fragmente verläuft im Fall der Pyrimidinbasen ohne große Probleme. Für Thymidin und Uracil sind im weiteren Verlauf der Oligomersynthese keine Schutzgruppen nötig. Hier ist nach Alkylierung mit Halogenessigsäureestern und anschließender Esterspaltung ohne Umwege die gewünschte Einheit zugänglich.[171,238,239] Im Fall von Cytosin muss vor der Alkylierung[231,236,237,239] die exocyclische Aminogruppe geschützt werden. Häufig verwendet werden die Benzyloxycarbonyl-[170,231,239] die Monomethoxytrityl-[236] aber auch die in der Nucleinsäurechemie gängigen und deshalb auch zur Herstellung von PNA-DNA-Chimären kompatiblen Benzoylfunktionalitäten (z. B. 4-tert.-Butylbenzoyl- und Anisoylreste).[233,237].

Die Herstellung der Essigsäurekonjugate der Purinbasen ist teilweise mit größeren Schwierigkeiten behaftet. Bei Adenin ist es möglich, die Reihenfolge der Schritte (Schutz der exocyclischen Aminofunktion mit der Monomethoxytrityl-, [236] der Benzyloxycarbonyl-[231,240] oder verschiedenen Benzoylgruppen[237] und Alkylierung) zu vertauschen, ohne Probleme bei der Alkylierung in Kauf nehmen zu müssen. Erst im Fall des Guanins kommt es aus Chemoselektivitäts- und Löslichkeitsgründen zu erheblichen Schwierigkeiten, die meist nur mit großem synthetischem Aufwand gelöst werden können.[186]. [231,233,236,237,239,241]

Die Kupplung der Fragmente (Nucleobasenessigsäure und geschützte Aminoethylglycineinheit) wird in der Regel durch in der Peptidchemie gängige Kupplungsreagenzien (DCC[242], PyBrop[243], HATU, TOTU[244]) bewerkstelligt, wobei allerdings meist nur mässige Ausbeuten (unter 70 %) erreicht werden.

Üblicherweise wird die Monomersynthese durch die Esterspaltung und die Einführung der für die Oligomersynthese passenden *N*-terminalen Schutzgruppe (meist Boc, MMTr oder Fmoc) abgeschlossen. Diese Schritte erfolgen meist mit Standardtechniken.

Der Aufbau der PNA-Oligomeren erfolgt im meist durch den Einsatz normaler, aus der Peptidchemie bekannter Methoden, unter Verwendung der bekannten Schutzgruppenstrategien (Boc[168,170,239] oder Fmoc[171,231,239]). In jüngerer Zeit

wurde, v. a. zur Synthese von PNA/DNA-Hybriden wegen der Kompatibilität zur Methodik der Oligonucleotidsynthese, die Monomethoxytritylgruppe als *N*-terminale Schutzgruppe etabliert. Die im Vergleich zur Boc-Strategie mild sauren Abspaltungsbedingungen vermeiden dabei die Depurinierung der Nucleotide.[232,235,237,245-247] Zur Aktivierung werden meist die Kupplungsreagenzien HBTU, HATU oder PyBOP verwendet. Die wichtigste Nebenreaktion bei der Synthese der Oligomere ist die im neutralen und basischen stattfindende Wanderung der Nucleobasen-Essigsäure-Einheit des in der Sequenz letzten Monomeren von der sekundären Aminogruppe zur freien *N*-terminalen Aminofunktion.[248]

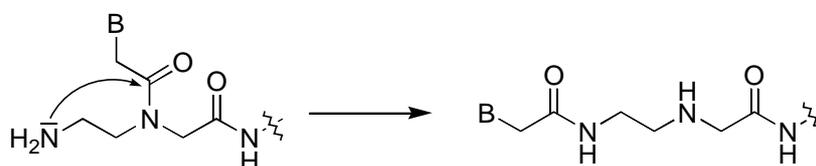


Abb. 6.8: Der Acyltransfer der in der Sequenz terminalen Einheit stellt die wichtigste Nebenreaktion dar.[248]

Die ungewöhnlichen Eigenschaften der PNA-Oligomere haben naturgemäß eine rege Forschungstätigkeit auf dem Gebiet der PNA-Analoga ausgelöst. Die Vielfalt der dabei verfolgten Zielsetzungen spiegelt sich in der großen Diversität der publizierten Strukturen wider.

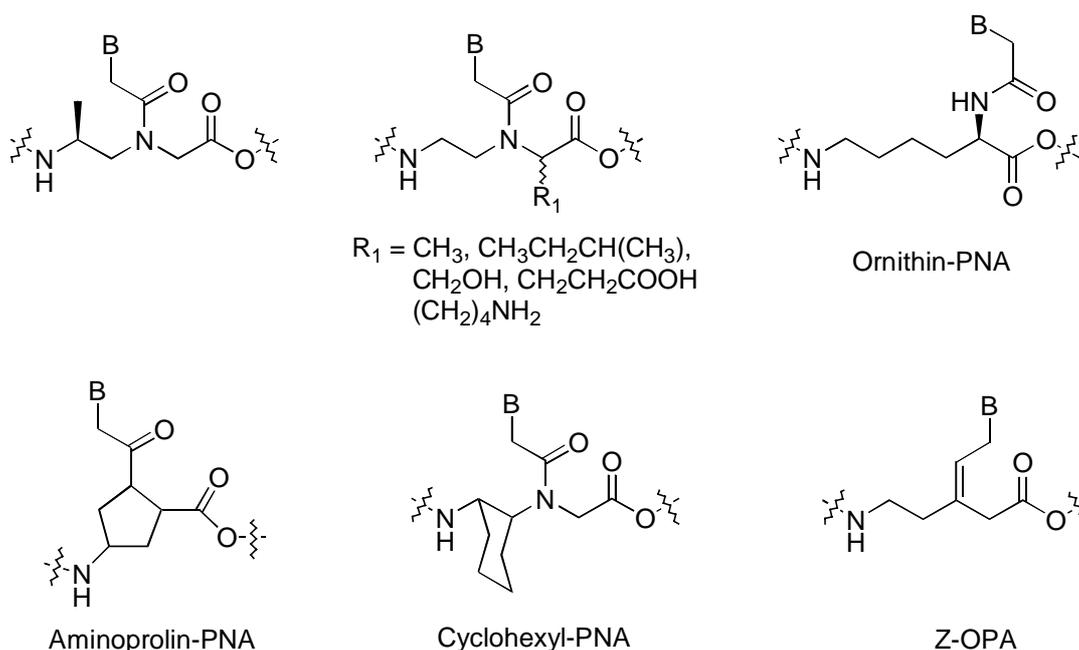


Abb. 6.9: Strukturen einiger PNA-Analoga.[205,249-261]

6.4 Struktur

Das Fehlen von Chiralitätszentren und elektrostatischer Ladungen in PNA erzwingt verglichen mit den entsprechenden reinen DNA- oder RNA-Komplexen geringere strukturelle Restriktionen. Das ungeladene Rückgrat ermöglicht vergleichsweise kurze Rückgrat-Rückgrat-Abstände. Darüber hinaus besitzt die achirale PNA keinen inhärent bevorzugten Helixdrehsinn. Konsequenterweise wird die Struktur von PNA-Oligonucleotidkomplexen weitestgehend durch den DNA- bzw. RNA-Strang bestimmt.

Bis heute wurden erst vier „PNA-Strukturen“ gelöst: PNA-RNA- und PNA-DNA-Duplexe wurden mit NMR-Techniken analysiert, die komplexere Struktur eines PNA₂-DNA-Triplexes wurde genau wie die eines PNA-PNA-Duplexes durch Kristallstrukturanalyse bestimmt.

6.4.1 Struktur von PNA-DNA-Duplexen

Die Lösungsstruktur antiparalleler PNA-DNA-Komplexe wurde anhand mehrerer Duplexe geklärt (Oktamer und Dekamer).[262,263] Überraschenderweise konnten die Strukturen allein anhand von COSY-, NOESY- und TOCSY-Experimenten gelöst werden. Danach handelt es sich, wie schon aus CD-spektroskopischen Untersuchungen bekannt,[172] um eine rechtsgängige Helix, die durch Watson-Crick-Basenpaarungen zustande kommt. Sie verfügt über eine, verglichen mit einer B-DNA-Doppelhelix, sehr breite und tiefe große sowie eine schmale und flache kleine Furche. Die primären Amidbindungen sind durchweg trans-konfiguriert, die Oxogruppen der Carboxymethyleinheiten zwischen dem Rückgrat und den Nucleobasen sind in C-terminaler Richtung orientiert. Die Ethylendiamineinheiten zeigen starke konformationelle Heterogenität. Es existieren keine Hinweise auf Wasserstoffbrücken zwischen Amid- und Carbonylgruppen des PNA-Rückgrates. Der DNA-Strang besitzt mit der überwiegenden C2'-endo-Konformation und der ausschließlichen anti-konfigurierten glykosidischen Anordnung sowohl Merkmale der B-DNA-Form als auch, mit der Übereinstimmung der meisten Torsionswinkel, Ähnlichkeit mit der A-Form (Abb. 6.10).

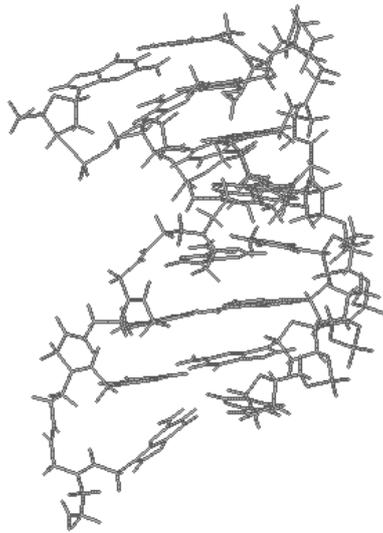


Abb. 6.10: Lösungsstruktur eines PNA-DNA-Duplexes.

6.4.2 Struktur von PNA-RNA-Duplexen

Auch die Lösungsstruktur eines antiparallelen PNA-RNA-Duplexes wurde mit NMR-Techniken aufgeklärt.[264] In der ebenfalls rechtsgängigen Doppelhelix, die wiederum durch Watson-Crick-Basenpaarung zustande kommt, überwiegt im Gegensatz zum PNA-DNA-Paarungskomplex bei weitem der A-Form-Charakter. Wiederum sind im PNA-Strang die Carbonylgruppen der Acetyl linker zwischen Rückgrat und Nucleobasen in Richtung des C-Terminus orientiert, die primären Amidbindungen liegen in trans-Konfiguration vor. Die Torsionswinkel der Ethylendiaminregion weisen auf eine syn-clinale Anordnung. Im Widerspruch zu im Vorfeld durchgeführten *molecular modelling* Studien[265,266] bilden die sekundären Amidprotonen des Rückgrates keine Wasserstoffbrücken aus. Der RNA-Strang liegt in seiner Konformation sehr nahe an der regulären A-Form, was die Zuckerfaltung (C3'-endo) und die glykosidischen Torsionswinkel betrifft (Abb. 6.11).

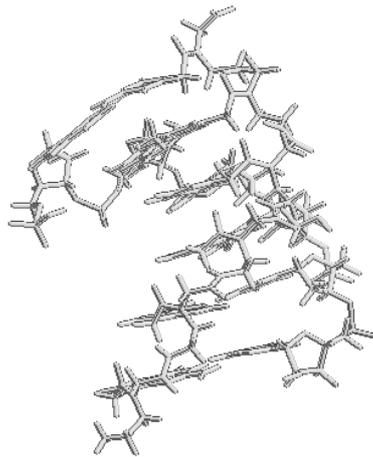


Abb. 6.11: Lösungsstruktur eines PNA-RNA-Duplexes.

6.4.2 PNA₂-DNA-Triplexe

Die Aufklärung der Kristallstruktur eines PNA₂-DNA-Komplexes durch Betts et al. hat große Aufmerksamkeit erregt.[203]

Die Triplexbildung kommt dabei durch die Watson-Crick-Paarung des DNA-Stranges mit einem antiparallelen und die Hoogsteen-Paarung mit einem parallelen PNA-Strang zustande. Obwohl die Kristallisation unter basischen Bedingungen (pH 8.5) durchgeführt wurde, liefert die durchgeführte Untersuchung deutliche Hinweise auf die Protonierung der Cytosin-N3-Position im Hoogsteen-Strang sowie auf eine Wasserstoffbrücke zu den Guanosin-N7-Positionen der DNA, was auf die Bildung regulärer Basentriplets hinweist. Die im Kristall beobachtete Struktur unterscheidet sich in vielen Punkten von tripelhelikalen reinen Oligonucleotidkomplexen und zeigt auch nur wenige Gemeinsamkeiten mit den bekannten A- und B-Formen der Doppelhelix. Man spricht in diesem Fall von einer „P-Helix“ mit 16 Basentriplets pro Windung.

Der DNA-Teil des Triplex zeigt, mit der C3'-endo-Konformation und den ähnlichen Torsionswinkeln, Merkmale sowohl der A- als auch, mit der fast senkrechten Orientierung der Basen zur Helixachse, der B-Helix. Die Struktur wird weiterhin stabilisiert durch ein Netzwerk von Wassermolekülen, die in der kleinen Furche gebunden sind und die die an der Watson-Crick-Paarung beteiligten PNA- und DNA-

Stränge verbinden. Ein auffälliges Merkmal bilden die Wasserstoffbrücken zwischen den Phosphatgruppen des DNA-Teils und den Amidprotonen des PNA-Rückgrates, die neben vielen hydrophoben Wechselwirkungen und der fehlenden elektrostatischen Abstossung der Hauptgrund für die außergewöhnliche thermische Stabilität von PNA₂-DNA-Tripelhelices darstellen (Abb. 6.12).

Die mit der Kristallstrukturanalyse gewonnenen Erkenntnisse decken sich mit denen aus Untersuchungen mittels optischer Spektroskopie (circularer und linearer Dichroismus), die neben dem rechtsgängigen Helixdrehsinn auf die senkrechte Orientierung der Basen zur Helixachse hinwiesen.[192] Die optischen Methoden deuten außerdem auf eine bemerkenswert hohe Rigidität der Helix, die wiederum auf eine sehr effiziente Basenstapelung schliessen lässt.

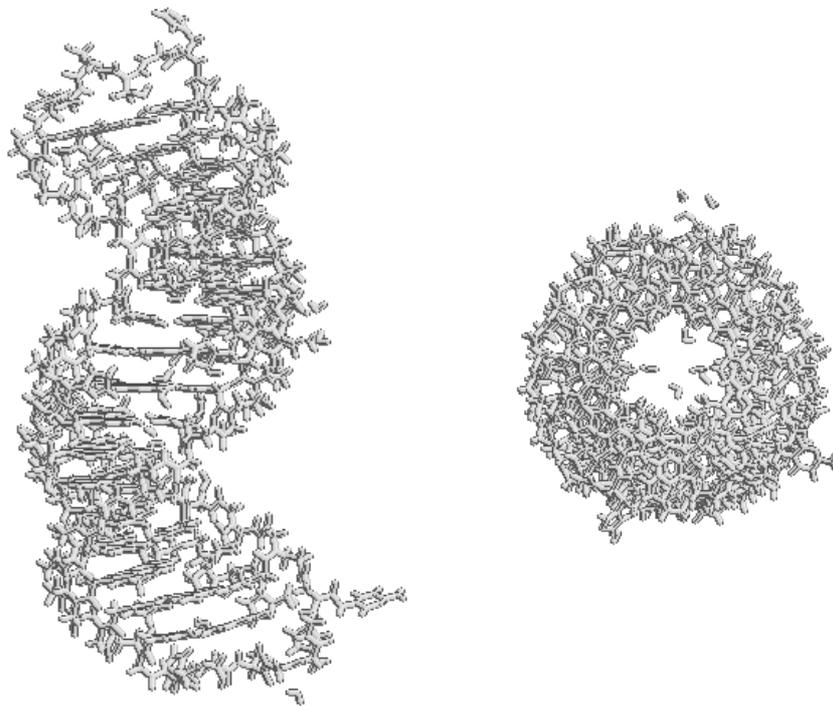


Abb. 6.12: Darstellung der Kristallstruktur einer PNA₂·DNA-Tripelhelix (Aufsicht entlang der Helixachse und Seitenansicht).

7 Synthese eines isotopenmarkierten PNA₂DNA-Triplexes für NMR-spektroskopische Untersuchungen

7.1 Projektbeschreibung

Das in dieser Arbeit bearbeitete Projekt besteht in der Synthese einer PNA₂-DNA-Tripelhelix mit dem Ziel der Strukturaufklärung unter Zuhilfenahme von NMR-Methoden. Beim Design des dafür erforderlichen Systems ergaben sich dabei zwei Probleme. Einerseits mußte eine Sequenz entworfen werden, die die nötige thermische Stabilität für die Messungen aufweist. Auf der anderen Seite ist bei der Untersuchung von PNA-Systemen (ähnlich wie im Fall von RNA) mit starken Signalüberlagerungen zu rechnen, was für die Länge der untersuchbaren PNA-Abschnitte einen bedeutenden limitierenden Faktor darstellt. Das eigens für die gegebene Problemstellung entworfene bis-PNA-System besteht aus zwei PNA-Hexameren, die über eine DNA-Sequenz verbunden sind (Abb. 7.1), um für eine zusätzliche entropische Stabilisierung zu sorgen und so die nötige thermische Stabilität zu erreichen. Entscheidender Vorteil des DNA-Linkers gegenüber anderen gebräuchlichen Systemen ist die deutliche Verbesserung der Löslichkeitseigenschaften, ein Faktor der vor allem bei NMR-Untersuchungen eine große Rolle spielt. Die Eigenschaften dieses Systems wurden von E. Lioy beschrieben.[267]

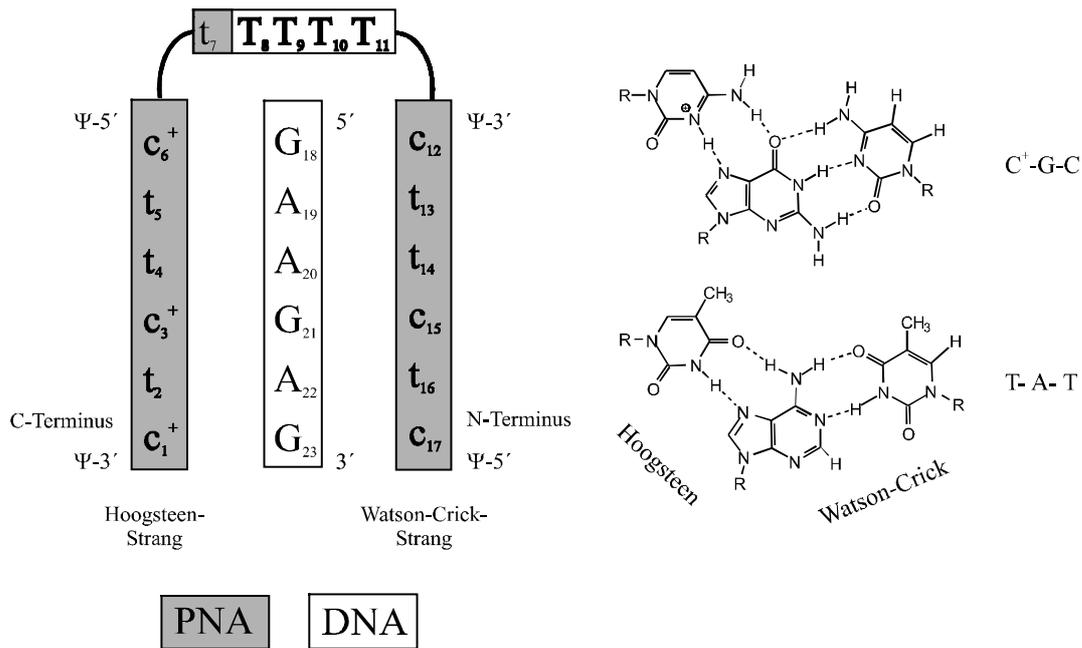


Abb. 7.1: Darstellung des untersuchten tripelhelikalen Systems.

Da die NMR-Untersuchung und die anschließende Berechnung der Struktur mit *molecular modelling* Methoden lediglich aufgrund von NOE-Abständen nicht möglich ist, muss die Möglichkeit Strukturdaten aus skalaren Kopplungen zu gewinnen, genutzt werden. Hierzu muss, ähnlich wie im Fall von längeren RNA-Sequenzen, mit isotopenmarkierten Substanzen gearbeitet werden. Deshalb wurde, in Analogie zu Arbeiten von Brown et al.[264] zur Strukturaufklärung der Lösungsstruktur eines PNADNA-Duplexes von E. Lioy zuerst eine Position (t_4) mit einem isotopenmarkierten Baustein besetzt, um erste Rückschlüsse zur Struktur des Triplexes zu gewinnen. Die mit Hilfe dieser Probe aufgenommenen Spektren zeigen die erwarteten Ergebnisse.

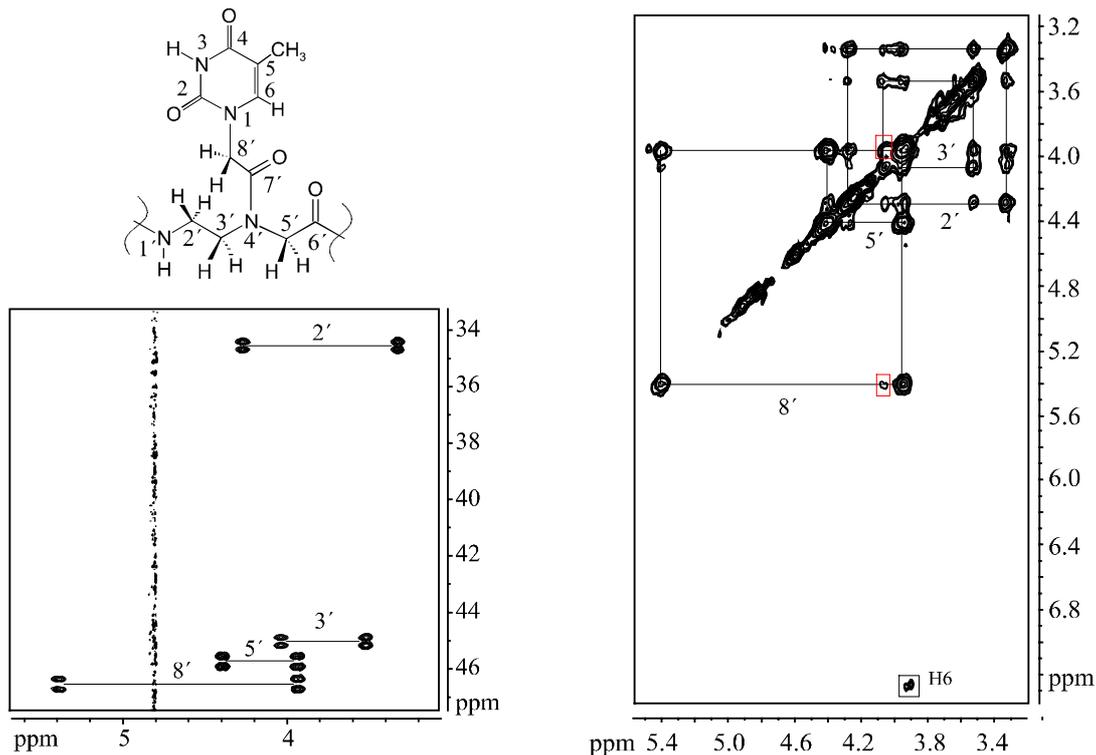


Abb. 7.2: ^{13}C -HSQC- und ^{13}C -gefiltertes NOESY-Spektrum der einfach markierten (PNA)₂DNA-Tripelhelix. Diese Experimente wurden gewählt, damit nur die Signale der isotoopenmarkierten Positionen sichtbar sind (die gezeigten Spektren wurden von M. Bachelin aufgenommen).

Das ^{13}C -HSQC-Spektrum enthält vier Signalgruppen: je eine pro ^{13}C -markierter Methylengruppe, was ein deutlicher Hinweis auf das Vorliegen einer Hauptkonformation ist. Damit ist die wichtigste Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Strukturaufklärung erfüllt. Auffällig ist das Auftreten einer relativ großen diastereotopen Aufspaltung der Methylenprotonen. Alle Signale sind zusätzlich durch $^1\text{J}_{\text{CC}}$ -Kopplungen aufgespalten (ca. 50 Hz für C5' und C8' und ca. 35 Hz für C2' und C3'). Im ^{13}C -gefilterten NOESY-Spektrum sind Kreuzsignale zwischen H8' und H3' sichtbar, was ein Beweis für die Z-Konfiguration der sekundären Amidbindung des isotoopenmarkierten Bausteines ist (ähnliche Verhältnisse liegen auch bei PNA/RNA- und PNA/DNA-Duplexen vor).

Obwohl diese Ergebnisse schon tiefgehende Einblicke in die Struktur der PNA-Sequenzen liefern können, sind weitere Experimente nötig, um die Struktur des gesamten Komplexes aufklären zu können. Im vorliegenden Fall sollten alle

Kohlenstoff- und Stickstoffatome des Rückgrates durch die NMR-aktiven Isotopen ^{13}C und ^{15}N ersetzt werden. Um die Gefahr der Uninterpretierbarkeit der Spektren aufgrund der starken zu erwartenden Signalüberlagerung gering zu halten, wurde die Sequenz zweimal hergestellt: einmal mit der Isotopenmarkierung im Rückgrat des Watson-Crick-Stranges und einmal im Hoogsteen-Strang.

Zur Komplexierung des dritten Stranges im Hoogsteen-Bindungsmodus ist die Protonierung der N3-Position der Cytosin-Basen notwendig, was nur in sauren Lösungen (üblicherweise pH 5-5.5) erfolgen kann. Obwohl mit dem sogenannten NOE-walk eine sehr zuverlässige Methode zur vollständigen Zuordnung der Signale im Amino- und Iminobereich der Spektren zur Verfügung steht, ist es in diesem pH-Bereich möglich, dass durch Austauschphänomene die Interpretierbarkeit gefährdet ist. Deshalb wurde im Vorgriff auf diese Probleme eine zusätzliche Sequenz hergestellt, bei der die Cytosinbasen des Hoogsteen-Stranges gegen die unnatürliche Nucleobase ψ -iso-Cytosin ersetzt wurden (Abb. 7.3). Die Eigenschaften dieses Oligomeren wurden mit denen des Ursprungssystems verglichen.

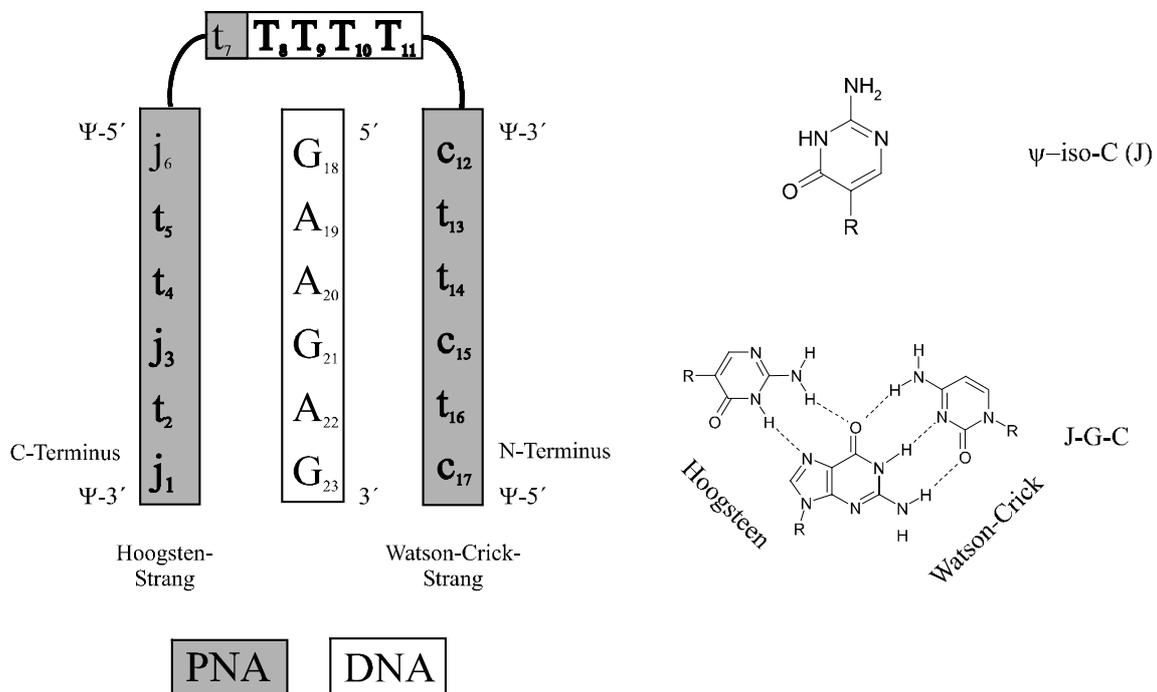


Abb. 7.3: Darstellung des tripelhelikalen Systems, bei dem Cytosin gegen ψ -iso-Cytosin ersetzt wurde.

7.2 Synthesen der PNA-Monomere

Zur Synthese der für den Einbau mittels Festphasenmethoden geeigneten PNA-Bausteine stehen mehrere zuverlässige Methoden zur Verfügung. Üblicherweise wird dabei eine konvergente Synthesestrategie angewendet, bei der zuerst die jeweils geschützte Aminoethylglycin- und die Nucleobasenessigsäureeinheit unabhängig voneinander hergestellt und dann gekuppelt werden. Die weiteren Schritte beschränken sich dann auf die Einführung der für die gewählte Festphasenstrategie nötigen Schutzgruppen.

7.2.1 Synthese des isoto­penmarkierten Cytosin-Monomeren

Die Synthese des isoto­penmarkierten PNA-Bausteins verlief in weiten Teilen im Rahmen bekannter Methoden. Aufgrund der kostenintensiven Isoto­penmarkierung lag der Schwerpunkt im Besonderen darauf, die verwendeten Strategien in Hinsicht auf preiswerte und zugängliche Edukte sowie möglichst hohe Gesamtausbeuten auszulegen. Aus dem gleichen Grund wurde auf die Optimierung jedes einzelnen Reaktionsschrittes großer Wert gelegt.

Bei der Auswahl der besten Synthesemethode gab es vor allem im Bereich der Herstellung des Rückgrates mehrere Alternativen:

1. Alkylierung von Ethylendiamin oder eines seiner einfach geschützten Derivate mit einer 2-Halogenessigsäure oder einem seiner Ester.
2. Reduktive Aminierung eines Glycinesters mit dem entsprechend geschützten 2-Aminoacetaldehyd. Für die Herstellung stehen verschiedene Routen mit leicht zugänglichen Ausgangsmaterialien zur Verfügung.
3. Reduktive Aminierung von Glyoxalsäure mit Ethylendiamin und anschließender Schutz der reaktiven Funktionalitäten.

Den Ausschlag zugunsten des zweiten angeführten Weges gab schliesslich die preiswerte Zugänglichkeit des Edukts. Beide Bausteine - der Glycinester wie auch der 2-Aminoacetaldehyd – sind aus dem verhältnismäßig günstig zu erwerbenden entsprechend isoto­penmarkierten Glycin **105** einfach herstellbar.

Entsprechend diesen Vorüberlegungen bestanden die ersten Schritte der Synthese die Darstellungen der Glycinderivate nach bekannten Methoden. Den Beginn der dreistufigen Sequenz zur Herstellung des 2-Aminoacetaldehyds stellte die quantitativ verlaufende Umsetzung des isotopenmarkierten Glycins **105** unter basischen Bedingungen mit Di-*tert.*-butyldicarbonat dar, gefolgt von der Reaktion des entstehenden Boc-Glycins **106** unter Aktivierung mit PPA mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin zum Weinrebamid **107** und dessen Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid zum Boc-geschützten 2-Aminoacetaldehyd **108**. [268] Die gesamte Reaktionsfolge konnte in einer Ausbeute von 93 % realisiert werden. Parallel dazu wurde durch Umsetzung von Glycin mit 2,2-Dimethoxypropan in quantitativer Ausbeute Glycinmethylester **109** hergestellt. [269] Den Abschluss der Herstellung der Boc-geschützten Aminoethylglycineinheit **110** bildet die reduktive Aminierung, bei der die beiden Glycinderivate in 85 % Ausbeute miteinander umgesetzt werden (Abb. 7.4).

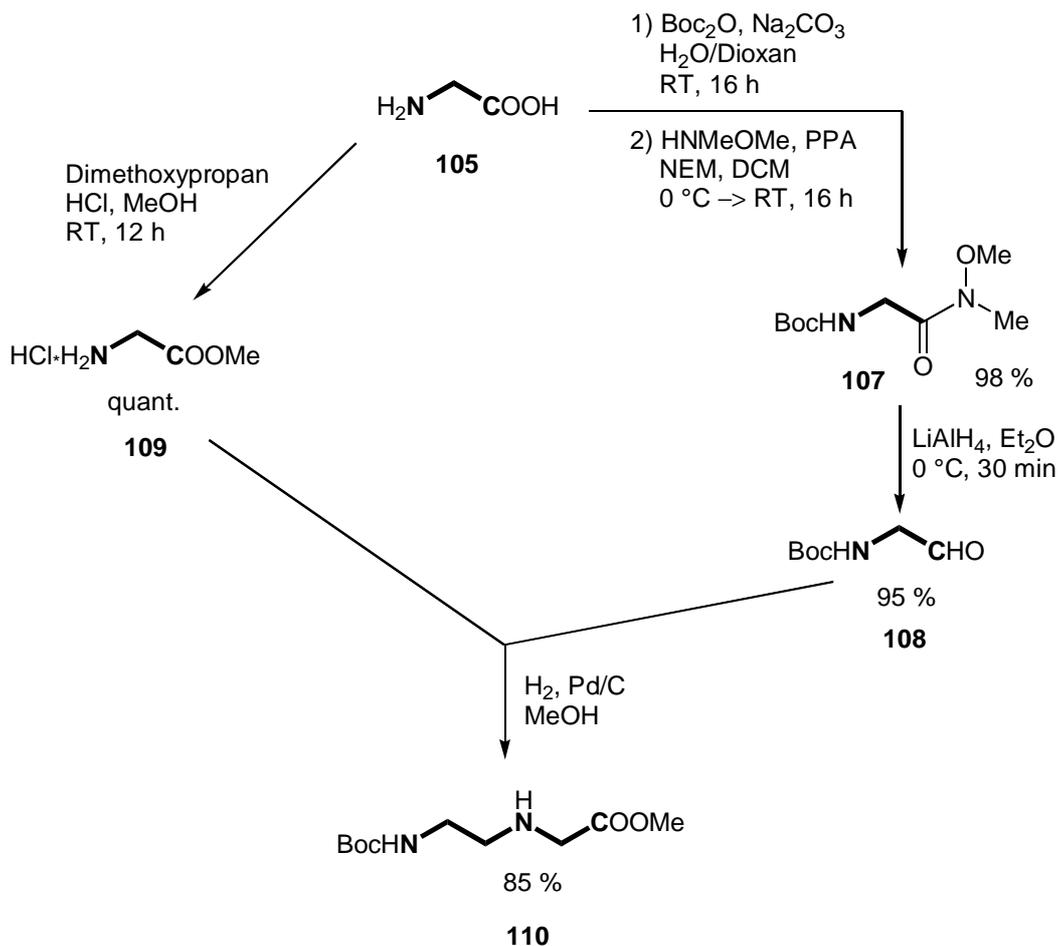


Abb. 7.4: Herstellung des isotopenmarkierten Aminoethylglycinerückgrates (die isotopenmarkierten Positionen sind fett gedruckt).

Die erste Stufe der Synthese der *tert.*-Butylbenzoyl-geschützten Cytosinessigsäureeinheit bestand in der Umsetzung von Cytosin mit *tert.*-Butylbenzoylchlorid (**111**), gefolgt von der Deprotonierung an N¹H mit Natriumhydrid und der Alkylierungsreaktion mit isotopenmarkiertem Bromessigsäureethylester (**112**). Die Esterspaltung mit Natriumhydroxid komplettiert die dreistufige Reaktionssequenz (**113**), die mit einer Gesamtausbeute von 71 % verlief.

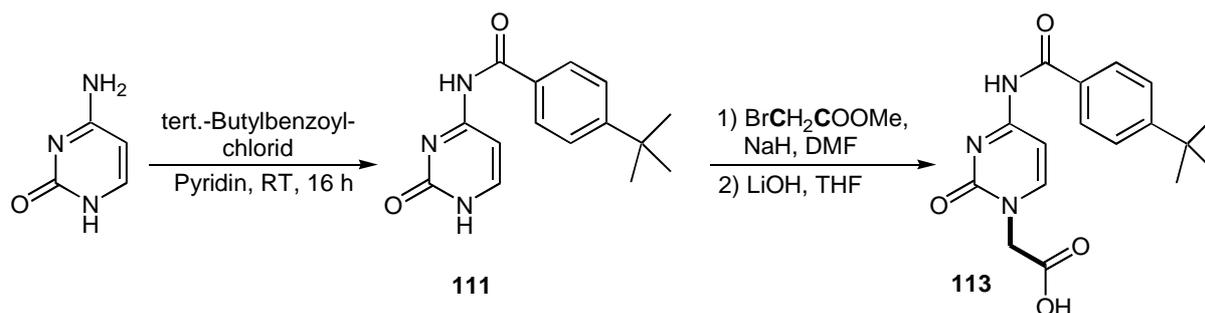


Abb. 7.5: Reaktionssequenz zur Herstellung der geschützten isotopenmarkierten Cytosinessigsäureeinheit **113** (die isotopenmarkierten Positionen sind fett gedruckt).

Die so hergestellten Untereinheiten des PNA-Monomeren können nun zur Herstellung der PNA-Grundstruktur gekuppelt werden. Vergleichende Versuche mit TBTU, HATU und PPA ergaben, dass PPA in diesem Fall als Kupplungsreagenz am besten geeignet ist. Die Reaktion zu **114** verläuft mit einer Ausbeute von 71 %, was nach Literaturvergleichen mit ähnlichen Umsetzungen an der oberen erreichbaren Grenze liegt.

Der weitere Verlauf der Synthese besteht in Schutzgruppenoperationen. Zuerst wird der Ethylester mit Lithiumhydroxid gespalten (**115**), danach die Boc-Schutzgruppe durch Behandlung mit TFA entfernt (**116**). Beide Umsetzungen verlaufen nach Optimierung, vor allem der Aufarbeitungsoperationen, quantitativ. Den letzten Schritt der Synthese stellt die Einführung des Monomethoxytritylschutzes an der freigesetzten Aminofunktion dar (**117**, Abb. 7.6).

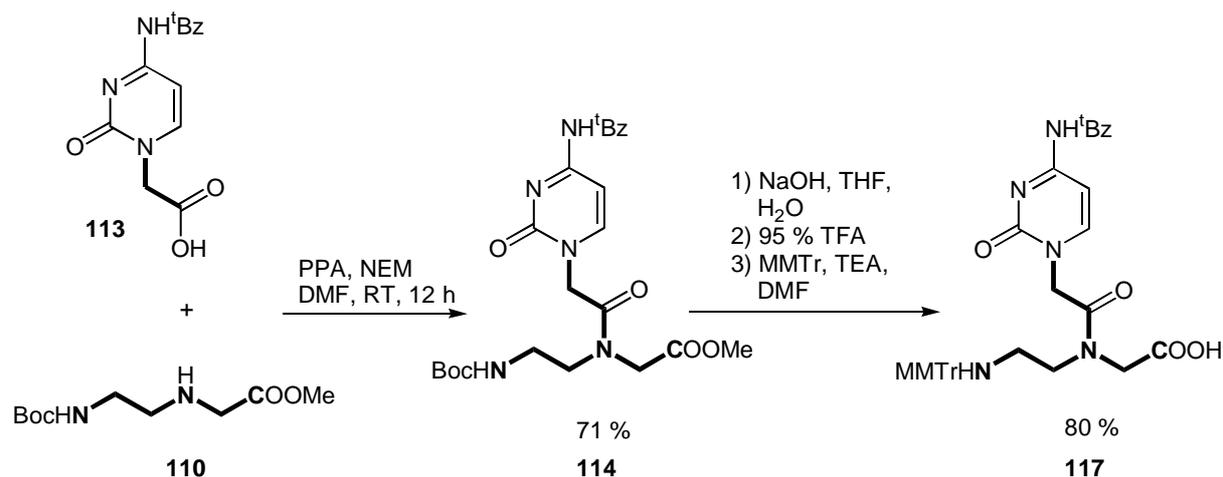


Abb. 7.6 : Abschliessende Schutzgruppenoperationen (die isotoopenmarkierten Positionen sind fett gedruckt).

7.2.2 Synthese des ψ -iso-Cytosin-Monomeren

Die Synthese des ψ -iso-Cytosin-Monomeren orientiert sich über weite Strecken an der von Egholm vorgestellten Methode.[193] Da aus den Vorversuchen zur Herstellung des isotoopenmarkierten Monomeren schon größere Mengen der Boc-geschützten Aminoethylglycinesterseinheit vorhanden waren, konnte auf seine Synthese verzichtet werden.

Am Beginn der Sequenz steht die Herstellung des heterocyclischen ψ -iso-Cytosin-Systems. Dazu wurde zuerst Bernsteinsäuredimethylester mit Ameisensäuremethylester formyliert und anschliessend mit Guanidinhydrochlorid die Ringbildung zum ψ -iso-Cytosin-Grundkörper **118** vollzogen. Da es im Verlauf der Aufarbeitung zum Verlust der Esterfunktionalität kommt, muß diese durch Umsetzung mit Dimethoxypropan und Salzsäure wiederhergestellt werden (**119**), bevor in Analogie zur Synthese des Cytosinmonomeren die *tert.*-Butylbenzoylschutzgruppe eingeführt werden kann (**120**). Den abschliessenden Schritt bildet die Esterspaltung, die den zur Kupplung an den Boc-geschützten Aminoethylglycinethylester fertigen Baustein **121** liefert (Abb. 7.7).

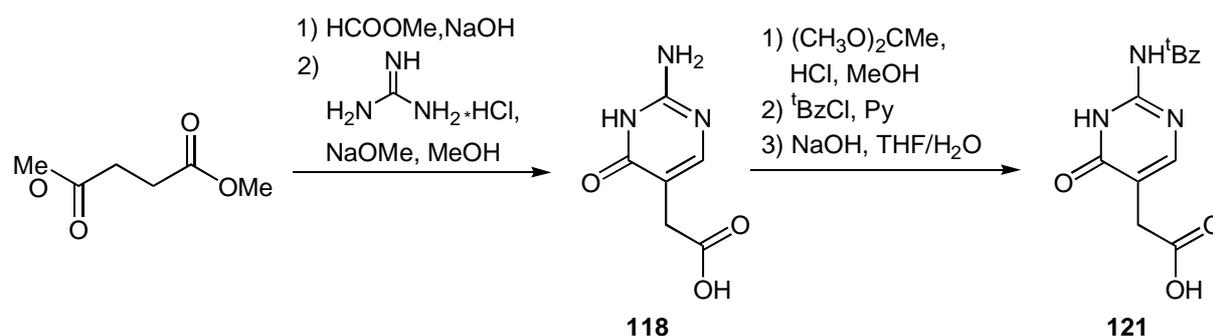


Abb. 7.7: Herstellung der ψ -iso-Cytosin-Essigsäureeinheit **121**.

Die weiteren Schritte verlaufen erwartungsgemäß wie im Fall des isotope-markierten Bausteins beschrieben. Das Kuppeln der Aminoethylglycin- **110** und der ψ -iso-Cytosin-Untereinheit **121** erfolgt hier allerdings mit HATU/HOAt in den besten Ausbeuten (**122**). Der Spaltung der Estergruppe des Aminoethylglycinrückgrates (**123**) folgt die Entfernung der Boc-Gruppe (**124**) und die Einführung der Monomethoxytritylfunktion (**125**, Abb. 7.8).

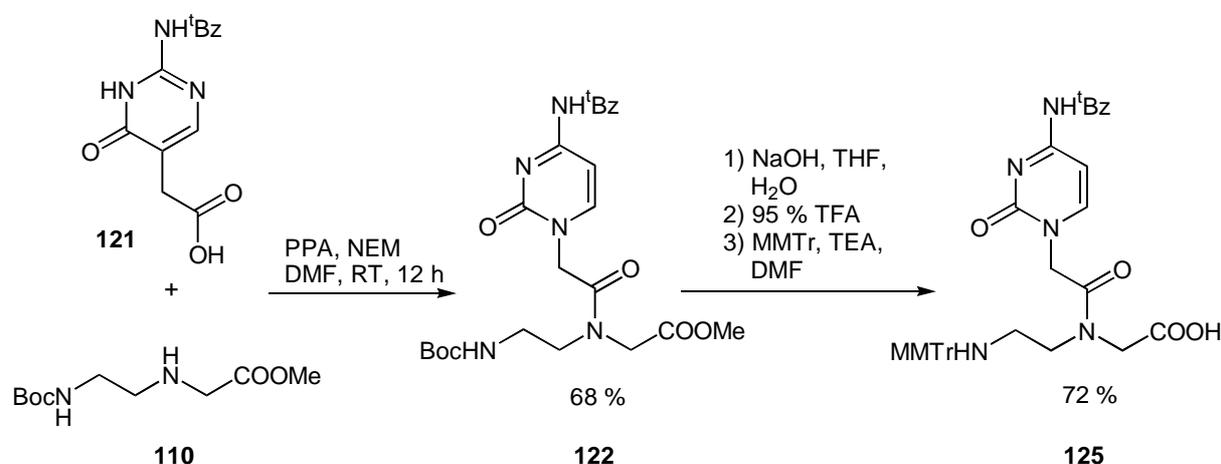


Abb. 7.8: Herstellung des fertigen ψ -iso-Cytosin-Monomeren **125**.

7.3 Synthesen der PNA-Oligomere

Die Synthese der oligomeren Strukturen erfolgte gemäss den in Kapitel X vorgestellten Strategien. Da es sich bei dem gewählten System um PNA-DNA-Chimären (Abb. 7.1 und 7.3) handelt, fand – um die schon im mäßig sauren Millieu

einsetzende Depurinierung der Nucleotide und den damit einhergehenden Strangbruch zu vermeiden – die eigens dafür entwickelte MMTr-Methode Anwendung, die eine Anpassung der Peptid- an die Oligonucleotidsynthese darstellt. Der sich in der Mitte der Sequenz befindende DNA-Teil wurde durch die konventionelle Phosphoramidit-Kupplung synthetisiert (Abb. 7.10).

Die problematischsten Kupplungen treten an den Übergängen zwischen den PNA-Sequenzen und der DNA-Spacereinheit auf. Deshalb wurden an diese Stellen die beiden Übergangsstücke 5'-Aminothymidin (PNA-DNA-Übergang) und N-(2-Thymidinylacetyl)-hydroxyethylglycin eingebaut, um den Wechsel zwischen den beiden Oligomerisierungsmethoden zu ermöglichen (Abb. 7.9).

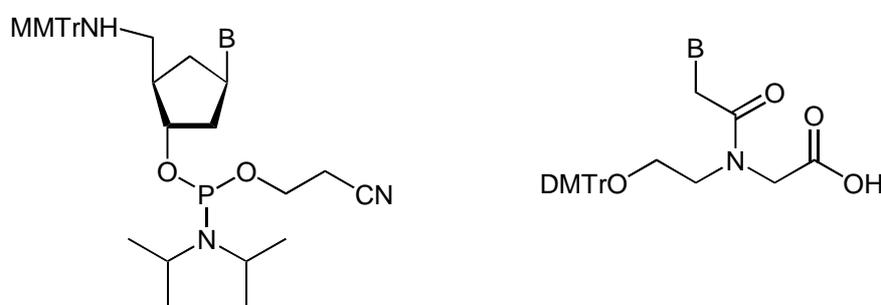


Abb. 7.9: Bausteine für die Übergangsbereiche von PNA-DNA-Chimären.

Da die Nucleobasen der PNA-, genau wie die der DNA-Monomere, mit basenlabilen Acylgruppen geschützt und die PNA-Sequenzen gegen die harten Abspaltbedingungen der DNA-Chemie inert sind, kann nach der Fertigstellung der Oligomeren an der Festphase, die Aufarbeitung nach konventionellen DNA-Protokollen erfolgen. Die Abspaltung vom CPG-Träger erfolgte simultan mit der Entfernung der Schutzgruppen (Acylgruppen der Nucleobasen und Cyanoethylgruppe des Phosphatrestes) durch Umsetzung mit konz. Ammoniaklösung bei 55° C (Abb. 7.10).

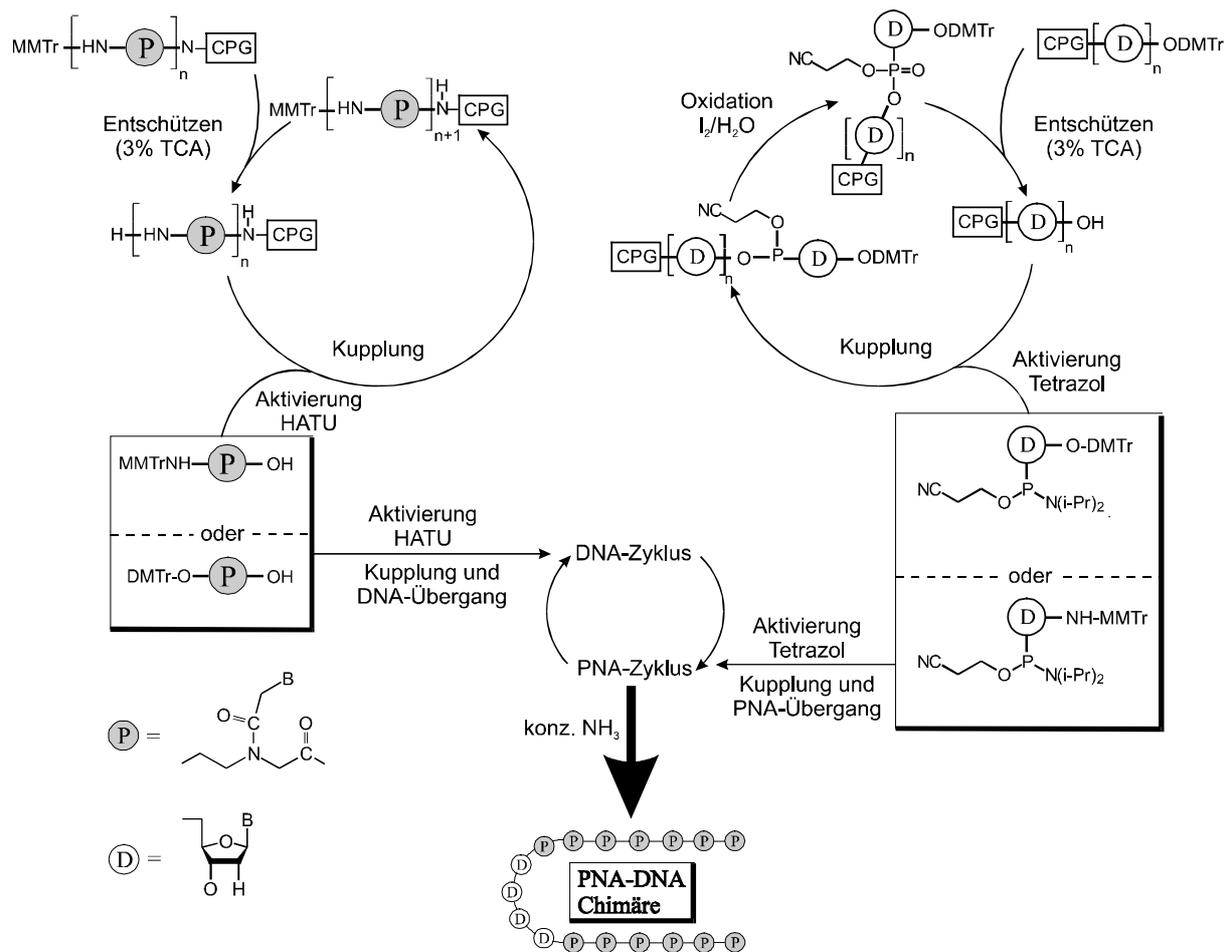


Abb. 7.10: Synthesestrategie der PNA-DNA-Chimäre (links ist der PNA-Cyclus, rechts der DNA-Cyclus gezeigt).

Die gesamten Oligomersynthesen wurden in der Gruppe um E. Uhlmann an einem entsprechend modifizierten DNA-Synthesizer durchgeführt.

7.4 Präparation der Proben für die NMR-Untersuchung

Die vorgestellte PNA₂-DNA-Tripelhelix eignet sich aus zwei Gründen für die NMR-spektroskopische Untersuchung. Zum einen ist das System ausreichend thermisch stabil für die Experimente, zum anderen ist es klein genug, um trotz der zu erwartenden schweren Signalüberlagerungen noch für Kernresonanzspektroskopie erreichbar zu sein.

Vorraussetzung für die NMR-technische Untersuchung des Triplexes ist die einwandfreie Probenvorbereitung, d. h. das exakte stöchiometrische Verhältnis des PNA-Stranges zur komplementären DNA von 1:1. Das einfache Zusammenmischen der entsprechenden Mengen der beiden Oligomere scheitert jedoch, da im Fall der PNA die genaue UV-spektroskopische Stoffmengenbestimmung nicht möglich ist. DNA kann durch UV-Messungen relativ genau quantifiziert werden, da sowohl die Extinktionskoeffizienten der Monomere, als auch die Zusammenhänge zwischen diesen und den Extinktionskoeffizienten der Oligomere mathematisch erfasst sind. Bei PNA und auch PNA-DNA-Oligomeren ist dies nicht möglich, so dass durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) die Stoffmenge lediglich abgeschätzt werden kann.

Die NMR-Spektroskopie bietet hier einen Ausweg. Da die Triplexbildung bei den gewählten Bedingungen ein schneller Prozeß ist, kann die PNA-Probe durch sukzessive Zugabe kleiner Mengen der komplementären DNA und anschließende Aufnahme entsprechender zweidimensionaler Spektren, am besten geeignet ist in diesem Fall (im PNA-Teil ¹⁵N-markierte Probe, unmarkierte DNA) das ¹⁵N-HSQC-Experiment, titriert werden. Sobald der vollständige Übergang von einem Signalsatz in einen anderen abgeschlossen ist, ist die Titration beendet. Die Kontrolle der Qualität der Titration erfolgt durch die Aufnahme eines ¹³C-HSQC-Spektrums (Abb. 7.11)

7.5 Untersuchung der Paarungseigenschaften der ψ -iso-Cytosin haltigen Sequenz

Zur Prüfung, ob sich das ψ -iso-Cytosin-haltige Oligomere wie geplant als Referenzsystem zur Zuordnung der Basenregion der NMR-Spektren eignet, stand als wichtigste Methode die UV-spektrometrische Untersuchung der Paarungseigenschaften der Sequenz zur Verfügung. Dabei kann in einfacher Weise die Bindungsstöchiometrie sowie die Schmelztemperatur des entstandenen Paarungskomplexes bestimmt und mit den Werten des Ursprungssystems verglichen werden. Idealerweise sollten diese Parameter einerseits denen des ausschliesslich Cytosin enthaltenden

Monomeren entsprechen und außerdem einen für die NMR-spektroskopische Untersuchung sinnvollen Wert aufweisen.

Für die UV-Titration werden kleine Mengen der komplementären DNA zur vorgelegten Lösung des PNA-Oligomeren zugegeben. Die Absorption wird bei 260 nm bestimmt. Der Äquivalenzpunkt ist bei Erreichen des minimalen Wertes erreicht^{a)}. Als Schmelztemperatur ergab mit 49.5 °C ein Wert, die im Vergleich mit der Ausgangssequenz (67.5 °C, die Schmelztemperatur der reinen DNA-Komplexes liegt bei 28.5 °C) überraschend niedrig liegt, jedoch in einem Temperaturbereich der die NMR-Analyse des Komplexes zulässt (Abb. 7.12).

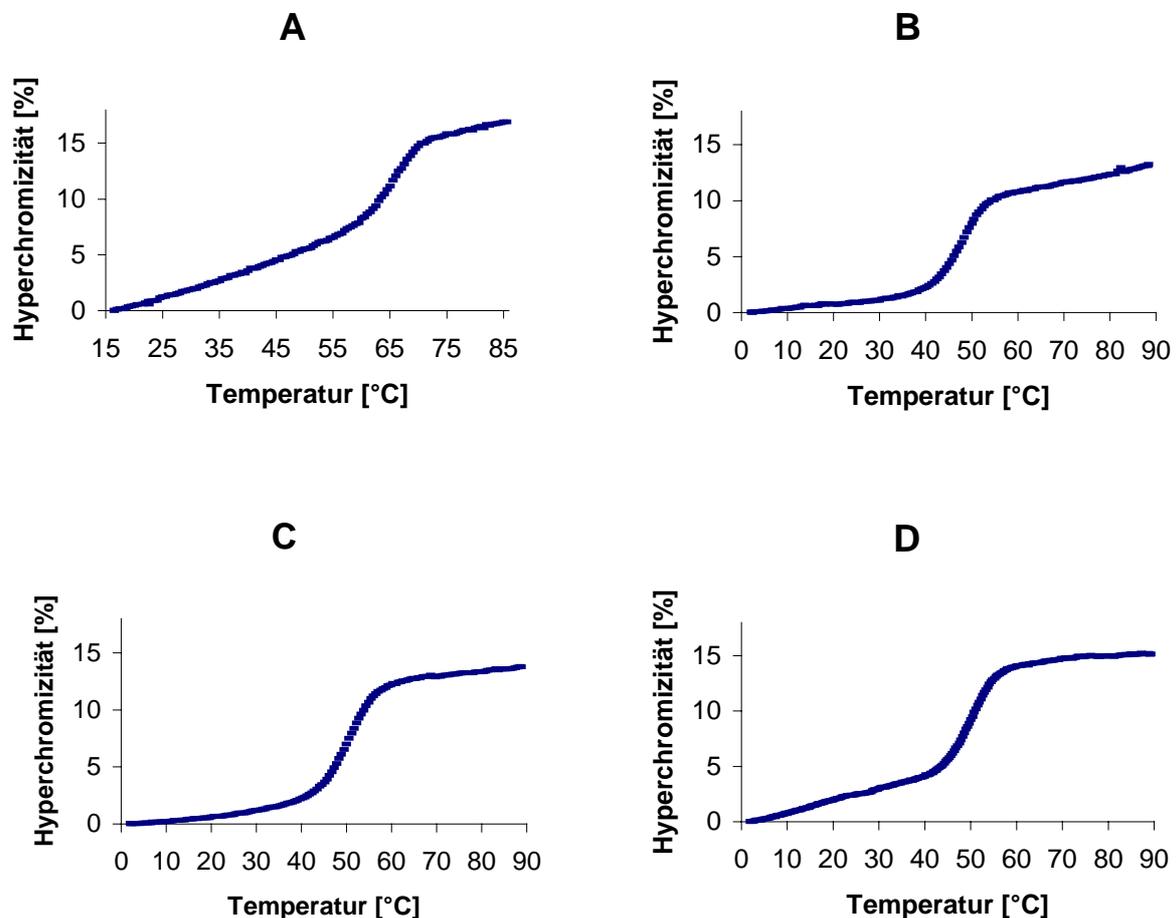


Abb. 7.12: Schmelzkurven der Ausgangssequenz (A), und des ψ -iso-Cytosin-haltigen Oligomeren (B, C und D). Die Kurven A und B wurden bei identischen Bedingungen

^{a)} Im ungepaarten Zustand weisen Nucleobasen-haltige Oligomere die höchste Absorption auf. Sobald komplementäre Sequenzen zugegeben werden, tritt Basenpaarung und damit einhergehend auch Basenstapelung auf. Sobald der minimale Wert der Absorption erreicht ist, ist die Titration abgeschlossen, da im vollständig gepaarten Zustand das Höchstmass an Stapelung vorliegt. Auf diesem Umstand beruht auch die temperaturabhängige Beobachtung der Absorption zur Bestimmung der Schmelztemperatur. Beobachtet wird im Grunde die Entstapelung der Basen.

(10 mM Phosphatpuffer, pH 7) aufgenommen, die Kurven C (10 mM Phosphatpuffer, 100 mM NaCl, pH 7) und D (10 mM Phosphatpuffer, pH 5) zeigen die erwartete Invarianz von T_m der modifizierten Sequenz gegen Salzzugabe und pH-Änderungen. Für alle Bedingungen konnte beim Abkühlen die für PNA typische Hysterese beobachtet werden (nicht gezeigt). Die Beobachtung, dass die Hysterese relativ flach verläuft, was für bis-PNAs wegen der entropischen Favorisierung normal ist, ist ein Indiz für das Auftreten des gewünschten tripelhelikalen Komplexes. Das Ansteigen der Kurven nach Beendigung des Schmelzvorganges ist auf Verdampfungseffekte zurückzuführen.

Der Grund für das unerwartet starke Absinken der Schmelztemperatur des ψ -iso-Cytosin-haltigen Oligomeren ist nicht völlig geklärt. Egholm et al. erhielten in einem analogen Paarungssystem (bis-PNA aus zwei heptameren PNA-Sequenzen mit zwei ψ -iso-Cytosin-Basen im Hoogsteen-Strang) einen Stabilitätsabfall des Triplexes von 3-4 °C pro modifizierter Base.[193] Der Grund für die Abweichung kann sowohl in der kürzeren Sequenz gesehen werden, bei der sich die Destabilisierung durch die unnatürlichen Basen stärker auswirkt, als auch in dem höheren Anteil des ψ -iso-Cytosins im Hoogsteen-Strang (3 von 6 im Vergleich zu 2 von 7). Ein anderer Erklärungsansatz liegt in der Tatsache, dass Stapelungswechselwirkungen immer auch sequenzabhängig sind.[270] Im Vergleich zu dem von Egholm untersuchten System, bei dem sich die Positionen des ψ -iso-Cytosins im Inneren der Hoogsteen-Sequenz befinden, liegen zwei der drei im Strang befindlichen ψ -iso-Cytosin-Basen am jeweiligen Ende der Sequenz des Hoogsteen-Stranges, ein Umstand von dem anzunehmen ist, dass Konsequenzen bezüglich der Basenstapelung entstehen. Wahrscheinlich führt das Zusammenwirken aller dieser Faktoren zu dem beobachteten starken Abfall der Schmelztemperatur. Der allerdings immer noch recht hohe Wert bei einer Bindungsstöchiometrie von 1:1 ist jedoch ein Indiz für die Ausbildung des gewünschten Paarungskomplexes.

Die Aufnahme der Schmelzkurve mit Salzzusatz (C) ergibt erwartungsgemäss im Vergleich zu Kurve B (ohne Salzzusatz) einen identischen Verlauf. Diese Beobachtung entspricht anderen publizierten Daten der Triplexbildung von PNA mit

einzelsträngiger DNA. Eine Abhängigkeit von der Salzkonzentration wird ausschließlich im Falle der Komplexierung mit dsDNA beobachtet.

Weiterreichende Schlüsse können aus der Invarianz der Schmelztemperatur gegenüber pH-Änderungen gezogen werden. Während im Falle der Ursprungssequenz Triplexbildung aufgrund der notwendigen Protonierung der Cytosinbasen nur im Sauren (pH 5-5.5) stattfinden kann, sollte die Substitution von Cytosin im Hoogsteen-Strang gegen ψ -iso-Cytosin die pH-Abhängigkeit eliminieren. Dieses Verhalten wird auch im Experiment beobachtet. Der Umstand, daß im Sauren der gleiche Wert für die Schmelztemperatur gemessen wird, läßt den Schluß zu, daß es sich bei beiden Messungen (pH 7 und 5.5) um den gleichen Paarungskomplex handelt. Da im Neutralen nur eine Möglichkeit der Strangorientierung möglich ist (antiparalleler Watson-Crick- und paralleler Hoogsteen-Strang; da ψ -iso-Cytosin über eine veränderte H-Brücken-Charakteristik verfügt, ist eine Erkennung nur im Hoogsteen-Modus möglich) ist die Folgerung zulässig, dass es sich bei allen Bedingungen um die gewünschte tripelhelikale Struktur handelt. Damit und mit der Bestimmung einer Schmelztemperatur von 49.5 °C, die für NMR-Untersuchungen ausreichend ist, ist der Beweis erbracht, dass sich die mit ψ -iso-Cytosin variierte Sequenz als Hilfssystem bei eventuellen, durch pH-induzierte Austauschphänomene entstehenden Schwierigkeiten der Zuordnung der austauschbaren Basenprotonen eignet.

8 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese von Biopolymerhybriden der Zuckeraminosäuren und der Peptidnukleinsäuren. Die Aufgabenstellung bestand jeweils in der Entwicklung neuer Bausteine zur Beantwortung spezieller Fragestellungen.

Auf dem Gebiet der Zuckeraminosäuren wurde der in unserem Arbeitskreis entwickelte „Baukasten“ der Zuckeraminosäuren erweitert. Die neuen Vertreter dieser Stoffklasse konnten für weiterführende Struktur-Wirkungs-Studien zu Somatostatin-Analogen und RGD-Peptiden erfolgreich eingebaut werden. Zu diesem Zweck wurden die Synthesewege für die selektiv funktionalisierbaren, festphasentauglichen SAA2-Derivate SAA2(4N) und SAA2(2N) erarbeitet und auf eine Durchführung für einen Einsatz in der Festphasensynthese optimiert.

Ausgangspunkt für die Synthese von SAA(4N) war Galactose, an der in einer vierstufigen Sequenz die anomere Aminomethyleneinheit eingeführt werden konnte. In den folgenden vier Schritten konnte die Differenzierung der axialständigen OH-Funktion von den beiden anderen sekundären Hydroxylgruppen auf effektive Weise erreicht werden, um die regioselektive Konversion in das Azid durchzuführen. Als Schlüsselschritt der Synthese erwies sich die Umwandlung der Azidogruppe in das Boc-geschützte Amin. Das Problem konnte durch die chemoselektive Reduktion mit Benzolselenol und die anschließende Umsetzung mit BocOSu gelöst werden. Eine selektive Funktionalisierung der Aminofunktionalität für die nachfolgenden biologischen Untersuchungen erfolgte am Beispiel einer Benzylierung am Ende der Reaktionssequenz.

SAA2(2N) konnte ausgehend von *N*-Acetylglucosamin dargestellt werden. Als Startsequenz wiederum die Einführung der anomeren Aminomethyleneinheit mittels der Nitroaldolreaktion gewählt. Als Schlüsselproblem der Synthese erwies sich die Acetylsplaltung, die erfolgreich mit der Einführung der Boc-Schutzgruppe verknüpft werden konnte. Abschließend wurde die für den geplanten Einbau in ein Somatostatinanaloges geforderte *N*-Benzylierung durchgeführt. Die elfstufige Synthese eignet sich dazu schnell und im großen Maßstab durchgeführt zu werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch erstmals eine galactose-konfigurierte Zuckeraminosäure als Peptidmimetikum eingebaut werden. Mit der ausgesprochen robusten und einfachen fünfstufigen Reaktionssequenz stellt SAA2-gal das bei weitem am einfachsten zugängliche SAA2-Derivat dar. Darüber hinaus konnte in einer zwölfstufigen Reaktionsfolge die benzylierte Zuckeraminosäure SAA2-gal(Bn)₃ zugänglich gemacht werden.

Zum Einbau in die Peptide wurden zwei verschiedene Sequenzen gewählt. Im Rahmen von weiterführenden SAR-Studien wurden SAA2(2NBn), SAA2(4NBn) und SAA2-gal(Bn)₃ in eine somatostatinanaloge Peptidsequenz eingebaut und auf ihre biologische Aktivität getestet. Die Ergebnisse der biologischen Tests stehen noch aus.

Um das Potential der Zuckeraminosäuren als Glykosylierungsmimetika zu evaluieren, wurden zwei zuckerderivatisierte cyclische RGD-haltige Sequenzen hergestellt. Dabei wurde mit *cyclo*(-RGDFK(SAA2-gal(Ac)-)) das einzige Cyclopeptid einer Serie ähnlicher Strukturen synthetisiert, das höhere Aktivität ($IC_{50}(\alpha_v\beta_3) = 0.8 \text{ nM}$; $IC_{50}(\alpha_{IIb}\beta_3) = 1910 \text{ nM}$) als das Leitpeptid *cyclo*(-RGDFV-) aufwies. In Zusammenarbeit mit R. Haubner konnte das ¹⁸F-radiomarkierte Derivat *cyclo*(-RGDFK(SAA2-gal(2-Fluorpropionyl)-)) hergestellt und auf seine Verwendbarkeit im Tumortargeting mit der Positronenemissions-Tomographie getestet werden.

Außerdem konnte mit Hilfe der höherfunktionalisierten SAA2-Derivate erstmalig ein verzweigtes, reines Zuckeraminosäureoligomer hergestellt werden. Diese eignen sich grundsätzlich dazu komplexe Oligosaccharidstrukturen nachzubilden. Der Aufbau des linearen Vorläufermoleküls erfolgte mittels Festphasenmethoden, die Einführung der Verzweigung wurde in Lösung durchgeführt. Anschließende NMR-Untersuchungen sollten zeigen, ob es auf diesem Weg möglich ist, die angestrebte strukturelle Mimifizierung komplexer Oligosaccharide zu erreichen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte in Zusammenarbeit mit der Gruppe um E. Uhlmann (Aventis AG) die Synthese eines PNA₂DNA-tripelhelikalen Komplexes fertiggestellt werden. Dafür konnte der im Rückgrat isotoopenmarkierte (¹³C, ¹⁵N) Cytosinbaustein in einer hochoptimierten, konvergenten zwölfstufigen Synthese hergestellt werden. Der Baustein konnte zusammen mit dem von E. Liroy synthetisierten isotoopenmarkierten Thyminmonomeren in das für diesen Zweck entworfene Oligomere

eingebaut werden. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit die Probenvorbereitung für die NMR-spektroskopische Strukturuntersuchung abgeschlossen.

Im Vorgriff auf die zu erwartende erschwerte Zuordnung im Amino-/Imino-Bereich aufgrund von Austauschphänomenen wurde darüber hinaus ein basenmodifiziertes Monomeres hergestellt. An Stelle von Cytosin wurde der ψ -iso-Cytosin-Baustein in den Hoogsteen-Strang des gleichen Oligomeren eingebaut. Anschließend konnte anhand der temperaturabhängigen UV-Spektroskopie zum einen der erwartete Paarungsmodus verifiziert werden und zum anderen aufgrund der gemessenen thermodynamischen Stabilität die Tauglichkeit der modifizierten Chimäre als Zuordnungshilfe für die Untersuchung der isotonenmarkierten Sequenz nachgewiesen werden.

9. Experimenteller Teil

9.1 Synthetische, analytische und spektroskopische Methoden

Alle technischen **Lösungsmittel** wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach den gängigen Verfahren absolutiert.

Das verwendete Tritylchlorid-Polystyrol-Harz (TcP-Harz) wurde von der Firma *PepChem*, Tübingen, bezogen, das Rink-Amid MBHA und 3,4-Dihydro-2*H*-pyran-1-ylmethoxymethyl Polystyrolharz von *Novabiochem*, Bad Soden. Die Aminosäure-derivate, falls nicht selbst synthetisiert, kamen von den Firmen *Bachem*, *Novabiochem*, *Senn*, *Neosystem* oder *Alexis*. Aminosäuren, Fmoc-Cl und Palladium/Aktivkohle waren Stiftungen der Firma *Degussa*. HOBt und Fmoc-OSu wurden selbst hergestellt. Alle anderen eingesetzten Reagenzien stammten von den Firmen *E. Merck*, *Fluka* und *Sigma Aldrich* und entsprachen der Qualität 'zur Synthese'.

Die **dünnschichtchromatographischen Kontrollen (DC)** wurden mit Aluminium-fertigfolien der Firma *Merck* (Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.25 mm) durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption (254 nm), durch Eintauchen in 5 %ige methanolische Schwefelsäure, 5 % ethanolische Ninhydrin-Lösung (0.3 g Ninhydrin, 3 g Essigsäure, 100 g Ethanol) oder eine wäßrige, schwefelsaure Cersulfat/Phosphormolybdänsäure-Lösung (6.25 g Phosphormolybdänsäure Hydrat, 2.5 g Cer(IV)sulfat, 15 mL Schwefelsäure, 235 mL Wasser) und anschließende Entwicklung mit dem Heißluftfön oder durch Besprühen mit einer 1 %igen wäßrigen Kaliumpermanganatlösung und anschließende Wärmebehandlung.

Säulenchromatographische Trennungen wurden an Kieselgel 60 bzw. 40 der Firma *Merck* durchgeführt. Bei Bedarf erfolgten die Trennungen mit Überdruck von 0.6 - 1.8 bar (*Flash*-Chromatographie). Die Rohsubstanzen in der Regel mit Dichlormethan oder Chloroform aufgenommen, auf Kieselgel 60 (0.063-0.200 mm) aufgezogen, das Lösungsmittel abgezogen und der Feststoff getrocknet; nach Auftragen auf die äquilibrierte Kieselgelsäule (ca. 50 bis 100facher Überschuß an Kieselgel, 0.040 - 0.063 mm, bezogen auf eingesetzte Menge Substanz in Gramm)

HPLC-Analysen und Trennungen wurden mit *reversed phase*-Chromatographie Geräten der Firma *Beckmann* (System Gold, Hochdruckpumpenmodul 126, UV-Detektor 166) durchgeführt. Als Säulen kamen dabei die Nucleosilsäule RP18, 5 μm (4.6 * 250 mm) der Firma *YMC* (analytisch) und die Nucleosilsäule RP18, 7 μm (21 * 250 mm) der Firma *Macherey-Nagel* (präparativ) zum Einsatz. Die mobile Phase bestand in allen Fällen aus Wasser-Acetonitril Mischungen, die 0.1 Vol. % Trifluoressigsäure enthielten.

Folgende *reversed phase* Säulen der Firma *Macherey-Nagel* und *YMC* wurden verwendet:

Nucleosil-5-C ₁₈ -Säule	(5 μm ; l = 250 mm; d = 4 mm)
Nucleosil-5-C ₁₈ -ppn-Säule	(5 μm ; l = 250 mm; d = 4 mm)
Nucleosil-7-C ₁₈ -Säule	(7 μm ; l = 250 mm; d = 21 mm)
Nucleosil-7-C ₁₈ -ppn-Säule	(7 μm ; l = 250 mm; d = 21 mm)
ODS-A-5-C ₁₈ -Säule	(5 μm ; l = 250 mm; d = 4.6 mm)
ODS-A-5C ₁₈ -Säule	(5 μm ; l = 250 mm; d = 20 mm)

Die **Schmelzpunkte** wurden an einer *Tottoli*-Schmelzpunktbestimmungsapparatur der Firma *Büchi* gemessen und sind nicht korrigiert.

HPLC-ESI-MS-Massenspektren wurden an einem Gerät Typ *Finnigan* NCQ-ESI mit HPLC Kopplung LCQ (HPLC-System Hewlett Packard HP 1100, Säulenmaterial Nucleosil 100 5C₁₈) aufgenommen.

Die **NMR-Spektren** wurden mit den Geräten AC250 und DMX500 der Firma *Bruker* aufgenommen und an SGI-Workstations mit dem Programm UXNMR Version 1.3 (*Bruker*) prozessiert. Die verwendeten Pulsprogramme stammen von *Bruker* oder wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe geschrieben. Die NMR-Untersuchungen wurden in 0.5 cm Durchmesser Probenröhrchen durchgeführt, wobei in der Regel 5 mg bis 15 mg Substanz in 0.5 mL [D₆]DMSO bzw. CDCl₃ gelöst wurden. Die chemischen Verschiebungen wurden auf das Restprotonensignal des [D₆]DMSO bei

2.50 ppm bzw. CDCl_3 bei 7.24 ppm (^1H -Spektrum) und auf das ^{13}C -Signal des $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ bei 39.5 ppm bzw. CDCl_3 bei 77.0 ppm (^{13}C -Spektrum) geeicht. Für NOE-Messungen wurden die Proben im Hochvakuum entgast und abgeschmolzen.

9. 2 Liste der synthetisierten Verbindungen

Synthese von Fmoc-SAA2(4NBn)-OH

2,3,4,6-Penta-O-acetyl- β -D-galactopyranosylcyanid	7
Galactopyranosylamin	8
N-Benzyloxycarbonylgalactopyranosylamin	9
(N-Benzyloxycarbonyl-)4,6-O-benzyliden-galactosylmethylamin	11
2,3-Di-O-acetyl-4,6-O-benzyliden-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin	12
2,3-Di-O-acetyl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin	13
2,3-Di-O-acetyl-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin	14
2,3-Di-O-acetyl-4-O-trifluormethylsulfonyl-6-O-trityl-N-benzyloxy carbonylgalactosylmethylamin	19
2,3-Di-O-acetyl-4-azido-4-deoxy-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonylgalactosyl- methylamin	20
4-Azido-4-deoxy-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin	21
4-Amino-4-deoxy-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin	22
4-N-(tert.-Butoxycarbonyl)-4-deoxy-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonyl- galactosylmethylamin	23
4-N-(tert.-Butoxycarbonyl)-4-deoxy-6-O-trityl-galactosylmethylamin	24
4-N-(tert.-Butoxycarbonyl)-4-deoxy-6-O-trityl-N-fluorenylmethoxy- carbonylgalactosylmethylamin	25
4-N-(tert.-Butoxycarbonyl)-4-deoxy-N-fluorenylmethoxycarbonyl- galactosylmethylamin	26
Fmoc-SAA2(4NBoc)-OH	27
Fmoc-SAA2(4N)-OH*TFA	28
Fmoc-SAA2(4-NBn)-OH	29

Synthese von Fmoc-SAA2(2NBn)-OH

2-Acetamido-2-deoxy-glucopyranosylnitromethan	37
2-Acetamido-2-deoxy-glucopyranosylmethylamin	38
2-Acetamido-2-deoxy-N-benzyloxycarbonylglucopyranosylmethylamin	39

2-N-tert.-Butoxycarbonyl-2-amino-2-deoxy-N-benzyloxycarbonyl- N-tert.-butoxycarbonyl- β -D-glucopyranosylmethylamin	41
2-N-tert.-Butoxycarbonyl-2-amino-2-deoxy-N-benzyloxycarbonyl- β -D-glucopyranosylmethylamin	42
2-N-tert.-Butoxycarbonyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranosylmethylamin	43
2-N-tert.-Butoxycarbonyl-2-amino-2-deoxy-N-fluorenylmethyl- oxycarbonyl- β -D-glucopyranosylmethylamin	44
Fmoc-SAA2(2N-Boc)OH	45
Fmoc-SAA2(2N)OH	46
Fmoc-SAA2(2N-Bn)OH	47

Synthese der Derivate von SAA2-gal

(N-tert.-Butyloxycarbonyl-) β -D-galactosylmethylamin	49
Boc-SAA2gal-OH	51
(N-Fluorenylmethyloxycarbonyl-) β -D-galactosylmethylamin	50
Fmoc-SAA2-gal-OH	52
Ethyl-6-O-trityl-1-thiogalactopyranosid	54
Ethyl-2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-trityl-1-thiogalactopyranosid	55
Ethyl-2,3,4-tri-O-benzyl-thiogalactopyranosid	56
Ethyl-2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-acetyl-1-thiogalactopyranosid	57
6-O-Acetyl-2,3,4-tri-O-benzyl-D-galactopyranosylfluorid	58
6-O-Acetyl-2,3,4-tri-O-benzyl-D-galactopyranosylcyanid	59
2,3,4-tri-O-benzyl-D-galactopyranosylmethylamin	60
2,3,4-tri-O-benzyl-N-fluorenylmethyloxycarbonyl-D-galactopyranosyl- methylamin	61
Fmoc-SAA2-gal(Bn) ₃ -OH	62

Synthese der Peptide

Cyclo(-Thr-SAA2(4NBn)-Phe-D-Trp-Lys-)	80
Cyclo(-Thr-SAA2(2NBn)-Phe-D-Trp-Lys-)	81
Cyclo(-Thr- α -SAA2gal(Bn) ₃ -Phe-D-Trp-Lys-)	82

Cyclo(-Thr-β-SAA2gal(Bn) ₃ -Phe-D-Trp-Lys-)	83
Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(SAA2gal)-)	89
Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(AcSAA2gal)-)	90

Synthese des Zuckeraminosäureoligomeren

Ac-SAA2gal(Bn) ₃ -SAA2(4N)-SAAgal-NH ₂	104
Ac-SAA2gal(Bn) ₃ -SAA2(4N-SAA1(Bn))-SAAgal-NH ₂	103

Synthese des ψ-iso-Cytosin-PNA-Monomeren

Isocytosin-5-yl-essigsäure	118
Isocytosin-5-yl-essigsäuremethylester Hydrochlorid	119
Methyl N ² -(4-tert.-butylbenzoyl)isocytosin-5-yl-acetat	120
N ² -(4-tert.-butylbenzoyl)isocytosin-5-yl-essigsäure	121
N-(2-Boc-aminoethyl)-N-(N ² -(4-tert.-butylbenzoyl) isocytosin-5-yl- -acetyl)glycinmethylester	122
N-(2-Boc-aminoethyl)-N-(N ² -(4-tert.-butylbenzoyl)isocytosin-5-yl- acetyl)glycin	123
N-(Aminoethyl)-N-(N ² -(4-tert.-butylbenzoyl)isocytosin-5-yl-acetyl)glycin	124
N-(2-Monomethoxytritylaminoethyl)-N-(N ² -(4-tert.-butylbenzoyl) isocytosin-5-yl-acetyl)glycin Triethylammoniumsalz	125

Synthese des isotopenmarkierten Cytosin-PNA-Monomeren

(4-tert.-Butylbenzoyl-)cytosin	111
(4-tert.-Butylbenzoyl-)cytosin-1-yl-essigsäureethylester	112
(4-tert.-Butylbenzoyl-)cytosin-1-yl-essigsäure (¹³ C ₂)	113
Boc-Glycin (¹³ C ₂ , ¹⁵ N)	106
Glycinmethylester Hydrochlorid (¹³ C ₂ ¹⁵ N)	109
BocGlyNMeOMe (¹³ C ₂ ¹⁵ N)	107
Boc-Glycinaldehyd (¹³ C ₂ ¹⁵ N)	108
Boc-Aminoethylglycin Methylester (¹³ C ₄ ¹⁵ N ₂)	110
N-(2-Boc-aminoethyl)-N-(N ² -(4-tert.-butylbenzoyl)cytosin-5-yl-acetyl)	

glycinmethylester ($^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$)	114
N-(2-Boc-aminoethyl)-N-(N ² -(4-tert.-butylbenzoyl)cytosin-5-yl-acetyl)glycin	
Triethylammoniumsalz ($^{13}\text{C}_6^{14}\text{N}_2$)	115
N-(Aminoethyl)-N-(N ² -(4-tert.-butylbenzoyl)isocytosin-5-yl-acetyl)	
glycin ($^{13}\text{C}_6^{14}\text{N}_2$)	116
N-(2-Monomethoxytritylaminoethyl)-N-(N ² -(4-tert.-butylbenzoyl)	
cytosin-5-yl-acetyl)glycin Triethylammoniumsalz ($^{13}\text{C}_6^{14}\text{N}_2$)	117

9.3 Synthesen der Zuckeraminosäuren

Allgemeine Arbeitsvorschriften:

AAV 1: TEMPO-Oxidation[38]

1 mmol des Zuckerderivates werden in 30 mL Wasser suspendiert. Es wird gerade soviel THF zugesetzt, dass eine klare Lösung entsteht. Danach gibt man 50 mg Natriumbromid und 20 mg TEMPO zu, kühlt die Lösung auf 0° C und fügt tropfenweise 2 mL Natriumhypochloritlösung (1.3 M) zu (die Reaktion wird unter pH-Kontrolle durchgeführt; der pH sollte in keinem Fall 11 überschreiten. Wenn der pH den Wert von 9.5 unterschreitet wird durch weitere Zugabe von NaOCl-Lösung wieder ein Wert von 10.5 eingestellt). Die Reaktion ist normalerweise innerhalb von zwei bis drei Stunden abgeschlossen. Wenn nicht anders angegeben wird die Lösung durch Zugabe von 1N Salzsäure angesäuert (pH 2-3) und das Produkt extrahiert. Die weitere Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie.

AAV 2: Zweiphasen-TEMPO-Oxidation[39]

1 mmol der Zuckerderivates und 10 mg TEMPO werden in 10 mL Methylenchlorid gelöst. Man gibt 1.5 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung die 50 mg Kaliumbromid und 30 mg Tetrabutylammoniumchlorid enthält zu und kühlt die Mischung auf 0° C. Danach wird langsam ein Gemisch aus 1.8 mL Natriumhypochlorit- (1.3 M), 1 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und 2mL gesättigter Kochsalzlösung zugetropft zu (die Reaktion wird unter pH-Kontrolle durchgeführt; der pH sollte in keinem Fall 11 überschreiten. Wenn der pH den Wert von 9.5 unterschreitet wird durch weitere Zugabe der NaOCl-Mischung wieder ein Wert von 10.5 eingestellt). Nach Ablauf der Reaktion (normalerweise 1-3 Stunden) wird die Mischung durch Zugabe von 1N Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 gebracht, die Phasen getrennt und die wässrige Phase zwei weitere Male extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Die weitere Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie.

AAV3: Hydrogenolytisches Entfernen der Z-Schutzgruppe

Das zu entschützende Derivat wird in einem geeigneten, möglichst polaren Lösungsmittel (z. B. Methanol) aufgenommen und mit 100 mg pro mmol Peptid Hydrierkatalysator (10 % Pd auf Kohle, Wassergehalt etwa 0-50 %) versetzt. Anschließend wird mit Wasserstoff gespült und unter leichtem Überdruck (Ballon) kräftig gerührt. Nach 0.5 h ist die Reaktion meist beendet (DC-Kontrolle), der Katalysator wird über Kieselgur abfiltriert, das Lösungsmittel abgezogen (Badtemperatur unter 30 °C) und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

AAV4: Kupplung der ersten Aminosäure an das TCP/RINK-Amid-Harz

Die Peptidkupplungen wurden bei größeren Mengen in denen in unserem Arbeitskreis üblichen „Enten“ durchgeführt; diese wurden nur vor dem allerersten Gebrauch mit TMS-Cl/Toluol silyliert. Bei kleineren Mengen Harz (ca. 100 mg Harz) wurden die Kupplungen in den handelsüblichen 2 mL Einmalspritzen der Fa. *Becton-Dickinson*, mit PE-Fritten mit entsprechendem Durchmesser durchgeführt.

Standardprotokoll: 1.00 g 2-Chlortrityl-Harz wird in 15 mL absolutem Dichlormethan in einem silylierten Schüttelgefäß („Ente“) suspendiert. Dazu gibt man 2 Äquivalente (bezogen auf die mmol Menge Chlorids des Harzes) der Fmoc-geschützten Aminosäure. Nach fünf Minuten wird eine der Aminosäure äquivalente Menge DIPEA zugegeben. Die Kupplungszeit beträgt mindestens zwei Stunden. Anschließend gibt man 4 mL Methanol und 400 µL DIPEA zu und läßt für weitere 15 min reagieren. Das Harz wird über eine Fritte abgesaugt und nach folgendem Schema gewaschen:

Lösungsmittel	Anzahl	Menge [mL]	Zeit [min]
NMP	2	20	2 min
CH ₂ Cl ₂	5	20	2 min
CH ₂ Cl ₂ /MeOH			
1:1	4	20	2 min
MeOH	2	20	2 min

Das Harz wird im Hochvakuum getrocknet und ausgewogen. Die Belegungsdichte des Harzes wird nach folgender Formel bestimmt:

$$n = \frac{m_{\text{ges}} - m_{\text{Harz}}}{MG_{\text{XXX}} - MG_{\text{Cl}}}$$

n	Mol Aminosäure am Harz [mol]
m _{Harz}	Masse des eingesetzten Harzes [g]
m _{ges}	Gesamtmasse des Polymers nach Ankupplung [g]
MG _{XXX}	Molmasse der Fmoc-Aminosäure minus 1 (Fmoc-XXX-O) [g/mol]
MG _{Cl}	Molmasse Chlorid [35,45 g/mol]

AAV5: Festphasensynthese linearer Peptide mit Fmoc/tBu-Schutzgruppenkombination

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe der harzgebundenen Aminosäure und die Kupplung einer weiteren Fmoc-Aminosäure erfolgt direkt hintereinander nach folgendem Schema:

Schritt	Reagenzien	Operation	Anzahl	Zeit [min]
1	NMP	waschen	1	3
2	20 % Piperidin/DMF	entschützen	1	5
3	20 % Piperidin/DMF	entschützen	1	15
4	NMP	waschen	7	3
5	Fmoc-AS-OH DIPEA/NMP	kuppeln	1	120
6	NMP	waschen	7	3
7 ^a	CH ₂ Cl ₂	waschen	2	3

^a Schritt 7 ist nur erforderlich, wenn SPPS über Nacht unterbrochen wird.

Das Volumen der Reagenzien beträgt jeweils 10 mL pro 1 g eingesetztem Harz. Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin in DMF und anschließendem mehrmaligen Waschen mit *N*-Methylpyrrolidon (NMP) wird jeweils die nächste Aminosäure angekuppelt.

Kupplungen mit TBTU/HOBt (Schritt 5)

2.0 eq der benötigten Aminosäure (AS) werden in 10 mL NMP (Lösung 1), 2.0 eq HOBt in 5 mL NMP (Lösung 2) und 2.0 eq TBTU in 10 mL NMP (Lösung 3) gelöst. Lösung 1 und 2 werden vereinigt und gefolgt von der TBTU-Lösung ins Schüttelgefäß gegeben. Nach fünf Minuten Reaktionszeit wird der pH-Wert mit DIPEA auf 8.5-9.0 eingestellt.

Vor der Abspaltung des Peptids vom Harz wird die letzte Fmoc-Schutzgruppe, analog der Schritte 1-4 des Fließschemas, entfernt.

AAV6: Abspaltung vom Harz

Die Abspaltung des linearen Peptids wird folgendem Fließschema entsprechend durchgeführt:

a) Tcp-Harz:

Schritt	Reagenzien	Operation	Anzahl	Zeit [min]
1	CH ₂ Cl ₂	waschen	8	3
2	HOAc/TFE/CH ₂ Cl ₂ (1:1:8)	spalten	1	60
3	HOAc/TFE/CH ₂ Cl ₂ (1:1:8)	spülen	3	5

b) Rink-Amid-Harz:

Schritt	Reagenzien	Operation	Anzahl	Zeit [min]
1	CH ₂ Cl ₂	waschen	8	3
2	TFA/TIS/H ₂ O (95:2.5:2.5)	spalten	1	30
3	TFA/TIS/H ₂ O (95:2.5:2.5)	spülen	3	10

AAV7: Cyclisierung

1 mmol Peptid-Acetat wird in 500 mL frisch destilliertem DMF ($2 \cdot 10^{-3}$ mmolar) gelöst. Unter Rühren werden 3 mmol (0.65 mL) DPPA sowie 5 mmol (0.42 g) NaHCO_3 zugegeben, und anschließend bei Raumtemperatur für weitere 24 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wird die überschüssige Base und das entstandene Natriumacetat abfiltriert und das Lösungsmittel bei maximal 40 °C am Ölpumpenvakuum eingeengt. Die Peptidlösung wird langsam unter Rühren zu 300 mL Wasser getropft, wobei das Peptid ausfällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und danach in CH_3CN oder DMF/DMSO gelöst und durch HPLC gereinigt.

AAV8: Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen

0.5 mmol Peptid werden in 15 mL eines Gemisches aus 95 % TFA, 2.5 % Wasser und 2.5 % Triisopropylsilan gelöst und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeengt. Die reduzierte Lösung wird zu 300 mL eisgekühltem Diethylether getropft. Die Niederschlagsbildung wird bei -20 °C vervollständigt (ca. 3 h), der weiße Niederschlag wird abzentrifugiert, mit Diethylether gewaschen und am Ölpumpenvakuum über P_4O_{10} getrocknet.

Spezielle Arbeitsvorschriften

Synthese von Baustein 1**2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylcyanid 7[42]**

42.8 g Penta-O-acetyl- β -D-galactose **6** (0.11 mol) werden in 200 mL Nitromethan gelöst und mit 15 mL Trimethylsilylcyanid (0.11 mol, 1 Äquiv.) versetzt. Es werden 3 mL Bortrifluorid Diethyletherat (33 mmol, 0.3 Äquiv.) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach werden nochmals 10 mL Trimethylsilylcyanid (55 mmol, 0.5 Äquiv.) und 2 mL Bortrifluorid Diethyletherat (22 mmol, 0.15 Äquiv.) zugetropft und eine weitere Stunde gerührt. Das Lösungsmittel wird abgezogen und der Rückstand mit Essigester aufgenommen. Die Lösung wird je einmal mit gesättigter Natriumacetatlösung (dabei entsteht ein weisser Feststoff der durch Zugabe von Essigester wieder aufgelöst wird), Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, danach über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Der dunkelbraune, sirupartige Rückstand wird aus Essigester kristallisiert, die Mutterlauge einrotiert und zwei weitere Male aus Essigester kristallisiert. Das verbleibende, noch produktthaltige Öl kann durch Flash-Chromatographie gereinigt werden.

Ausbeute: 32.4 g (25.4 + 5.6 + 1.4 g aus Kristallisation, 83 %).

R_f (Hexan/Essigester 2:1) = 0.3

ESI-MS: 710 (2M-HCN+Na⁺), 737 (2M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz):

5.5 (t, 1H, H2); 5.42 (dd, 1H, ³J_{3,4} = 3.3 Hz, ³J_{4,5} = 1.1 Hz, H4); 4.95 (dd, 1H, ³J_{2,3} = 10.1 Hz, ³J_{3,4} = 3.3 Hz, H3); 4.15 (d, 1H, ³J_{1,2} = 10.2 Hz, H1), 4.08 (d, 2H, ³J_{5,6} = 6.3 Hz, H6 und H6'); 3.93 (td, 1H, ³J_{4,5} = 1.1 Hz, ³J_{5,6} = 6.3 Hz, H5); 2.12-1.92 (4s, 12H, Acetyl-CH₃)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 62.5 MHz):

169.9, 169.8, 169.3, 169.1 (Acetyl- $\underline{\text{C}}\text{O}$); 115.6 ($\underline{\text{C}}\text{N}$); 74.5 (C1); 69.7 (C2); 67.3 (C3); 65.9 (C4); 65.0 (C5); 61.6 (C6); 20.5, 20.3, 20.24, 20.19 (Acetyl- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)

β -D-Galactopyranosylmethylamin 8[50]

20 g Lithiumaluminiumhydrid (0.527 mol, 3.8 Äquiv.) werden in 100 mL abs. THF suspendiert, danach wird eine konzentrierte Lösung von 50 g 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosylcyanid **7** (140 mmol) in abs. THF langsam zugegeben. Nach beendeter Zugabe wird noch 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wird tropfenweise so lange Ethanol zugesetzt bis die Gasentwicklung aufhört, danach werden langsam 100 mL Ammoniaklösung (25 %) zugegeben und eine weitere Stunde gerührt. Die weisse Suspension wird zentrifugiert, der Rückstand noch fünfmal mit Wasser gewaschen und die vereinigten Überstände einrotiert.

Ausbeute: 36.6 g eines weissen Feststoffes, der noch mit anorganischen Salzen verunreinigt ist. Die folgende Umsetzung wird ohne weitere Reinigung durchgeführt.

ESI-MS: $m/z = 194.2$ ($\text{M}+\text{H}^+$); 200.1 ($\text{M}+\text{Li}^+$)

(N-Benzyloxycarbonyl-)galactosylmethylamin 9

Der Rückstand der vorigen Umsetzung und 15 g Natriumhydrogencarbonat werden in 100 mL Wasser und 50 mL Methanol gelöst und mit 90 mL Benzyloxycarbonylchlorid (50 %ige Lösung in Toluol) umgesetzt. Man rührt 60 min und zieht dann das Methanol am Rotationsverdampfer ab. Die verbleibende Lösung wird mit Diethylether gewaschen und danach das Produkt durch fünfmaliges Ausschütteln mit THF extrahiert. Das Lösungsmittel wird abgezogen und der verbleibende Rückstand mit abs. Acetonitril gelöst. Man filtriert die ungelösten Bestandteile ab und zieht das Lösungsmittel ab.

Ausbeute: 40.3 g (88 % über zwei Stufen) eines weissen Feststoffes.

ESI-MS: 350.1 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 676.8 ($2\text{M}+\text{Na}^+$)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz):

7.4-7.27 (m, 5H, Aromaten-H); 7.11 (t, br, 1H, NH); 5.01 (s, 2H, Benzyl- $\underline{\text{CH}}_2$); 4.83 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.5$ Hz, OH); 4.62 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, OH); 4.44 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, OH); 4.25 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, OH); 3.64 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.1$ Hz, H3); 3.59 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 13.7$ Hz, H7); 3.51 (m, 1H, H1); 3.42 (m, 1H, H1'); 3.29 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$, H2); 3.26 (m, 1H, H4); 3.25 (m, 1H, H5); 3.04 (t, br, 1H, H6); 2.98 (m, 1H, H7')

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz):

156.6 ($\underline{\text{CO}}$); 137.5 (Aryl-C1); 130.5-126.8 (m, Aryl-C2, -C3, -C4); 82.2 (C2); 82.1 (C6); 77.7 (C4); 72.0 (C5); 71.9 (C3); 68.6 (Benzyl- $\underline{\text{CH}}_2$); 64.3 (C1), 46.2 ($\underline{\text{CH}}_2\text{NH}$)

(N-Benzyloxycarbonyl-)4,6-O-benzyliden-galactosylmethylamin 11

14.43 g (N-Benzyloxycarbonyl-)galactosylmethylamin **9** (44.1 mmol) werden in 150 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 25 mL Benzylidendimethylacetal (167 mmol, 3.8 Äquiv.) und 800 mg p-Toluolsulfonsäure (4 mmol, 0.1 Äquiv.) versetzt. Es wird ca. 15 min kräftig gerührt (die Umsetzung ist normalerweise beendet wenn das Edukt vollständig gelöst ist). Danach wird die Lösung durch Zugabe von Triethylamin neutralisiert und das Lösungsmittel abgezogen. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Lösungsmittel: Chloroform/Methanol 9:1).

Ausbeute: 8.67 g (47.3 %) eines weissen Schaums.

R_f (Chloroform/Methanol 9:1) = 0.3

ESI-MS: 438.4 ($\text{M}+\text{Na}^+$); 853 (M_2+Na^+)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 250 MHz):

7.4-7.1 (m, 11H, Aromaten-H und NH); 5.55 (s, 1H, Benzyliden-CH); 5.04 (s, 2H, Benzyl- $\underline{\text{CH}}_2$), 4.1 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.7$ Hz, H3); 4.06 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 12.8$ Hz, H1); 4.0 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 12.2$ Hz, H1'); 3.65 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 14.3$ Hz, H7); 3.47 (m, 1H, H4); 3.41 (s, br, 1H, H2); 3.34 (m, 1H, H5); 3.21 (dt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 9.3$ Hz, H6); 3.02 (m, 1H, H7')

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 62.5 MHz):

156.7 ($\underline{\text{C}}\text{O}$); 139.2 und 137.6 (Aryl- $\text{C}1$); 130-125.8 (Aryl- C); 103.1 (Benzyliden- $\underline{\text{C}}\text{H}$); 81.8 ($\text{C}6$); 79.7 ($\text{C}3$); 76.4 ($\text{C}4$); 72.1 ($\text{C}2$); 72.0 ($\text{C}1$); 71.7 ($\text{C}5$); 68.5 (Benzyl- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 45.9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NH}_2$)

Recycling der zuckerhaltigen Fraktionen

Die zuckerhaltigen Fraktionen (Detektion mit Orcinol-Dip) der letzten Umsetzung werden in 80 %iger Essigsäure gelöst und die Mischung mehrere Tage unter Rückfluss erhitzt. Nach Reaktionsende (DC-Kontrolle) rotiert man das Lösungsmittel ab und wäscht den öligen Rückstand dreimal mit Hexan. Der verbleibende braunschwarze, zähe Rückstand besteht fast ausschliesslich aus (N-Benzyloxycarbonyl-)galactosylmethylamin **9** und kann direkt nach obiger Vorschrift umgesetzt werden.

2,3-Di-O-acetyl-4,6-O-benzyliden-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin **12**

8.67 g (N-Benzyloxycarbonyl-)4,6-O-benzyliden-galactosylmethylamin **11** (21 mmol) werden mit 300 mL einer 2:1 Mischung (v/v) aus Pyridin und Acetanhydrid umgesetzt. Man rührt eine Stunde, engt die Lösung ein, koevaporiert anschliessend dreimal mit Toluol und trocknet am Hochvakuum.

Ausbeute: 10.6 g (quantitativ) eines schwach gelblichen Schaums.

ESI-MS: 456 ($\text{M-Ac}+\text{H}^+$), 500 ($\text{M}+\text{H}^+$), 522.2 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 768.6 ($3\text{M}+\text{H}^++\text{K}^+/2$), 1020.6 ($2\text{M}+\text{Na}^+$)

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz):

7.43-7.22 (m, 11H, Aromaten-H und NH); 5.6 (s, 1H, Benzyliden- $\underline{\text{C}}\text{H}$); 5.14 (dd, 1H, $^3\text{J}_{3,4} = 3.6$, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 10.1$ Hz, H4); 5.0 (s, 2H, Benzyl- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 4.99 (m, 1H, H5); 4.41 (d, 1H, $^3\text{J}_{3,4} = 3.6$ Hz, H3); 4.25 (2d, 2H, $^3\text{J}_{1,1'} = 11.6$ Hz, H1 und H1'); 3.69 (m, 1H, H6); 3.29 (ddd, 1H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 2.6$ Hz, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 6.2$ Hz; $^3\text{J}_{\text{HH}} = 13.6$ Hz, H7); 3.03 (m, 1H, H7'); 2.01 und 1.99 (2s, 6H, Acetyl- CH_3)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz):

170.3 und 170.1 (Acetyl-CO); 156.4 (Urethan-CO); 103.1 (Benzyliden- $\underline{\text{C}}\text{H}$); 79.1 (C6); 77.1 (C3); 75.3 (C4); 71.8 (C2); 70.9 (C5); 68.5 Benzyl- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 54.6 (C1); 45.4 (C7); 21.5 und 20.5 (Acetyl- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)

2,3-Di-O-acetyl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin 13

10.4 g 2,3-Di-O-acetyl-4,6-O-benzyliden-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin **12** (20.8 mmol) werden in 200 mL Acetonitril und 70 mL Methanol gelöst und mit 3 g p-Toluolsulfonsäure versetzt. Man rührt eine Stunde, gibt dann noch einmal 1 g p-Toluolsulfonsäure und 20 mL Methanol zu und rührt weitere 30 min. Die Lösung wird mit Triethylamin neutralisiert und das Lösungsmittel abgezogen. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Laufmittel: Chloroform/Methanol 9:1).

Ausbeute: 5.3 g (72 %) eines weissen Schaums (mit zunehmender Reaktionsdauer werden steigende Mengen des aus einer Umesterungsreaktion resultierenden einfach deacetylierten Produktes gefunden).

R_f (Chloroform/Methanol 9:1) = 0.3

ESI-MS: 434.3 ($\text{M}+\text{Na}^+$); 844.9 (M_2+Na^+); 861.0 (M_2+K^+)

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz):

7.42-7.17 (m, 6H, Aromaten-H und NH); 5.03 (m, 1H, H5); 5.02 (s, 2H; Benzyl- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 4.81 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10$ Hz, H4); 3.93 (m, br, 1H, H3); 3.51-3.5 (m, 4H, H1, H1', H2, H6); 3.25 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 14$ Hz, H7); 2.97 (m, 1H, H7'); 2.0 und 1.98 (Acetyl- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz):

170.4 und 170.1 (Acetyl-CO); 156.5 (Urethan-CO); 140.7-126.5 (Aromaten-C); 81.7 (C2); 79.4 (C6) 78.1 (C4); 70.8 (C5); 69.2 (C3); 68.6 (Benzyl- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 63.3 (C1); 45.3 (C7); 20.7 und 20.5 (Acetyl- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)

2,3-Di-O-acetyl-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin 14

5.6 g 2,3-Di-O-acetyl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin **13** (13.6 mmol) werden in 250 mL abs. Pyridin gelöst und mit 11.4 g Triphenylmethylchlorid (40.5 mmol, 3 Äquiv.) versetzt. Es wird 8 Stunden bei 100° C gerührt, danach das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand mit 40 mL Pyridin aufgenommen und mit 10 mL Methanol versetzt. Die Lösung wird einrotiert, der verbleibende Rückstand mit Chloroform aufgenommen und die Lösung dreimal mit 0.1 N Salzsäure gewaschen. Die verbleibende Lösung wird über Natriumsulfat getrocknet, einrotiert und der Rückstand dreimal mit Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Laufmittel: Chloroform/Methanol 97.5:2.5).

Ausbeute: 6.76 g (76 %) eines weissen Schaums.

R_f (Chloroform/Methanol 95:5) = 0.65

ESI-MS: 676.1 ($M+Na^+$), 691.9 ($M+K^+$), 999.7 ($3M+K^++H^+/2$), 1328.7 ($2M+Na^+$)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz):

7.51-7.13 (m, 21H, Aromaten-H und NH); 5.02 (m, 1H, H5); 4.99 (s, 2H, Benzyl- \underline{CH}_2); 4.89 (m, 1H, H4); 4.05 (m, 1H, H3); 3.81 (m, 1H, H2); 3.56 (m, 1H, H6); 3.14 (m, 1H, H7); 3.1 (m, 2H, H1 und H1'); 3.04 (m, 1H, H7'); 2.0 und 1.88 (2s, 6H, Acetyl- \underline{CH}_3)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz):

170.2 und 169.9 (Acetyl-CO); 156.2 (Urethan-CO); 143.4 (Trityl-C1); 136.4 (Phenyl-C1); 128.7-127.1 (Aromaten-C); 79.5 (C2); 79.2 (C6); 78.0 (C4); 70.8 (C5); 69.5 (C3); 68.4 (Benzyl- \underline{CH}_2); 65.3 (C1); 45.1 (C7); 41.9 (Trityl q-C); 23.9 und 23.6 (Acetyl- \underline{CH}_3)

2,3-Di-O-acetyl-4-O-trifluormethylsulfonyl-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin 19

1.182 g 2,3-Di-O-acetyl-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin **14** (1.808 mmol) werden unter Argonatmosphäre in 20 mL abs. Pyridin gelöst und

langsam mit 0.37 mL Trifluormethansulfonsäureanhydrid (2.2 mmol, 1.2 Äquiv.) versetzt. Man rührt eine Stunde und zieht anschliessend das Lösungsmittel ab. Der Rückstand wird mit Methylenchlorid aufgenommen und die entstehende Suspension nacheinander mit 0.5M Salzsäure, Wasser und gesättigter Natriumsulfatlösung extrahiert. Man trocknet über Natriumsulfat und zieht das Lösungsmittel ab.

Ausbeute: 1.33 g (93 %) eines gelben Schaums, der ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt wird.

2,3-Di-O-acetyl-4-azido-4-deoxy-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonylgalactosyl-methylamin 20

1.32 g des Rückstandes der vorigen Umsetzung wird unter Argonatmosphäre in abs. DMF gelöst und mit 131 mg Natriumazid (2 mmol, 1.2 Äquiv.) versetzt. Man rührt über Nacht und zieht dann das Lösungsmittel ab (Badtemperatur max. 60°C). Der Rückstand wird mit Essigester aufgenommen und mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Man trocknet über Natriumsulfat und zieht das Lösungsmittel ab. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Laufmittel Hexan/Essigester 6:4)

Ausbeute: 964 mg (78.6 % über zwei Stufen) eines weissen Schaums.

$R_f = 0.28$

ESI-MS: 701.2 ($M+Na^+$); 1378.6 ($2M+Na^+$)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz):

7.43 (m, 20H, Trityl- und Phenyl-H); 5.14 (t, 1H, $^3J_{4,5} = 9.6$ Hz, H4); 4.98 (s, 2H, Benzyl-H); 4.86 (t, 1H, $^3J_{3,4} = 9.6$ Hz, H3); 3.89 (t, 1H, $^3J_{5,6} = 9.9$ Hz, H5); 3.71 (dt, 1H, $^3J_{5,6} = 9.9$ Hz, $^3J_{6,7} = 4.9$ Hz, H6); 3.60 (m, 1H, H2); 3.39 (m, 1H, H7); 3.2 (m, 2H, H1 und H1'); 3.01 (dd, 1H, $^3J_{7,7'} = 10.5$ Hz, $^3J_{6,7} = 4.9$ Hz, H7'); 2.05 und 1.99 (2s, je 3H, Acetyl- CH_3)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz):

76.2 (C2); 75.1 (C6); 74.0 (C4); 69.9 (C3); 65.2 (Benzyl-CH₂); 62.6 (C7); 59.9 (C5); 41.5 (C1)

4-Azido-4-deoxy-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin 21

6.5 g 2,3-Di-O-acetyl-4-azido-4-deoxy-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin **20** (1 mmol) werden in 50 mL abs. Methanol gelöst und mit 100 mg Natriummethylat versetzt. Es wird 60 min. gerührt, mit Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird mit Chloroform aufgenommen, die Lösung mit Wasser gewaschen, die wässrige Phase mit Chloroform rückextrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen.

Ausbeute: quantitativ, die folgenden Umsetzungen werden ohne weitere Reinigung durchgeführt.

R_f (Essigester/Hexan) = 0.25

ESI-MS: 617.1 (M+Na⁺), 1210.6 (2M+Na⁺)

4-Amino-4-deoxy-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin 22 [55]

Der Rückstand der obigen Umsetzung wird in 100 mL Triethylamin gelöst. Die Lösung wird entgast und unter Argonatmosphäre langsam mit 10 mL Phenylselenol (96 mmol, 10 Äquiv.) versetzt (es entsteht ein weisser Niederschlag), danach 6 Stunden bei 55° C gerührt. Die Lösung wird mit 400 mL Methylenchlorid verdünnt und mit Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wird mit Methylenchlorid rückextrahiert, die vereinigten organische Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Der verbleibende Feststoff wird dreimal mit Hexan gewaschen. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Laufmittel Chloroform/Methanol 93:7).

Ausbeute: 5.2 g (95%) eines weissen Schaums.

R_f (Chloroform/Methanol 9:1) = 0.3

ESI-MS: 591.2 (M+Na⁺); 1136.8 (2M+H⁺); 1158.6 (2M+Na⁺);

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz):

7.53-7.07 (m, 20H, Trityl-H, Phenyl-H); 5.11 (s, 2H, Benzyl-CH₂); 4.0 (s, br, NH); 3.63 (H7); 3.45 (H5); 3.40 (H7'); 3.39 (H2); 3.38 (H1); 3.38 (H3); 3.29 (H6); 3.26 (H1'); 3.1 (s, br, 2H, NH₂); 2.87 (H4);

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):

156.2 (Urethan-CO); 141.0 (Trityl-C1); 138.4 (Benzyl-C1); 129.8-126.5 (Aromaten-C); 82.0 (C3); 81.0 (C2); 79.3 (C5); 73.8 (C6); 70.0 (Benzyl-CH₂); 66.9 (C1), 57.2 (C4); 44.7 (C7)

4-N-(tert.-Butoxycarbonyl)-4-deoxy-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin 23

1.285 g 4-Amino-4-deoxy-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin **22** (2.26 mmol) werden in 50 mL THF gelöst und mit 700 g tert.-Butyloxycarbonylsuccinimid versetzt. Man stellt den pH-Wert durch Zugabe von Triethylamin auf 9-9.5 und rührt 24 h bei 50°C. Das Lösungsmittel wird abgezogen, und der Rückstand durch Flash-Chromatographie (Laufmittel: Chloroform/Methanol 95:5) gereinigt.

Ausbeute: 1.44 g (95 %) eines weissen Schaums.

ESI-MS: 691.1 (M+Na⁺); 1358.7 (2M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz):

7.6-7.1 (m, 20 H, Aromaten-H); 4.95 (s, 2H, Benzyl-CH₂); 3.68 (m, 1H, H7); 3.62 (m, 1H, H1'); 3.44 (m, 1H, H4); 3.40 (m, 1H, H1); 3.39 (m, 1H, H7'); 3.34 (m, 1H, H2); 3.30 (m, 1H, H5); 3.29 (m, 1H, H6); 2.86 (m, 1H, H3); 1.28 (s, 9H, C(CH₃)₃)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):

82.4 (C2); 81.1 (C6); 79.7 (C4); 73.7 (C5); 66.7 (C1); 57.2 (C3); 44.7 (C7)

4-N-(tert.-Butoxycarbonyl)-4-deoxy-6-O-trityl-galactosylmethylamin 24

4.284. g 4-N-(tert.-Butoxycarbonyl)-4-deoxy-6-O-trityl-N-benzyloxycarbonylgalactosylmethylamin **23** (6.4 mmol) werden in 200 mL Methanol gelöst. Es werden 200 mg Palladium auf Aktivkohle (10%, trocken) zugegeben und die Suspension zwei Stunden bei Normaldruck unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Katalysator wird abfiltriert, das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 3.4 g (99 %) einer weissen Substanz.

R_f (Chloroform/Methanol 9:1) = 0.1

ESI-MS: 557.1 ($M+Na^+$), 1069.0 ($2M+H^+$), 1602.5 ($3M+H^+$)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz):

7.6-7-7.23 (m, 16 H, Trityl-H und NH); 5.0 (s, br, 2H, NH₂); 3.43 (H2); 3.22 (H4); 3.05 (H6); 3.03 (H5); 3.02 (H3); 3.02 (H1); 2.93 (H7); 2.69 (H7'); 1.2 (s, 9H, Boc-CH₃)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz):

155.6 (Urethan-CO); 144.3 (Trityl-C1); 129.8-126.5 (Aromaten-C); 83.5 (C6); 82.0 (C2); 78.3 (C4); 75.9 (C4); 67.7 (C1); 56.8 (C3); 46.8 (C7); 31.6 (C(CH₃)₃); 28.0 (C(CH₃)₃)

4-N-(tert.-Butoxycarbonyl)-4-deoxy-6-O-trityl-N-fluorenylmethyloxycarbonyl-galactosylmethylamin 25

917 mg 4-N-(tert.-Butoxycarbonyl)-4-deoxy-6-O-trityl-galactosylmethylamin **24** (1.715 mmol) werden in 20 mL THF gelöst und mit 636 mg FmocCl umgesetzt. Der pH der Lösung wird mit Triethylamin auf 9 eingestellt, danach wird 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit Essigsäure neutralisiert, das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand wird mit Essigsäure aufgenommen und zweimal mit Wasser gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet

und das Lösungsmittel abgezogen. Die Reinigung erfolgt durch Flash Chromatographie (Laufmittel: Chloroform/Methanol 95:5).

Ausbeute: 1.240 g (95 %) eines weissen Schaums.

R_f (Laufmittel: Chloroform/Methanol 95:5) = 0.55

ESI-MS: 779.3 ($M+Na^+$); 1535.1 ($2M+Na^+$)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz):

7.89 (m, 23 H, Aromaten-H); 7.03 (s, br, 1H, FmocNH); 6.54 (t, br, 1H, BocNH); 4.19 (m, 2H, \underline{CH}_2CH); 4.09 (m, 1H, \underline{CH}_2CH); 3.47 (m, 1H, H7); 3.39 (m, 1H, H2); 3.21 (m, 1H, H6); 3.20 (m, 1H, H4); 3.20 (m, 1H, H7'); 3.04 (m, 1H, H2); 3.00 (m, 2H, H1 und H1'); 2.89 (m, 1H, H5)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz):

156.8 und 155.6 (Urethan-CO); 144.1 (Trityl-C1); 141.1 und 129.2-126.7 (Aromaten-C); 78.6 (C2); 77.9 (C6); 74.8 (C4); 72.5 (C5); 65.4 (\underline{CH}_2CH); 64.0 (C1); 53.4 (C3); 48.9 (Trityl-qC); 46.6 ($\underline{CH}_2\underline{CH}$); 42.5 (C7); 33.7 ($\underline{C}(\underline{CH}_3)_3$); 28.3 ($C(\underline{CH}_3)_3$)

4-N-(tert.-Butoxycarbonyl)-4-deoxy-N-fluorenylmethyloxycarbonylgalactosylmethylamin 26

1.224 g 4-N-(tert.-Butoxycarbonyl)-4-deoxy-6-O-trityl-N-fluorenylmethylgalactosylmethylamin **25** (1.6 mmol) werden in 200 mL einer Mischung aus Methylenchlorid/Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser 88:2:5:5 gelöst und 5 min gerührt. Man versetzt die Mischung solange mit 5% Natriumhydrogencarbonatlösung bis die Gasentwicklung ausbleibt, trennt die Phasen und wäscht die Wasserphase dreimal mit Methylenchlorid nach. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie (Laufmittel: Chloroform/Methanol 93:7) gereinigt.

Ausbeute: 767 g (92 %) eines weissen Feststoffes.

R_f (Chloroform/Methanol 9:1) = 0.25

ESI-MS: 514.9 ($M+H^+$), 537.1 ($M+Na^+$), 791.3 ($3M+K^+H^+/2$), 1028.8 ($2M+H^+$), 1050.9 ($2M+Na^+$),

1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz):

7.88 (d, 2H; $^3J_{HH} = 7.8$ Hz, Fmoc-CH); 7.68 (d, 2H; $^3J_{HH} = 7.5$ Hz, Fmoc-CH); 7.40 (t, 2H; $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, Fmoc-CH); 7.32 (t, 2H; $^3J_{HH} = 7.6$ Hz, Fmoc-CH); 7.27 (s, br, FmocNH); 6.74 (t, br, 1H, $^3J_{HH} = 8.5$ Hz, BocNH) ; 4.29 (m, 2H, $\underline{CH_2CH}$); 4.23 (m, 1H, $\underline{CH_2CH}$); 3.65 (dd, 1H, $^3J_{1,2} = 7.8$ Hz, $^3J_{1,1'} = 13.1$ Hz, H7); 3.42 (t, 1H, $^3J_{5,6} = 11.8$ Hz; H1); 3.32 (m, 1H, H1'); 3.24 (t, 1H, $^3J_{HH} = 8.5$, H4); 3.11 (m, 1H, H2); 3.04 (m, 1H, H3); 3.00 (m, 1H, H6); 2.92 (m, 1H, H5); 2.84 (m, 1H, H7'); 1.39 (s, 9H, $C(CH_3)_3$)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz):

157.2 und 156.6 (Urethan-CO); 141-125.6 (Aromaten-C); 83.6 (C2); 81.7 (C6); 77.6 (C4); 75.9 (C5); 68.6 ($\underline{CH_2CH}$); 65.5 (C1); 56.7 (C3); 49.9 ($\underline{CH_2CH}$); 46.1 (C7); 39.6 ($\underline{C(CH_3)_3}$); 28.7 ($\underline{C(CH_3)_3}$)

Fmoc-SAA2(4NBoc)-OH 27

707 mg 4-N-(tert.-Butoxycarbonyl)-4-deoxy-N-fluorenylmethyloxycarbonylgalaktosylmethylamin **26** (1.4 mmol) werden nach AAV 2 umgesetzt. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Chloroform/Methanol/Essigsäure 95:5:3)

Ausbeute: 474 mg (66 %) eines weissen Feststoffes.

R_f (Chloroform/Methanol/Essigsäure 95:5:3) = 0.25

ESI-MS: 551.2 ($M+Na^+$), 1057.1 ($2M+H^+$), 1079.1 ($2M+Na^+$)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz):

7.87 (d, 2H, $^3J_{HH} = 7.3$ Hz, Fmoc-H2); 7.71-7.28 (m, 6H, Aromaten-H); 4.29 (m, 2H, $\underline{CH_2CH}$); 4.22 (m, 1H, $\underline{CH_2CH}$); 3.47 (m, 1H, H7); 3.40 (m, 1H, H2); 3.34 (m, 1H, H3); 3.26 (m, 1H, H4); 3.05 (m, 1H, H7'); 3.05 (m, 1H, H6); 3.03 (m, 1H, H5); 1.35 (s, 9H, $C(CH_3)_3$)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 250 MHz):

175.8 (COOH); 156.8 (Fmoc-CO); 156.2 (Boc-CO); 144.3; 141; 129.6-125.8 (Aromaten-C); 80.0 (C2); 78.5 (C6); 75.7 (C4); 71.9 (C5); 65.5 (Fmoc-CH₂); 54.7 (C3); 46.5 (Fmoc-CH); 41.9 (C7); 28.2 (C(CH₃)₃)

Fmoc-SAA2(4-N)OH 28

460 g Fmoc-SAA(4N-Boc)OH **27** (0.87 mmol) werden mit 10 mL einer Mischung aus Methylenchlorid/TFA/Triethylsilan/Methanol (88/3/5/5, v/v/v/v) gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt der Umsetzung wird durch Zugabe von kaltem Ether gefällt, abfiltriert und mit kaltem Ether gewaschen.

Ausbeute: 438 mg (quantitativ) eines weissen Pulvers.

ESI-MS: 429.1 (M+H⁺), 451.3 (M+Na⁺), 857.0 (2M+H⁺), 879.0 (2M+Na⁺), 895.2 (2M+K⁺)

Fmoc-SAA(4-NBn)OH 29

430 g Fmoc-SAA(4N)OH*TFA **28** (0.8 mmol) werden in 10 mL einer Mischung aus Methanol und THF (2:1, v/v) gelöst. Danach wird mit 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung ein pH-Wert von 8 eingestellt, anschliessend werden 105 μL Benzaldehyd (1 mmol, 1.3 Äquiv.) zugegeben und 2 h gerührt. Danach werden 65 mg Natriumcyanoborhydrid (1 mmol, 1.3 Äquiv.) zugegeben und weitere 12 h gerührt.

Die Mischung wird auf 1N Salzsäure gegeben und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Mischung fünfmal mit Methylenchlorid extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Chloroform/Methanol/Essigsäure 9:1:0.3 v/v/v).

Ausbeute: 326 mg (79 %) einer weissen Substanz.

R_f (Chloroform/Methanol/Essigsäure 9:1:0.3)= 0.15

ESI-MS: 519.1 ($M+H^+$), 541.2 ($M+Na^+$), 557.0 ($M+K^+$), 563.1 ($M-H^++2Na^+$), 1036.9 ($2M+H^+$), 1059.0 ($2M+Na^+$), 1075.1 ($2M+K^+$), 1554.6 ($3M+H^+$), 1592.9 ($3M+K^+$)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz):

7.87-7.22 (m, 13 H, Aromaten-H); 4.26 (m, 2H, $\underline{CH_2}CH$); 4.21 (s, 2H, Benzyl- CH_2); 4.19 (m, 1H, $\underline{CH_2}CH$); 3.70 (m, 1H, H2); 3.59 (m, 1H, H7); 3.42 (m, 1H, H4); 3.15 (m, 1H, H6); 3.02 (m, 1H, H5); 2.94 (m, 1H, H7'); 2.84 (m, 1H, H3);

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz):

141-126 (Aromaten-C); 81.8 (C6); 76.9 (C2); 76.5 (C4); 74.4 (C5); 69.0 (Benzyl- CH_2); 68.7 ($\underline{CH_2}CH$); 56.5 (C3); 49.8 ($\underline{CH_2}CH$); 43.2 (C7)

Baustein 2

2-Acetamido-2-deoxy-glucopyranosylnitromethan **37** [65]

Zu einer Lösung von 25 g N-Acetylglucosamin **36** (0.113 mol) in 100 mL DMSO und 40 mL Nitromethan werden 175 mL einer Natriummethylatösung (5 g Natrium in Methanol) gegeben und die Mischung drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach werden 750 mL n-Butanol zugesetzt und die entstandene Suspension 24 Stunden bei 4° C gelagert. Der weisse Feststoff wird abfiltriert und mit wenig eiskaltem Methanol gewaschen, in 200 mL Wasser gelöst und mit einer Mischung aus saurem Ionentauscher (Amberlyst 15, H^+ -Form) und 80 g Trockeneis 40 min gerührt. Der Ionentauscher wird abfiltriert, gut mit Wasser gewaschen und die resultierende Lösung 30 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das rötlichbraune Gemisch wird mit Aktivkohle entfärbt, mit basischem Ionentauscher (Ambersep 900, OH^- -Form) versetzt und zwölf Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Der Ionentauscher wird abfiltriert, gründlich mit Wasser gewaschen, danach in Wasser suspendiert und bei Raumtemperatur mit Trockeneis (4 mal 25 g) versetzt. Der Ionentauscher wird abfiltriert, gründlich mit Wasser gewaschen und die vereinigten Filtrate werden einrotiert.

Ausbeute: 10.5 g (35 %, Anomerenverhältnis α/β ca. 2:1) eines gelblichen verklebenden Schaums

Zur Charakterisierung werden 250 mg der Produktmischung entnommen und das β -Anomere aus Methanol kristallisiert

R_f (Acetonitril/Wasser 4:1) = 0.8 (beide Anomere).

ESI-MS: 306.3 ($M-H^+$), 613.2 ($2M-H^+$), 635.3 ($2M-2H^++Na^+$), 964.2 ($3M+2Na^+-3H^+$), 1293.1 ($4M+3Na^+-4H^+$), 1622.1 ($5M+4Na^+-5H^+$)

1H -NMR (D_2O , 500 MHz):

4.13 (m, 2H, $\underline{C}H_2NO_2$); 3.82 (m, 1H, H1); 3.72 (m, 1H, H6); 3.70 (m, 1H, H5); 3.67 (m, 1H, H1'); 3.56 (m, 1H, H4); 3.42 (m, 1H, H3); 3.38 (m, 1H, H2); 1.96 (s, 3H, $CO\underline{C}H_3$)

^{13}C -NMR (D_2O , 125 MHz):

174.6 (CO); 82.4 (C2); 77.7 ($\underline{C}H_2NO_2$); 77.6 (C5); 77.4 (C4); 72.4 (C3); 63.4 (C1); 55.2 (C6); 25.0 ($CO\underline{C}H_3$)

2-Acetamido-2-deoxy-glucopyranosylmethylamin 38

10.2 g 2-Acetamido-2-deoxy-glucopyranosylnitromethan **37** werden in 400 mL Methanol gelöst und 24 h unter Normaldruck unter Wasserstoff gerührt. Der Katalysator wird abfiltriert, das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand am Hochvakuum getrocknet..

Ausbeute: 8.834 g (97.7 %) eines gelblichen harten Schaums.

R_f (Acetonitril/Wasser 4:1) = 0.2 (beide Anomere).

ESI-MS: 235.1 ($M+H^+$), 481.0 ($2M+Na^+$)

2-Acetamido-2-deoxy-N-benzyloxycarbonylglucopyranosylmethylamin 39

8.8 g des Rückstandes der vorigen Umsetzung werden in 200 mL Methanol und 100 mL Wasser gelöst. Man gibt 15 g Natriumhydrogencarbonat und 70 mL einer Lösung von Benzyloxycarbonylchlorid in Toluol (50 %) zu und rührt die entstandene Suspension drei Stunden. Das Methanol wird abgezogen, die verbleibende Emulsion dreimal mit Hexan gewaschen und danach dreimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterphasen werden einrotiert und am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 12.2 g (88.4 %) eines gelblichen Schaums.

R_f (Acetonitril/Wasser 4:1) = 0.88 (β -Anomeres) und 0.75 (α -Anomeres)

ESI-MS: 391.2 ($M+Na^+$), 407.3 ($M+K^+$)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz):

7.4-7.19 (m, 5H, Aromaten-H); 5.12 (s, 2H, Benzyl- CH_2); 3.77 (H7); 3.62 (H1); 3.54 (H7'); 3.44 (H1'); 3.41 (H6); 3.4 (H5); 3.28 (H4); 3.13 (H3); 3.0 (H2); 1.78 (s, 3H, $COCH_3$)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz):

170.1 (Acetyl-CO); 154.0 (Urethan-CO); 130.2-125.9 (Aromaten-C); 83.7 (C2); 79.9 (C6); 78.2 (C4); 73.7 (C3); 71.0 (Benzyl- CH_2); 64.4 (C1); 56.2 (C5); 55.3 (C7); 26.0 (Acetyl- CH_3)

2-N-tert.-Butoxycarbonyl-2-amino-2-deoxy-N-benzyloxycarbonyl-N-tert.-butoxycarbonyl- β -D-glucopyranosylmethylamin 41 [66]

Eine Lösung von 6.64 g des Rückstandes der vorigen Umsetzung, 20 g Boc-anhydrid (9 mmol, 5 Äquiv.) und 400 mg Dimethylaminopyridin in 300 THF werden drei Stunden unter Rückfluss gekocht. Die Lösung wird einrotiert, der Rückstand mit Methylenchlorid aufgenommen und die entstandene Lösung je einmal mit 1N Salzsäure, 1N Kupfersulfatlösung und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und

einrotiert. Die Reinigung erfolgt durch Flash Chromatographie (Laufmittel: Hexan/Essigester 1:1)

Ausbeute: 5.9 g β - und 2.7 g α -Produkt (Auf dieser Stufe konnten keine analytischen Daten erhalten werden).

Das Produkt der vorhergehenden Umsetzung (β -Produkt) wird in 250 mL Methanol gelöst und mit 25 mL 2 N Natriumhydroxidlösung umgesetzt. 2 Stunden wird die Reaktion durch Zugabe von Essigsäure abgebrochen und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird dreimal mit Toluol koevaporiert, die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Laufmittel: Chloroform/Methanol 9:1). (Im Fall des α -Anomeren beträgt die Reaktionszeit 30 min)

Ausbeute: 4.2 g (66 %) eines weissen Schaums (α -Produkt: 1.9 g (60%)).

ESI-MS: α -Anomeres 327.1 (M-2Boc+3H⁺), 449.0 (M-Boc+H⁺+Na⁺), 549.0 (M+Na⁺)
 β -Anomeres 327.1 (M-2Boc+3H⁺), 393.1 (M-Boc-^tBu+2H⁺+Na⁺), 449.0 (M-Boc+H⁺+Na⁺), 549.0 (M+Na⁺), 1074.8 (2M+H⁺)

2-N-tert.-Butoxycarbonyl-2-amino-2-deoxy-N-benzyloxycarbonyl- β -D-glucopyranosylmethylamin 42[67]

4 g 2-N-tert.-Butoxycarbonyl-2-amino-2-deoxy-N-benzyloxycarbonyl-N-tert.-butoxycarbonyl- β -D-glucopyranosylmethylamin **41** (7.6 mmol) werden in 150 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 5 g Magnesiumperchlorat umgesetzt. Man rührt 4 Tage, zieht das Lösungsmittel ab, nimmt den Rückstand mit Essigester auf und extrahiert mit Wasser. Das Lösungsmittel wird abgezogen. (In analoger Weise erfolgt die Umsetzung des α -Anomeren)

Ausbeute: 3.3 g (quantitativ) einer weissen Substanz.

ESI-MS: 327.1 (M-Boc+2H⁺), 449.1 (M+Na⁺), 465.1 (M+K⁺), 659.2 (3M+K⁺+H⁺/2), 875.0 (2M+Na⁺), 891.1 (M+K⁺)

2-N-tert.-Butoxycarbonyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glucoopyranosylmethylamin 43

3.2 g 2-N-tert.-Butoxycarbonyl-2-amino-2-deoxy-N-benzyloxycarbonyl- β -D-glucoopyranosylmethylamin **42** (7.5 mmol) werden in 250 mL Methanol gelöst und nach Zugabe von 200 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %, trocken) zwei Stunden bei Normaldruck unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Der Katalysator wird abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen.

Ausbeute: 2.18 g (quantitativ) eines weissen Feststoffes.

2-N-tert.-Butoxycarbonyl-2-amino-2-deoxy-N-fluorenylmethylloxycarbonyl- β -D-glucoopyranosylmethylamin 44

2.1 g 2-N-tert.-Butoxycarbonyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glucoopyranosylmethylamin **43** (7.2 mmol) werden in 150 mL 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung gelöst und mit 2.6 g Fmoc-OSu versetzt (7.9 mmol, 1.1 Äquiv.). Die Lösung wird 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, danach mit Essigsäure angesäuert und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird mit Essigester aufgenommen und mit halbgesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Natriumsulfat erfolgt die Reinigung durch Flash-Chromatographie (Laufmittel Chloroform/Methanol 92:8)

Ausbeute: 2.75 g (73 %) eines weissen Feststoffes.

ESI-MS: 415.1 (M-Boc+2H⁺), 514.8 (M+H⁺), 537.1 (M+Na⁺), 791.2 (3M+K⁺+H⁺/2), 1028.8 (2M+Na⁺), 1050.9 (2M+Na⁺)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 250 MHz):

7.7-7.1 (m, 8H, Aromaten-H); 4.29 (m, 2H, CH₂CH); 4.23 (m, 1H, CH₂CH); 3.67 (m, 1H, H1); 3.46 (m, 1H, H7); 3.41 (m, 1H, H1'); 3.23 (m, 1H, H4); 3.10 (m, 1H, H6); 3.06 (m, 1H, H5); 3.03 (m, 1H, H2); 3.0 (m, 1H, H3); 2.77 (m, 1H, H7'); 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 250 MHz):

156.8 und 156.4 (Urethan-CO); 144.3, 141, 129.4-125.6 (Aromaten-C); 83.4 (C2); 81.5 (C6); 77.8 (C4); 74.5 (C3); 68.7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}$); 65.2 (C1); 58.0 (C5); 49.9 ($\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}$); 46.0 (C7); 31.3 (Boc- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)

Fmoc-SAA2(2NBoc)-OH 45

450 mg 2-N-tert.-Butoxycarbonyl-2-amino-2-deoxy-N-fluorenylmethyloxycarbonyl- β -D-glucopyranosylmethylamin **44** (0.87 mmol) werden nach AAV 2 umgesetzt. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Laufmittel: Chloroform/Methanol/Essigsäure 93:7:3)

Ausbeute: 318 mg (69 %) eines weissen Feststoffes.

R_f (Chloroform/Methanol/Essigsäure 93:7:3) = 0.15

ESI-MS: 429.1 (M-Boc+2H⁺), 551.1 (M+Na⁺), 1078.8 (2M+Na⁺), 1095.1 (2M+K⁺)

Fmoc-SAA2(2N)OH*TFA 46

370 g Fmoc-SAA(2N-Boc)OH **45** (0.7 mmol) werden mit 10 mL einer Mischung aus Methylenchlorid/TFA/Triethylsilan/Methanol (88/3/5/5, v/v/v/v) gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt der Umsetzung wird durch Zugabe von kaltem Ether gefällt, abfiltriert und mit kaltem Ether gewaschen.

Ausbeute: 349 mg (quant.) eines weissen Pulvers.

R_f (Chloroform/Methanol/Essigsäure 93:7:3) = 0.1

ESI-MS: 429.1 (M-Boc+2H⁺), 528.8 (M+H⁺), 551.1 (M+Na⁺), 567.0 (M+K⁺), 812.2 (3M+K⁺+H⁺/2), 1079 (2M+Na⁺), 1095.1 (2M+K⁺),

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz):

12.8 (s, br, 1H, COOH); 7.88 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, Fmoc-CH); 7.-7.24 (m, 6H, Aromaten-H); 74.33 (m, 2H, CH_2CH); 4.24 (m, 1H, CH_2CH); 3.62 (m, 1H, H2); 3.60 (m, 1H, H4); 3.45 (m, 1H, H7); 3.44 (m, 1H, H6); 3.41 (m, 1H, H3); 3.19 (m, 1H, H7'); 2.81 (m, 1H, H5);

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz):

142.3-126.5 (Aromaten-C); 82.7 (C3); 78.3 (C4); 76.1 (C6); 74.9 (C2); 69.0 (CH_2CH); 56.1 (C5); 49.9 (CH_2CH); 44.6 (C7)

Fmoc-SAA2(2N-Bn)OH 47

340 mg Fmoc-SAA2(2N)OH **46** (0.63 mmol) werden in 9 mL einer Mischung aus THF und Methanol (2:1) gelöst. Der pH der Mischung wird mit 5% Natriumhydrogencarbonatlösung auf 8-9 eingestellt, danach werden 83 μL Benzaldehyd (0.82 mmol, 1.3 Äquiv.) zugegeben und vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man gibt 53 mg Natriumcyanoborhydrid (0.82 mmol, 1.3 Äquiv.) und rührt weitere 12 Stunden. Man stellt den pH-Wert der Lösung mit 1N Salzsäure auf 2-3 und zieht die organischen Lösungsmittel ab. Die verbleibende Suspension wird fünfmal mit Essigester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Chloroform/Methanol/Essigsäure 93/7/0.1).

Ausbeute: 137 mg (42 %) einer weissen Substanz.

R_f (Chloroform/Methanol/Essigsäure 93:7:3) =

ESI-MS: 519.2 ($\text{M}+\text{H}^+$), 533.2 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 1059.0 ($2\text{M}+\text{Na}^+$), 1075.1 ($\text{M}+\text{K}^+$)

Baustein 3**(N-tert.-Butyloxycarbonyl-) β -D-galactosylmethylamin 49**

1.76 g β -D-Galactosylmethylamin **8** (9.1 mmol) und 965 mg Natriumhydrogencarbonat werden in Wasser gelöst. Man gibt eine Lösung von 3.2 g Boc-anhydrid (10 mmol, 1.1 Äquiv.) in 30 mL THF zu und rührt drei Stunden bei Raumtemperatur. Die Mischung wird mit Ammoniumchlorid gesättigt und fünfmal mit Tetrahydrofuran extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden eingengt und dreimal mit Toluol koevaporiert.

Ausbeute: 2.63 g (99 %) eines weissen Feststoffes.

ESI-MS: 300.0 (M+Li⁺), 316.0 (M+Na⁺), 608.8 (2M+Na⁺)

Boc-SAA2gal-OH 51

1.8 g (N-tert.-Butyloxycarbonyl-) β -D-galactosylmethylamin **49** (6.1 mmol) werden nach AAV 2 umgesetzt. Nach abgeschlossener Reaktion wird mit saurem Ionentauscher (Amberlyst 15, H⁺-Form) vorsichtig pH 2 eingestellt. Der Ionentauscher wird abfiltriert und gründlich mit Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wird mit Ammoniumchlorid gesättigt und zehnmal mit THF extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einrotiert und dreimal mit Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgt durch Kristallisation aus Wasser.

Ausbeute: 1.27 g (67 %) weisse Kristalle.

ESI-MS: 208.1 (M-Boc+2H⁺), 307.9 (M+H⁺), 330.1 (M+Na⁺), 614.8 (2M+H⁺), 636.8 (2M+Na⁺), 653.0 (2M+K⁺),

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz):

6.55 (t, br, 1H, NH); 5.0-4.65 (m, 3H, OH); 4.05 (s, 1H, H2); 3.97 (s, br, 1H, H3); 3.55 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.4 Hz, ³J_{HH} = 12.7 Hz, H7); 3.38 (m, 1H, H4); 3.30 (m, 1H, H5); 3.19 (m, 1H, H6); 3.05 (m, 1H, H7'); 1.30 (C(CH₃)₃)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz):

169.9 (COOH); 156.2 (Boc-CO); 78.0 (C6); 77.3 (C2); 73.5 (C4); 70.8 (C5); 69.9 (C3); 42.2 (C7); 39.6 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 23.1 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$)

(N-Fluorenylmethyloxycarbonyl-) β -D-galactosylmethylamin 50

4.7 g β -D-Galactosylmethylamin **8** (24 mmol) werden in 70 mL 10%iger Natriumhydrogencarbonatlösung gelöst und mit einer Mischung aus 6.93 g Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (26.8 mmol, 1.1 Äquiv.) in 40 mL THF umgesetzt. Man rührt 1.5 Stunden und stellt mit saurem Ionentauscher (Amberlyst 15, H^+ -Form) auf pH 2. Der Ionentauscher wird abfiltriert und gründlich nachgewaschen, danach die vereinigten Filtrate fünfmal mit Essigester extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen werden einrotiert und der verbleibende Rückstand dreimal mit Toluol kodestilliert.

Ausbeute: 9.6 g (95 %) eines weissen Feststoffes.

ESI-MS: 416.2 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Fmoc-SAA2gal-OH 52

9 g (N-Fluorenylmethyloxycarbonyl-) β -D-galactosylmethylamin **50** (21.7 mmol) werden nach AAV 2 umgesetzt. Anschliessend wird mit saurem Ionentauscher (Amberlyst 15, H^+ -Form) pH 1.5 eingestellt. Der Ionentauscher wird abfiltriert und gründlich mit Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wird mit Ammoniumchlorid gesättigt und fünfmal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einrotiert und dreimal mit Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgt durch Kristallisation aus Methanol (dreimal).

Ausbeute: 6.7 g (72 %) weisser Kristalle.

ESI-MS: 429.9 ($\text{M}+\text{H}^+$); 452.2 ($\text{M}+\text{Na}^+$); 663.6 ($3\text{M}+\text{K}^++\text{Na}^+/2$); 858.8 ($2\text{M}+\text{H}^+$); 880.9 ($2\text{M}+\text{Na}^+$); 897.0 ($2\text{M}+\text{K}^+$); 1309.6 ($3\text{M}+\text{Na}^+$); 1326.7 ($3\text{M}+\text{K}^+$)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz):

7.87 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, Fmoc-CH); 7.69 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, Fmoc-CH); 7.4 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, Fmoc-CH); 7.3 (m, 2H, Fmoc-CH); 7.23 (t, br, 1H, NH); 5.0-4.65 (m, 3H, OH); 4.32 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, Fmoc-CH- $\underline{\text{CH}_2}$), 4.24 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, Fmoc- $\underline{\text{CH}}$ - CH_2); 4.05 (s, 1H, H2); 3.97 (s, br, 1H, H3); 3.55 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 12.7$ Hz, H7); 3.38 (m, 1H, H4); 3.30 (m, 1H, H5); 3.19 (m, 1H, H6); 3.05 (m, 1H, H7')

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz):

170.2 (COOH); 156.2 (Fmoc-CO); 143.9-120.1 (Aromaten-C); 78.2 (C6); 77.1 (C2); 73.8 (C4); 70.2 (C3); 67.9 (Fmoc- CH_2); 65.4 (C5); 46.8 (Fmoc-CH); 42.2 (C7);

Baustein 4

Ethyl-6-O-trityl-1-thiogalactopyranosid 54

20 g eines Anomerengemisches von Ethyl-2,3,4,6-O-acetyl-1-deoxy-1-thiogalactopyranosid [70] (α/β 1:1, 51 mmol) werden in 200 mL abs. Methanol gelöst und mit 1.5 g Natriumethylat umgesetzt. Man rührt drei Stunden, neutralisiert mit Essigsäure und zieht das Lösungsmittel ab.

Der Rückstand wird in 300 mL abs. Pyridin gelöst und mit 25 g Tritylchlorid umgesetzt. Man rührt 4 Stunden bei 100° C, dann 12 Stunden bei 60° C, bricht die Reaktion durch Zugabe von 20 mL Methanol ab, zieht das Lösungsmittel ab und koevaporiert noch dreimal mit Toluol. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Laufmittel: Chloroform/Methanol 95:5 \rightarrow 9:1).

Ausbeute: 15.2 g eines schwach gelben Schaums (Die Trennung der Anomeren ist auf dieser Stufe nicht möglich).

R_f (Chloroform/Methanol 9:1) = 0.45

ESI-MS: 489.1 ($M+Na^+$), 505.0 ($M+K^+$), 729.0 ($M+Na^++K^+/2$), 954.8 ($2M+Na^+$), 971.0 ($2M+K^+$)

Ethyl-2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-trityl-1-thiogalactopyranosid 55

15 g Ethyl-6-O-trityl-1-thiogalactopyranosid **54** (32.2 mmol) werden in 300 mL DMF gelöst und mit 4.7 g Natriumhydrid (55-65% in Paraffinöl, 116 mmol, 3.6 Äquiv.) und 13.8 mL Benzylbromid (116 mmol, 3.6 Äquiv.) umgesetzt (im Lauf der Reaktion kommt es zu starker Wärmeentwicklung). Man rührt drei Stunden bei Raumtemperatur und zerstört überschüssiges Natriumhydrid durch Zugabe von Methanol und engt die Lösung am Rotationsverdampfer ein. Der Rückstand wird mit Chloroform aufgenommen, die entstandene Lösung dreimal mit Wasser extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Die Reinigung erfolgt durch Flash Chromatographie (Laufmittel Hexan/Essigester 6:1).

Ausbeute: 13.2 g (56 %) eines farblosen Öls.

ESI-MS: 759.2 (M+Na⁺), 775.1 (M+K⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): nur α-Verbindung

7.55-7.06 (m, 30H, Aromaten-H); 5.59 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H1-α); 4.95-4.69 (m, 6H, Benzyl-CH₂); 4.31 (H2); 3.87 (H3); 3.58 (H4); 3.51 (H6); 3.40 (H5); 3.31 (H6'); 2.78 (m, 2H, SCH₂CH₃); 1.33 (t, 3H, SCH₂CH₃);

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):

143.9 (Trityl-C1); 138.8, 138.5 und 138.3 (Benzyl-C1); 130.0-125.8 (m, Aromaten-C); 87.0 (C4); 85.7 (C1); 82.4 (C3); 80.4 (C5); 79.1 (C2); 78.5, 77.5 und 75.6 (Benzyl-CH₂); 65.7 (C6); 27.3 (SCH₂CH₃); 17.7 (SCH₂CH₃)

Ethyl-2,3,4-tri-O-benzyl-thiogalactopyranosid **56**

13 g Ethyl-2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-trityl-1-thiogalactopyranosid **55** (17.7 mmol) werden in 100 mL einer Mischung aus Methylenchlorid/Trifluoressigsäure/Wasser/Triethylsilan (88:2:5:5) gelöst und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abgezogen und der verbleibende Rückstand durch Flash-Chromatographie (Laufmittel: Hexan/Essigester 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 8.1 g (93 %) eines farblosen Öls.

ESI-MS: 517.2 (M+Na⁺); 1010.7 (M₂+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): nur β-Verbindung

7.48-7.24 (m, 15H, Aromat. H); 5.04-4.63 (m, 6H, Benzyl-CH₂); 4.46 (d, 1H, ³J_{1,2} = 9.6 Hz, H1); 3.88 (H3); 3.87 (H2); 3.82 (H6); 3.62 (H4); 3.53 (H6'); 3.44 (H5); 2.81 (m, 2H, SCH₂CH₃); 1.32 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, SCH₂CH₃)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):

138.3 (Benzyl-C1); 129.6-126.2 (Aromaten); 88.3 (C1); 87.0 (C4); 81.4 (C5); 81.3 (C3); 78.5, 76.8 und 75.8 (Benzyl-CH₂); 75.9 (C2); 64.9 (C6); 28.0 (SCH₂CH₃); 18.0 (SCH₂CH₃)

Ethyl-2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-acetyl-1-thiogalactopyranosid 57

8 g Ethyl-2,3,4-tri-O-benzyl-1-thiogalactopyranosid **56** (16.2 mmol) werden in 300 mL einer Mischung aus Pyridin und Acetanhydrid gelöst und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abgezogen und der verbleibende Rückstand dreimal mit Toluol koevaporiert.

Ausbeute: 8.9 g (quantitativ) eines gelblichen Öls.

ESI-MS: 559.1 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): nur β-Verbindung

7.51-7.23 (m, 15 H, Aromat. H); 5.08- 4.69 (m, 6H, Benzyl-CH₂); 4.5 (d, 2H, ³J_{1,2} = 9.1 Hz, H1-β); 4.3 und 4.12 (H6 und H6'); 3.93 (H2); 3.90 (H4); 3.64 (H3); 3.62 (H5); 2.81 (m, 2H, SCH₂CH₃); 2.03 (s, 3H, COCH₃); 1.36 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, SCH₂CH₃)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):

170.5 (CO); 138.3 (Aromat. C1); 129.6-126.2 (Aromaten); 88.2 (C1); 86.9 (C3); 81.2 (C2); 78.7 (C5); 78.6, 77.0 und 75.9 (Benzyl-CH₂); 76.0 (C4); 66.5 (C6); 28.0 (SCH₂CH₃); 23.8 (COCH₃); 18.0 (SCH₂CH₃)

6-O-Acetyl-2,3,4-tri-O-benzyl-D-galactopyranosylfluorid 58

2.414 g Ethyl-6-O-acetyl-2,3,4-tri-O-benzyl-1-thiogalactopyranosid **57** (4.5 mmol) werden in einem Polyethylengefäß in 40 mL abs. Methylenchlorid gelöst und auf 0°C gekühlt. Es werden 1.1 g N-Bromsuccinimid (6.2 mmol, 1.4 Äquiv.) zugegeben, fünf Minuten später gefolgt von 0.51 mL HF/Pyridin (1.1 Äquiv.). Nach 30 Minuten wird die Reaktion durch die Zugabe gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung abgebrochen, die Mischung mit Methylenchlorid verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen

Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel abgezogen und der verbleibende Rückstand durch Flash Chromatographie gereinigt (Laufmittel: Hexan/Essigester 4:1)

Ausbeute: 2.069 g (93 %, α -Form) eines farblosen, langsam kristallisierenden Öls. (In Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen und des Anomerenverhältnissen des Edukts können bis zu 50 % des β -Anomeren entstehen, was aber für den weiteren Verlauf der Synthese keine Auswirkungen hat)

ESI-MS: α -Anomeres 517.1 ($M+Na^+$); 989.2 ($2M+H^+$)

β -Anomeres 517.1 ($M+Na^+$); 533.1 ($M+K^+$); 989.2 ($2M+H^+$)

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): α -Anomeres

7.53-7.25 (m, 15H, Aromaten-H); 5.63 (dd, 1H, $^2J_{HF} = 55.2$ Hz, H1- α); 5.07-4.64 (m, 6H, Benzyl- CH_2); 4.23 und 4.16 (H6 und H6'); 4.14 (H2); 4.12 (H4); 4.01 (H5); 3.99 (H3); 2.06 (s, 3H, $COCH_3$)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): α -Anomeres

170.2 (CO); 138.6, 138.4 und 138.2 (Benzyl-C1); 129.8-125.5 (Aromaten-C); 109.7 ($^1J_{CF} = 172.9$ Hz, C1); 81.1 (C5); 78.5 (C4); 77.4, 76.5 und 76.2 (Benzyl- CH_2); 77.0 (C3); 73.9 (C2); 66.0 (C6); 23.5 ($COCH_3$)

6-O-Acetyl-2,3,4-tri-O-benzyl-D-galactopyranosylcyanid 59

1.913 g (3.9 mmol) 6-O-Acetyl-2,3,4-tri-O-benzyl-D-galactopyranosylfluorid **58** wird in 35 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 0.63 mL (5 mmol, 1.3 Äquiv.) Trimethylsilylcyanid und 0.54 mL (4.32 mmol, 1.1 Äquiv.) Bortrifluorid-Diethyletherat umgesetzt. Nach 30 min wird das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand mit Essigester aufgenommen und die Suspension mit gesättigter Natriumacetatlösung extrahiert. Die Lösung wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Laufmittel: Hexan/Essigester 3:1).

Ausbeute: 680 mg (α -Anomeres) und 989 mg (β -Anomeres) zweier farbloser Öle (Gesamt 86 %. Die Verwendung der jeweils reinen anomeren Glycosylfluoride anstelle des Anomerengemisches hat keinen Einfluss auf die Produktverteilung).

R_f (Hexan/Essigester 3:1) = 0.5 (α -Anomeres)
0.35 (β -Anomeres)

APCI-MS: α -Anomeres 502.1 ($M+H^+$)
 β -Anomeres 502.1 ($M+H^+$)

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz):

7.47-7.12 (m, 15H, Aromaten-H); 4.91-4.52 (m, 6H, Benzyl- CH_2); 4.58 (m, 1H, H6); 4.16 (m, 1H, H3); 4.15 (m, 1H, H1); 3.96 (m, 1H, H1'); 3.96 (m, 1H, H5); 3.86 (m, 1H, H2); 3.77 (m, 1H, H4); 1.99 (s, 3H, $COCH_3$)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz):

170.5 ($\underline{C}OCH_3$); 144.2, 143.8, 141.6 (Benzyl-C1); 129.8-125.0 (Aromaten-C); 118.0 (CN); 85.0 (C4); 78.8 (C5); 78.6, 78.4, 77.7 (Benzyl- $\underline{C}H_2$); 76.6 (C3); 75.9 (C2); 69.6 (C6); 65.8 (C1); 23.9 ($CO\underline{C}H_3$)

2,3,4-tri-O-benzyl-D-galactopyranosylmethylamin 60

904 mg 6-O-Acetyl-2,3,4-tri-O-benzyl-D-galactopyranosylcyanid **59** (1.8 mmol) werden in 20 mL abs. THF gelöst und mit 10 mL Lithiumaluminiumhydrid-Lösung (1M in THF) umgesetzt. Man rührt zwei Stunden, hydrolysiert überschüssiges Lithiumaluminiumhydrid mit Wasser (vorsichtig) und zentrifugiert den weissen Niederschlag ab. Der Rückstand wird noch dreimal mit THF aufgeschlämmt wiederum zentrifugiert und die gesammelten Überstände einrotiert.

Ausbeute: nicht bestimmt.

ESI-MS (beide Anomere): 464.2 ($M+H^+$)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 250 MHz):

7.45-7.16 (m, 15H, Aromaten-H); 4.94-4.62 (m, 6H, Benzyl- CH_2); 4.32 (m, 1H, H2); 4.11 (m, 2H, H1); 4.06 (m, 1H, H3); 3.84 (m, 1H, H5); 3.68 (m, 1H, H4); 3.59 (m, 1H, H7); 3.41 (m, 1H, H6); 3.22 (m, 1H, H1')

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 250 MHz):

142, 141.1, 140.3 (Benzyl-C1); 129.7-124.6 (Aromaten-C); 79.0 (C3); 86.0 (C4); 77.5 und 74.8 (Benzyl- CH_2); 75.3 (C5); 80.9 (C6); 69.4 (C2); 49.8 (C1); 44.4 (CH_2NH_2)

2,3,4-tri-O-benzyl-N-fluorenylmethyloxycarbonyl-D-galactopyranosylmethylamin 61

2,3,4-tri-O-benzyl-D-galactopyranosylmethylamin **60** (Rückstand der vorigen Umsetzung) wird in THF gelöst und mit 2 g FmocOSu bei pH 9 (Triethylamin) umgesetzt. Nach drei Stunden wird mit Essigsäure angesäuert und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird mit Essigester aufgenommen und die Lösung mit 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Man trocknet über Natriumsulfat und zieht das Lösungsmittel ab. Die Reinigung erfolgt durch Flash Chromatographie (Laufmittel Chloroform/Methanol 99:1)

Ausbeute: 1.01 g (89 %).

R_f (Hexan/Essigester 1:1) = 0.3 (α -Anomeres), 0.25 (β -Anomeres)

ESI-MS: α -Anomeres 686.0 ($\text{M}+\text{H}^+$); 708.3 ($\text{M}+\text{Na}^+$); 1047.9 ($\text{M}_3+\text{K}^++\text{Na}^+/2$); 1370.8 (M_2+H^+); 1392.8 (M_2+Na^+)

β -Anomeres 686.0 ($\text{M}+\text{H}^+$); 708.3 ($\text{M}+\text{Na}^+$); 1047.9 ($\text{M}_3+\text{K}^++\text{Na}^+/2$); 1370.8 (M_2+H^+); 1392.8 (M_2+Na^+)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

7.76 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, aromat. H2); 7.6 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, aromat. H5); 7.43 (m, 5H, aromat. H3, H4 und NH) 5.04-4.59 (Benzyl- CH_2); 4.40 (m, 2H, CH_2CH); 4.24

(m, 1H, CH₂CH); 3.92 (H3); 3.84 (H5); 3.77 (H1); 3.66 (2H, H4 und H7); 3.54 (H1'); 3.50 (H7'); 3.44 (H2); 3.39 (H6);

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 250 MHz):

144.0, 141.4 und 138.2 (Benzyl-C1); 130.4-118.5 (aromat.-C); 87.4 (C4); 81.2 (C2); 81.1 (C6); 78.6 (C5); 78.2, 77.1 und 75.5 (Benzyl-CH₂); 76.3 (C3); 69.8 (CH₂CH); 65.2 (C1); 50.1 (CH₂CH); 44.9 (CH₂NH);

Fmoc-SAA2gal(Bn)₃-OH 62

459 mg 2,3,4-tri-O-benzyl-N-fluorenylmethyloxycarbonyl-D-galactopyranosylmethylamin **61** (0,67 mmol) werden nach AAV 2 umgesetzt. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Laufmittel: Chloroform/Methanol/Essigsäure:)

Ausbeute: 270 mg (58 %) eines farblosen Öls.

R_f (Chloroform/Methanol/Essigsäure 95:5:0.2) = 0.2

APCI-MS (Negativdetektion): α-Anomeres

698.4 (M-H⁺)

ESI-MS (Negativdetektion): β-Anomeres

698.1 (M-H⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): α-Anomeres

7.7 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, Fmoc-CH); 7.63 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, Fmoc-CH); 7.45-7.15 (Aromaten-H); 5.25 (s, br, 1H, NH); 4.66-4.40 (m, 6H, Benzyl-CH₂); 4.40 (m, 2H, CH₂CH); 4.39 (m, 1H, H4); 4.31 (m, 2H, H5 und H6); 4.26 (m, 1H, CH₂CH); 3.76 (m, 1H, H2); 3.60 (m, 1H, H3); 3.50 und 3.40 (m, 2H, H7 und H7');

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):

169.9 (COOH); 156.6 (Urethan-CO); 144.1, 144.0, 141.2 (Benzyl-C1); 137.3, 129.0-124.8 (Aromaten-C); 78.4 (C3); 76.6, 76.0 und 75.4 (Benzyl-CH₂); 76.5 (C5); 75.4 (C2); 73.2 (C4); 73.2 (C6); 69.7 (CH₂CH); 50.0 (CH₂CH); 44.1 (C7)

9.4 Synthesen der Peptide

Cyclo(-Thr-SAA2(4NBn)-Phe-D-Trp-Lys-) 80

Beginnend mit Fmoc-Lys(Boc)-OH wird das Peptid nach den Vorschriften AAV4-6 zum linearen, N-terminal entschützten aber seitenkettengeschützten Peptid aufgebaut und danach nach AAV 7 und 8 zum fertigen Cyclus umgesetzt. Die Reinigung erfolgt erst auf dieser Stufe mittels semipräparativer HPLC ($t_r = 16.3$ min, Gradient:10→60 in 30 Minuten). Danach wird lyophilisiert.

Ausbeute: 10.5 mg (12 %).

ESI-MS: $m/z = 841.3$ ($M+H^+$); 863.4 ($M+Na^+$); 993.1 ($M+TFA+K^+$)

Cyclo(-Thr-SAA2(2NBn)-Phe-D-Trp-Lys-) 81

Beginnend mit Fmoc-Lys(Boc)-OH wird das Peptid nach den Vorschriften AAV4-6 zum linearen, N-terminal entschützten aber seitenkettengeschützten Peptid aufgebaut und danach nach AAV 7 und 8 zum fertigen Cyclus umgesetzt. Die Reinigung erfolgt erst auf dieser Stufe mittels semipräparativer HPLC ($t_r = 16.6$ min, Gradient:10→60 in 30 Minuten). Danach wird lyophilisiert.

Ausbeute: 8.6 mg (10 %).

ESI-MS: $m/z = 841.2$ ($M+H^+$); 863.4 ($M+Na^+$)

Cyclo(-Thr- α -SAA2gal(Bn)₃-Phe-D-Trp-Lys-) 82

Beginnend mit Fmoc-Lys(Boc)-OH wird das Peptid nach den Vorschriften AAV4-6 zum linearen, N-terminal entschützten aber seitenkettengeschützten Peptid aufgebaut und danach nach AAV 7 und 8 zum fertigen Cyclus umgesetzt. Die Reinigung erfolgt erst auf dieser Stufe mittels semipräparativer HPLC ($t_r = 18.2$ min; Gradient:60→100 in 30 Minuten). Danach wird lyophilisiert.

Ausbeute: 15.2 mg (13 %).

ESI-MS: $m/z = 1022.6 (M+H^+); 1044.4 (M+Na^+)$

Cyclo(-Thr- β -SAA2gal(Bn)₃-Phe-D-Trp-Lys-) 83

Beginnend mit Fmoc-Lys(Boc)-OH wird das Peptid nach den Vorschriften AAV4-6 zum linearen, N-terminal entschützten aber seitenkettengeschützten Peptid aufgebaut und danach nach AAV 7 und 8 zum fertigen Cyclus umgesetzt. Die Reinigung erfolgt erst auf dieser Stufe mittels semipräparativer HPLC ($t_r = 18.5$ min; Gradient: 60→100 in 30 Minuten). Danach wird lyophilisiert.

Ausbeute: 17.6 mg (15 %).

ESI-MS: $m/z = 1022.5 (M+H^+); 1044.5 (M+Na^+)$

Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(SAA2gal)-) 89

Beginnend mit Fmoc-Gly-OH wird das Peptid nach den Vorschriften AAV4-6 zum linearen, N-terminal entschützten aber seitenkettengeschützten linearen Peptid aufgebaut und danach nach AAV 7 und 8 zum fertigen Cyclus umgesetzt. Die Reinigung erfolgt durch Fällung aus Wasser. Die selektive Entschützung der Lysinseitenkette erfolgt nach AAV3. Danach wird die Zuckeraminosäure nach AAV9 angekuppelt, überschüssiges Kupplungsreagens durch Zugabe von Wasser und 30 min stehenlassen hydrolysiert, die Fmoc-gruppe abgespalten und danach nach AAV8 die restlichen Seitenketten entschützt. Die Grobreinigung erfolgt durch Fällung aus eiskaltem Diethylether, die endgültige Reinigung dann durch semipräparative HPLC ($t_r = 19.1$ min; Gradient: 0→30 in 30 Minuten).

Ausbeute: 59 mg (43 %).

ESI-MS: $m/z = 809.4 (M+H^+); 831.3 (M+Na^+)$

Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(AcSAA2gal)-) 90

Die Synthese verläuft parallel mit der von Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(SAA2gal)-) **89**. Nach der Fällung aus Ether wird das Peptid mit einer 10:1-Mischung aus Methanol und Acetanhydrid umgesetzt (7 Äquiv. Acetanhydrid pro freier Lysin-Aminogruppe). Die restlichen Schritte verlaufen wie oben beschrieben ($t_r = 17.9$ min, HPLC-Gradient: 0→30 in 30 Minuten).

ESI-MS: $m/z = 851.3$ ($M+H^+$); 873.4 ($M+Na^+$)

Ac-SAA2gal(Bn)₃-SAA2(4N)-SAAgal-NH₂*TFA

Ausgehend von Fmoc-SAA2-gal-OH wird nach SAA4b und 5 das lineare Oligomere an Rink-Amid-MBHA-Harz aufgebaut. Die Kupplungszeiten betragen jeweils 16 h, im Falle von Fmoc-SAA2(4NBoc)-OH wird eine Doppelkupplung durchgeführt. Nach Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe wird durch zweistündige Umsetzung mit einer Mischung aus DMF/MeOH/Ac₂O 9:1:0.2 gecappt. Unerwünschte O-Acetylierungsprodukte werden danach durch eine 4-stündige Umsetzung mit einer 0.1 M Lösung von Natriummethylat in DMF/MeOH 9:1 hydrolysiert. Harzabspaltung und simultane Boc-Abspaltung werden nach AAV6b durchgeführt.

$t_r = 15.4$ min (Gradient 10→90 in 20 Minuten)

Ac-SAA2gal(Bn)₃-SAA2(4N-SAA1(Bn))-SAAgal-NH₂ 103

Ac-SAA2gal(Bn)₃-SAA2(4N)-SAAgal-NH₂ wird nach AAV9 in Lösung mit 5 Äquiv. H-SAA1(Bn)-OH bei 60° C 20 Stunden umgesetzt. Überschüssiges Kupplungsreagens wird durch Zugabe von Wasser hydrolysiert, das Lösungsmittel wird abgezogen. Die abschliessende Reinigung erfolgt durch semipräparative HPLC (HPLC-Gradient: 10→90 in 45 Minuten).

$t_r = 14.3$ min (Gradient 10→90 in 20 Minuten)

HPLC-MS: $m/z = 1203.2$ ($M+H^+$); 1225.5 ($M+Na^+$)

9.5 Synthese der PNA-Monomere

Methyl α -formylsuccinat

16.2 g Natriummethylat (300 mmol, 1.5 Äquiv.) werden unter Argonatmosphäre in 200 mL abs. Diethylether suspendiert. Die Mischung wird auf 0°C gekühlt, danach wird langsam eine Mischung aus 49.2 mL Methylformiat (800 mmol, 4 Äquiv.) und 26.2 mL Dimethylsuccinat (200 mmol) zugetropft, 2 h bei 0° C und weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wird einrotiert, der Rückstand mit Hexan gewaschen und dann mit 3 N Salzsäure gelöst. Es wird mit konzentrierter Salzsäure pH 5 eingestellt und die Lösung viermal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen.

Die Reinigung erfolgt durch Destillation am Hochvakuum. ($Sdp_{0.5 \text{ Torr}} = 108-112^\circ\text{C}$)

Ausbeute: 25 g (71.8 %) eines schwach gelblichen Öls.

APCI-MS: 174.9 ($M+H^+$)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 250 MHz): (die Verbindung liegt in vollständig enolisierter Form vor)

10.89 (s, br, 1H, OH); 7.7 (s, 1H, CHOH); 3.56 (s, 3H, OCH_3); 3.52 (s, 3H, OCH_3); 3.15 (s, 2H, CH_2)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 62.5 MHz):

171 (s, COOMe); 167 (s, COOMe); 155 (s, CHOH); 101 (s, C=CHOH); 50 (s, OCH_3), 49.5 (s, OCH_3); 28 (s, CH_2)

Isocytosin-5-yl-essigsäure 118

2.974 g Natriummethylat (55 mmol, 4.6 Äquiv.) werden unter Argonatmosphäre in 20 mL abs. Methanol gelöst, danach werden 3.45 g Guanidinium Hydrochlorid (36 mmol, 3 Äquiv.) und die Mischung wird zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Es wird eine Lösung von 2.097 g Formylsuccinat (12 mmol) in 10 mL abs. Methanol

zugegeben, dann drei Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschliessend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wird filtriert und der Rückstand mit Methanol gewaschen. Filtrat und Waschlösung werden vereinigt und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird mit Wasser gelöst und mit konzentrierter Salzsäure angesäuert (pH 4). Die entstehende Suspension wird eine weitere Stunde bei 0°C gerührt, danach der entstandene weisse Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.624 g (80%) eines weissen Pulvers.

APCI-MS: 170.0 (M+H⁺)

Aufgrund der schlechten Löslichkeit wurde auf die NMR-spektroskopische Charakterisierung verzichtet.

Isocytosin-5-yl-essigsäuremethylester Hydrochlorid 119

1 g (5.9 mmol) Isocytosin-5-yl-essigsäure **118** wird in einer Mischung aus 100 mL 2,2-Dimethoxypropan und 10 mL Methanol gelöst und mit 20 mL konzentrierter Salzsäure versetzt. Man rührt 18 h und destilliert aus der braunschwarzen Lösung das Solvens ab. Die Reinigung erfolgt durch Kristallisation aus Methanol/Diethylether.

Ausbeute: 1.08 g (quantitativ) eines weissen Pulvers.

ESI-MS: 184.5 (M+H⁺)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 250 MHz):

10.94 (s, br, 1H, NH); 7.46 (s, 1H, H6); 6.44 (s, br, 2H, NH₂); 3.56 (s, 3H, OCH₃); 3.20 (s, 2H, CH₂);

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 62.5 MHz):

171 (s, COOMe); 163 (s, C-4); 156 (s, C-6); 153 (s, C-2); 107 (s, C-5); 51 (OCH₃); 31 (s, CH₂)

Methyl N²-(4-tert.-butylbenzoyl)isocytosin-5-yl-acetat 120

526 mg Isocytosin-5-yl-essigsäuremethylester Hydrochlorid **119** werden in 25 mL abs. Pyridin suspendiert. Danach werden 1.57 mL 4-tert.-Butylbenzoylchlorid (8.61 mmol, 3 Äquiv.) zugegeben. Es wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt und dann durch Zugabe von 1 mL Methanol gequenchet. Man rührt weitere zehn Minuten und zieht dann das Lösungsmittel ab. Der Rückstand wird mit Essigester gelöst und die organische Phase zweimal mit Wasser gewaschen, die vereinigten wässrigen Phasen mit Essigester rückextrahiert. Die gesammelten organischen Phasen werden mit 1 N HCl und gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, dann mit Na₂SO₄ getrocknet und einrotiert. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Laufmittel: Methylenchlorid/Methanol 98:2).

Ausbeute: 882 mg (89.5%) einer weißen Substanz.

R_f (Methylenchlorid/Methanol 98:2) = 0.7

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz):

11.5 (s, br, NH); 7.87 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.4 Hz; Benzoyl-H2 und H6); 7.5 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.5 Hz, Benzoyl-H3 und H5); 7.3 (s, 1H, H4); 3.66 (s, 3H, OCH₃); 3.3 (s, 2H, CH₂); 1.3 (s, 9H, C(CH₃)₃)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 62.5 MHz):

170.5 (C=OOME); 168.7 (Benzoyl-CO); 161 (C4); 157.8 (C6); 151 (Benzoyl-C4); 150.2 (C2); 129.1 (Benzoyl-C1); 128 (Benzoyl-C2 und C6); 126.4 (Benzoyl-C3 und C5); 117 (C5); 52.1 (COOCH₃); 35.2 (C(CH₃)₃); 32.6 (CH₂); 31.4 (C(CH₃)₃)

N²-(4-tert.-butylbenzoyl)isocytosin-5-yl-essigsäure 121

1.475 g Methyl N²-(4-tert.-butylbenzoyl)isocytosin-5-yl-acetat **120** (4.3 mmol) werden in 15 mL THF suspendiert. Die Mischung wird auf 0°C gekühlt, danach werden tropfenweise 13.5 mL 1 M LiOH zugetropft. Es wird noch 1.5 h bei 0°C nachgerührt und dann mit 1 N HCl auf pH 2 gebracht. Die Suspension wird noch 20 min gerührt, der entstandene Niederschlag abgesaugt und am Hochvakuum getrocknet. Ausbeute: 1.383 (98%) eines weißen Pulvers.

R_f (Methylenchlorid/Methanol 9:1) = 0.15

ESI-MS: 330.3 ($M+H^+$), 658.9 (M_2+H^+)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 250 MHz):

12.18 (s, br, 1H, COOH); 7.95 (d, 2H, $^3J_{HH} = 8.5$ Hz; Benzoyl-H2 und H6); 7.76 (s, 1H, H6); 7.55 (d, 2H, $^3J_{HH} = 8.5$ Hz, Benzoyl-H3 und H5); 3.25 (s, 2H, CH₂); 1.35 (s, 9H, C(CH₃)₃)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 62.5 MHz):

172 (COOH); 170.5 (Benzoyl-CO); 155.8 (C6); 152 (Benzoyl-C4); 130.8 (Benzoyl-C1); 128.1 (Benzoyl-C2); 125.9 (Benzoyl-C3); 116 (C5); 34.8 (C(CH₃)₃); 32.7 (CH₂); 30.1 (C(CH₃)₃)

N-(2-Boc-aminoethyl)-N-(N²-(4-tert.-butylbenzoyl) isocytosin-5-yl-acetyl)glycinmethylester **122**

798 mg N²-(4-tert.-butylbenzoyl)isocytosin-5-yl-essigsäure **121** (2.4 mmol) und 560 mg N-(2-Boc-aminoethyl)glycinmethylester **110** (2.4 mmol) werden zusammen dreimal mit Toluol koevaporiert und dann unter Argonatmosphäre in 20 mL DMF suspendiert. Dann werden 0.6 mL DIPEA und 862 mg HATU zugegeben und 16 h gerührt. Die Lösung wird einrotiert, der Rückstand mit Essigester aufgenommen und mit H₂O, 5% KHSO₄, 5% NaHCO₃ und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie (Laufmittel: Chloroform/Methanol 98:2).

Ausbeute: 1.109 g (85%) eines blaßgelben Schaums.

ESI-MS: 444.4 (M-Boc+H⁺), 544.2 (M+H⁺), 566.2 (M+Na⁺), 1087.0 (M_2+H^+), 1109.0 (M_2+H^+)

1H -NMR (CDCl₃, 250 MHz):

12 (s, br, 1H, COOH); 7.82 (d, 2H, $^3J_{HH} = 8$ Hz, Benzoyl-H2 und H6); 7.68 (s, 1H, H6); 7.50 (d, 2H, $^3J_{HH} = 8$ Hz, Benzoyl-H3 und H5); 5.5 (s, br, 1H, BocNH); 4.32 und

4.03 (s, mi und s, ma, 2H, $\underline{\text{CH}}_2\text{COOMe}$); 3.76 und 3.49 (s, mi und s, ma, 2H, isoC- $\underline{\text{CH}}_2\text{CO}$); 3.71 (s, 3H, OCH_3); 3.61 (t, br, 2H, $\text{BocNHCH}_2\underline{\text{CH}}_2$); 3.33 (m, br, 2H, $\text{BocNHCH}_2\underline{\text{CH}}_2$); 1.40 (s, 9H, Boc-CH_3); 1.33 (s, 9H, tert.-Butyl- CH_3)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 62.5 MHz):

170 (m, $\underline{\text{C}}\text{OOMe}$ und Cytosin- $\underline{\text{CH}}_2\underline{\text{C}}\text{ON}$); 162 (C4); 156.2 (C6); 155.6 (Boc-CO); 152.2 (Benzoyl-C4); 147.5 (C2); 131.1 (Benzoyl-C1); 128.9 (Benzoyl-C2 und C6); 125.3 (Benzoyl-C3 und C5); 115.8 (C5); 78 (Boc- $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 52.1 (OCH_3); 51.8 ($\underline{\text{CH}}_2\text{COOMe}$); 49.8 und 48.2 (s, mi und s, ma, Cytosin- $\underline{\text{CH}}_2\text{CON}$); 47.9 und 46.2 (s, ma und s, mi, $\text{BocNHCH}_2\underline{\text{CH}}_2$); 34.6 (tert.-Butyl- $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 31.1 (tert.-Butyl- CH_3); 28.3 (Boc- CH_3)

N-(2-Boc-aminoethyl)-N-(N²-(4-tert.-butylbenzoyl)isocytosin-5-yl-acetyl)glycin

123

1.854 g N-(2-Boc-aminoethyl)-N-(N²-(4-tert.-butylbenzoyl)isocytosin-5-yl-acetyl)glycinethylester **122** (3.4 mmol) werden in 68 mL einer Mischung aus Dioxan und Wasser (5:1, v/v) gelöst. Man gibt tropfenweise 14 mL einer 1 M Natriumhydroxidlösung zu und rührt bei Raumtemperatur solange bis DC-Kontrolle vollständige Umsetzung anzeigt. Es wird mit einer 1.5 M Kaliumhydrogensulfatlösung pH 2 eingestellt und 20 min gerührt. Der entstehende weisse Niederschlag wird abfiltriert und mit 50 mL 2 N Salzsäure aufgenommen. Die entstehende Suspension wird dreimal mit Essigester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, danach das Lösungsmittel abgezogen und der verbleibende Rückstand am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.61 g (89.6 %) eines weissen Pulvers.

ESI-MS: 430.4 ($\text{M-Boc}+\text{H}^+$), 530.3 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1059.4 (M_2+H^+), 1082.2 (M_2+Na^+), 1588 (M_3+H^+), 1610.0 (M_3+Na^+)

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 250 MHz):

12.3 (s, br, 1H, COOH); 7.95 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, Benzoyl-H2 und H6); 7.66 und 7.60 (s, ma und s, mi, H6); 7.55 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, Benzoyl-H3 und H5); 6.89 und 6.72 (s,

ma und s, mi, 1H, BocNH); 4.21 und 3.94 (s, ma und s, mi, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{COOH}}$); 3.41 (t, 2H, BocNH $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2}$); 3.32 (s, 2H, isoC- $\underline{\text{CH}_2\text{CON}}$); 3.18 und 3.07 (q, ma und q, mi, 2H, BocNH $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2}$); 1.4 (s, 9H, Boc- CH_3); 1.32 (s, 9H, tert.-Butyl- CH_3)

N-(Aminoethyl)-N-(N²-(4-tert.-butylbenzoyl)isocytosin-5-yl-acetyl)glycin 124

1.252 g N-(2-Boc-aminoethyl)-N-(N²-(4-tert.-butylbenzoyl)isocytosin-5-yl-acetyl)-glycin **123** (2.4 mmol) werden in 18 mL einer Mischung aus Trifluoressigsäure und Wasser (95:5, v/v) gelöst und 20 min bei Raumtemperatur gerührt (DC-Kontrolle zeigt vollständige Umsetzung). Die Lösung wird langsam in kalten Diethylether eingetropfelt, der entstehende weisse Niederschlag abzentrifugiert und über Nacht an der Luft getrocknet.

Ausbeute: 1.28 g (quantitativ) eines weissen Pulvers.

R_f (Chloroform/Methanol/Essigsäure 1:1:0.1) = 0.2.

ESI-MS: 430.2 (M-TFA+H⁺)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 250 MHz): (zwei gleichstark populierte Konformationen)

12.2 (s, br, COOH und NH₃⁺); 8.0 (d, 2H, ³J_{CC} = 8.3 Hz, Benzoyl-H2 und H6); 7.8 (s, br, 1H, Benzoyl-NH); 7.75 und 7.68 (ein s pro Konformer, 1H, Isocytosin-H4); 7.53 (d, 2H, ³J_{CC} = 8.3 Hz, Benzoyl-H3 und H5); 7.18 (m, 1H, Isocytosin-N¹H); 4.30 und 4.0 (2s, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{COOH}}$); 3.71 und 3.52 (2t, 2H, ⁺H₃N $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2}$); 3.49 und 3.33 (2s, 2H, Isocytosin- $\underline{\text{CH}_2\text{CON}}$); 3.12 und 2.95 (2q, 2H, ⁺H₃N $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2}$); 1.30 (s, 9H, C($\underline{\text{CH}_3}$)₃)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 62.5 MHz): (zwei gleichstark populierte Konformationen)

171.3 (CF₃ $\underline{\text{COO}}$); 170.4 und 170.3 (COOH); 170.1 (CON); 162.6 und 162.3 (C4); 156.1 (C6); 151.4 (Benzoyl-C4); 147 (br, C2); 130.4 (Benzoyl-C1); 128.5 (Benzoyl-C2 und C6); 125.3 (Benzoyl-C3 und C5); 118.4 und 117.4 (CF₃); 116.2 und 113.8 (C5); 50.1-38.5 (m, H₃N $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2}$, $\underline{\text{CH}_2\text{COOH}}$ und Isocytosin- $\underline{\text{CH}_2\text{CON}}$); 37.2 und 37.0 (H₃N $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2}$); 34.8 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 30.8 (C($\underline{\text{CH}_3}$)₃)

MMtAEG(ICatBz)OH 125

1.275 g HAEG(ICatBz)OH*TFA **124** (2.3 mmol) dreimal mit abs. Pyridin koevaporiert und dann unter Argonatmosphäre in 20 mL abs. DMF gelöst. Es werden 1.4 mL Triethylamin und 885 mg Monomethoxytritylchlorid zugegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 mL Methanol abgestopt und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird mit Methylenchlorid aufgenommen, die Lösung mit Wasser gewaschen und die wäßrige Phase mit Methylenchlorid rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird in wenig Essigester gelöst und langsam im Diethylether eingetroppt, danach der dabei entstehende weisse Niederschlag abzentrifugiert und am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.455 g (87%) eines weissen Pulvers.

ESI-MS: 702.0 (M+H⁺)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 250 MHz):

11.1 (s, br, 1H, COOH); 8.0-6.7 (m, 20H, arom. H und Cytosin-H), 5.0 und 4.7 (s, ma und s, mi, 2H, Cytosin-CH₂CO); 4.38 und 3.92 (s, mi und s, ma, 2H, CH₂COOH); 3.72 (s, 3H, OCH₃); 3.47 (t, br, 2H, MMTrNHCH₂CH₂); 2.23 (m, br, 2H, MMTrNHCH₂CH₂); 1.35 (s, 9H, tert.-Butyl)

(4-tert.-Butylbenzoyl)-cytosin 111

2.5 g Cytosin (22.5 mmol) werden in 100 mL Pyridin suspendiert. Danach werden auf einmal 10.8 mL (59.4 mmol, 2.6 eq) 4-tert.-Butylbenzoylchlorid zugegeben, worauf die Suspension zwischenzeitlich aufklart. Es wird noch 2h gerührt und dann durch langsame Zugabe von 60 mL Wasser in drei Portionen die Reaktion abgebrochen. Man rührt über Nacht, saugt den entstandenen Niederschlag ab, wäscht ihn mit Wasser und Diethylether und trocknet am Hochvakuum.

Ausbeute: 4.917g (80.5%) eines weissen Pulvers.

ESI-MS: 272.4 (M+H⁺), 294.3 (M+Na⁺)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO):

9.2 (s, br, N^3H), 7.9 (d, 2H, Benzoyl-H2 und H6), 7.8 (d, 1H, Cytosin-H6), 7.5 (d, 2H, Benzoyl-H3 und H5), 7.2 (d, 1H, Cytosin-H5), 1.3 (s, 9H, $\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$)

(4-tert.-Butylbenzoyl)-cytosin-1-yl-essigsäureethylester ($^{13}\text{C}_2$) 112

3.853 g 4-(tert.-Butylbenzoyl)-cytosin **111** (14.202 mmol) werden dreimal mit Toluol koevaporiert und dann in 66 mL abs. DMF suspendiert. Man gibt 560 mg Natriumhydrid (60%ige Suspension in Öl) zu und rührt 30 min wobei eine gelbe Lösung entsteht. Dann werden innerhalb von 10 min 2g (11.835 mmol) Bromessigsäureethylester ($^{13}\text{C}_2$) zugegeben. Nach 1h wird die Reaktion durch Zugabe von 10 mL Methanol abgestoppt., das Lösungsmittel abgezogen und am Hochvakuum getrocknet. Der entstehende braune Schaum wird mit einer Mischung aus Methylenchlorid und Wasser aufgenommen, die Phasen werden getrennt und die organische Phase nochmals mit Wasser gewaschen. Die vereinigten Wasserphasen werden mit Methylenchlorid rückextrahiert, danach die gesammelten Methylenchlorid-Phasen mit Na_2SO_4 getrocknet, einrotiert und am Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung des schwach gelblichen Rückstandes erfolgt durch Flash Chromatographie (Laufmittel: Hexan/Aceton 2:1).

Ausbeute: 4.035 g (95 %) eines weissen Schaums.

R_f (Methylenchlorid/Methanol) = 0.79.

ESI-MS: 360.4 ($\text{M}+\text{H}^+$), 382.4 ($\text{M}+\text{H}^+$), 741.2 (M_2+Na^+), 757.4 (M_2+K^+)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 250 MHz):

8.72 (s, br, NH); 7.81 (d, 2H, $^1J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, Benzoyl-H2 und H2'); 7.64-7.46 (m, 2H, Cytosin-H5 und H6); 7.49 (d, 2H, $^1J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, Benzoyl-H3 und H3'); 4.64 (dd, 2H, $^1J_{\text{CH}} = 43$ Hz, $^3J_{\text{CH}} = 6.1$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2$); 4.22 (dq, 2H, $^3J_{\text{HH}} =$, $\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_3$); 1.32 (s, 9H, tert.-Butyl $\underline{\text{CH}}_3$); 1.27 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, $\text{CH}_2\underline{\text{CH}}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 62.5 MHz):

167.3 ppm (d, $^1J_{\text{CC}} = 62.4$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{OOEt}$); 166.5 (s, CONH) 162.9 ppm (s, C4); 156.7 ppm (s, C6); 149.1 ppm (s, Bz-C4); 129.9 (s, Bz-C1); 127.5 ppm (s, Bz-C2); 126.0 ppm (s,

Bz-C3); 96.9 ppm (s, C5); 62.2 ppm (s, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$); 50.9 ppm (d, $^1J_{\text{CC}} = 62.4$ Hz, N- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -CO); 35.1 ppm (s, $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 31.0 ppm (s, C($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃); 14.0 (s; $\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

(4-tert.-Butylbenzoyl-)cytosin-1-yl-essigsäure 113 ($^{13}\text{C}_2$)

1.527 g CatBz ($^{13}\text{C}_2$) **112** (4.2 mmol) werden in 66 mL Dioxan gelöst. Es werden langsam 6.6 mL 2 N Natriumhydroxidlösung zugetropft und solange bei Raumtemperatur gerührt bis DC-Kontrolle die vollständige Umsetzung anzeigt. Danach wird mit konzentrierter Salzsäure pH 2 eingestellt und der entstehende Niederschlag abgesaugt. Der Rückstand wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst und wiederum durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure (vorsichtig!) gefällt. Das Produkt wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Ausbeute: 1.312 g (93.2%) eines weissen Pulvers.

ESI-MS: 332.4 ($\text{M}+\text{H}^+$), 354.4 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 663 (M_2+H^+)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 250 MHz):

11.0 (s, br, 1H, COOH); 8.07-8.13 (m, 1H, Cytosin-H6); 7.96 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, Benzoyl-H2 und H4); 7.52 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, Benzoyl-H3 und H5); 3.39 (d, 2H, $^1J_{\text{CH}} = 141.3$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 1.30 (s, 9H, C($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₃)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 62.5 MHz):

169.3 (d, $^1J_{\text{CC}} = 59.2$ Hz, COOH); 167.1 (s, $\text{NH}\underline{\text{C}}\text{O}$); 163.5 (s, C4); 155.8 (s, C6); 155.1 (s, C2); 150.6 (s, Bz-C4); 130.4 (s, Bz-C1); 128.4 (s, Bz-C2); 125.3 (s, Bz-C3); 95.9 (s, C5); 50.5 (d, $^1J_{\text{CC}} = 59.2$ Hz, CH_2); 34.8 (s, $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 30.8 (s, CH_3)

Boc-Glycin ($^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$) **106**

1.105g Glycin ($^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$) **105** (14.16 mmol) und 1.5 g (1 eq.) Natriumcarbonat werden in 45 mL Wasser gelöst. Danach wird eine Lösung von 3.709 g (16.992 mmol, 1.2eq.) Boc_2O in 45 mL Dioxan zugegeben. Nach sechzehnständigem Rühren bei Raumtemperatur wird das Dioxan abgezogen und mit konzentrierter Salzsäure ein pH-Wert von 1.5 bis 2 eingestellt. Die Lösung wird fünfmal mit Essigester extrahiert und die

vereinigten organischen Phasen mit Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wird aus Hexan/Essigester umkristallisiert. Die nach der Kristallisation verbleibende Mutterlauge wird einrotiert und durch Flash Chromatographie gereinigt (Laufmittel: Chloroform/Ethanol/Essigsäure 7:3:0.5, v/v/v).

Ausbeute: 2.464 durch Kristallisation und 37 mg durch Flash Chromatographie ergibt 2.501 g (99.2%) eines weissen Pulvers.

APCI-MS: 178.9 ($\text{M}+\text{H}^+$)

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 250 MHz):

12.41 (s, br, 1H, COOH); 7.03 (dt, 1H, $^1\text{J}_{\text{NH}} = 93.3$ Hz, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 5.6$ Hz, NH); 3.55 (dt, 2H, $^1\text{J}_{\text{CH}} = 137.7$ Hz, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, CH_2); 1.37 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 62.5 MHz):

174.3 (t, $^1\text{J}_{\text{CC}} = 58$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{OOH}$); 42.6 (td, $^1\text{J}_{\text{CC}} = 59$ Hz, $^1\text{J}_{\text{CN}} = 11$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 28.3 (s, $\underline{\text{C}}\text{H}_3$);

Glycinmethylester Hydrochlorid ($^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$) **109** C103

895 mg Glycin ($^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$) **105** (11.464 mmol) werden in einer Mischung aus 105 mL 2,2-Dimethoxypropan und 9 mL Methanol gelöst und mit 11 mL konzentrierter Salzsäure versetzt. Man rührt 18 h und destilliert aus der braunschwarzen Lösung das Solvens. Die Reinigung erfolgt durch Kristallisation aus Methanol/Diethylether.

Ausbeute: 1.485g (quantitativ) eines weissen Pulvers.

ESI-MS: 93.1 ($\text{M}-\text{HCl}+\text{H}^+$)

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 250 MHz):

8.46 (s, br, 3H, NH_3^+); 3.75 (dd, 2H, $^1\text{J}_{\text{CH}} = 144$ Hz, $^2\text{J}_{\text{CH}} = 6.4$ Hz, CH_2); 3.72 (d, 3H, $^3\text{J}_{\text{CH}} = 3.8$ Hz, OCH_3)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 62.5 MHz):

167.3 (d, $^1\text{J}_{\text{CC}} = 62.3$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{OOMe}$); 52.4 (s, $\text{COO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 39.5 (d, $^1\text{J}_{\text{CC}} = 62.4$ Hz, CH_2)

BocGlyNMeOMe ($^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$) 107

1.5 g Boc-Glycin ($^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$) **106** (8.4 mmol) und 1.15 g N,O-Dimethylhydroxylamin (11.8 mol, 1.4 Äquiv.) werden in 75 mL Methylenchlorid gelöst. Nach Zugabe von 3.2 mL N-Ethylmorpholin (3 Äquiv.) wird auf 0°C gekühlt. 6.75 mL PPA-Lösung (50% Lösung in DMF) werden zugetropft und man rührt 1h bei 0°C und anschliessend 18h bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wird abgezogen, der weisse Rückstand mit Essigester aufgenommen und die entstandene Lösung nacheinander mit Wasser, 10% Natriumhydrogensulfatlösung, 10% Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen.

Ausbeute: 1.72g (92%) einer weissen Substanz.

ESI-MS: 244.2 ($\text{M}+\text{Na}^+$)

^1H -NMR (CDCl_3 , 250 MHz):

5.23 (d, br, $^1\text{J}_{\text{NH}} = 92$ Hz, 1H, NH); 4.0 (d, $^1\text{J}_{\text{CH}} = 141$ Hz, 2H, CH_2); 3.69 (s, 3H, OCH_3); 3.18 (s, 3H, NCH_3); 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$)

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 62.5 MHz):

170.2 (d, $^1\text{J}_{\text{CC}} = 53.8$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{NMe}(\text{OMe})$), 79.6 (s, NCH_3); 61.4 (s, OCH_3); 41.7 (dd, $^1\text{J}_{\text{CC}} = 53.8$ Hz, $^1\text{J}_{\text{CN}} = 14.3$ Hz, CH_2); 32.4 (s, $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 28.3 (s, $\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$)

Boc-Glycinaldehyd ($^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$) 108

1.72 g BocGlyNMeOMe ($^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$) **107** (7.77 mmol) werden in 260 mL absolutem Diethylether gelöst. Danach werden unter Eiskühlung langsam 2.8 mL einer Lithiumaluminiumhydridlösung (1.6 M in THF) zugetropft und gerührt bis DC-Kontrolle vollständige Umsetzung anzeigt. Danach werden 60 mL einer 5% Kaliumhydrogensulfatlösung zugegeben (weißer Niederschlag). Die Phasen werden getrennt, die wässrige Phase dreimal mit Essigester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen je einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und

das Lösungsmittel abgezogen. Es entsteht ein farbloses Öl, das kurz am Hochvakuum getrocknet wird.

Ausbeute: nicht bestimmt, für die weiteren Umsetzungen wird eine Ausbeute von 90 % vorausgesetzt.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz): (Referenzspektrum der unmarkierten Verbindung)

9.6 (s, br, 1H, CHO); 5.4 (s, 1H, NH); 4.0 (s, 2H, CH_2); 1.3 (s, 9H, Boc- CH_3)

Boc-Aminoethylglycin Methylester ($^{13}\text{C}_4\ ^{15}\text{N}_2$) 110

1.135 g BocGlyH ($^{13}\text{C}_2\ ^{15}\text{N}$) **108** (Rohprodukt der vorigen Umsetzung, 90% Ausbeute vorausgesetzt), 0.907 g HGlyOMe*HCl ($^{13}\text{C}_2\ ^{15}\text{N}$) **109** (7 mmol, 1 Äquiv.) und 1.177 g Natriumacetat werden in 270 mL Methanol (HPLC-Grade) gelöst. Man suspendiert 180 mg Palladium auf Aktivkohle (10%, trocken) in der Lösung und hydriert über Nacht unter Normaldruck. Die Reaktionslösung wird über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird mit Wasser aufgenommen und es wird mit 1 N Natriumhydroxidlösung pH 8 eingestellt. Die trübe Lösung wird fünfmal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert.

Ausbeute: 1.612 g (96.7%) eines farblosen, langsam kristallisierenden Öls.

R_f (Methylenchlorid/Methanol 9:1) = 0.55.

ESI-MS: 239.1 ($\text{M}+\text{H}^+$), 261.2 ($\text{M}+\text{Na}^+$)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 250 MHz):

5.23 (d, br, 1H, $^1J_{\text{NH}} = 117.8$ Hz, BocNH); 3.59 (d, 3H, $^2J_{\text{CH}} = 4.8$ Hz, OCH_3); 3.29 (dt, 2H, $^1J_{\text{CH}} = 136.4$ Hz, $^1J_{\text{NH}} = 5.8$ Hz, CH_2COOMe); 3.07 (d, br, 2H, $^1J_{\text{CH}} = 116.8$ Hz, BocNH CH_2); 2.6 (d, br, 2H, $^1J_{\text{CC}} = 107.2$ Hz, BocNH CH_2CH_2); 2.18 (s, br, 1H, NH CH_2COOMe); 1.3 (s, 9H, C(CH_3) $_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6 , 62.5 MHz):

172.6 (d, $^1J_{\text{CC}} = 58.2$ Hz, COOMe); 155.9 (s, CONH); 78.8 (s, C(CH_3) $_3$); 51.2 (s, OCH_3); 50.1 (d, $^1J_{\text{CC}} = 58.2$ Hz, CH_2COOMe); 48.6 (d, $^1J_{\text{CC}} = 38.4$ Hz,

BocNHCH₂CH₂); 40.0 (dd, ¹J_{CC} = 38.0 Hz, ¹J_{CN} = 8.7 Hz, BocNHCH₂CH₂); 28.2 (s, C(CH₃)₃)

BocAEG(CatBz)OMe (¹³C₆¹⁵N₂) 114

2.09 g CatBz (¹³C₂) **113** und 1.503 g BocAEGOMe (¹³C₄¹⁵N₂) **110** (6.4 mmol) werden dreimal mit Toluol koevaporiert und in 52 mL absolutem DMF suspendiert. Es werden 4.0 mL N-Ethylmorpholin zugegeben, auf 0° C gekühlt und danach zur entstandenen gelblichen Lösung langsam 3.5 mL PPA-Lösung (50% in DMF) zugetropft. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abgezogen, der Rückstand mit Essigester aufgenommen und nacheinander mit Wasser, 10% Kaliumhydrogensulfatlösung, 10% Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand am Hochvakuum getrocknet.

Die Reinigung erfolgt mittels Flash Chromatographie (Laufmittel: Chloroform/Methanol 98:2).

Ausbeute: 2.47g (71%) eines weißen Schaums.

R_f (Methylenchlorid/Methanol 9:1) = 0.6.

ESI-MS: 552.3 (M+H⁺), 574.4 (M+Na⁺), 1104.2 (M₂+H⁺), 1126.1 (M₂+Na⁺), 1654.3 (M₃+H⁺), 1676.2 (M₃+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz):

9.24 (s, br, 1H, Benzoyl-NH); 7.83 (m, 2H, ³J_{HH} = 8.4 Hz, Benzoyl-H2 und H6); 7.72-7.6 (m, 1H, Cytosin-H6); 7.42 (d, 3H, Cytosin-H5 und Benzoyl-H3 und H5); 5.71 (d, 1H, BocNH); 4.72 und 4.52 (d, ma und d, mi, 2H, CH₂COOMe); 4.2 und 4.05 (d, mi und d, ma, 2H, Cytosin-CH₂CON); 3.66 (d, 3H, ³J_{CH} = 2.3 Hz, OCH₃); 3.65-3.45 (m, 2H, BocNHCH₂CH₂); 3.1 und 2.97 (d, ma und d, mi, 2H, BocNHCH₂CH₂); 1.42 (s, 9H, Boc-CH₃); 1.27 (s, 9H, tert.-Butyl-CH₃)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 62.5 MHz):

169.9 (d, $^1J_{CC} = 61.3$ Hz, \underline{COOMe}); 167.2 (dd, $^1J_{CC} = 64.7$ Hz, $^1J_{CN} = 15.6$ Hz, CON); 165.4 (s, C2); 164.5 (s, Benzoyl-CO); 163 (s, C4); 156.7 (s, C6); 149.8 (s, Benzoyl-C4); 129 (s, Benzoyl-C1); 127.6 (s; Benzoyl-C2 und C6); 125.7 (Benzoyl-C3 und C5); 96.8 (s, C5); 52.2 (s, OCH_3); 51.1-48.3 (m, Cytosin- $\underline{CH_2CO}$, $\underline{CH_2COOMe}$ und $\underline{BocNHCH_2CH_2}$); 39.6 (s, Boc-qC); 38.8 (2d, ma und mi, $^1J_{CC} = 50.9$ Hz, $\underline{BocNHCH_2}$); 35.0 (s, tert.-Butyl-qC); 30.9 (s, tert.-Butyl- $\underline{CH_3}$); 28.3 (s; Boc- $\underline{CH_3}$)

BocAEG(CAtBz)OH ($^{13}C_6^{14}N_2$) 115

2.334 g BocAEG(CAtBz)OMe ($^{13}C_6^{14}N_2$) **114** (4.3 mmol) werden in 68 mL einer Mischung aus Dioxan und Wasser (5:1, v/v) gelöst. Man gibt tropfenweise 14 mL einer 1 M Natriumhydroxidlösung zu und rührt bei Raumtemperatur solange bis DC-Kontrolle vollständige Umsetzung anzeigt. Es wird mit einer 1.5 M Kaliumhydrogensulfatlösung pH 2 eingestellt und 20 min gerührt. Der entstehende weisse Niederschlag wird abfiltriert und mit 50 mL 2 N Salzsäure aufgenommen. Die entstehende Suspension wird dreimal mit Essigester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, danach das Lösungsmittel abgezogen und der verbleibende Rückstand am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.26 g (99.4%) eines weissen Pulvers.

ESI-MS: 538.2 ($M+H^+$), 1075.1 (M_2+H^+), 1612.3 (M_3+H^+)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 250 MHz):

12.65 (s, br, 1H, COOH); 11.08 (s, br, 1H, N^4H); 7.9-8.0 (m, 3H, Cytosin-H6 und Benzoyl-H2 und H6); 7.53 (d, 2H, $^3J_{HH} = 8.5$ Hz, Benzoyl-H3 und H5); 7.30 und 7.27 (d, ma und d, mi, 1H, $^3J_{HH} = 6.5$ Hz, Cytosin-H5); 6.89 und 6.72 (d, ma und d, mi, 1H, BocNH); 4.82 und 4.65 (d, ma und d, mi, 2H, $\underline{CH_2COOH}$); 4.2 und 4.0 (d, mi und d, ma, 2H, Cytosin- $\underline{CH_2CON}$); 3.58 und 3.50 (d, ma und d, mi, 2H, $\underline{BocNHCH_2CH_2}$); 3.02 und 2.88 (d, ma und d, mi, 2H, $\underline{BocNHCH_2CH_2}$); 1.38 (s, 9H, Boc- $\underline{CH_3}$); 1.29 (s, 9H, tert.-Butyl- $\underline{CH_3}$)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 62.5 MHz):

170.8 und 170.5 (d, mi und d, ma, $^1J_{\text{CC}} = 59$ Hz, COOH); 167.1 und 166.9 (d, ma und d, mi, $^1J_{\text{CC}} = 53$ Hz, CON); 163.4 (Benzoyl-CO); 155.7 (C6); 155.1 (C2); 151 (Benzoyl-C4); 130.4 (Benzoyl-C1); 128.4 (Benzoyl-C2 und C6); 125.3 (Benzoyl-C3 und C5); 95.7 (C5); 78.0 (Boc-qC); 49.5 und 49.4 (d, ma und d, mi, $^1J_{\text{CC}} = 53$ Hz, Cytosin- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CON}$); 47.7 und 47.5 (d, mi und d, ma, $^1J_{\text{CC}} = 59$; $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{COOH}$); 47.2 und 46.6 (d, ma und d mi, $^1J_{\text{CC}} = 38$ Hz, BocNH $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$); 39.2 und 38.9 (d, ma und d, mi, $^1J_{\text{CC}} = 40$ Hz, BocNH $\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 34.8 (tert.-Butyl-qC); 30.8 (tert.-Butyl- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 28.1 (Boc- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)

HAEG(CAtBz)OH*TFA ($^{13}\text{C}_6^{14}\text{N}_2$) 116

2.275 g BocAEG(CAtBz)OH ($^{13}\text{C}_6^{14}\text{N}_2$) **115** (4.2 mmol) werden in 18 mL einer Mischung aus Trifluoressigsäure und Wasser (95:5, v/v) gelöst und 20 min bei Raumtemperatur gerührt (DC-Kontrolle zeigt vollständige Umsetzung). Die Lösung wird langsam in kalten Diethylether eingetropft, der entstehende weisse Niederschlag abzentrifugiert und über Nacht an der Luft getrocknet.

Ausbeute: 2.334 g (quantitativ) eines weissen Pulvers.

R_f (Chloroform/Methanol/Essigsäure 1:1:0.1) = 0.2.

ESI-MS: 438.2 (M-TFA+ H^+), 875.1 (M_2 -2TFA+ H^+), 1312.2 (M_3 -3TFA+ H^+)

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 250 MHz):

12.8 (s, br, COOH); 11.09 (s, br, 1H, N^4H); 8.04 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, Cytosin-H5); 7.96 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, Benzoyl-H2 und H2'); 7.76 (d, br, $^1J_{\text{NH}} = 43.7$ Hz, NH_3^+); 7.52 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, Benzoyl-H3 und H3'); 7.33 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, Cytosin H-6); 4.79 (d, 2H, $^1J_{\text{CH}} = 41$ Hz, Cytosin- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CO}$); 4.17 (d, 2H, $^1J_{\text{CC}} = 62$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{COOH}$); 3.6 (dt, 2H, $^1J_{\text{CH}} = 32$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$); 3.05 (dq, 2H, $^1J_{\text{CH}} = 45.8$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NH}_3^+$); 1.3 (s, 9H, tert.-Butyl- CH_3);

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 62.5 MHz):

170.6 und 170.4 (d, mi und d, ma, $^1J_{\text{CC}} = 58.2$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{OOH}$); 166.5 und 166.4 (d, ma und d, mi, $^1J_{\text{CC}} = 52.6$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{ON}$); 163.9 (s, BzCO); 157.8 (s, $\text{CF}_3\underline{\text{C}}\text{OO}^-$); 155.2 und

154.9 (s, ma und s, mi, C2); 151.0 (s, C4); 146.2 (s, C6); 138.1 (s, Bz-C1); 130.5-125.2 (m, Aromaten-C); 113.2 (s, $\underline{\text{C}}\text{F}_3\text{COO}^-$); 95.5 (s, C5); 50.3 und 49.8 (d, ma und d, mi, Cytosin- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CON}$); 48.7-47.4 (m, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{COOH}$ und $\text{H}_3\text{N}^+\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 41.8 (d, br, $^1\text{J}_{\text{CC}} = 38.3$ Hz, $\text{H}_3\text{N}^+\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$); 35.1 (s, $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 30.3 (s, $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$)

MMtAEG(CatBz)OH Triethylammoniumsalz ($^{13}\text{C}_6^{14}\text{N}_2$) 117

2.333 g HAEG(CatBz)OH*TFA ($^{13}\text{C}_6^{14}\text{N}_2$) **116** (4.2 mmol) dreimal mit abs. Pyridin koevaporiert und dann unter Argonatmosphäre in 37 mL abs. DMF gelöst. Es werden 2.6 mL Triethylamin und 1.162 g Monomethoxytritylchlorid zugegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 mL Methanol abgestopt und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird mit Methylenchlorid aufgenommen, die Lösung mit Wasser gewaschen und die wäßrige Phase mit Methylenchlorid rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird in wenig Essigester gelöst und langsam im Diethylether eingetroppt, danach der dabei entstehende weisse Niederschlag abzentrifugiert und am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.1 g (90%) eines weissen Pulvers.

ESI-MS: 273.3 (MMTr $^+$), 438.2 (M-MMTr+H $^+$), 709.8 (M+H $^+$), 1418.8 (M $_2$ +H $^+$)

^1H -NMR (CDCl_3 , 250 MHz):

7.81 (d, mi und d, ma, 1H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, Cytosin-H6); 7.65-6.7 (m, 19H, Aromaten-CH); 5.1 und 4.65 (dd, mi und dd, ma, 1H, $^1\text{J}_{\text{NH}} = 103.4$ Hz, MMTrNH); 4.0 und 3.85 (d, ma und d, mi, 2H, $^1\text{J}_{\text{CH}} = 159$ Hz, Cytosin- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CON}$); 3.7 (s, mi und s, ma, 3H, OCH_3), 3.5 (d, br, 2H, $^1\text{J}_{\text{CH}} = 144$ Hz, MMTr $\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 3.04 (d, br, 2H, $^1\text{J}_{\text{CH}} = 115.5$ Hz, MMTr $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$); 2.93 (q, 6H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, TEA- CH_2); 2.55 und 2.25 (d, ma und d, mi, br, 2H, $^1\text{J}_{\text{CC}} = 135.7$ Hz, CH_2COO^-); 1.27 (s, 9H, $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 1.2 (t, 9H, TEA- CH_3)

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 62.5 MHz):

173.8 (d, mi und d, ma, $^1\text{J}_{\text{CC}} = 52.7$ Hz, COO^-); 166.9 (dd, ma und dd, mi, $^1\text{J}_{\text{CC}} = 53.6$ Hz, $^1\text{J}_{\text{CN}} = 16.4$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{ON}$); 162.6 (s, C6); 157.9 (s, Tr-C4); 156.8 (s, C2); 150.3 (s,

Benzoyl-C4); 146.2 (s, Trityl-qC); 145.5 (s, C4), 138-125 (m, Aromaten-C); 113.1 (s, Tr-C2); 96.5 (s, C5); 55.1 (s, OCH₃); 52.7 (d, ma und d, mi, ¹J_{CC} = 52.9, CH₂COO⁻); 51.8-49.0 (m, MMTrNHCH₂CH₂, Cytosin-CH₂CON); 45.3 (s, TEA-CH₂); 41.9 (d, ¹J_{CC} = 39.8 Hz, MMTrCH₂CH₂); 35.1 (s, C(CH₃)₃); 30.1 (s, C(CH₃)₃); 8.5 (s, TEA-CH₃)

10 Literatur

- [1] R. S. Bohacek, C. McMartin, W. C. Guida, *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*, 3-50.
- [2] I. D. Kuntz, *Science* **1992**, *257*, 1078-1082.
- [3] *De Novo Design*, Band 3, Escom, Leiden, **1995**.
- [4] M. Whittaker, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 386-396.
- [5] F. Balkenhohl, C. von der Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436-2488.
- [6] R. Brown, *Contemp. Org. Synth.* **1996**, 216-237.
- [7] A. R. Brown, P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees, *Synlett* **1998**, 817-830.
- [8] M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233-1251.
- [9] L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555-600.
- [10] H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1996**.
- [11] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 857-859.
- [12] A. Rockwell, M. Melden, R. A. Copeland, K. Hardman, C. P. Decicco, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10337-10338.
- [13] D. L. Kirkpatrick, S. Watson, S. Ulhaq, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **1999**, *2*, 211-221.
- [14] E. G. v. Roedern, E. Lohof, G. Hessler, M. Hoffmann, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10156-10167.
- [15] E. G. v. Roedern, *Dissertation*, TU München, **1992**.
- [16] L. Szabo, B. L. Smith, K. D. McReynolds, A. L. Parrill, E. R. Morris, J. Gervay, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1074-1078.
- [17] P. S. Ramamoorthy, J. Gervay, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7801-7805.
- [18] D. D. Long, M. D. Smith, D. G. Marquess, T. D. W. Claridge, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9293-9296.
- [19] C. Petö, P. Fügedi, K. Wlasichuk, *8th European Carbohydrate Symposium* Sevilla, Spain, **1995**, Abstract A-74.

- [20] J. P. McDevitt, P. T. Lansbury Jr, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3818-3828.
- [21] L. Poitout, Y. Le Merrer, J.-C. Depezay, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6887-6890.
- [22] L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, *276*, 1125-1128.
- [23] L. K. Mahal, C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 415-422.
- [24] B. Lindberg, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, *48*.
- [25] S. Hase, Y. Matsushima, *J. Biochem.* **1971**, *69*, 559-565.
- [26] J. P. Waltho, D. H. Williams, E. Selva, P. Ferrari, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1987**, *9*.
- [27] J. J. Fox, Y. Kuwada, K. A. Watanabe, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *57*, 6029-6032.
- [28] K. Heyns, H. Paulsen, *Chem. Ber.* **1955**, *88*, 188-195.
- [29] M. P. Kotick, R. S. Klein, K. A. Watanabe, J. J. Fox, *Carbohydr. Res.* **1969**, *11*, 369-377.
- [30] S. Ats, E. Lausberg, J. Lehmann, K. Sandhoff, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 1261-1264.
- [31] E. Lohof, *Dissertation*, **1998**.
- [32] M. Born, *Dissertation*, TU München, **1999**.
- [33] F. Burkhart, *Dissertation*, TU München, **1999**.
- [34] E. Lohof, E. Planker, C. Mang, F. Burkhart, M. A. Dechantsreiter, R. Haubner, H.-J. Wester, M. Schwaiger, G. Hölzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2000**, im Druck.
- [35] M. J. Sofia, *Med. Chem. Res.* **1998**, *8*, 362-378.
- [36] M. J. Sofia, *Mol. Div.* **1998**, *3*, 75-94.
- [37] M. J. Sofia, R. Hunter, T. Y. Chan, A. Vaughan, R. Dulina, H. Wang, D. Gange, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2802-2803.
- [38] A. E. J. d. Nooy, A. C. Besemer, H. v. Bekkum, *Carbohydr. Res.* **1995**, *269*, 89-98.
- [39] N. J. Davis, S. L. Flitsch, *Tetrahedron. Lett.* **1993**, *34*, 1181-1184.
- [40] P. Collins, R. Ferrier, *Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **1995**.
- [41] M. L. Wolfrom, A. Thompson, *Acetylation*, Band II, **1963**.

- [42] F. G. de las Heras, P. Fernandez-Resa, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1982**, 903-907.
- [43] M. Stöckle, *geplante Dissertation*, TU München.
- [44] D. Deslongchamps, *Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry*, Pergamon Press, Oxford, **1983**.
- [45] T. K. Brunck, F. Weinhold, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 1700-1709.
- [46] P. Dionne, M. St-Jaques, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2616-2623.
- [47] E. Juaristi, *J. Chem. Educ.* **1979**, *56*, 438-441.
- [48] L. Phillips, V. Wray, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1973**, 90-91.
- [49] S. Wolfe, *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 102-111.
- [50] J. N. BeMiller, M. P. Yadav, *Carbohydr. Res.* **1990**, *200*, 111-126.
- [51] L. Petrus, S. Bystricky, T. Sticzay, V. Bilik, *Chem. Zvesti* **1982**, *36*, 103-110.
- [52] S. Hanessian, *Preparative Carbohydrate Chemistry*, Marcel Dekker Inc., New York, **1997**.
- [53] A. Guzaev, H. Salo, A. Azhayev, H. Lönnberg, *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 240-248.
- [54] M. Bartra, P. Romea, F. Urpi, J. Vilarrasa, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 587-594.
- [55] A. G. Myers, R. Gin, D. H. Rogers, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4697-4718.
- [56] C.-H. Wong, X.-S. Ye, Z. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7137-7138.
- [57] X. Ding, W. Wang, F. Kong, *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 445-448.
- [58] E. Nicolas, M. Pujades, J. Bacardit, E. Giralt, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2317-2320.
- [59] L.-X. Wang, M. Tang, T. Suzuki, K. Kitajima, Y. Inoue, S. Inoue, J.-Q. Fan, Y. C. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11137-11146.
- [60] J. O. Osby, M. G. Martin, B. Ganem, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2093-2096.
- [61] R. A. Laforge, C. E. Cosgrove, A. D'Adamo, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *21*, 988-992.
- [62] B. Coxon, H. G. Fletcher, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2637-2642.
- [63] M. R. Mish, F. M. Guerra, E. M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8379-8380.
- [64] I. Fleming, *Grenzorbitale*, VCH Weinheim, **1990**.
- [65] M. Petrusova, M. Fedoronko, L. Petrus, *Chem. Papers* **1990**, *14*, 267-271.

- [66] M. J. Burk, J. G. Allen, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7054-7057.
- [67] J. A. Stafford, M. F. Brackeen, D. S. Karanewsky, N. L. Valvano, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7873-7876.
- [68] E.-F. Fuchs, J. Lehmann, *Chem. Ber.* **1975**, *108*, 2254-2260.
- [69] G. Zemplen, E. Pascu, *Chem. Ber.* **1929**, *62*, 1613-1614.
- [70] L. Käsbeck, TU München, **1997**.
- [71] Y. Igarashi, T. Shiozawa, Y. Ichikawa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 613-616.
- [72] R. Hirschmann, K. C. Nicolaou, S. Pietranico, E. M. Leahy, J. Salvino, B. Arison, M. A. Cichy, P. G. Spoor, W. C. Shakespeare, P. A. Sprengeler, P. Hamley, A. B. Smith III, T. Reisine, K. Raynor, L. Maechler, C. Donaldson, W. Vale, R. M. Freidinger, M. R. Cascieri, C. D. Strader, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12550-12568.
- [73] G. L. Olson, H.-C. Cheung, E. Chiang, V. S. Madison, J. Sepinwall, G. P. Vincent, A. Winokur, K. A. Gary, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2866-2879.
- [74] R. Hirschmann in *Peptide Chemistry 1992*, ESCOM, Leiden, **1993**.
- [75] P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Revier, R. Guillemin, *Science* **1973**, *179*, 77-79.
- [76] P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, R. Guillemin, *Ca. J. Biochem.* **1974**, *52*, 1067-1072.
- [77] S. Reichlin, *New Engl. J. Med.* **1983**, *309*, 1495-1501 u. 1556-1563.
- [78] S. C. Moreau, W. A. Murphy, D. H. Coy, *Drug Develop. Research* **1991**, *22*, 79-93.
- [79] B. Colas, C. Cambillau, L. Buscail, M. Zeggari, J. P. Esteve, V. Lautre, F. Thomas, N. Vaysse, C. Susini, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *207*, 1017-1024.
- [80] L. J. Dorflinger, A. Schönbrunn, *Endocrinology* **1983**, *113*, 1551-1558.
- [81] J. R. de Welle, H. Schmid-Antomarchi, M. Fosset, M. Lazdunski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2971-2975.
- [82] W. H. Hsu, H. Xiang, A. S. Rajan, D. Kunze, A. E. Boyd, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 837-843.
- [83] M. G. Pan, T. Florio, P. J. Stork, *Science* **1992**, *256*, 1215-1217.
- [84] B. Szende, A. Zalatnai, A. V. Schally, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 1643-1647.

- [85] K. Sharma, Y. C. Patel, C. B. Srikant, *Mol. Endocrinol.* **1996**, *10*, 1688-1696.
- [86] Y. C. Patel, *Front. Neuroendocrinol.* **1999**, *20*, 157-198.
- [87] M. C. Pagliacci, R. Tognellini, F. Grignani, I. Nicoletti, *Endocrinology* **1991**, *129*, 2555-2562.
- [88] G. Keri, J. Erchegeyi, A. Horvath, I. Mezo, M. Idei, T. Vantus, A. Balogh, Z. Vadasz, G. Bokonyi, J. Seprodi, I. Teplan, O. Csuka, M. Tejada, D. Gaal, Z. Szegedi, B. Szende, C. Roze, H. Kalthoff, Ullrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12513-12518.
- [89] K. Raynor, W. A. Murphy, D. H. Coy, J. E. Taylor, J. P. Moreau, Yasuda, K., G. I. Bell, T. Reisine, *Molecular Pharmacology* **1993**, *43*, 838-844.
- [90] K. Raynor, A.-M. O'Carroll, H. Kong, K. Yasuda, L. C. Mahan, G. I. Bell, T. Reisine, *Molecular Pharmacology* **1993**, *44*, 385-392.
- [91] D. Hoyer, G. I. Bell, M. Brerlowitz, J. Epelbaum, W. Feniuk, P. P. A. Humphrey, A. M. O'Carroll, Y. C. Patel, A. Schonbrunn, J. E. Taylor, T. Reisine, *TiPS* **1995**, *16*, 86-88.
- [92] T. Reisine, *American Physiological Society* **1995**.
- [93] W. Meyerhof, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1998**, *133*, 55-108.
- [94] Y. C. Patel, *J. Endocrinol. Invest.* **1997**, *20*, 348-367.
- [95] T. Florio, G. Schettini, *J. Mol. Endocrinol.* **1996**, *17*, 89-100.
- [96] T. Florio, S. Thellung, G. Schettini, *Pharmacol. Res.* **1996**, *33*, 297-305.
- [97] Y. C. Patel, M. T. Greenwood, A. Warszynska, R. Panetta, C. B. Srikant, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *198*, 605-612.
- [98] C. Hou, R. L. Gilbert, D. L. Barber, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10357-10362.
- [99] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509-520.
- [100] K. H. Usadel, H. Kessler, G. Rohr, K. Kusterer, K. D. Palitzsch, U. Schwedes, *Klin. Wochenschr.* **1986**, *Suppl VII*, 59-63.
- [101] K. H. Usadel, H. Kessler, G. Rohr, K. Kusterer, K. D. Palitzsch, U. Schwedes in *Somatostatin* (Hrsg.: S. Reichlin), **1987**, S. 193.
- [102] H. Kessler, J. W. Bats, C. Griesinger, S. Koll, M. Will, K. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1033.
- [103] H. Kessler, E. Graf von Roedern, E. Lohof, R. Haubner, A. Geyer, V. Wittmann, *5th Akabori Conference Dresden, Germany*, **1994**.

- [104] B. H. Arison, R. Hirschmann, D. F. Veber, *Bioorg. Chem.* **1978**, *7*, 447-451.
- [105] B. H. Arison, R. Hirschmann, W. J. Paleveda, S. F. Brady, D. F. Veber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *100*, 1148-1153.
- [106] J.-L. Fauchere, C. Thurieau, *Adv. Drug Res.* **1992**, *23*, 127-159.
- [107] R. Chandrasekaran, A. V. Lakshminarayanan, U. V. Pandya, G. N. Ramachandran, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *303*, 14-27.
- [108] R. Hirschmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1278-1301.
- [109] D. F. Veber, F. W. Holly, R. F. Nutt, S. J. Bergstrand, S. F. Brady, R. Hirschmann, M. S. Glitzer, R. Saperstein, *Nature* **1979**, *280*, 512-514.
- [110] D. F. Veber, R. M. Freidinger, D. Schwenk Perlow, W. J. Paleveda, F. W. Holly, R. G. Strachan, R. F. Nutt, B. H. Arison, C. Homnick, W. C. Randall, M. S. Glitzer, R. Saperstein, R. Hirschmann, *Nature* **1981**, *292*, 55-58.
- [111] D. F. Veber, *Design of a highly active cyclic hexapeptide analog of somatostatin*, ESCOM Publishers, Leiden, **1981**.
- [112] H. Kessler, M. Bernd, H. Kogler, J. Zarbock, O. W. Soerensen, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6944-6952.
- [113] C. Pattaroni, P. Lucietto, M. Goodman, G. Yamamoto, W. Vale, L. Moroder, L. Gazerro, W. Göhring, B. Schmied, E. Wünsch, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *36*, 401-417.
- [114] D. F. Mierke, C. Pattaroni, N. Delaet, A. Toy, M. Goodman, T. Tancredi, A. Motta, P. A. Temussi, L. Moroder, G. Bovermann, E. Wünsch, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *36*, 418-432.
- [115] Y.-B. He, Z. Huang, K. Raynor, T. Reisine, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8066-8072.
- [116] Z. Huang, Y.-B. He, K. Raynor, M. Tallent, T. Reisine, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9390-9401.
- [117] E. Lohof, F. Burkhart, M. A. Born, E. Planker, H. Kessler in *Advances in Amino Acids Mimetics and Peptidomimetics*, Band 2 (Hrsg.: A. Abell), JAI Press, Stamford, **1999**, S. 263-292.
- [118] H. Kessler, M. Bernd, H. Kogler, J. Zarbock, O. W. Sorensen, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6944-6952.

- [119] A. E. Aplin, A. Howe, S. K. Alahari, R. L. Juliano, *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 197-263.
- [120] G. A. Heavner, *Drug Discovery Today* **1996**, *1*, 295-304.
- [121] M. Pignatelli, D. Liu, A. K. Nigam, G. Gagliardi, E.-N. Lalani, G. W. H. Stamp, Harwood Academic Publishers, **1995**.
- [122] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11-25.
- [123] M. J. Humphries, P. Newham, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 78-83.
- [124] M. A. Horton, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1997**, *29*, 491-497.
- [125] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* **1987**, *238*, 491-497.
- [126] P. Newham, M. J. Humphries, *Mol. Med. Today* **1996**, *2*, 304-313.
- [127] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697-715.
- [128] S. A. Moussa, D. A. Cheresch, *Drug Discovery Today* **1997**, *2*, 509-520.
- [129] D. Cox, T. Aoki, J. Seki, Y. Motoyama, K. Yoshida, *Med. Res. Rev.* **1994**, *14*, 195-228.
- [130] E. Ruoslahti, F. G. Giancotti, *Cancer Cells* **1989**, *1*, 119-126.
- [131] L. A. Liotta, P. S. Steeg, W. G. Stetler-Stevenson, *Cell* **1991**, *64*, 327-336.
- [132] Y. Wei, M. Lukashev, D. I. Simon, S. C. Bodary, S. Rosenberg, M. V. Doyle, H. A. Chapman, *Science* **1996**, *273*, 1551-1555.
- [133] J. Nip, P. Brodt, *Cancer Metastasis Rev.* **1995**, *14*, 241-252.
- [134] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50-54.
- [135] H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, G. Müller, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1201-1205.
- [136] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1440-1456.
- [137] R. Haubner, H.-J. Wester, U. Reuning, R. Senekowitsch-Schmidtke, R. Diefenbach, H. Kessler, G. Stöcklin, M. Schwaiger, *J. Nucl. Med.* **1999**, *40*, 1061-1071.
- [138] J. Yoshimura, H. Ando, T. Sato, S. Tsuchida, H. Hashimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49*, 2511-2514.
- [139] F. Zaman, A. Fatima, A. Malik, W. Voelter, *Z. Naturforsch.* **1994**, *49b*, 1434-1438.
- [140] S. Sabesan, *Tetrahedron. Lett.* **1997**, *38*, 3127-3130.

- [141] E.-F. Fuchs, J. Lehmann, *Carbohydr. Res.* **1976**, *49*, 267-273.
- [142] P. Fügedi, C. J. Petö, L. Wang, *9th European Carbohydrate Symposium (Eurocarb9)* Utrecht, Netherlands, **1997**, A113, A114.
- [143] P. Fügedi, C. Peto, L. Wang, *18th International Carbohydrate Symposium* Mailand, Italy, **1996**, Abstract B0 013.
- [144] P. Fügedi, C. Peto, *8th European Carbohydrate Symposium* Sevilla, Spain, **1995**, Abstract A-75.
- [145] K. C. Nicolaou, H. Flörke, M. G. Egan, T. Barth, V. A. Estevez, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1775-1778.
- [146] Y. Suhara, J. E. K. Hildreth, Y. Ichikawa, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1575-1578.
- [147] Y. Suhara, M. Izumi, M. Ichikawa, M. B. Penno, Y. Ichikawa, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7167-7170.
- [148] H. P. Wessel in *Carbohydrate Mimics* (Hrsg.: Y. Chapleur), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 428-431.
- [149] H. P. Wessel, C. Mitchell, C. M. Lobato, G. Schmid, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2920-2921.
- [150] C. M. Timmers, J. J. Turner, C. M. Ward, G. A. v. d. Marel, M. L. C. E. Kouwijzer, P. D. J. Grootenhuis, J. H. v. Boom, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 920-929.
- [151] Y. Suhara, M. Ichikawa, J. E. K. Hildreth, Y. Ichikawa, *Tetrahedron. Lett.* **1996**, *37*, 2549-2552.
- [152] S.-I. Nishimura, S. Nomura, K. Yamada, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1998**, 617-618.
- [153] S. Tokura, Y. Ikeuchi, S.-I. Nishimura, N. Nishi, *Int. J. Biol. Macromol.* **1983**, *5*, 249.
- [154] Y. Ichikawa, *persönliche Mitteilung, 19th Internat. Carbohydr. Symp., San Diego* **1998**.
- [155] D. Seebach, M. Overhand, F. N. M. Kühnle, B. Martinoni, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913-941.
- [156] D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, G. Giuchard, T. Hintermann, B. Jaun, J. Matthews, J. V. Schreiber, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 932-982.

- [157] D. Seebach, M. Overhand, F. N. M. Kühnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913-941.
- [158] D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071-13072.
- [159] S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173-180.
- [160] M. D. Smith, D. D. Long, A. Martin, D. G. Marquess, T. D. W. Claridge, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2191-2194.
- [161] T. D. W. Claridge, D. D. Long, N. L. Hungerford, R. T. Aplin, M. D. Smith, D. G. Marquess, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2199-2202.
- [162] D. D. Long, N. L. Hungerford, M. D. Smith, D. E. A. Brittain, D. G. Marquess, T. D. W. Claridge, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2195-2198.
- [163] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
- [164] S. T. Crooke, C. F. Bennet, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, *36*, 107-129.
- [165] U. Englisch, D. H. Gauss, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 629-646.
- [166] N. T. Thuong, C. Helene, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 697-723.
- [167] E. Uhlmann, A. Peymann, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 563-584.
- [168] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895-1897.
- [169] M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9677-9678.
- [170] M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, J. Buchardt, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 800-801.
- [171] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
- [172] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566-568.
- [173] D. Y. Cherny, B. P. Belotserkovskii, K. M. D. Frank, M. Egholm, O. Buchardt, R. H. Berg, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1667-1670.
- [174] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Anti-Cancer Drug Res.* **1993**, *8*, 53-63.

- [175] O. Buchardt, M. Egholm, R. H. Berg, P. E. Nielsen, *Trends Biotechnol.* **1993**, *11*, 384-386.
- [176] B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 5-23.
- [177] C. Meier, J. W. Engels, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1039-1041.
- [178] P. E. Nielsen, *Origins Life* **1993**, *23*, 323-327.
- [179] C. Böhler, P. E. Nielsen, L. Orgel, *Nature* **1995**, *376*, 578-581.
- [180] J. Schmidt, P. E. Nielsen, L. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4797-4802.
- [181] J. Schmidt, L. Christensen, P. E. Nielsen, L. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4792-4796.
- [182] K. L. Dueholm, P. E. Nielsen, *New J. Chem.* **1997**, *21*, 19-31.
- [183] T. Koch, M. B. Borre, M. Naesby, H. G. Batz, H. Orum, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1771-1774.
- [184] P. E. Nielsen, *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 105-110.
- [185] P. E. Nielsen, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 624-630.
- [186] E. Uhlmann, A. Peymann, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2954-2983.
- [187] M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Quart. Rev. Biophys.* **1996**, *29*, 369-394.
- [188] E. Uhlmann, D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, A. Rytte, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2793-2797.
- [189] K. K. Jensen, H. Orum, P. E. Nielsen, B. Norden, *Biochemistry* **1997**, *36*, 5072-5077.
- [190] D. J. Rose, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3545-3548.
- [191] S. Tomac, M. Sarkar, T. Ratilainen, P. Wittung, P. E. Nielsen, B. Norden, A. Gräslund, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5544-5552.
- [192] S. K. Kim, P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, R. H. Berg, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*.
- [193] M. Egholm, L. Christensen, K. L. Dueholm, O. Buchardt, J. Coull, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 217-222.
- [194] M. C. Griffith, L. M. Risen, M. J. Greig, E. A. Lesnik, K. G. Sprankle, R. H. Griffey, J. S. Kiely, S. M. Freier, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 831-834.
- [195] V. V. Demidov, M. V. Yavnilovich, B. P. Belotserkovskii, M. D. Frank-Kamenetskii, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 2637-2641.

- [196] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *J. Mol. Recogn.* **1994**, 7, 165-172.
- [197] V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 2103-2110.
- [198] V. V. Demidov, D. I. Cherny, A. V. Kurakin, M. V. Yavnilovich, V. A. Malkov, M. D. Frank-Kamenetskii, S. H. Sönnichsen, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 5218-5226.
- [199] A. Ono, P. O. P. Ts'O, L.-S. Kan, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4032-4033.
- [200] A. Ono, P. O. P. Ts'O, L.-S. Kan, *J. Org. Chem.* **1991**, 57, 3225-3230.
- [201] N. J. Pfeffer, J. C. Hanvey, J. E. Bisi, S. A. Thomson, C. F. Hassmann, S. A. Noble, L. E. Babiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10648-10655.
- [202] P. Wittung, P. E. Nielsen, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7049-7054.
- [203] L. Betts, J. A. Josey, J. M. Veal, S. R. Jordan, *Science* **1995**, 270, 1838-1841.
- [204] P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm, B. Norden, *Nature* **1994**, 368, 561-565.
- [205] P. Wittung, P. E. Nielsen, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3189-3190.
- [206] V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Sönnichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 48, 1310-1313.
- [207] P. Wittung, J. Kajanus, P. Edwards, P. E. Nielsen, B. Norden, B. G. Malmstroem, *FEBS Lett.* **1995**, 365, 27-29.
- [208] M. A. Bonham, S. Brown, A. L. Boyd, P. H. Brown, D. A. Bruckenstein, J. C. Hanvey, S. A. Thomson, A. Pipe, F. Hassman, J. E. Bisi, B. C. Froehler, M. D. Matteucci, R. W. Wagner, S. A. Noble, L. E. Babiss, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 1197-1203.
- [209] J. C. Hanvey, N. J. Pfeffer, J. E. Bisi, S. A. Thomson, R. Cadilla, J. A. Josey, D. J. Ricca, C. F. Hassman, M. A. Bonham, K. G. Au, S. G. Carter, D. A. Bruckenstein, A. L. Boyd, S. A. Noble, L. E. Babiss, *Science* **1992**, 258, 1481-1485.
- [210] S. A. Noble, M. A. Bonham, J. E. Bisi, D. A. Bruckenstein, P. H. Brown, R. Cadilla, M. D. Gaul, J. C. Hanvey, C. F. Hassman, J. A. Josey, M. J. Luzzio, P. M. Myers, A. J. Pipe, D. J. Ricca, C. W. Su, C. L. Stevenson, S. A. Thomson, R. W. Wieth, L. E. Babiss, *Drug Deliv. Res.* **1995**, 34, 184-195.
- [211] J. C. Norton, M. A. Piatyszek, W. E. Wright, J. W. Shay, D. R. Corey, *Nature Biotechnol.* **1996**, 14, 615-619.

- [212] L. C. Boffa, P. L. Morris, E. M. Carpaneto, M. Louissaint, V. G. Allfrey, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 13228-13233.
- [213] P. E. Nielsen, M. Enghom, O. Buchardt, *Gene* **1994**, *149*, 139-145.
- [214] N. E. Mollegaard, O. Buchardt, M. Egholm, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *91*, 3892-3895.
- [215] H. J. Larsen, P. E. Niesen, *Nucleic Acid Res.* **1996**, *24*, 458-463.
- [216] E. Uhlmann, D. W. Will, G. Breipohl, A. Peymann, D. Langner, J. Knolle, G. O'Malley, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 603-608.
- [217] A. Peymann, E. Uhlmann, K. Wagner, S. Augustin, C. Weiser, S. Hein, D. Langner, G. Breipohl, D. W. Will, *Nucleosides Nucleotides* **1998**, *17*, 1997-2001.
- [218] A. Peymann, E. Uhlmann, K. Wagner, S. Augustin, C. Weiser, D. W. Will, G. Breipohl, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2809-2812.
- [219] A. Peymann, E. Uhlmann, K. Wagner, S. Augustin, G. Breipohl, D. W. Will, A. Schäfer, H. Wallmeier, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2797-2800.
- [220] C. Carlsson, M. Jonsson, B. Norden, M. T. Dulay, R. N. Zare, J. Noolandi, P. E. Nielsen, L.-C. Tsui, J. Zielenski, *Nature* **1996**, *380*, 207-209.
- [221] H. Oerum, P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, C. Stanley, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5332-5336.
- [222] C. Thiede, E. Bayersdoerffer, R. Blasczyk, B. Wittig, A. Neubauer, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 983-984.
- [223] J. Weiler, H. Gausepohl, N. Hauser, O. N. Jensen, J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2792-2799.
- [224] J. Wang, E. Palecek, P. E. Nielsen, G. Rivas, X. Cai, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, P. A. M. Farias, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7667-7670.
- [225] H. F. Arlinghaus, M. N. Kwoka, K. B. Jacobson, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3747-3753.
- [226] A. G. Veselkov, V. V. Demidov, P. E. Nielsen, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2483-2487.
- [227] E. Jankowsky, G. Strunk, B. Schwenzler, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2690-2693.
- [228] H. Oerum, P. E. Nielsen, M. Joergensen, C. Larsson, C. Stanley, T. Koch, *BioTechniques* **1995**, *19*, 472-480.

- [229] L. C. Boffa, E. M. Carpaneto, V. G. Allfrey, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1995**, *92*, 1901-1905.
- [230] E. P. Heimer, H. E. Gallo-Torres, A. M. Felix, M. Ahmad, T. J. Lambros, F. Scheidl, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1984**, *23*, 203-211.
- [231] S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, F. Hassmann, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, R. W. Wiethe, S. A. Noble, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6179-6194.
- [232] D. A. Stetsenko, E. N. Lubyako, V. K. Potapov, T. L. Azhikina, E. Sverdlov, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3571-3574.
- [233] G. Breipohl, D. W. Will, A. Peymann, E. Uhlmann, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 14671-14686.
- [234] K. L. Dueholm, M. Egholm, O. Buchardt, *Org. Prep. Proced. Int.* **1993**, *25*, 457-461.
- [235] P. J. Finn, N. J. Gibson, R. Fallon, A. Hamilton, T. Brown, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3357-3363.
- [236] G. Breipohl, J. Knolle, D. Langner, G. O'Malley, E. Uhlmann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 665-670.
- [237] D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, J. Knolle, E. Uhlmann, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12069-12082.
- [238] L. Kosynkina, W. Wang, T. C. Liang, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5173-5176.
- [239] K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5767-5773.
- [240] B. E. Watkins, J. S. Kiely, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5702-5703.
- [241] R. Zou, M. J. Robins, *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 1436-1437.
- [242] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [243] B. Castro, J. Coste, M. N. Dufour, A. Pantaloni, *Pept. Chem. Struct. Biol. Proc. Am. Pept. Symp.* **1990**, *11*, 900-901.
- [244] W. König, G. Breipohl, P. Pokorny, M. Birkner, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp.* **1991**, *21*.

- [245] G. Breipohl, D. W. Will, D. Langner, J. Knolle, E. Uhlmann, *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis* Birmingham, **1996**, 61-64.
- [246] A. C. v. d. Laan, N. J. Meeuwenoord, E. Kuyl-Yeheskiely, R. S. Oosting, R. B. Brands, J. H. van, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1995**, *114*, 295-297.
- [247] A. C. v. d. Laan, R. Bill, R. G. Kuimelis, E. Kuyl-Yeheskiely, J. H. v. Boom, A. Andrus, R. Vinayak, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2249-2252.
- [248] L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 175-183.
- [249] K. L. Dueholm, K. H. Petersen, D. K. Jensen, M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*.
- [250] B. P. Gangamani, V. A. Kumar, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 15017-15030.
- [251] S. Jordan, C. Schwemler, W. Kosch, A. Kretschmer, E. Schwenner, U. Stropp, B. Mielke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 687-690.
- [252] G. Lowe, T. Vilavian, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1997**, 539-546.
- [253] G. Lowe, T. Vilavian, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1997**, 547-554.
- [254] P. Lagriffoule, P. Wittung, M. Eriksson, K. K. Jensen, B. Norden, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 912-919.
- [255] K. A. Ramasamy, W. Seifert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1799-1804.
- [256] G. Haaima, A. Lohse, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2068-2070.
- [257] K. H. Petersen, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 793-796.
- [258] E. Lioy, H. Kessler, *Liebigs Ann. Chem.* **1996**, 201-204.
- [259] M. Cantin, R. Schütz, C. J. Leumann, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4211-4214.
- [260] H. Challa, S. A. Woski, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 419-422.
- [261] H. Challa, M. L. Styers, S. A. Woski, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1639-1642.
- [262] M. Leijon, A. Gräslund, P. E. Nielsen, O. Buchardt, B. Norden, S. M. Kristensen, M. Eriksson, *Biochemistry* **1994**, *33*, 9820-9825.
- [263] M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Nature Struct. Biol.* **1996**, *3*, 410-413.
- [264] S. C. Brown, S. A. Thomson, J. M. Veal, D. G. Davis, *Science* **1994**, *265*, 777-783.

- [265] O. Almarsson, T. C. Bruice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9542-9546.
- [266] O. Almarsson, T. C. Bruice, J. Kerr, R. N. Zuckermann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 7518-7522.
- [267] E. Lioy, TU, **1997**.
- [268] J.-A. Fehrentz, B. Castro, *Synthesis* **1983**, 676-678.
- [269] J. R. Rachele, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2898.
- [270] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acids Structure*, Springer, New York, Berlin, **1983**.