

UNIVERSITÄT
BAYREUTH

Konvergente Synthesemethoden für *N*- und *O*- glycosylierte Proteine

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) der Fakultät Biologie, Chemie und
Geowissenschaften der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Marisa Rädisch

aus Berlin

Bayreuth, April 2016

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von Februar 2011 bis Juli 2015 am Lehrstuhl für Bioorganische Chemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Carlo Unverzagt durchgeführt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 02.05.2016

Zulassung durch die Promotionskommission: 10.05.2016

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 28.10.2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Stefan Schuster

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Carlo Unverzagt (Ertgutachter)

Prof. Dr. Matthias Breuning (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Birgit Weber (Vorsitz)

Prof. Dr. Andreas Möglich

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1 Bedeutung von Glycoproteinen	9
1.2 Gewinnung einheitlicher Glycoproteine.....	10
1.3 Gewinnung einheitlicher Glycoproteine durch native chemische Ligation	11
1.4 Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc/t-Bu Strategie (SPPS).....	13
1.5 Synthese von N-Glycopeptiden	15
1.6 Entwicklung von HIV-1 Impfstoffen durch synthetische Glycopeptidmimetika.....	18
1.7 Antikörper als Therapeutikum: Der Einfluss von IgG1 Fc N- Glycanen.....	21
1.8 Das Proteoglycan Bikunin	24
2. Themenstellung	28
3. Synthese von HIV-1 V1/V2 Loop Mimetika	30
3.1 Synthese von glycosylierten HIV-1 V1/V2 Loop Mimetika.....	31
3.2 Synthese eines optimierten HIV-1 V1/V2 Glycopeptids	37
3.3 Funktionalisierung des zyklischen Glycopeptids durch Azidoprolin.....	40
4. Semisynthese von IgG1 Fc.....	43
4.1 Synthese von (R,S) 2-Chlor-4'-carboxy-triphenylmethanol	44
4.2 Synthese von IgG1 Fc 223-260	45
4.3 Synthese von IgG1 Fc 261-286 Thioestern	47
4.4 Synthese von IgG1 Fc 287-320 Glycopeptidhydraziden.....	50
4.5 Ligation zu IgG1 Fc 261-320 Glycopeptidhydraziden.....	56
4.6 Entschwefelung von IgG1 Fc 261-320 Glycopeptiden	58
4.7 Abspaltung der PhAcM-Gruppe des 261-320 Glycopeptids	61
4.8 Ligation zu IgG1 Fc 223-320	65
5. Semisynthese von Bikunin	67
5.1 Synthese von Bikunin 1-25 O-Glycopeptiden.....	67
5.2 Enzymatische Verlängerung von Bikunin 1-25 O-Glycopeptidhydraziden.....	74

5.3	Synthese von Bikunin 26-50 N-Glycopeptiden.....	77
5.4	Synthese von N- und O-glycosylierten Bikunin 1-50 Fragmenten	88
5.5	Synthese von N- und O-glycosyliertem Bikunin 1-147	92
5.6	Rückfaltung und Aktivitätstests vom semisynthetischen Bikunin 121	96
6.	Zusammenfassung.....	101
7.	Summary	104
8.	Experimenteller Teil.....	107
8.1	Allgemeines	107
8.2	Versuche zu Kapitel 3.1	109
8.3	Versuche zu Kapitel 3.2	114
8.4	Versuche zu Kapitel 3.3	117
8.5	Versuche zu Kapitel 4.1	122
8.6	Versuche zu Kapitel 4.2	123
8.7	Versuche zu Kapitel 4.3	126
8.8	Versuche zu Kapitel 4.4	135
8.9	Versuche zu Kapitel 4.5	144
8.10	Versuche zu Kapitel 4.6.....	147
8.11	Versuche zu Kapitel 4.7.....	150
8.10	Versuche zu Kapitel 4.8.....	152
8.11	Versuche zu Kapitel 5.1.....	154
8.12	Versuche zu Kapitel 5.2.....	162
8.12	Versuche zu Kapitel 5.3.....	163
8.13	Versuche zu Kapitel 5.4.....	180
8.14	Versuche zu Kapitel 5.5.....	183
8.15	Versuche zu Kapitel 5.6.....	185
9.	Danksagung.....	188
10.	Literaturverzeichnis.....	190

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
Acm	Acetamidomethyl
BAPNA	<i>N</i> -Benzoyl-D,L-Arginin- <i>p</i> -nitroanilid
ber	berechnet
B _H	Beladungsgrad eines Harzes
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
Cl-HOBt	6-Chlor-1-hydroxybenzotriazol
CM	ChemMatrix
CSPPS	<i>convergent solid phase peptide synthesis</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
Dmab	4- <i>{N</i> -[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl]-amino} <i>}</i> benzyl
Dmb	2,4-Dimethoxybenzyl
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eq	Äquivalent(e)
ESI-MS	<i>electrospray ionisation mass spectrometry</i>
Fab	<i>antigen binding fragment</i>
Fc	<i>crystallisable fragment</i>
FcγR	Fcγ-Rezeptor
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GAG	Glycosaminoglycan
Gal	D-Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
GalNAc4S	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin-4-sulfat

GdmCl	Guanidiniumhydrochlorid
gef	gefunden
GlcA	D-Glucuronsäure
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HCTU	<i>N</i> -[(6-Chlor- <i>1H</i> -benzo-1,2,3-triazol-1-yl)-(dimethylamino)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
HOObt	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HV	Hochvakuum
IgG	Immunglobulin G
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
MESNa	Natrium-2-sulfanylethansulfonat
MPAA	4-Mercaptophenyllessigsäure
MMBA	4-Mercaptomethylbenzoesäure
m/v	Masse pro Volumen
MW	Mikrowelle
NeuAc	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NCL	Native chemische Ligation
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
Nona	Nonasaccharid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pd(PPh ₃) ₄	Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0)
PGA	Penicillin G Acylase
PhAcM	Phenylacetamidomethyl
PhSiH ₃	Phenylsilan
PyBOP	Benzotriazol-1-yl- <i>N</i> -oxy-tris-(pyrrolidino)-phosphoniumhexafluorophosphat
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PS	Polystyrol

rel. Abs.	relative Absorption
R _f	Retentionsfaktor
rel. I.	relative Intensität
RP	<i>reversed-phase</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG	Schutzgruppe
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TGTA	Tris[(1-D-Glucose-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
THF	Tetrahydrofuran
Thz	Thiazolidin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Trt	Trityl
UTI	<i>Urinary Trypsin Inhibitor</i>
UV	ultraviolett
VA-044	2,2'-Azo-bis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan dihydrochlorid]
v/v	Volumen pro Volumen
Xaa	beliebige Aminosäure
Xyl	D-Xylose
ψpro	Pseudoprolin

Nicht spezifizierte Aminosäuren sind L-konfiguriert. Die verwendeten Abkürzungen folgen den von der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur aufgestellten Regeln.

1. Einleitung

1.1 Bedeutung von Glycoproteinen

Die meisten menschlichen Proteine sind posttranslational modifiziert. Eine der häufigsten Modifikationen ist die Glycosylierung. Als Glycoproteine bezeichnet man Proteine mit einem kovalent gebundenen Kohlenhydratteil, der *N*- oder *O*-glycosidisch an die Seitenketten von Asparagin oder den Hydroxysäuren Serin, Threonin, Hydroxyprolin, Hydroxylysin und Tyrosin gebunden ist.¹ Die *N*-Glycosylierung ist dabei die am häufigsten vorkommende Glycosylierungsform.² *In vivo* erfolgt die *N*-Glycosylierung im Endoplasmatischen Retikulum während der Translation des Proteins an der Konsensussequenz Asn-Xaa-Ser/Thr. Xaa steht für jede Aminosäure außer Prolin. Das Transmembranenzym Oligosaccharyltransferase überträgt dabei ein Oligosaccharid auf den Amidstickstoff des Asparaginrests. Die *N*-Glycane werden in drei Hauptklassen, den mannosereichen, den komplexen und den Hybridtyp, eingeteilt (Abbildung 1).³ *N*-Glycane enthalten ein gemeinsames Core-Pentasaccharid bestehend aus zwei *N*-Acetylglucosaminresten, einer β -Mannose und zwei α -Mannosen.

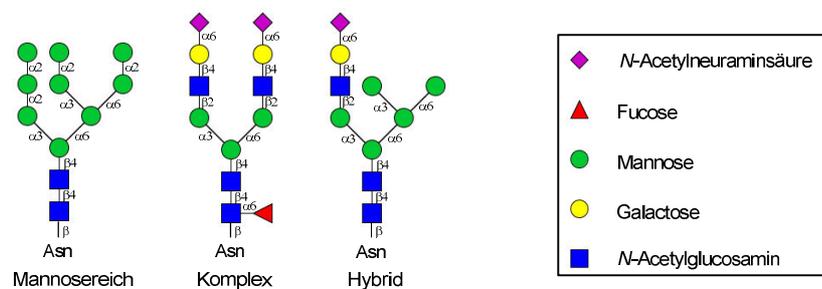


Abbildung 1: Darstellung der drei Hauptklassen der *N*-Glycane.⁴

Der Kohlenhydratanteil kann Proteinen ein hohes Maß an Diversität verleihen. Die Vielfalt ist bedingt durch unterschiedliche Monosaccharide, unterschiedliche Ringgrößen, Verzweigungen und Konfigurationen am anomeren Kohlenstoffatom. Glycosylierungen unterliegen in der Natur keiner direkten genetischen Kontrolle, sondern werden von unterschiedlichen Enzymen erzeugt. Daher liegen Glycoproteine normalerweise in verschiedenen Glycoformen vor. Diese besitzen zwar ein gemeinsames Peptidrückgrat, aber sie unterscheiden sich in der Art und Struktur des Kohlenhydratanteils an der entsprechenden Glycosylierungsstelle. Die

Mikroheterogenität erschwert die Isolierung homogener Glycoformen aus natürlichen Quellen erheblich. Der Kohlenhydratteil, der kovalent mit dem Proteingerüst verknüpft ist, beeinflusst die physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften des jeweiligen Proteins bezüglich der Löslichkeit, Ladung und Stabilität.⁵

Die Funktionen von Glycoproteinen sind vielfältig. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei molekularen Erkennungsvorgängen wie Zelladhäsion, Zelldifferenzierung oder Zellwachstum.⁶

Die Proteinglycosylierung ist somit wichtig für viele komplexe Prozesse in eukaryotischen Zellen. So regulieren Glycosylierungen die biologische Halbwertszeit und Aktivität vieler Hormone, indem sie strukturelle Integrität gewährleisten und Peptide vor dem Abbau bewahren.^{7,8} Glycosylierungen stabilisieren meist die Tertiärstruktur von Proteinen, was essentiell für die biologischen Funktionen und damit für die Anwendung z.B. als Therapeutikum ist.⁹ Abweichende Proteinglycosylierungen beeinflussen die intrazelluläre Erkennung, wodurch Infektionskrankheiten, Tumorerkrankungen und Autoimmunerkrankungen gefördert werden können.^{10,11} Um Struktur-Wirkungsbeziehungen untersuchen zu können, ist die Gewinnung einheitlicher Glycoproteine essentiell.

1.2 Gewinnung einheitlicher Glycoproteine

Homogene *N*-Glycoproteine können durch Peptid-Glycopeptid-Ligation oder Glycoprotein-Remodeling dargestellt werden (Abbildung 2).¹² Beim Glycoprotein-Remodeling wird der Saccharidteil eines natürlichen Gemisches von Glycoformen eines Glycoproteins durch enzymatischen Abbau durch ENGAsen zu einem einheitlichen GlcNAc-Glycoprotein abgebaut.¹³ Anschließend wird der GlcNAc-Rest durch Endoglycosidasen und Kohlenhydratoxazoline zu dem gewünschten Oligosaccharid verlängert.¹⁴ Für die Peptid-Glycopeptid-Ligation werden spezielle Glycopeptide benötigt. Deren Darstellung kann durch den linearen Einbau von Glycosylaminosäuren¹⁵, durch konvergente Verknüpfung eines Oligosaccharids³³ oder durch enzymatische Synthese erfolgen¹⁶. Die unglycosylierten Peptidsequenzen können durch SPPS,¹⁷ enzymatische Synthese oder rekombinante Expression erhalten werden.¹⁸ Anschließend kann das Vollängenprotein durch chemoselektive Ligationsmethoden aufgebaut werden.¹⁹

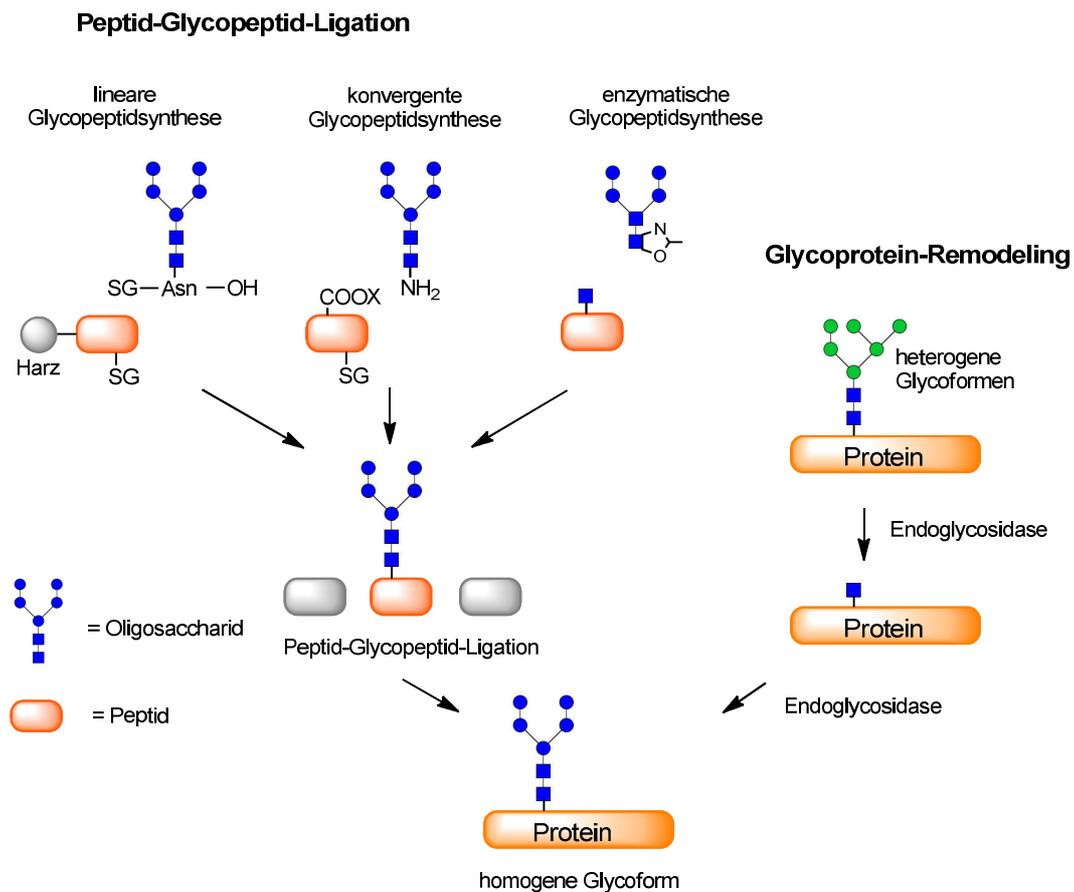


Abbildung 2: Strategien zur Synthese homogener N-Glycoproteine.

1.3 Gewinnung einheitlicher Glycoproteine durch native chemische Ligation

Durch chemische Synthese können modifizierte Proteine und Glycoproteine dargestellt werden. Dazu werden meist Ligationmethoden eingesetzt. Der Zugang zu einheitlichen Glycoformen kann über die native chemische Ligation erfolgen. Diese Ligationmethode wurde von *Kent et al.* entwickelt.²⁰ Dabei erfolgt eine chemoselektive Reaktion eines C-terminalen Peptidthioesters mit einem N-terminalen Cystein-Fragment (Abbildung 3).²¹ Die hohe Relevanz dieser Methode zur Synthese von Proteinen bzw. Glycoproteinen belegen aktuelle Beispiele.²² Zur Synthese der Peptid- und Glycopeptidthioester wird die Fmoc-Strategie häufig angewendet.²³ Peptidhydrazide stellen latente Peptidthioester dar und weisen gegenüber den labilen Thioestern verschiedene Vorteile auf. Peptidhydrazide sind unter Ligationsbedingungen stabil, zudem ist die Ligationsrichtung sowohl C-terminal als auch N-terminal möglich. Somit stellt die Verwendung von Peptidhydraziden eine Ergänzung bei der Proteinsynthese durch

nativer chemischer Ligation dar.²⁴ C-Terminale Peptidhydrazide können chemoselektiv zu Thioestern umgesetzt und mit Cysteinfragmenten ligiert werden. Zur Aktivierung wird das Peptidhydrazid in einem wässrigen Puffer gelöst und bei pH 3-4 und niedrigen Temperaturen (-10 °C) mit NaNO_2 zum Azid umgesetzt (Abbildung 3). Anschließend reagiert das Azid bei pH 6-7 mit einem Thiol zum Thioester, der in Ligationen eingesetzt werden kann.

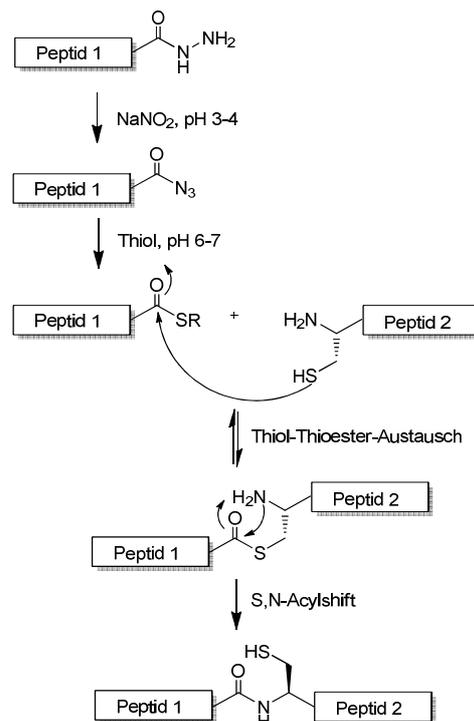


Abbildung 3: Native chemische Ligation von Peptidhydraziden.

Die natürliche Häufigkeit von Cysteinen und somit möglichen Ligationsstellen in Proteinen ist relativ gering (~1.4 %).²⁵ Daher wurden cysteinfreie Ligationen entwickelt.²⁶ Dazu werden am N-Terminus außer Cystein thiolmodifizierte Aminosäuren wie z. B. Thiophenylalanin²⁷ in Peptide eingebaut und nach erfolgter Ligation wird die Mercaptogruppe durch Raney-Nickel oder metallfreie Entschwefelung entfernt. Alle nativen Cysteine eines Proteins müssen bei dieser Methode orthogonal geschützt sein.

Ursprünglich wurden Thiolgruppen im Peptid mit einem großen Überschuss an Metallen entschwefelt. Dies bringt viele Nachteile, wie Nebenreaktionen mit anderen Aminosäureseitenketten, und schlechte Wiederfindungsrate von Peptiden, die gute Koordinatoren von Metallen darstellen, mit sich. Daher wurde eine metallfreie Entschwefelung von *S. Danishefsky et al.* entwickelt.²⁸ Die Methode basiert auf der Entschwefelung von Mercaptanen mit Trialkylphosphiten.²⁹

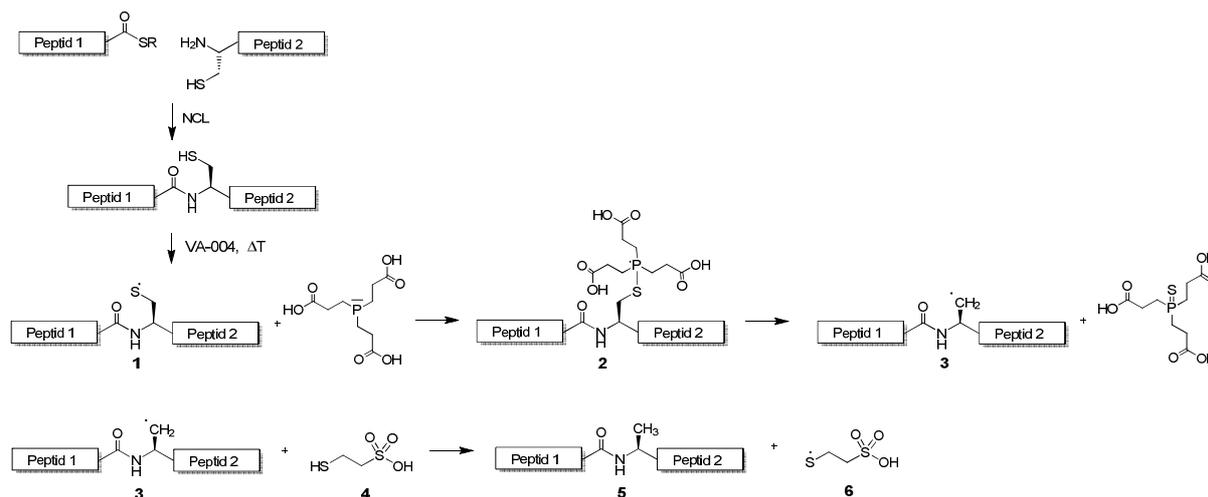


Abbildung 4: Mechanismus der nativen chemischen Ligation mit anschließender metallfreier Entschwefelung nach Walling et al.³⁰

Später wurden die Phosphite durch Phosphine ersetzt und der vorgeschlagene Mechanismus dazu ist in Abbildung 5 dargestellt.³⁰ Das Thiyl-Radikal **1** reagiert mit dem Phosphin (TCEP) zu einem Phosphoranyl-Radikal **2**. Der Zerfall von **2** führt zur Bildung des Alkylradikals **3**. Mit Hilfe des Mercaptans **4** entsteht Produkt **5** und gleichzeitig wird die Radikalkettenreaktion durch die Bildung eines neuen Thiyl-Radikals **6** weitergeführt.

1.4 Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc/t-Bu Strategie (SPPS)

Die Festphasenpeptidsynthese (SPPS) stellt eine grundlegende Methode dar, um Peptide zu synthetisieren. Bei der SPPS kann zwischen zwei Verfahren unterschieden werden. Die Synthese kann linear oder konvergent erfolgen. Bei der linearen Synthese nach Merrifield (1963)¹⁷ wird das Peptid an einem polymeren Träger sequentiell vom C- zum N-Terminus aufgebaut. Peptidbindungen zwischen Aminosäuren werden durch die Aktivierung der Carboxylkomponente und der anschließenden Umsetzung mit einer Aminokomponente gebildet. Aufgrund der vereinfachten Reinigung und der begrenzten Löslichkeit geschützter Peptidketten ist die Synthese längerer Sequenzen an der Festphase vorteilhaft. Für einen eindeutigen Verlauf der Synthese ist es nötig, die Seitenketten der eingesetzten Aminosäuren permanent zu schützen. Außerdem verwendet man einen orthogonalen Schutz der N^α -Aminogruppe der eingeführten Aminosäure.

Die Gewinnung von Peptiden an der Festphase ist ein Mehrstufenprozess aus sich wiederholenden Entschützungs- und Acylierungsschritten, wobei zahlreiche Nebenprodukte entstehen können. Die erste Aminosäure des Peptids wird C-terminal über einen Linker mit dem polymeren Träger verknüpft. Das Harz sollte chemisch inert gegenüber den verwendeten Reagenzien und Lösungsmitteln sein und gute Quelleigenschaften besitzen, um eine optimale Diffusion der Reagenzien zu gewährleisten. Zur C-terminalen Aktivierung von Fmoc-Aminosäuren werden verschiedene Klassen von Aktivierungsreagenzien verwendet, z. B. Phosphoniumsalze (PyBOP), Aminiumsalze (HCTU) oder Carbodiimide. Bei der Aktivierung des C-Terminus muss darauf geachtet werden, dass diese unter Konfigurationserhalt abläuft. Racemisierung tritt hauptsächlich durch 5-(4*H*)-Oxazolone-Bildung ein, die bei Verwendung von Urethanschutzgruppen (z. B. Fmoc) als *N*^α-Schutzgruppe für Aminosäuren sehr gering ausfallen.

Die von Mutter *et al.* entwickelten Pseudoprolindipeptide sind in Abbildung 5 dargestellt.³¹ Es handelt sich dabei um Oxazolidinderivate, die von Serin oder Threonin abgeleitet sind. Die Hydroxylgruppe der Seitenkette ist reversibel als Acetonid mit dem Amidstickstoff verknüpft.

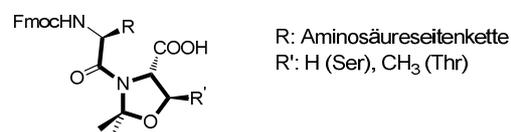


Abbildung 5: Struktur eines Pseudoprolindipeptids.

Da eine Acylierung des sekundären Oxazolidinstickstoffs schwierig ist, wird das Pseudoprolin als Dipeptid aufgebaut und in dieser Form racemisierungsfrei in die Peptidsequenz eingeführt. Durch die Verwendung von Pseudoprolinen bei C-terminalen Serin- und Threonin stehen damit neben Glycin und Prolin weitere Schnittstellen für epimerisierungsfreie Segmentkondensationen zur Verfügung.

Mit zunehmender Peptidlänge steigt die Aggregationstendenz. Intermolekulare Wasserstoffbrücken linearer Peptidketten führen zur Ausbildung von Sekundärstrukturen (Abbildung 6a). Somit sind die Peptidketten schlechter solvatisiert, was zu unvollständigen Entschützungs- und Acylierungsschritten führt. Dies kann zu Anhäufung von Fehlsequenzen

führen.³² Durch den Einbau von Pseudoprolinen (Abbildung 6b) in die Peptidsequenz kommt es durch die cis-Konformation der Peptidbindung zu einem „Konformations-Knick“ im Peptidrückgrat, wodurch Aggregationen durch intermolekulare β -Faltblattstrukturen verringert werden. Dadurch wird die Löslichkeit der Peptidketten an der Festphase verbessert, was die Zugänglichkeit für Acylierungs- und Entschützungsreagenzien verbessert und Ausbeuten und Reinheiten erhöht. Im Anschluss an die Synthese kann das Acetonid durch TFA-Behandlung abgespalten werden.

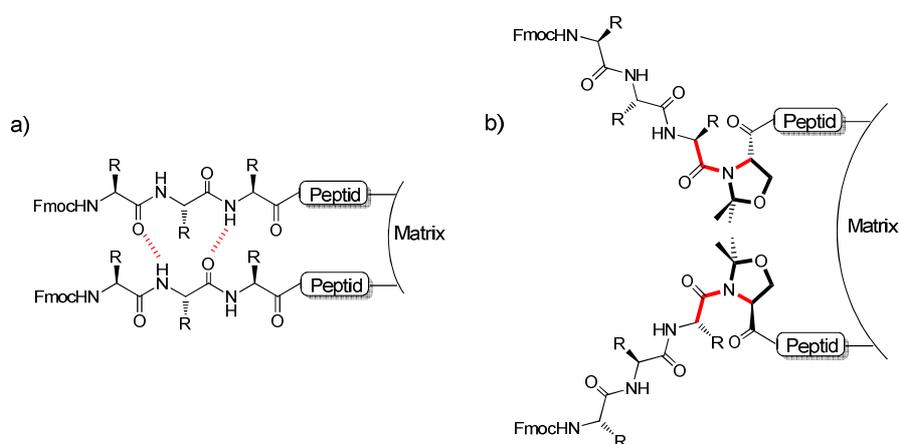


Abbildung 6: Auswirkungen auf die Anordnung der Peptidkette an der Festphase a) ohne und b) mit Pseudoprolin.

1.5 Synthese von *N*-Glycopeptiden

Der Zugang zu synthetischen *N*-Glycoproteinen gelingt über die native chemische Ligation (NCL), wozu meist die Synthese von Glycopeptidthioestern durch Festphasenpeptidsynthese nötig ist.²⁰ Die Synthese von Glycopeptiden kann über die konvergente Einführung eines Glycosylamins nach dem Lansbury Protokoll³³ oder durch schrittweises Einbringen einer Fmoc-geschützten Glycosylaminosäure in die Peptidsequenz während der Festphasensynthese erfolgen.³⁴ Anhand der Synthese der RNase C konnte von *Unverzagt et al.* gezeigt werden, dass sich komplexere Glycopeptidthioester mit fast 40 Aminosäuren durch Segmentkupplung erhalten lassen.³⁵ Es wurde eine Fragmentkondensation entwickelt, die auf dem Einbau von C-terminalen Pseudoprolinen basiert. Dadurch verliefen die Kupplungen trotz Mikrowelleneinsatz racemisierungsfrei. Die Entstehung von Nebenprodukten, wie bei der stufenweisen Synthese von Peptiden und Glycopeptiden, konnte reduziert werden. Die

sequenzielle Festphasenpeptidsynthese von *N*-Glycopeptiden mittels Fmoc/*t*-Bu-Strategie ist gut entwickelt. Allerdings kann es während der Festphasenpeptidsynthese zu *O*-Acylierungen von freien Hydroxygruppen des Glycosylrests kommen. Bei der konvergenten Synthese wird die Carboxylgruppe einer orthogonal geschützten Aspartatseitenkette im Peptid mit einem Glycosylamin kondensiert (Abbildung 7).

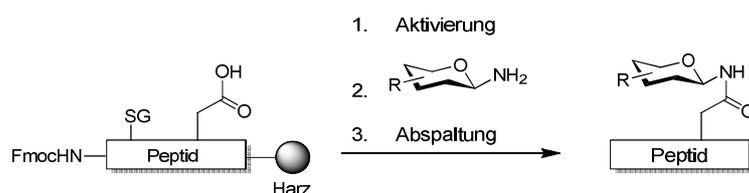


Abbildung 7: Konvergente Synthese von *N*-Glycopeptiden an der Festphase.

Ein Problem dieser Methode ist die häufige Bildung eines Aspartimid-Nebenprodukts. Durch den nukleophilen Angriff des Amidstickstoffs des Peptidrückgrads an dem Carbonyl-Kohlenstoff der Aspartatseitenkette kommt es zur intramolekularen Zyklisierung (Abbildung 8). Diese Nebenreaktion kann während der Peptidsynthese oder der Aktivierung des Carbonyl-Kohlenstoffs bei der Zuckerkupplung auftreten.

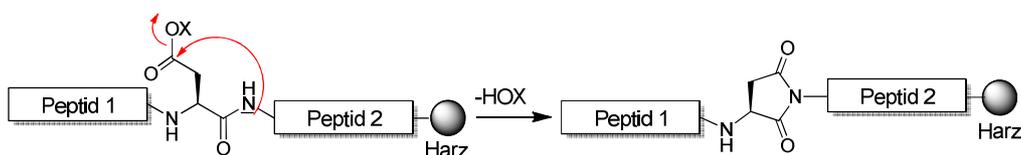


Abbildung 8: Schema der basenvermittelten Aspartimid-Bildung.

J. Tolbert et al. stellten Strategien vor, um *N*-Glycopeptide konvergent an der Festphase zu synthetisieren, wobei die sterisch anspruchsvolle 2-Phenylisopropyl-Schutzgruppe an der Glycosylierungsstelle eingesetzt wurde.³⁶ Nach Abschluss der Peptidsynthese wurde diese Schutzgruppe selektiv entfernt und die freie Carboxylgruppe nach Aktivierung mit einem Glycosylamin umgesetzt (Abbildung 7). Dabei zeigte sich, dass durch den Einsatz der 2-Phenylisopropyl-Schutzgruppe die Aspartimidbildung während der Peptidsynthese deutlich reduziert werden konnte. Jedoch ist die 2-Phenylisopropyl-Schutzgruppe säurelabil, weshalb sie sich nicht für die Peptidsynthese am 2-Cl-Trityl-Linker mit anschließender *in situ*

Thioveresterung eignet. Als orthogonale Schutzgruppe eignen sich auch Allylester.³⁷ Allylester reduzieren die Aspartimidbildung während der Peptidsynthese jedoch nur wenig.³⁶ *R. J. Payne et al.* versuchten bei der konvergenten Festphasensynthese von *N*-Glycopeptiden an der Festphase, die Aspartimidbildung durch die Einführung sterisch anspruchsvoller Aminosäuren bzw. den Schutz des Peptidrückgrats unmittelbar vor der Glycosylierungsstelle zu verhindern.³⁸ Die Bildung von Aspartimid wurde durch den Einbau einer 2,4-Dimethoxybenzyl (Dmb) Schutzgruppe am Amid-Stickstoff des Peptidrückgrats verhindert (Abbildung 10). Die Aspartatseitenkette der Glycosylierungsstelle wurde mit einer Allyl- oder Dmb-Gruppe geschützt. Außerdem reduzierte eine Verringerung des Basenanteils in der Kupplungslösung die Aspartimidbildung.

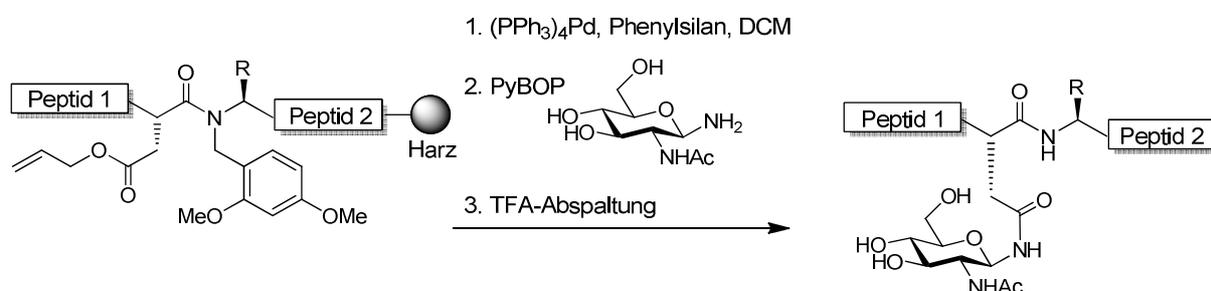


Abbildung 9: Synthese von *N*-Glycopeptiden nach Payne et al.³⁸; *R*: beliebige Aminosäureseitenkette.

C. Unverzagt et al. entwickelten eine Methode zur konvergenten Synthese von Glycopeptiden an der Festphase (Abbildung 10).^{126a}

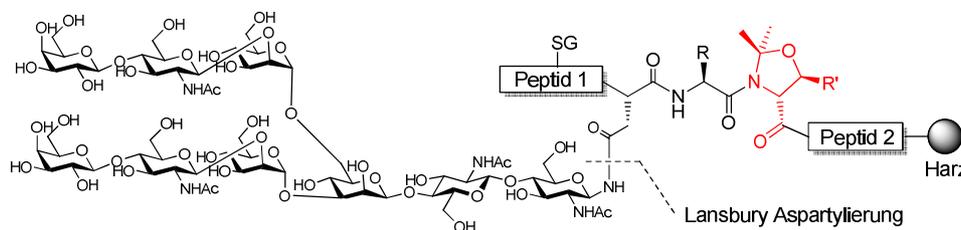


Abbildung 10: Konvergente Glycopeptidsynthese über Pseudoproline (rot) in der Konsensussequenz nach *C. Unverzagt et al.*^{126a} *R*: beliebige Aminosäureseitenkette; *R'*: *H* oder *CH*₃.

Durch Einbau eines Pseudoprolins in die Konsensussequenz kann die Aspartimidbildung wesentlich reduziert werden. Diese Methode erleichtert die Darstellung von komplexen Glycopeptiden erheblich. Parallel dazu stellten S. Danishefsky *et al.* den Einsatz von Pseudoprolinen für die konvergente Glycopeptidsynthese in Lösung vor.^{126b}

1.6 Entwicklung von HIV-1 Impfstoffen durch synthetische Glycopeptidmimetika

Peptidomimetika sind Substanzen, deren wesentliches Element (das Pharmacophor) natürlichen Peptiden oder Proteinen ähnelt und mit dem biologischen Target interagiert, was zum gleichen biologischen Effekt führt.³⁹ Chemische Modifizierungen von Peptiden, wie der Einbau von D-Aminosäuren bzw. unnatürlichen Aminosäuren, Zyklisierung und *N*-Methylierung können deren proteolytische Stabilität verbessern. Proteinepitopmimetika gewinnen an Bedeutung als neue Leitstrukturen für Therapeutika und bei der Impfstoffentwicklung. β -Hairpin Motive sind häufig in Proteinstrukturen zu finden und vermitteln Protein-Protein und Protein-Nukleinsäure Interaktionen. Ein β -Hairpin besteht aus zwei antiparallelen β -Faltblättern, die durch einen Loop verbunden sind. Basierend auf dieser Struktur können β -Hairpin Mimetika entwickelt werden.

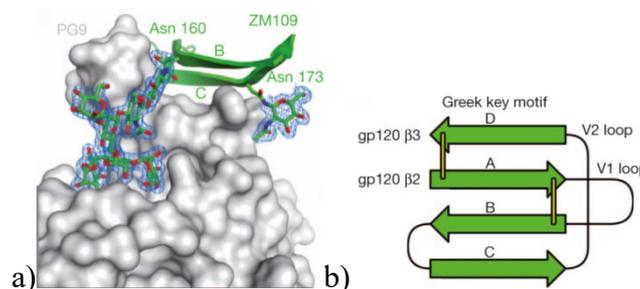


Abbildung 11: a) PG9–V1/V2 Interaktionen. PG9 ist grau dargestellt. Die B und C Region von gp120 sind grün dargestellt. Mannose und N-Acetylglucosamine sind als Strichmodell dargestellt, sowie die Seitenkette von Asn-160 und 173.⁵³ b) Schematische Abbildung der Struktur des HIV-1 gp120.⁵³

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) stellt eine global verbreitete Krankheit dar, die von HIV-1 verursacht wird. Somit besteht großer Bedarf für die Forschung an Virostatika.⁴⁰

Die Virusinfektion wird durch die Bindung des gp120 von HIV-1 an das CD4 Antigen der T-Zelloberfläche des Wirts verursacht.⁴¹ Eine Möglichkeit die HIV-Infektion zu verhindern besteht darin, die Interaktion zwischen gp120 und der Wirtszellrezeptoren durch Inhibitoren⁴² zu blockieren. Die Oberflächenproteine des HIV-1 sind das einzige Target für Antikörpervermittelte Neutralisation.⁴³

Die V1/V2 Region des gp120 besteht aus 50-90 Aminosäuren, enthält mehrere *N*-Glycosylierungen und beinhaltet die am meisten variablen Regionen. Der Anteil der mannosereichen *N*-Glycane überwiegt.⁴⁴ Cluster von mannosereichen Glycanen kommen sonst bei Säugetierzellen nicht vor, daher besitzen diese hohes Potenzial als Target für selektive Antikörpererkennung des Virus.⁴⁵ Die Glycandiversität spielt wohl eine Rolle bei der Infektiosität⁴⁶, der zellabhängigen Virusübertragung⁴⁷, der Regulation der *Spike* Konformation⁴⁸ und der Immunevasion.⁴⁹ Viren verhindern die Erkennung durch Antikörper, indem die Oberflächenproteine hohe Variabilität und starke Glycosylierung aufweisen. Obwohl Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkungen normalerweise eher schwach sind⁵⁰, sprechen einige humane, breitneutralisierende Antikörper auf die V1/V2 Region an. Dazu gehören u. a. die Antikörper PG9 und PG16, die 70-80 % des zirkulierenden HIV-1 neutralisieren.⁵¹ Breitneutralisierende Anti-HIV-Antikörper zu finden ist ein Ziel des HIV-Impfstoffdesigns.⁵² Die Antikörper PG9 und PG16 erkennen das *N*-Glycan an der Aminosäureposition 160 in der V1/V2 Region von gp120. Die Kristallstruktur der V1/V2 Region des HIV-1 gp120 wurde im Komplex mit PG9 aufgeklärt und die konservierten Merkmale der V1/V2 Region wurden analysiert.⁵³ PG9 erkennt die Kombination aus *N*-Glycan und der Oberflächenpeptidsequenz (Abbildung 11).⁵⁴ Somit können Glycopeptide als Target von Antikörpern genutzt werden. Die Struktur des PG16 Antikörpers, gebunden an die V1/V2 Region wurde ebenfalls hinsichtlich der Struktur der *N*-Glycane analysiert.⁵⁵

Synthetische Glycopeptide, basierend auf dem V1/V2 Epitop des Oberflächenproteins, können zur Entwicklung von HIV-1 Impfstoffen beitragen. *S. Danishefsky et al.* beschreibt die chemische Synthese von gp120 V1/V2 Glycopeptiden (Abbildung 12a), die PG9 mit hohen Affinitäten binden.⁵⁶ Für die Antikörpererkennung sind zwei *N*-Glycane an Position Asn-160

und Asn-156 wichtig. Die Gruppe um *S. Danishefsky* fand heraus, dass nur das $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ V1/V2 Glycopeptid hohe Affinität gegenüber PG9 zeigte (Abbildung 12b).⁵⁶

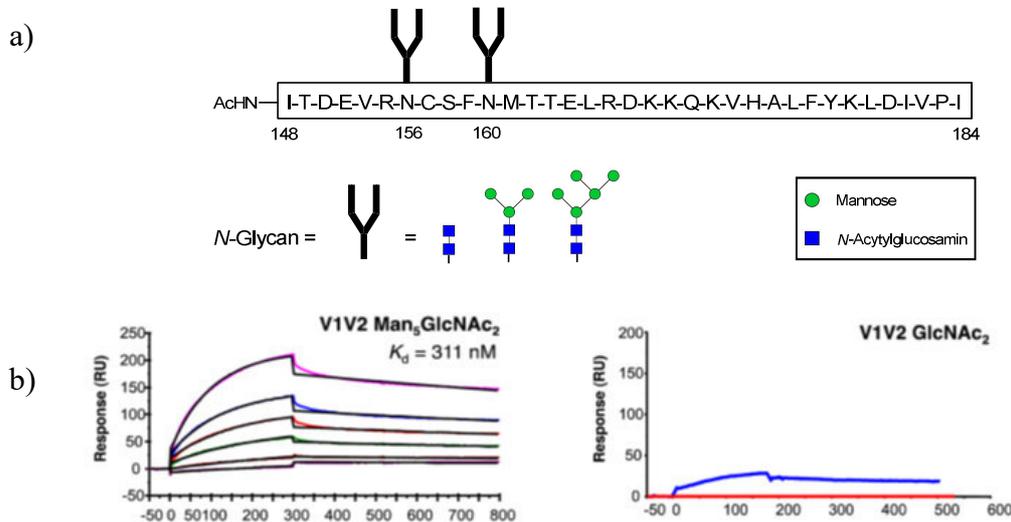


Abbildung 12: a) Von *S. Danishefsky et al.* aufgebautes gp120 V1/V1 Epitop Mimetikum und b) Interaktion von PG9 mit V1/V2 Glycopeptiden, untersucht durch Oberflächen-Plasmon-Resonanz.⁵⁶

L.-X. Wang et al. synthetisierten zyklische V1/V2 Glycopeptide und bauten auf chemoenzymatischem Weg mannosereiche und komplexe *N*-Glycane an den Positionen Asn-160 und Asn-156 bzw. Asn-173 ein (Abbildung 13).

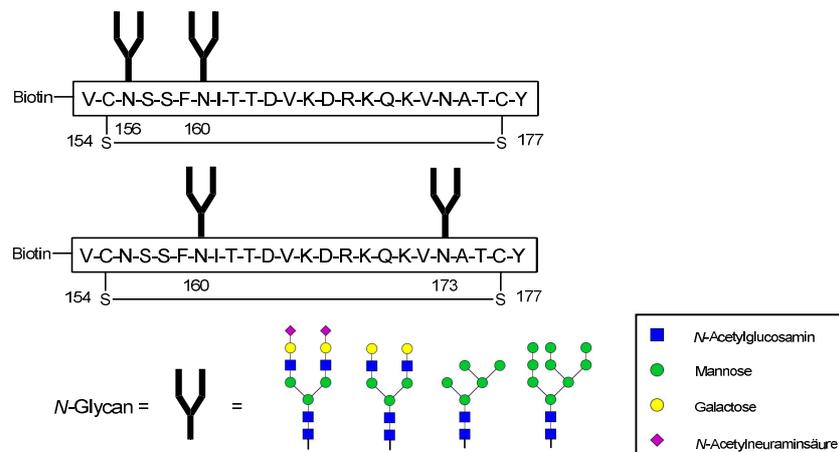


Abbildung 13: Designe V1/V2 Glycopeptide nach *L.-X. Wang et al.*⁵⁷

Diese Glycopeptide wurden über eine Disulfidbrücke zyklisiert. Es wurde dabei herausgefunden, dass das $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ Glycan an Position Asn-160 wichtig für die Erkennung des Antikörpers PG9 ist.⁵⁷

1.7 Antikörper als Therapeutikum: Der Einfluss von IgG1 Fc *N*-Glycanen

Antikörper sind Werkzeuge der Immunabwehr. In den letzten 15 Jahren wurden rekombinante, humanisierte IgG Antikörper zu den erfolgreichsten Therapeutika, da sie sehr spezifisch sind, eine lange Halbwertszeit im Serum besitzen und oft gut verträglich bei den Patienten sind. IgG Antikörper besitzen jeweils zwei identische leichte und schwere Ketten, welche eine Y-Struktur formen.⁵⁸ Die Antigenbindedomäne (Fab) bindet die Antigene mit hoher Affinität. Die kristallisierbare Domäne (Fc) bindet an Rezeptoren $\text{Fc}\gamma\text{R}$, die von Leukozyten exprimiert werden. Die Bindung von IgG an Fc-Rezeptoren kann sich aktivierend oder inhibierend auswirken. Es kann ein Immunorezeptor Tyrosin Aktivierungsmotiv (ITAM) oder ein Immunorezeptor Tyrosin Inhibitormotiv ausgelöst werden. Die Immunantwort hängt von der Affinität des Fc-Teils zum Rezeptor und vom Expressionslevel der aktivierenden oder inhibierenden FcRs ab.⁵⁹

Die Heterogenität an *N*-Glycanen von IgG Antikörpern, isoliert aus gesunden Individuen, ist groß.⁶⁰ Außerdem sind etwa 20 % der IgG Fab Teile glycosyliert, was Einfluss auf die Antigenbindung hat. Ein biantennäres *N*-Glycan vom komplexen Typ ist mit der Seitenkette von Asn-297 an beiden schweren Ketten des Fc-Teils verknüpft.⁶¹ Das Fc Glycan ist in Richtung des Zentrums des Antikörpers positioniert, der 1,3- Arm ragt in die Öffnung zwischen den schweren Ketten, der 1,6- Arm verläuft entlang des Rückgrats der schweren Ketten.^{61,59c} Das *N*-Glycan ist erforderlich für die Bindung an den Rezeptor. Es wurde beobachtet, dass unglycosylierte IgGs nicht binden.⁶¹ Die schweren Ketten werden durch die *N*-Glycane in einer offenen Konformation gehalten, was erforderlich für die Bindung an den Rezeptor ist.⁶² Ein derart großer Einfluss eines *N*-Glycans auf die Funktionalität eines Proteins ist selten.⁶³

Die Kernstruktur der *N*-Glycane von IgG kann zusätzlich mit einem *bisecting* GlcNAc oder einer Fucose versehen sein, wie auch die Arme der biantennären Struktur mit Galactosen und Sialinsäuren verlängert sein können. Durch eine Fucose am IgG1 Glycan wird die Affinität zum Rezeptor reduziert, was durch ein *N*-Glycan am $\text{Fc}\gamma\text{R}$ bedingt ist.⁶⁴ Terminale Sialinsäuren am

IgG *N*-Glycan reduzieren ebenfalls die Affinität zum Rezeptor.⁶⁵ Es spielt dabei keine Rolle, ob es sich um eine 2,3- bzw. 2,6-Sialylierung handelt. Die Affinität zum Rezeptor wird jedoch durch ein *bisecting* GlcNAc erhöht.⁶⁶ Somit erhöhen IgG *N*-Glycane mit *bisecting* GlcNAc die Auslösung von *antibody-dependent cytotoxicity* (ADCC).

Antikörper können aus transgenen Zelllinien gewonnen werden, jedoch führt die nicht zu humanen Glycoformen.⁶⁷ Außerdem ist die Gewinnung einheitlicher Glycoformen mittels eines Expressionssystems generell sehr schwierig. Durch Remodeling zeigten *L.-X. Wang et al.* einen chemoenzymatischen Ansatz zur einheitlichen Glycosylierung von monoclonalen Antikörpern (Abbildung 14).⁷⁰ Dabei katalysiert eine Endo- β -*N*-Acetylglucosaminidase (ENGase) die Hydrolyse der β -1,4-glycosidischen Bindung der Chitobiose des *N*-Glycans von intakten IgG Antikörpern.⁶⁸ Anschließend überträgt eine Glycosynthase *N*-Glycane als Oxazolinderivat auf ein GlcNAc am entsprechenden Antikörper.

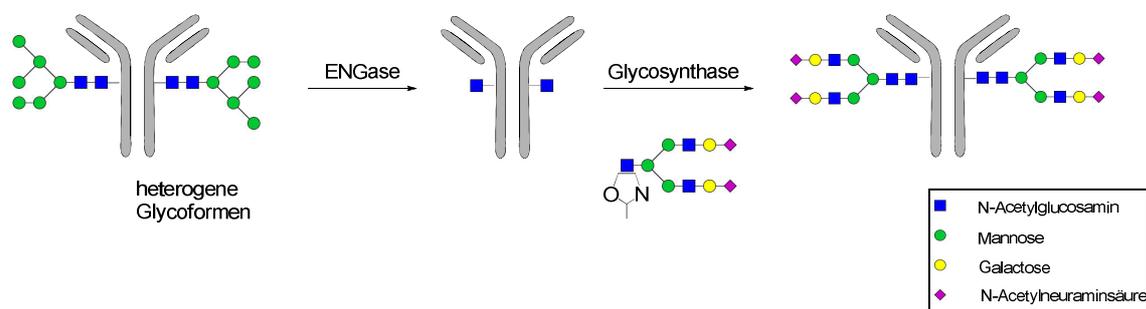


Abbildung 14: Schematische Darstellung der chemoenzymatischen Synthese von einheitlich glycosylierten IgG nach *T. Shirai et al.*⁶⁹ und *L.-X. Wang et al.*⁷⁰

Eine weitere Möglichkeit der Konjugation eines Fc-Teils mit einem *N*-Glycan über eine Aldehydfunktion wurde von *L.-X. Wang et al.* beschrieben (Abbildung 15).⁷¹ Es wurde ein Fc-Konstrukt exprimiert, worin die Glycosylierungsstelle durch die Aminosäuresequenz LCTPSR ersetzt wurde, die vom *formylglycine generating enzyme* (FGE) erkannt wird und die Cysteinseitenkette zu einem Formylglycin oxidiert. Diese Aldehydfunktion im Fc-Konstrukt wurde mit einem Aminoxy-*N*-Acetylglucosamin umgesetzt. Anschließend konnte das oximverknüpfte GlcNAc enzymatisch mit komplexen *N*-Glycanen verlängert werden.

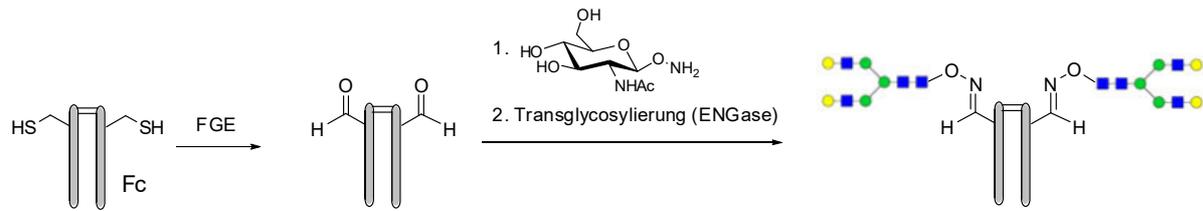


Abbildung 15: Darstellung von Fc- Glycoconjugaten durch Einführung eines Aldehyd-Tags in der Glycosylierungsstelle nach L-X. Wang et al.⁷¹

Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass keine natürlich verknüpften Glycoproteine, sondern oximverknüpfte Konjugate erhalten werden.

Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) bezeichnet eine fortschreitende und irreversible Schädigung der ersten und zweiten Motoneuronen. Es kommt zur zunehmenden Muskelschwäche bis hin zum Schwund des Muskeltonus und der Muskulatur. Die Krankheit ist nicht heilbar. Der Therapieansatz liegt lediglich auf der Linderung der Symptome und psychologischer Betreuung. Die Überlebenszeit beträgt im Mittel 3-5 Jahre.⁷²

Die Arbeitsgruppe um R. G. Lichtenstein isolierten IgG Fc N-Glycane mit *bisecting* GlcNAc ohne *Core*-Fucose aus dem Serum von ALS Patienten. *In vitro* Studien zeigten, dass diese Fc Glycane von ALS Patienten die Affinität der Antikörper zum Rezeptor der Effektorzelle erhöhen (Abbildung 16), was letztendlich zum beschleunigten Abbau der neuronalen Zellen führt.⁷³

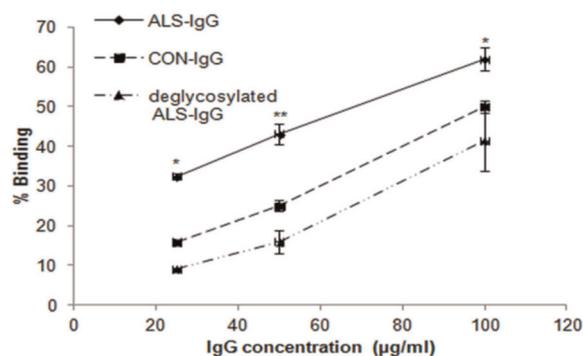


Abbildung 16: Spezifität von IgG Fc von ALS Patienten. Prozentual sind die Bindungen zum Rezeptor von unglycosylierten, PNGase F behandelten ALS IgG und IgG von gesunden Personen (CON-IgG) dargestellt.⁷³

Eine Annahme ist, dass die Degeneration von Neuronen bei ALS z. T. von den *N*-Glycanen der ALS spezifischen IgG Antikörper abhängt, die im Laufe der Krankheit im Gehirn der Patienten akkumulieren.⁷³

1.8 Das Proteoglycan Bikunin

1955 wurde ein Proteoglycan, genannt *urinary trypsin inhibitor*^{76,74} oder Bikunin⁷⁵, aus Urin isoliert, das die Fähigkeit besitzt, Trypsin zu inhibieren.⁷⁶ Bikunin enthält zwei Protease Inhibitor Domänen des Kunitz Typs (Abbildung 17). Eine Kunitz Domäne hat ein Molgewicht von 7 kDa und drei charakteristisch angeordnete Disulfidbrücken.⁷⁷ An der Seitenkette von Asn-45 ist ein biantennäres *N*-Glycan des komplexen Typs gebunden⁷⁸, während eine Chondroitinsulfatkette *O*-glycosidisch an Ser-10 gebunden ist.⁷⁹ Der N-terminale Teil mit der Chondroitinsulfatkette wird meist nach proteolytischer Spaltung entfernt, was meist bei der Proteinisolierung der Fall ist.⁸⁰

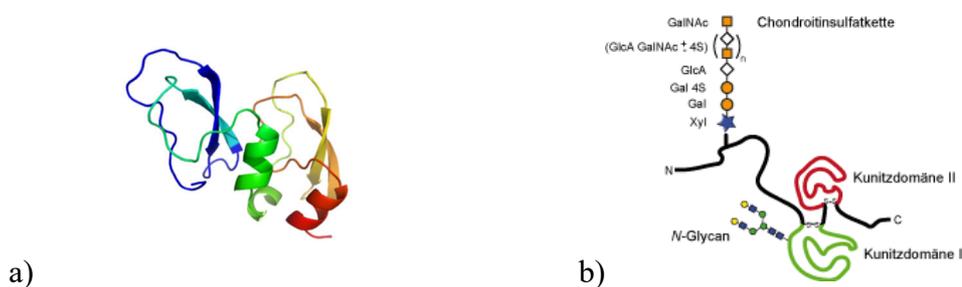


Abbildung 17: a) Kristallstruktur von Bikunin. PDB Code: 1BIK; b) Schematische Darstellung der Struktur von Bikunin.

Bikunin ist ein einfaches Proteoglycan, da es nur eine Glycosaminoglycansseitenkette trägt, die etwa 50 % der Molekülmasse ausmacht. Im Gegensatz zu Glycoproteinen überwiegt bei Proteoglycanen der Kohlenhydratanteil im Protein und sie enthalten die charakteristischen Glycosaminoglycanketten. Rekombinantes humanes Bikunin wurde in *Pichia pastoris* exprimiert.⁸¹

Obwohl die Glycosaminoglycankette von Bikunin relativ kurz ist, ist sie heterogen in der Größe und Zusammensetzung. Sie enthält 27-39 Monosaccharide mit einem Molekulargewicht zwischen 5505-7102 Da.⁸² Es wurde gezeigt, dass Sulfatierungen nur in Position 4 von Galactosamin vorkommen.⁸³

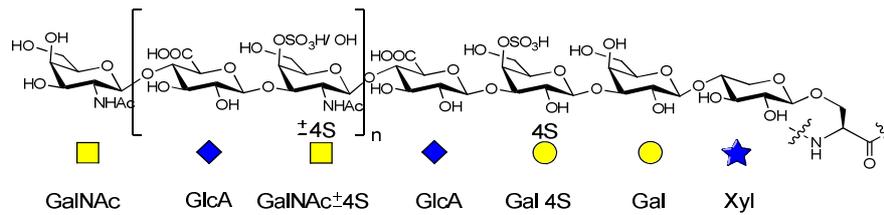


Abbildung 18: Aufbau der Chondroitinsulfatkette von Bikunin.⁸³

Im Plasma liegt Bikunin zu 90-98 % als kovalenter Komplex mit zwei Proteinen, den sogenannten schweren Ketten, vor.^{84,177} Dieser Komplex wird Pre- bzw. Inter- α -Inhibitor genannt. Bikunin und der Inter- α -Inhibitor inhibieren Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Cathepsin G⁸⁵ *in vitro* und Granzym K⁸⁶. Der Inter- α -Inhibitor und Pre- α -inhibitor spielen eine Rolle bei der Zellproliferation, Migration und dem Aufbau der extrazellulären Matrix, indem die schweren Ketten Hyaluronanketten binden.⁸⁷

Bikunin ist ein therapeutisch relevantes Proteoglycan, welches in Japan zur Behandlung akuter Pankreatitis eingesetzt wird.⁸⁸ Bikunin spielt eine Schlüsselrolle bei Entzündungsreaktionen und der angeborenen Immunantwort.⁸⁹ Entzündungen sind Indikatoren für Infektionen, Krebs und Gewebeschäden. Bikunin unterdrückt proteolytische Aktivität in verschiedenen Geweben und kann lokal entzündungshemmende Effekte auslösen.^{90,77} Bei Entzündungen spalten Serinproteasen den Inter- α -Inhibitor und setzen *N*- oder *O*-glycosyliertes Bikunin frei, welches hauptsächlich im Urin zu finden ist.^{91,92} Bikunin hat im Urin eine Halbwertszeit von 10 min. Bikunin inhibiert Trypsin indem es mit einer der Kunitz Domänen bindet. Die Dissoziationskonstanten variieren zwischen 0.03 bis 800 μM .⁹³ Je nach Fragmentierung von Bikunin schwankt die Stärke und Spezifität der Inhibition recht stark.¹⁷⁹

Bikunin wurde mit verschiedenen Glycosidasen modifiziert, um die Funktion der Glycane zu verstehen.⁹⁴ Bikunin mit einer Chondroitinsulfatkette bindet mit höherer Affinität an Zellen, Calcium und TSG-6.⁹⁵ Außerdem ist das Kernprotein mit *O*-Glycosiden für die Stabilisierung der lysosomalen Membran und für die Urokinase-Aktivierung verantwortlich. Die Entfernung des *N*-Glycans bewirkt, dass die Nierenzellen weniger vor Nekrose geschützt sind.⁹⁴ Die Trypsininhibition wird kaum durch die *N*- oder *O*-Glycane beeinflusst.⁹⁴ Im Urin befindet sich hauptsächlich ein *N*-glycosyliertes Fragment von Bikunin.⁹⁶

Proteoglycane bestehen aus einem Kernprotein und einer oder mehreren kovalent gebundenen Glycosaminoglycan-Ketten.⁹⁷ Glycosaminoglycane sind lineare Polysaccharide aus Disaccharideinheiten, bestehend aus einem Aminozucker (*N*-Acetylglucosamin oder *N*-Acetylgalactosamin) und einer Uronsäure (Glucuronsäure oder Iduronsäure) oder Galactose. Zwei Klassen der Glycosaminoglycane sind über eine Xylose mit der Seitenkette von Serin

verknüpft: Chondroitinsulfat/ Dermatan sulfat und Heparansulfat. Xylosyltransferasen katalysieren den Transfer von UDP-Xylose.⁹⁸

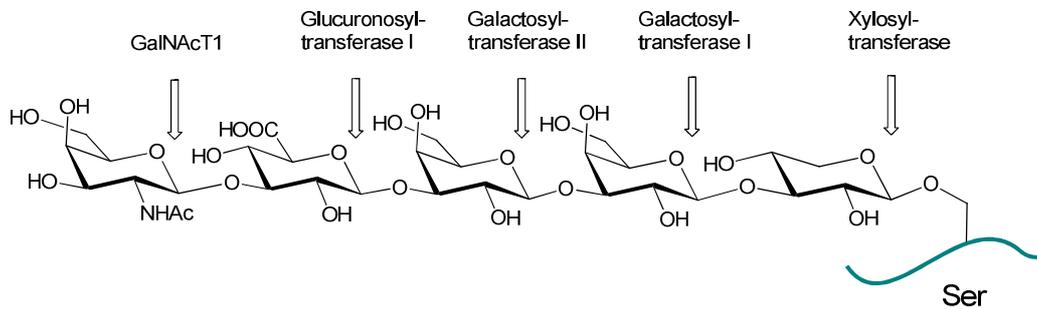


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Biosynthese von Chondroitinsulfat.

Nach dem Transfer der Xylose an das Kernprotein wird das Tetrasaccharid der *Linkage*-Region aufgebaut (Abbildung 19). Die Übertragung von Galactosen findet im Golgi-Apparat statt und wird von β -1,4 Galactosyl- (β 4GalT7) bzw. β -1,3 Galactosyltransferase¹⁵² (β 3GalT6) katalysiert. Im letzten Schritt wird eine Glucuronsäure von der β -1,3 Glucuronosyltransferase (GlcAT1) übertragen.⁹⁹ Je nachdem welcher Zucker anschließend übertragen wird, entsteht eine Chondroitinsulfatkette oder Heparansulfatkette. Die Verlängerung der Chondroitinsulfatkette wird durch den Transfer von *N*-Acetylgalactosamin an das Tetrasaccharid initiiert. Die Polymerisierung wird von einer oder mehreren bifunktionellen Chondroitinsynthasen katalysiert, die β -1,3 Glucuronosyltransferase und β -1,4 *N*-Acetylgalactosaminyltransferase Aktivität aufweisen. Bei der Chondroitinpolymerisierung wird außerdem ein Protein, ein Chondroitinpolymerisationsfaktor, benötigt. Verschiedene Sulfotransferasen sind für die Sulfatierung in 4- und 6- Position von *N*-Acetylgalactosaminen zuständig.¹⁰⁰

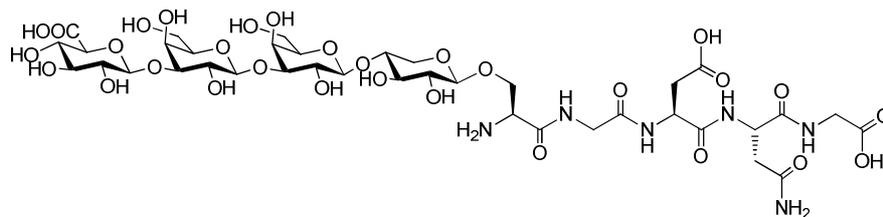


Abbildung 20: Synthetisches Glycopeptid mit dem Tetrasaccharid der Linkage-Region.¹⁰²

Die chemische Synthese von homogen glycosylierten Proteoglycanen ist besonders schwierig und es gibt nur wenige Synthesansätze. Die Chondroitinsulfatkette wurde bereits auf chemoenzymatischen Wege¹⁰¹ und mittels chemischer Synthese wurde ein Glycopeptid mit der *Linkage*-Region¹⁰² dargestellt (Abbildung 20).

Erstmals gelang *X. Huang et al.* die chemische Synthese von Heparansulfat Glycopeptiden aus Syndecan-1¹⁰³ und Syndecan-3¹⁰⁴ (Abbildung 21 und Abbildung 22).

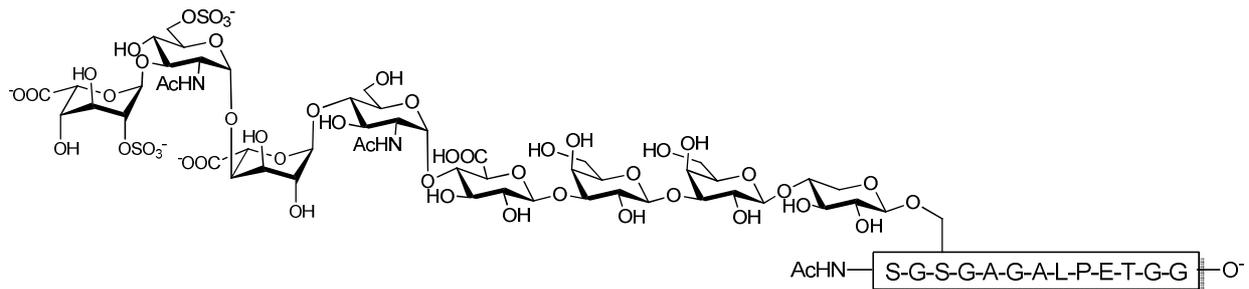


Abbildung 21: Sulfatiertes humanes Syndecan-1 Glycopeptid.¹⁰³

Während der Glycopeptidsynthese musste auf die Verwendung von starken Säuren aufgrund der säurelabilen Sulfatgruppen verzichtet werden. Daher konnten für die Peptidsynthese typischen Schutzgruppen nicht verwendet werden und es wurden Benzylester bzw. Benzylether als Seitenkettenschutz eingesetzt. Um eine β -Eliminierung des Oligosaccharids vom Peptidrückgrat zu vermeiden wurde außerdem auf den Einsatz von Basen verzichtet.

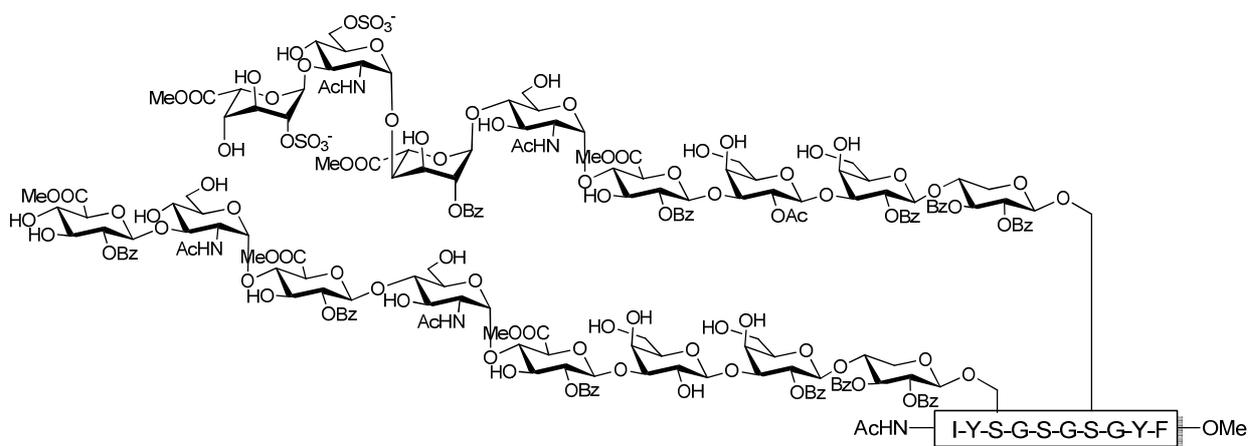
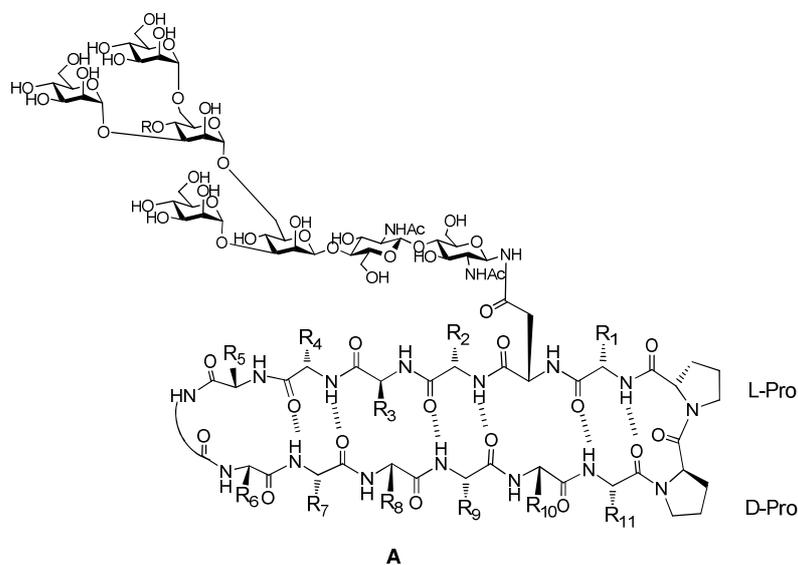


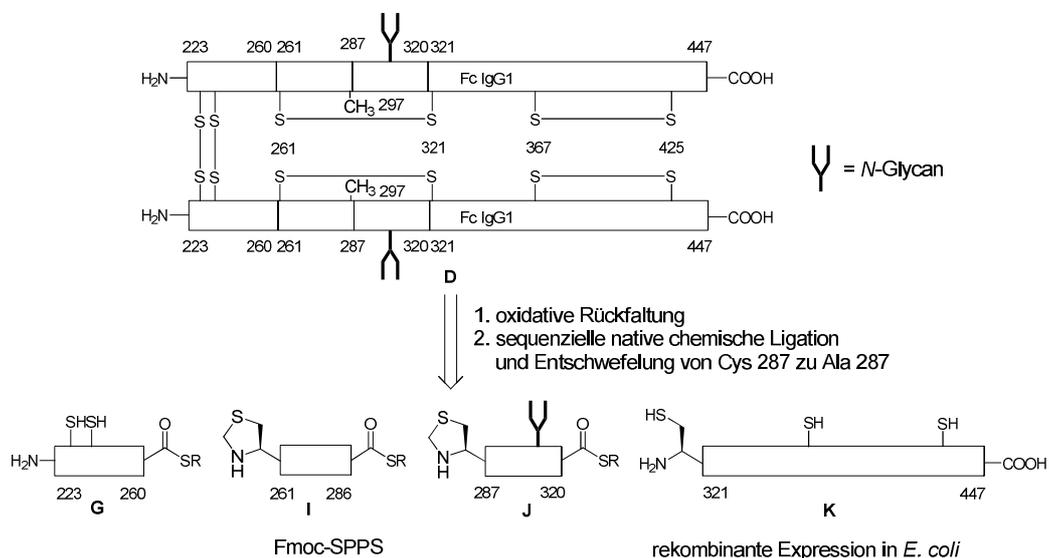
Abbildung 22: Sulfatiertes Syndecan-3 Glycopeptid.¹⁰⁴

2. Themenstellung

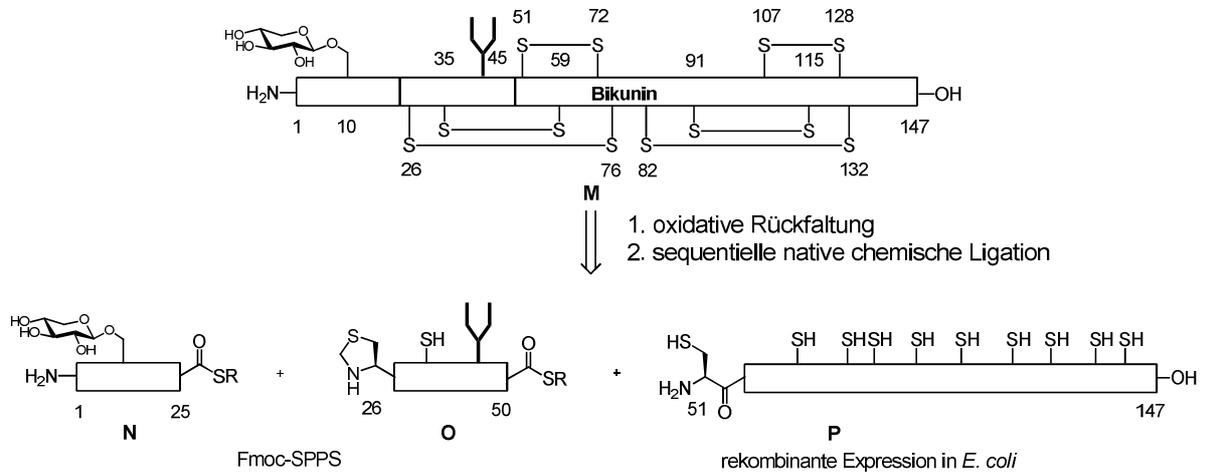
Ziel dieser Arbeit war es, Synthesemethoden für einheitliche Glycopeptide und -proteine zu etablieren und deren Bioaktivität zu untersuchen. Die biologische Evaluierung eines glycosylierten HIV-1 B/C Loop Mimetikums sollte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von *J. Robinson*¹¹¹ durchgeführt werden. In das zyklische Loop Mimetikum sollte ein mannosereiches *N*-Glycan eingebracht werden. Im Glycopeptid sollte ein Templat (D-Prolin + L-Prolin) verwendet werden¹⁰⁵, welches einen β -Turn vom Typ II' stabilisieren kann.¹⁰⁶



In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um *R. G. Lichtenstein*¹¹⁶ sollte eine Semisynthese für glycosylierte IgG 1 Fc Fragmente entwickelt werden, um Struktur-Wirkungsbeziehungen von einheitlich glycosylierten Fc Fragmenten zu untersuchen. Das Fc-Dimer **D** sollte über sequenzielle native chemische Ligation der Bausteine **G**, **I**, **J** und **K** aufgebaut werden.



Außerdem sollte eine Methode zur Semisynthese von *N*- und *O*-glycosyliertem Bikunin 1-147 **M** aus den Bausteinen **N**, **O** und **P** entwickelt werden.



3. Synthese von HIV-1 V1/V2 Loop Mimetika

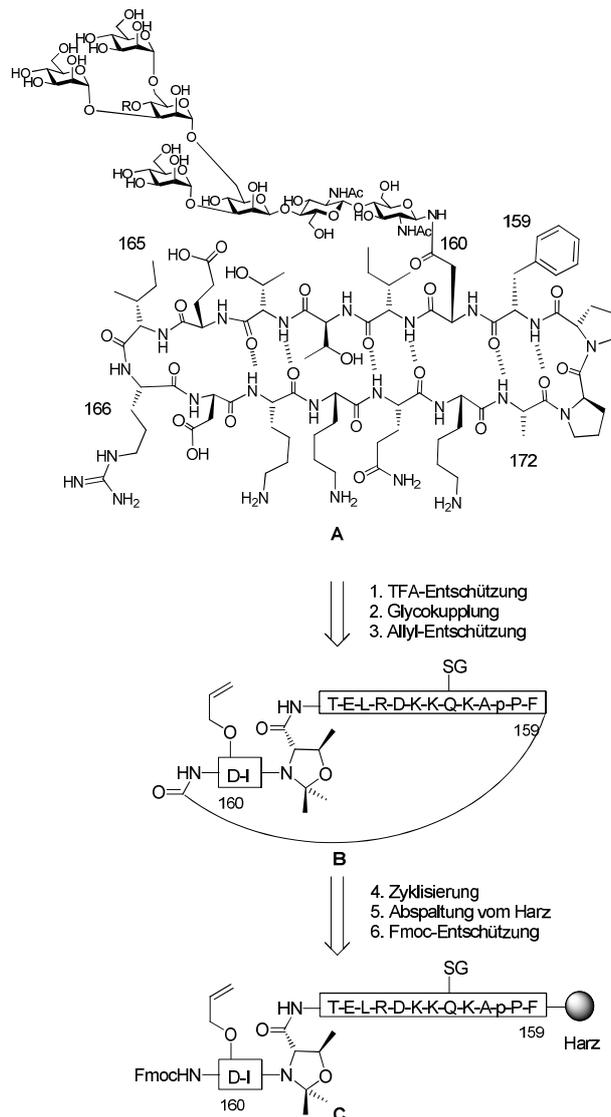


Abbildung 23: Synthesepfad eines zyklischen HIV-1 Loop Mimetikums.

Cluster von mannoreichen *N*-Glycanen, wie beim HIV-1 gp120 Glycoprotein, besitzen ein hohes Potenzial als Target für eine selektive Erkennung des Virus durch Antikörper.⁴⁵ Synthetische Glycopeptide, basierend auf dem V1/V2 Epitop des Oberflächenproteins gp120, können zur Entwicklung von HIV-1 Impfstoffen beitragen. Es wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von *J. Robinson*¹¹¹ versucht, ein glycosyliertes HIV-1 B/C Loop Mimetikum von Phe-159 bis Ala-172 des CAP45⁵³ Strangs zu synthetisieren. Der Synthesepfad und die Zusammensetzung der Peptidsequenz, wie in Abbildung 23 dargestellt, bezog sich auf Arbeiten der Arbeitsgruppe um *J. A. Robinson*, wobei u. a. die Struktur von unglycosylierten gp120 Peptidmimetika durch NMR untersucht wurde.¹⁰⁸ Ziel war es, mit einem mannoreichen *N*-

Glycan das zyklische Glycopeptid **A** aufzubauen (Abbildung 23). Um den β -Turn in **A** zu stabilisieren, war der Einbau eines Templats in Form von D-Pro und L-Prolin geplant.¹⁰⁷ Eventuell resultierende Probleme bei der Zyklisierung des Peptids zu **B** galt es zu prüfen. Ein Pseudoprolindipeptid sollte vor die Glycosylierungsstelle Asn-160 eingebaut werden, um die Aspartimidbildung bei der Synthese zu reduzieren.¹²⁶

3.1 Synthese von glycosylierten HIV-1 V1/V2 Loop Mimetika

Zur Synthese des linearen V1/V2 Loop Peptids **7** wurde 2-Cl-Tritylchlorid-Polystyrolharz **77** verwendet. Die Kupplung der ersten Aminosäure Fmoc-Phe-OH an das Harz erfolgte im Basischen, anschließend wurde das Peptid durch Kupplung der weiteren Aminosäuren durch Fmoc-SPPS maschinell aufgebaut (Abbildung 24a). Das Pseudoprolindipeptid Fmoc-Ile-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH und Fmoc-Asp(OAll)-OH wurden mit PyBOP gekuppelt. Für die restlichen Aminosäuren wurde HCTU verwendet. Das Templat aus L-Prolin und D-Prolin¹⁰⁷ sollte die spätere Zyklisierung erleichtern. D-L-Diproline haben sich als Templat für die Synthese von zyklischen β -Hairpin Strukturen bewährt.¹⁰⁸

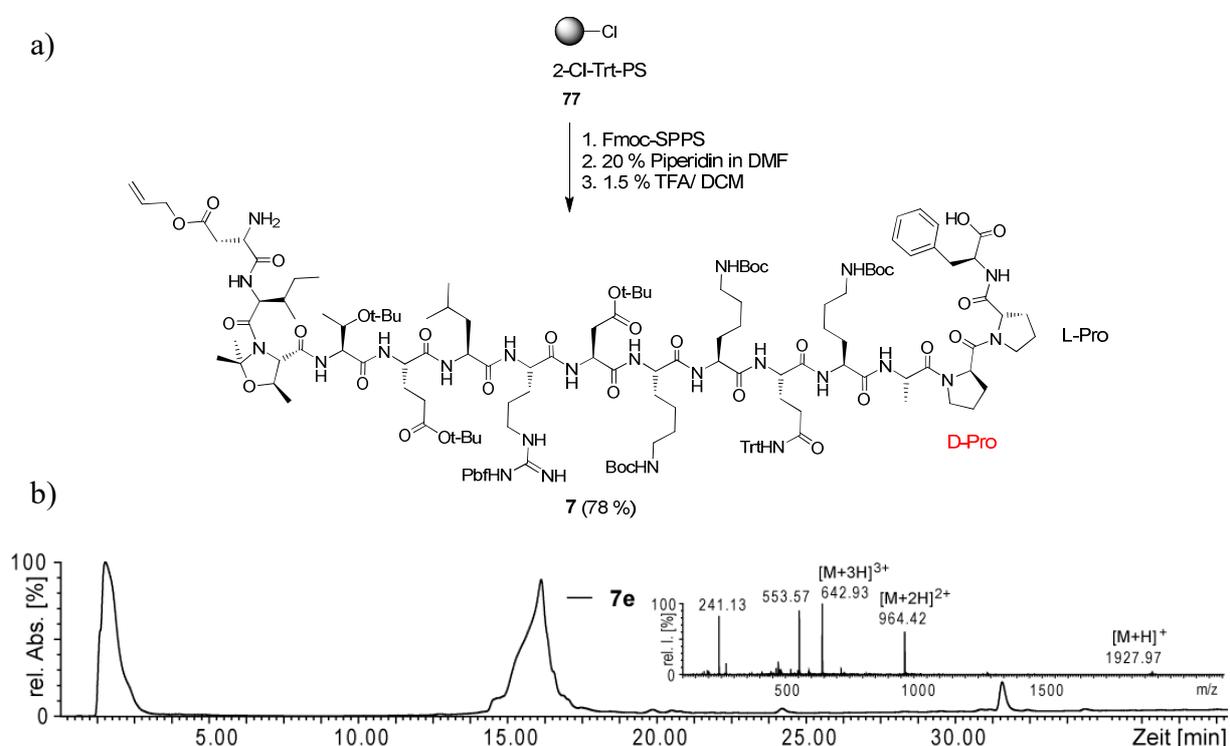


Abbildung 24: a) Synthese des V1/V2 Loop Peptids **7** und b) LC-MS des Peptids **7e**.

Die Fmoc-Gruppe wurde an der Festphase entfernt und das geschützte Peptid durch 1.5 % TFA vom Harz abgespalten. Nach einer analytischen TFA-Abspaltung (96 % TFA, 2 % TES, 2 % H₂O) wurde das Peptid **7e** durch LC-MS charakterisiert (Abbildung 24). Aufgrund der *cis/trans*- Isomerie der Proline wies das Peptid **7e** kein definiertes Elutionsverhalten auf. Das N- und C-terminal freie Peptid **7** wurde mit HATU und HOAt zyklisiert (Abbildung 25a). Es wurde eine Konzentration von 1.8 mM Peptid **7** eingestellt, um intermolekulare Reaktionen zu vermeiden. Die Zyklisierung eines linearen Peptids ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Glycin, Prolin, *N*-Alkylierungen, *D*-Aminosäuren oder Pseudoprolindipeptide können die Zyklisierung unterstützen.¹⁰⁹

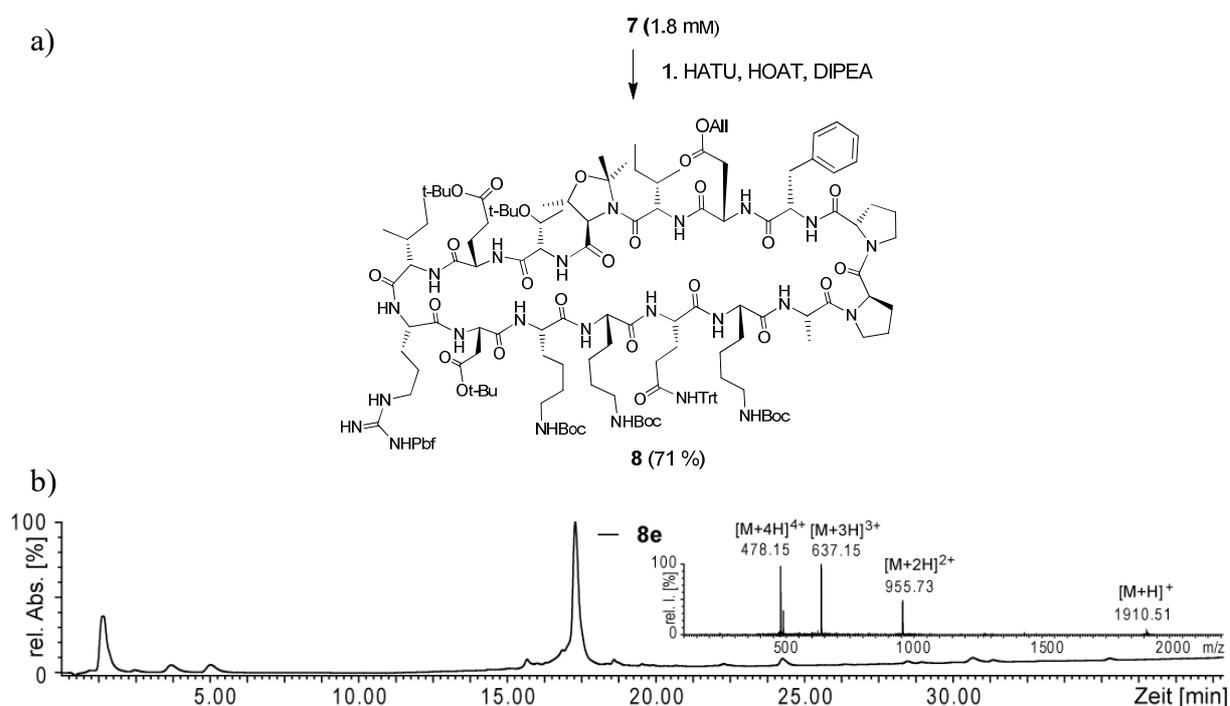


Abbildung 25: a) Intramolekulare Zyklisierung des Peptids **7** und LC-MS des entschützten Peptids **8e**.

Das Rohprodukt **8** wurde durch organische Gelpermeationschromatographie gereinigt und ergab eine Ausbeute von 71 %. Die Schutzgruppen des zyklisierten Peptids **8** wurden sauer entfernt und das entschützte Peptid **8e** wurde durch LC-MS analysiert (Abbildung 25b). Anschließend wurde der Allylester von **8** mit Pd(PPh₃)₄, Phenylsilan und DIPEA in DCM_{abs}

selektiv entschützt (Abbildung 26a).¹²⁸ Das Rohprodukt wurde in Methanol/H₂O gelöst, was zum Ausfallen von Pd führte. Dabei blieb jedoch Triphenylphosphinoxid **10** in Lösung (Abbildung 26b). Das Triphenylphosphinoxid konnte mit organischer Gelpermeationschromatographie entfernt werden. Es wurden 148.1 mg Peptid **9** erhalten, dies entsprach einer Ausbeute von 36 %. Die mehrstufige Reinigung des Peptids **9** war nicht günstig, da die Ausbeute reduziert wurde.

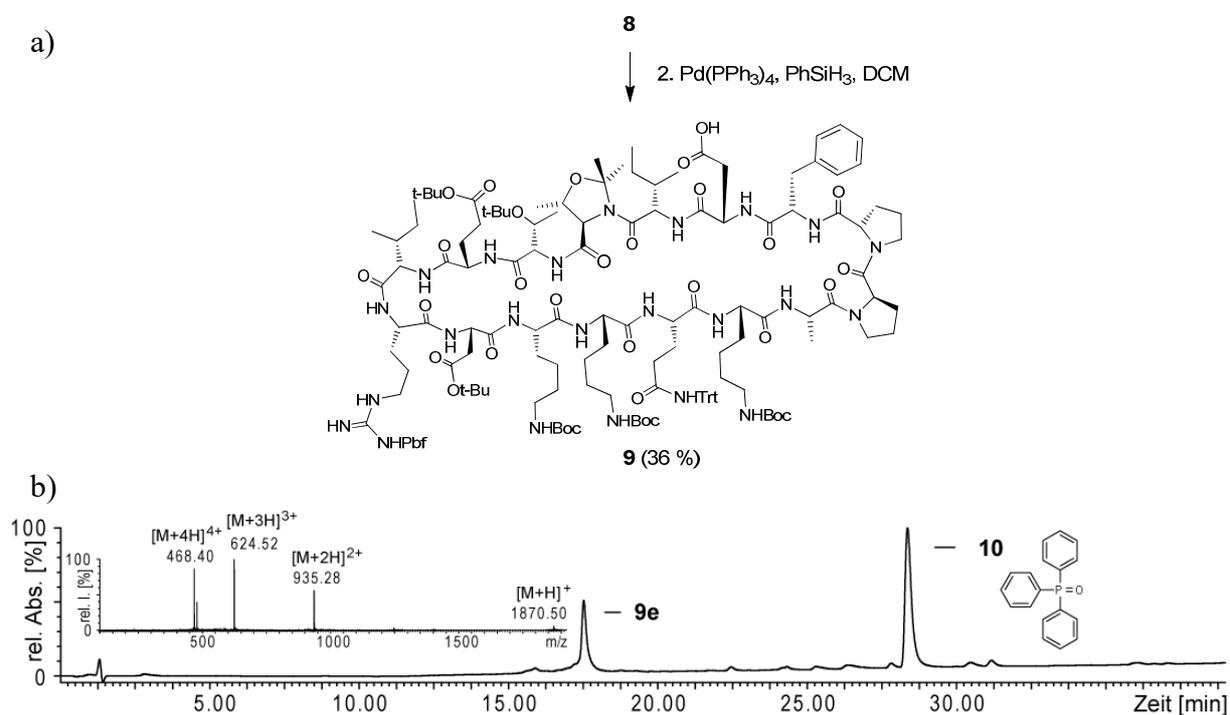


Abbildung 26: a) Desallylierung von Peptid **8** und b) LC-MS des entschützten Peptids **9e** nach Fällung mit MeOH.

Das Pseudoprolindipeptid vor der *N*-Glycosylierungsstelle sollte die Aspartimidbildung nach der Aktivierung der Carboxylgruppe reduzieren.¹²⁶ Zunächst wurde die Glycokupplung von **9** mit GlcNAc-NH₂ **11** in Gegenwart von HATU und HOAt getestet (Abbildung 27a). Von dem Rohprodukt wurde eine TFA-Abspaltung durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % H₂O). Nach RP-HPLC Reinigung konnte das Glycopeptid **12** in guter Reinheit erhalten werden (Abbildung 27b). Die Ausbeute der Glycokupplung betrug 31 %.

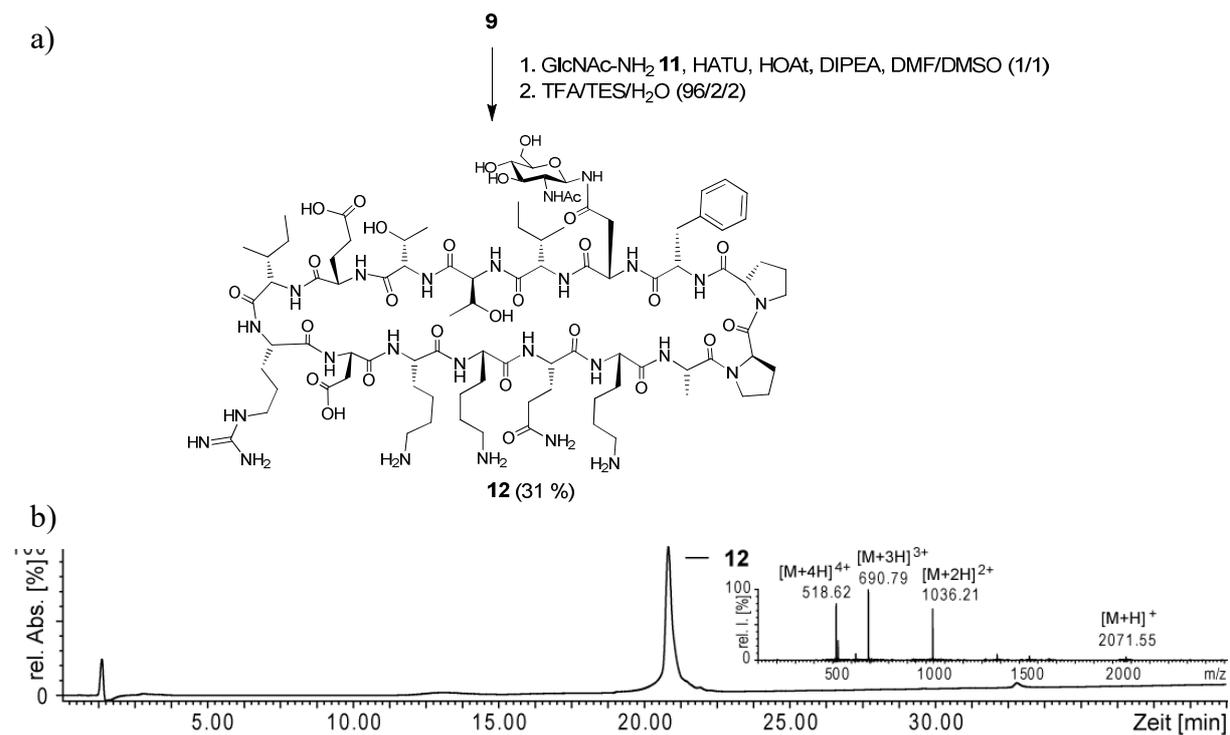


Abbildung 27: a) Synthese und b) LC-MS des zyklischen Glycopeptids **12** nach RP-HPLC.

Von dem breitneutralisierenden HIV- Antikörper PG9 ist bekannt, dass er ein mannosereiches *N*-Glycan als Epitop erkennt.⁵⁴ Daher wurde ein Glycosylamin des mannosereichen Typs an das Peptid **9** gekuppelt. Das von *I. Boos*¹¹⁰ dargestellte pentamannosyl- *N*-Glycanazid **13** wurde zum Glycosylamin **14** reduziert (Abbildung 28) und an das zyklische Peptid **9** mit HATU und HOAt gekuppelt (Abbildung 29a). Anschließend wurden die Schutzgruppen entfernt.

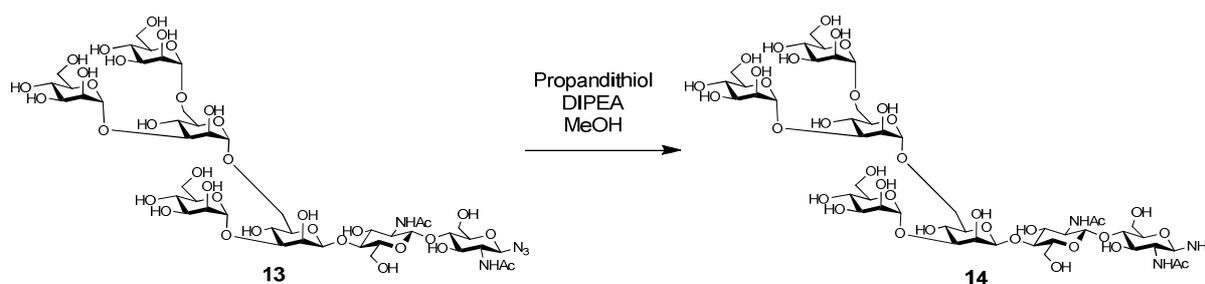


Abbildung 28: Reduktion des Azids **13** zum Glycosylamin **14**.

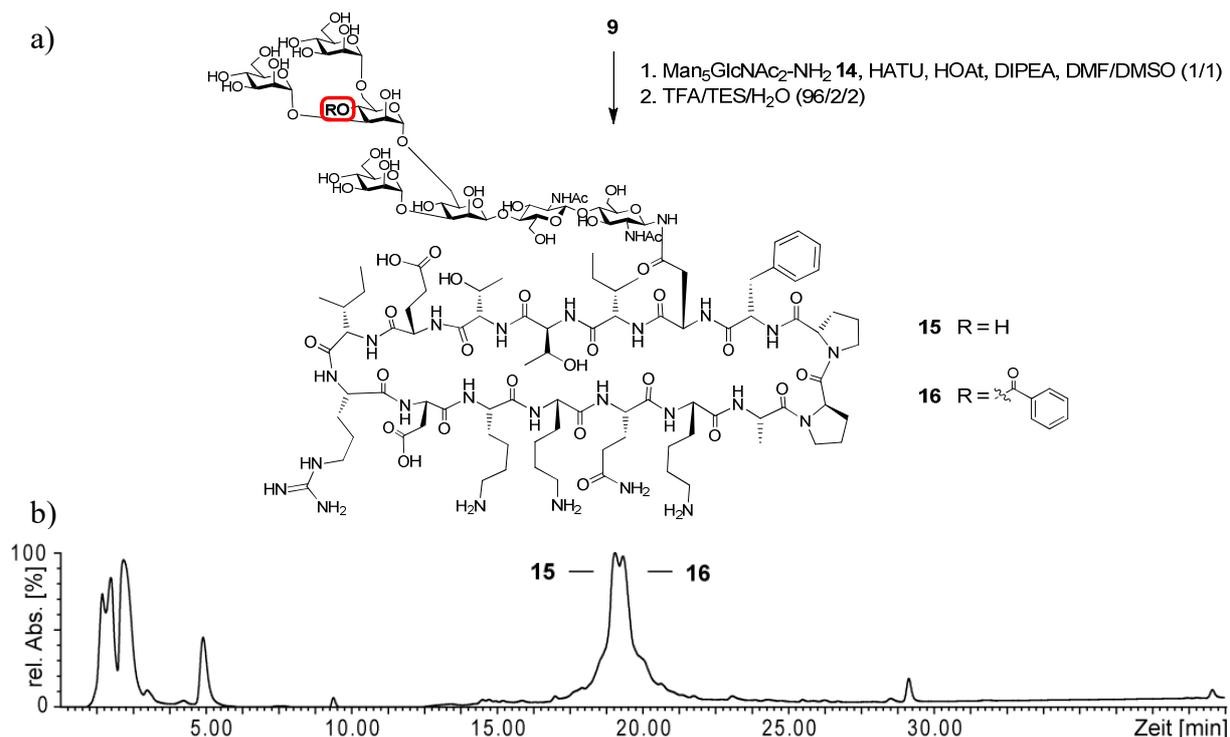


Abbildung 29: a) Synthese und b) RP-HPLC Chromatogramm des zyklischen Glycopeptids **15**.

Bedingt durch eine unvollständige Entschützung des zunächst verwendeten mannosereichen Oligosaccharidazids trat neben dem Zielprodukt **15** auch ein benzoyliertes Nebenprodukt **16** auf (Abbildung 29b). Durch RP-HPLC konnte das Nebenprodukt **16** nicht vollständig abgetrennt werden (Abbildung 30).

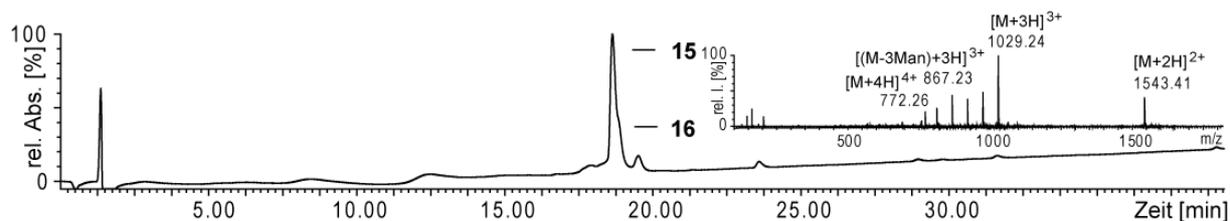


Abbildung 30: LC-MS des Glycopeptids **15** nach RP-HPLC.

Schließlich wurden die zyklischen Glycopeptide **12** und **15** von der Arbeitsgruppe *Robinson*¹¹¹ daraufhin getestet, ob sie als Epitop für den Antikörper PG9 in Frage kommen. Dazu wurde die Inhibition der Bindung des Antikörpers PG9 an das HIV Isolat CAP45 durch die Glycopeptide **12** und **15** untersucht. Als Referenz wurde der Antikörper PG9 ohne Glycopeptid eingesetzt (blaue Kurve). Bei einer Neutralisation müsste sich im Vergleich zur Negativkontrolle die Kurve nach rechts verschieben. Das V1/V2 Loop Mimetikum mit GlcNAc **12** wurde daher nicht vom Antikörper PG9 erkannt. Dies kann jedoch auch an der Struktur des Zuckers liegen, da

PG9 ein mannosereiches Oligosaccharid als Epitop erkennt.^{56,57} Allerdings somit wurde das mannosereiche V1/V2 Glycopeptid **15** ebenfalls nicht von dem Antikörper PG9 als Epitop erkannt (Abbildung 31).

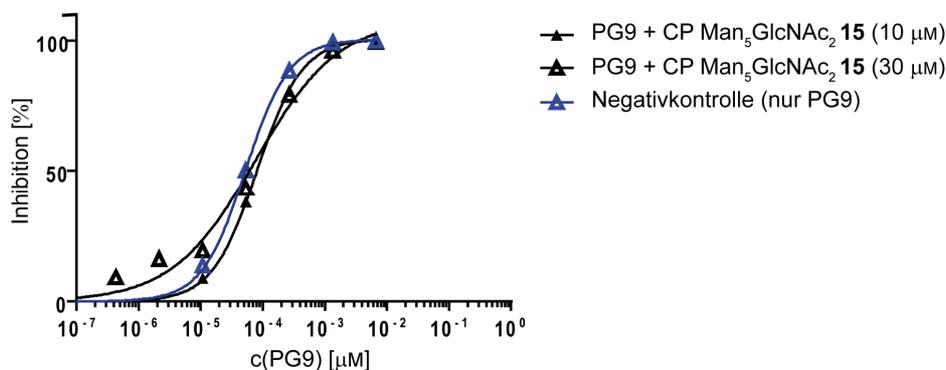


Abbildung 31: Inhibition von PG9 durch das zyklische V1/V2 Mimetikum **15**.¹¹¹

Daraufhin wurden von der Arbeitsgruppe *Robinson* NMR-Studien der zyklischen Glycopeptide mit GlcNAc **12** und Man₅GlcNAc₂ **15** durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass das Peptidrückgrat der beiden zyklischen Peptide von der erwarteten β -Hairpin-Struktur der B/C Region des gp120 abweicht. Die Aminosäuren Arginin-166 und Leucin-165 waren für die Ausbildung der β -Hairpin-Struktur hinderlich (Abbildung 32b). Daher waren die zyklischen Peptide **12** und **15** keine guten Mimetika der gp120 B/C Loop Region, die in der Kristallstruktur mit dem Antikörper PG9 gezeigt ist (Abbildung 32a). Daraufhin wurden die Aminosäuresequenz und die Synthese des Peptids optimiert, um eine stabile β -Hairpin-Struktur zu erhalten.

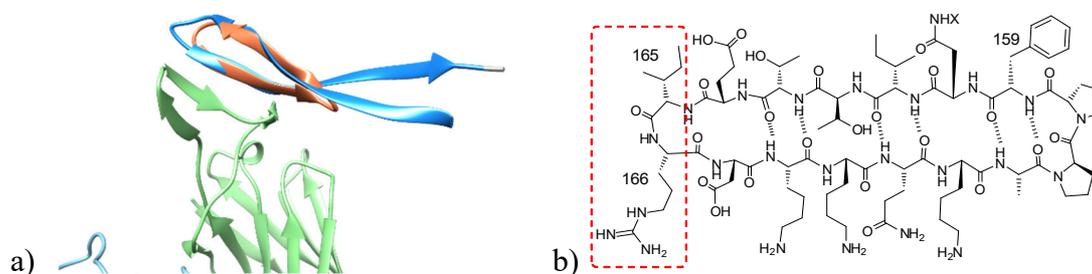


Abbildung 32: a) Kristallstruktur des B/C Loops (blau) mit dem Antikörper PG9 (grün). Das überlagerte Rückgrat der synthetischen Mimetika **12** und **15** ist orange dargestellt.¹¹¹

b) Struktur des Rückgrats der synthetischen Mimetika **12** und **15**.

3.2 Synthese eines optimierten HIV-1 V1/V2 Glycopeptids

Basierend auf NMR Studien der Arbeitsgruppe um *J. A. Robinson* wurde im Glycopeptid Alanin-172 durch Valin ausgetauscht.

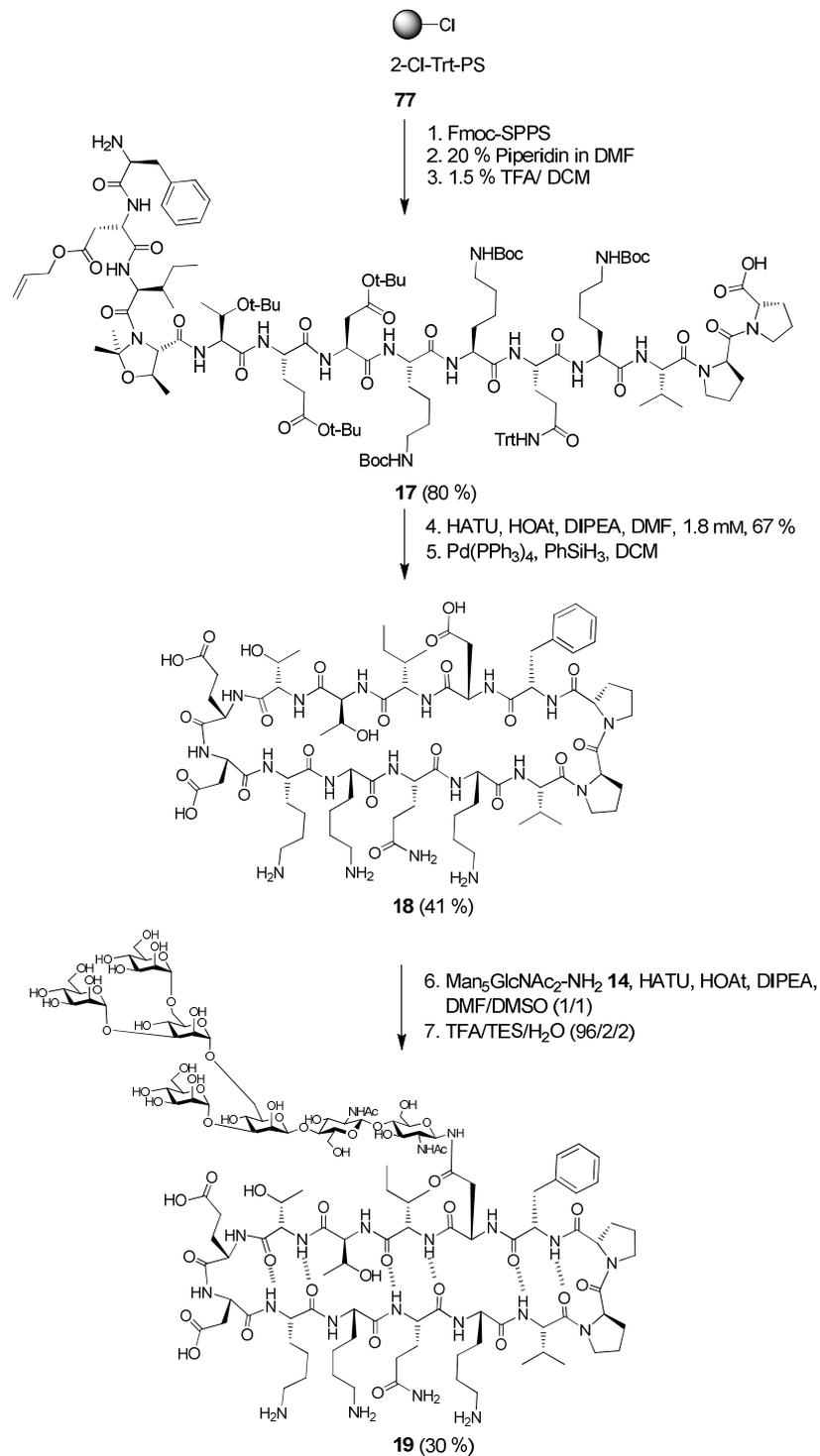


Abbildung 33: Synthese des optimierten V1/V2 Loop Mimetikums **19**.

Außerdem wurden zwei Aminosäuren, Arginin-166 und Leucin-165 entfernt. Zur Synthese des verbesserten Peptids **17** wurde 2-Cl-Tritylchlorid-Polystyrolharz verwendet. Es wurde Prolin als C-terminale Aminosäure gewählt, da die Aktivierung des C-Terminus bei der späteren Zyklisierung des Peptids racemisierungsfrei verläuft. Das Peptid wurde an der Festphase maschinell aufgebaut (Abbildung 33). Dabei wurden bei der Kupplung von Fmoc-D-Pro-OH die eingesetzten Äquivalente erhöht, um eine vollständige Kupplung zu ermöglichen. Andernfalls wurde eine Deletion dieser Aminosäure beobachtet.

Es wurde eine Fmoc-Abspaltung an der Festphase durchgeführt und das geschützte Peptid **17** mit 1.5 % TFA vom Harz abgespalten. Das Peptid **17** ($c = 1.8 \text{ mM}$) wurde mit HATU und HOAt zyklisiert. Anschließend wurde das Rohprodukt durch organische Gelpermeationschromatographie gereinigt, um die Aktivierungsreagenzien zu entfernen. Die Ausbeute nach der Zyklisierung betrug 67 %. Nach der Desallylierung ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Phenylsilan in DCM) wurden die Katalysatorreste mit Methanol/Wasser (4/1) ausgefällt und noch enthaltenes Triphenylphosphinoxid **10** anschließend durch Gelpermeationschromatographie abgetrennt. Die Reinheit des geschützten zyklischen Peptids **18** wurde anschließend durch LC-MS untersucht (Abbildung 34). Es wurden 19.4 mg Peptid **18** erhalten, dies entsprach einer Ausbeute von 41 %.

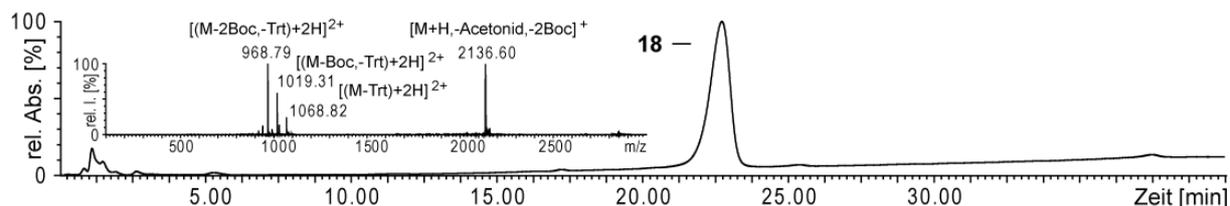


Abbildung 34: LC-MS des geschützten, zyklischen Peptids **18** nach Desallylierung.

An das zyklische Peptid **18** wurde mit HATU und HOAt eine reinere Charge des Glycosylamins **14** gekuppelt, das keine zusätzliche Benzoylschutzgruppe mehr aufwies (Abbildung 33). Das Rohprodukt wurde nach einer TFA-Behandlung durch LC-MS analysiert (Abbildung 35a). Neben dem Produkt **19** war auch Edukt **18e** zu finden. Das entschützte Rohprodukt wurde durch RP-HPLC gereinigt. Die Reinheit wurde per LC-MS überprüft (Abbildung 35b). Es wurde eine Ausbeute von 30 % erreicht.

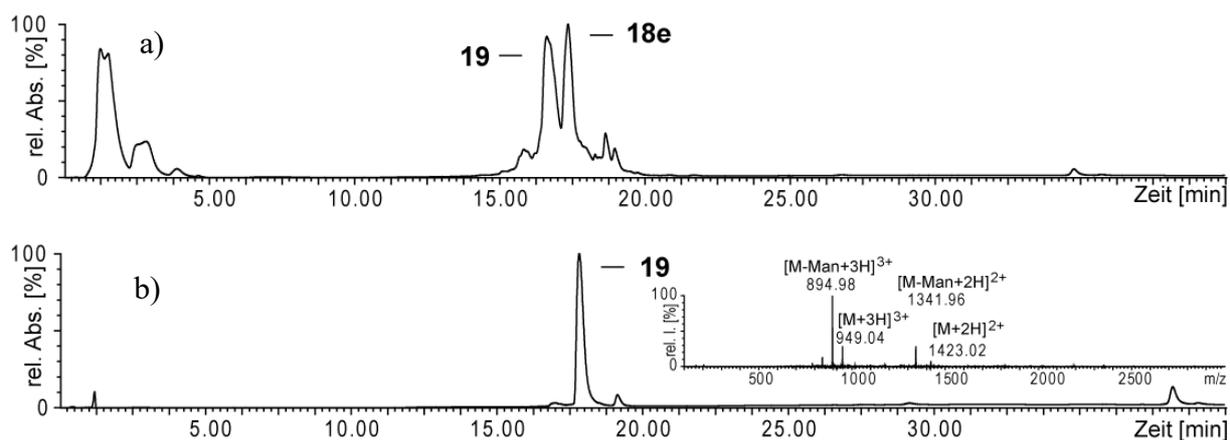


Abbildung 35: a) RP-HPLC Chromatogramm des rohen Glycopeptids **19** und b) des gereinigten Glycopeptids **19**.

Auch das modifizierte V1/V2 Loopmimetikum mit mannosereichem Zucker **19** wurde von der Arbeitsgruppe *Robinson*¹¹¹ getestet. Es wurde die Neutralisation eines viralen Isolats, CAP45.G3, durch den Antikörper PG9 in Gegenwart des Glycopeptidmimetikums **19** untersucht. Als Negativkontrolle wurde der Antikörper PG9 ohne **19** eingesetzt (blaue Kurve).

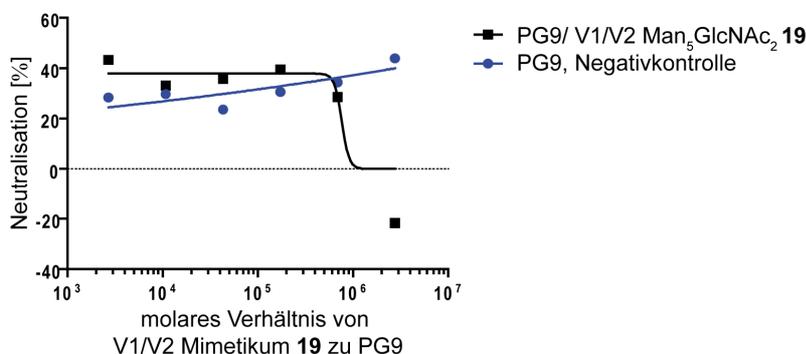


Abbildung 36: PG9 vermittelte Neutralisation des viralen Isolats CAP45.G3.¹¹¹

Das Glycopeptid mit mannosereichem Zucker **19** wurde vom Antikörper PG9 erkannt, da die Neutralisation des viralen Isolats durch PG9 bei höherer Konzentration des Mimetikums **19** abnimmt (Abbildung 36). Somit sollte das Peptidrückgrat von **19** eine stabile β -Hairpin-Struktur ausbilden, die den V1/V2 Loop ähnelt. Zusätzlich sollte auch das mannosereiche Oligosaccharid an den Antikörper PG9 binden. Der Vergleich der zwei Peptidmimetika **15** und **19** zeigt, dass die Stabilität des β -Hairpins essentiell für die Interaktion mit dem Antikörper PG9 ist.

3.3 Funktionalisierung des zyklischen Glycopeptids durch Azidoprolin

Der Einbau von Azidoprolin zur Modifikation von Biokonjugaten durch Click-Reaktion wurde auch bei gp120 Antagonisten verwendet.¹¹²

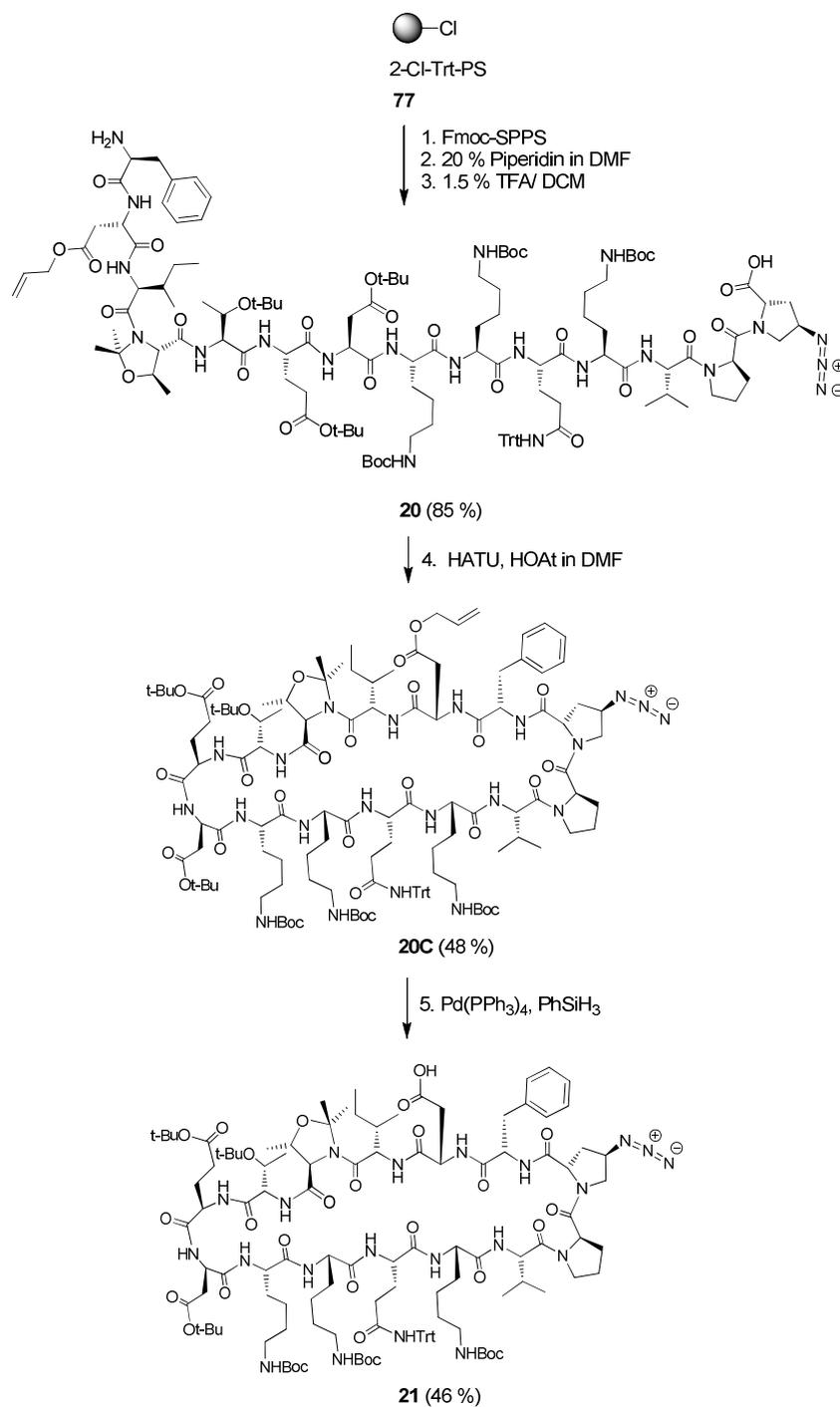


Abbildung 37: Synthese des optimierten V1/V2 Loop Glycopeptids **21** mit eingebautem Azidoprolin.

Zur Synthese des entsprechend funktionalisierbaren V1/V2 Loop Peptids **20** wurde Azidoprolin Fmoc-Pro(4-N₃)-OH (2*S*, 4*R*) an 2-Cl-Tritylchlorid-Polystyrolharz gekuppelt.

Nach der Peptidsynthese wurde eine Fmoc-Abspaltung an der Festphase durchgeführt und das C- und N- terminal entschützte Peptid mit 1.5 % TFA vom Harz abgespalten. Das Peptid **20** wurde mit HATU/HOAt zyklisiert und **20C** durch Flash-Chromatographie mit DCM/MeOH gereinigt. Die Ausbeute an **20C** betrug 48 %. Nach der Desallylierung wurden 40.6 mg gereinigtes Peptid **21** erhalten, dies entsprach einer Ausbeute von 46 %. Das Heptasaccharid **14** wurde an **21** gekuppelt (Abbildung 38a). Anschließend wurde eine Entschützung mit TFA durchgeführt und das Rohprodukt durch RP-HPLC gereinigt (Abbildung 38b). Es wurde eine Ausbeute von 25 % an **22** erreicht.

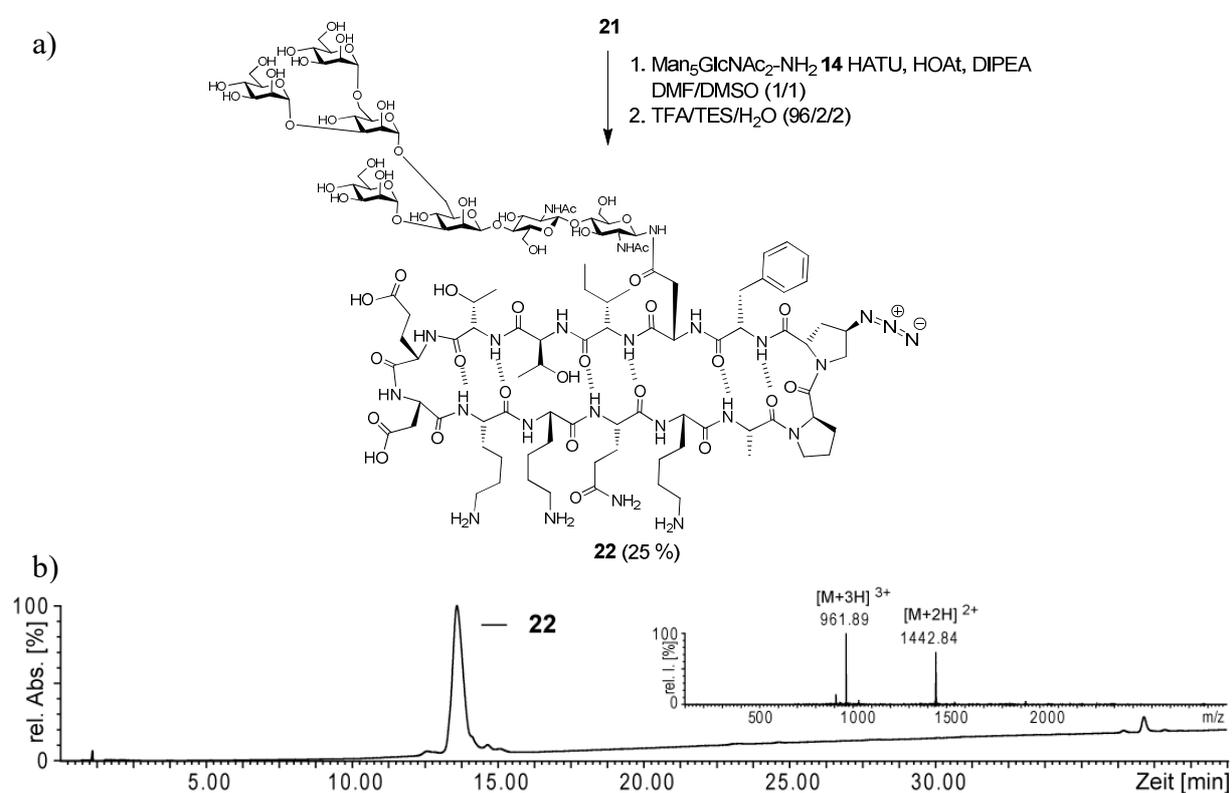


Abbildung 38: a) Synthese des Glycopeptids **22** und b) LC-MS von **22** nach RP-HPLC.

Cu^I- katalysierte 1,3-dipolare Zykoadditionen von Aziden und terminalen Alkinen liefern regioselektiv und fast quantitativ 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazole.¹¹³ Ein Vorteil ist, dass die Reaktion meist unter sehr milden Bedingungen abläuft. Aufgrund der einfachen und robusten Methodik findet diese Reaktion häufig Anwendung bei der Synthese von Biokonjugaten und Wirkstoffen.¹¹⁴ Das Glycopeptid **22** sollte mit einem Biotin-Linker modifiziert werden, um Studien über die Bindungsaffinität zum Antikörper PG9 durchführen zu können. Die Eignung

des Glycopeptids **22** für Click-Reaktionen wurde mit dem Propagylamid **23** überprüft (Abbildung 39a). TGTA¹¹⁰ **24** diente als Ligand für Cu^I.¹¹⁵ Nach 1d wurde eine Gelfiltration durchgeführt und das Produkt **25** wurde in guter Reinheit erhalten (Abbildung 39b).

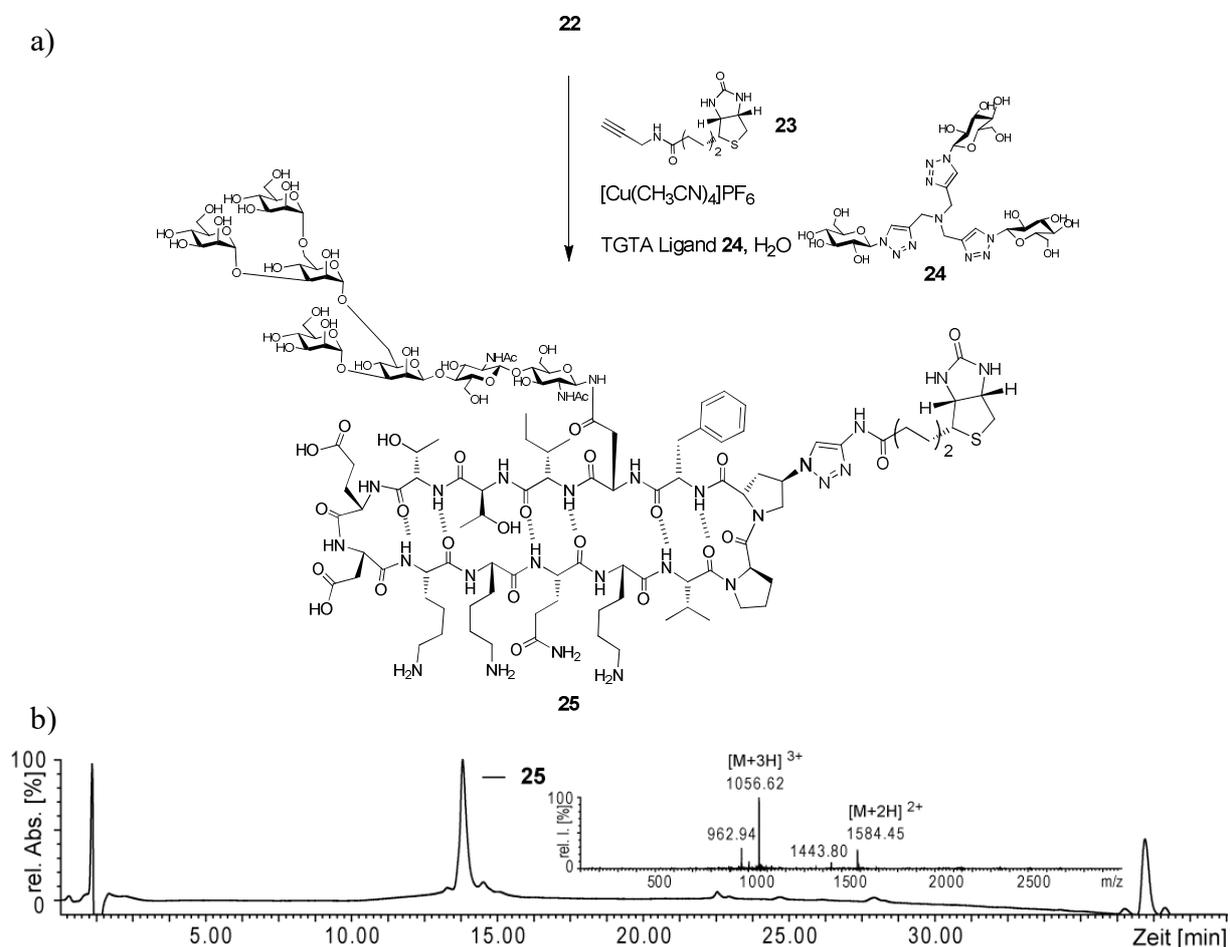


Abbildung 39: a) Click-Reaktion des Azidoglycopeptids **22** an Biotinylpropagylamid **23** und b) LC-MS des Glycopeptids **25**.

Von **25** wurden bisher keine Antikörperbindungsstudien durchgeführt. Für weitere Studien könnte das V1/V2 Mimetikum mit einem geeigneten Carrier auf diese Weise verknüpft werden. Weitere Optimierungen der Struktur des Mimetikums **25** zur stabilen und selektiven Bindung an den Antikörper PG9 sind jedoch sicherlich nötig.

4. Semisynthese von IgG1 Fc

Der Einsatz von rekombinanten Antikörpern als Therapeutikum ist von großer Bedeutung in der modernen Medizin. Die Wirksamkeit von Antikörpern wird von der Struktur des *N*-Glycans im Fc-Teil beeinflusst.⁶²

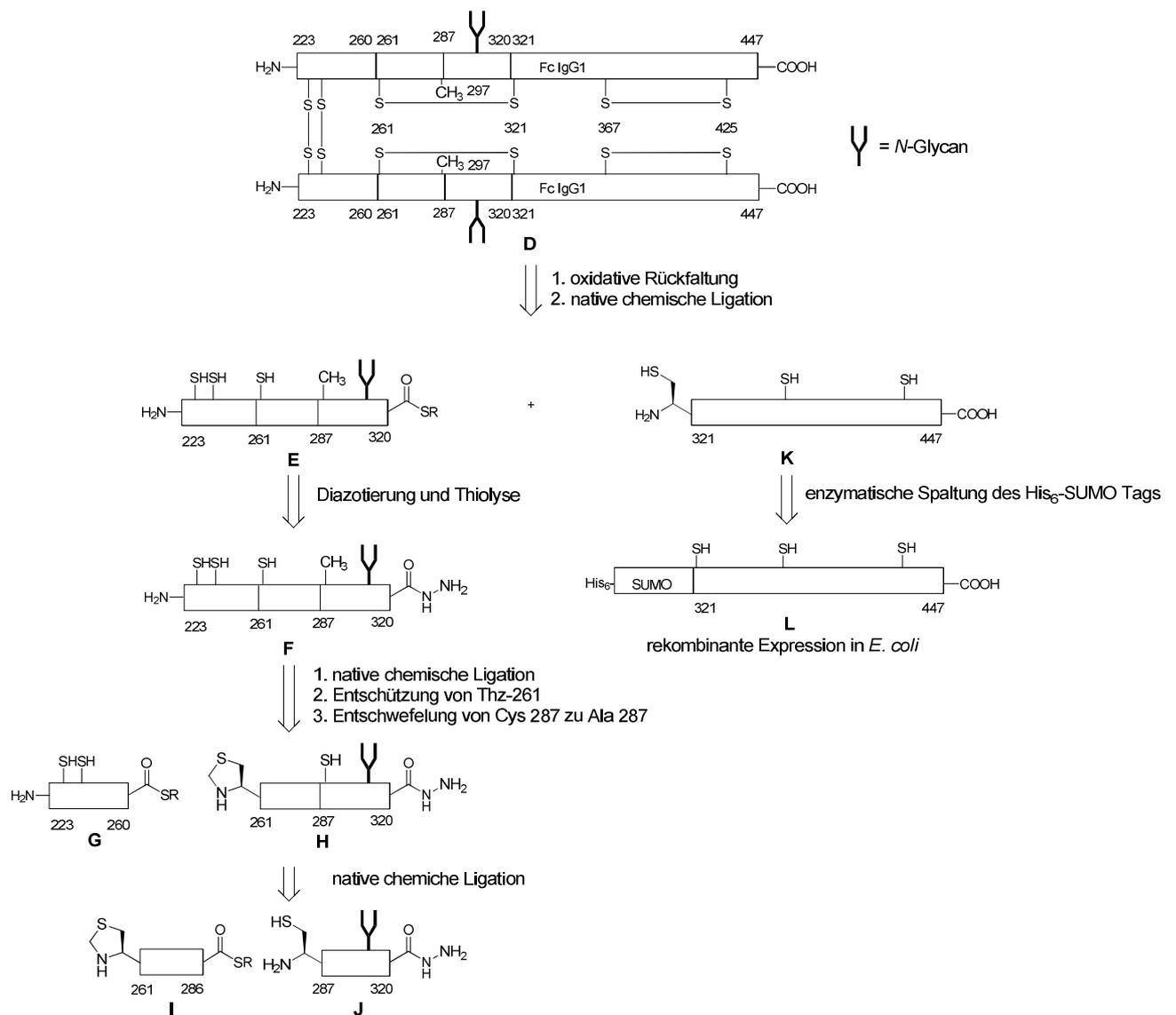


Abbildung 40: Retrosynthese von IgG1 Fc **D**.

Die Wechselwirkung des Fc Teils von IgG1 Antikörpern mit Fc-Rezeptoren hat hohe immunologische Relevanz. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe *Lichtenstein*¹¹⁶ sollte eine Synthesemethode für glycosylierte IgG 1 Fc Fragmente entwickelt werden. Die semisynthetisch gewonnenen Fc Glycopeptide FcγR sollten an SOD1_{G93A} Zellen und Mäusen

getestet werden. Nur solche Fc-Fragmente, die *in vitro* den Abbau von Neuronen reduzieren, sollten auch *in vivo* untersucht werden. Das Projekt soll dazu beitragen, die Struktur–Wirkungsbeziehungen von unterschiedlich glycosylierten Fc Fragmenten in Zusammenhang mit ALS (Amyotrophe Lateralsklerose) zu klären.

Durch sequenzielle native chemische Ligation sollte eine Bibliothek an unterschiedlich *N*-glycosylierten Fc Fragmenten **D** aufgebaut werden. Die Retrosynthese des Fc Fragments **D** ist schematisch in Abbildung 40 dargestellt. Das native Fc-Dimer **D** wurde in vier Peptide **G**, **I**, **J** und **K** unterteilt. **G**, **I** und **J** sollten durch Festphasenpeptidsynthese zugänglich sein. Das längere, unglycosylierte Peptidfragment **L** soll rekombinant aus *E. coli* gewonnen werden.¹¹⁷ Um diese Aufteilung zu ermöglichen, muss das native Ala-287 durch Cys-287 ersetzt werden und später durch Entschwefelung zu Ala umgewandelt werden. Die Peptide **G**, **I**, **J** und **K** können durch sequenzielle native chemische Ligation verknüpft werden.¹¹⁸ Nach der Ligation zum Glycopeptid **H** muss die Entschwefelung zu Ala-287 erfolgen. Durch eine Ligation sollte der Thioester **E** aufgebaut und mit dem Cys-Peptid **K** verknüpft werden. Die Rückfaltung und Oxidation sollte zum nativen Glycoprotein **D** führen.¹¹⁹

4.1 Synthese von (*R,S*) 2-Chlor-4'-carboxy-triphenylmethanol

Für die Synthese längerer geschützter Peptidylsäuren (ca. 40 Aminosäuren) nach der Fmoc-Strategie eignet sich das hydrophobe Polystyrolharz meist nicht. An dessen Stelle kann das hydrophile ChemMatrix-Harz verwendet werden. Dieses ist kommerziell jedoch nicht mit einem 2-Cl-Trityl-Linker erhältlich. Ein Vorteil dieses Linkers ist die besonders gute Unterdrückung der Diketopiperazinbildung auf Dipeptidstufe¹²⁰, gerade beim Einbau C-terminaler Pseudoproline.³⁵ Daher wurde der Linker 2-Chlor-4'-carboxy-triphenylmethanol **30** nach *Johnson et al.*¹²¹ synthetisiert (Abbildung 41).

Unter Argonatmosphäre wurde bei -78 °C *p*-Brombenzoesäure **26** mit *n*-Butyllithium in das Dilithiumderivat **27** überführt und mit 2-Chlorbenzophenon **28** zum Dilithiumsalz **29** umgesetzt. Das Produkt **30** wurde bei der Aufarbeitung freigesetzt. Bei der Zugabe von *n*-Butyllithium war es wichtig, die Reaktionstemperatur konstant niedrig zu halten (< - 80 °C), um Nebenreaktionen zu vermeiden. Es zeigte sich, dass dies bei der Zugabe einer 5 M *n*-BuLi Lösung besser zu realisieren war als bei 10 M *n*-BuLi.

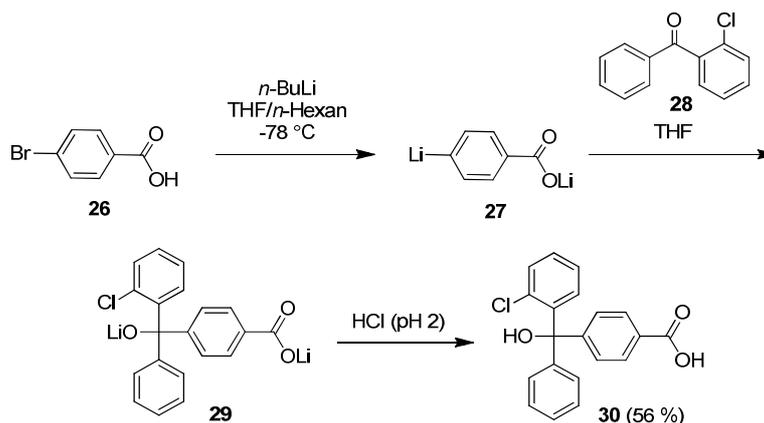


Abbildung 41: Synthese von (*R,S*)-2-Chlor-4'-carboxy-triphenylmethanol **30**.

Dadurch konnte die Entstehung von Nebenprodukten reduziert werden, was auch die Reinigung erleichterte. Das Rohprodukt wurde aus Cyclohexan/Essigester (10/1) umkristallisiert und das Produkt **30** in 56 % Ausbeute erhalten. Die Reinheit wurde durch LC-MS überprüft (Abbildung 42).

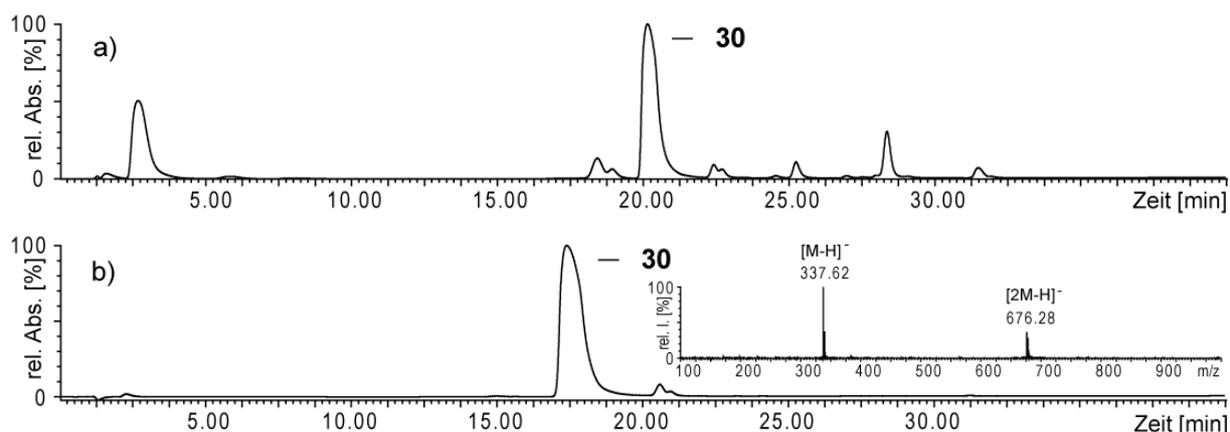


Abbildung 42: RP-HPLC Chromatogramm von 2-Chlor-4'-carboxy-triphenylmethanol **30**, a) Rohprodukt; b) nach Umkristallisieren.

4.2 Synthese von IgG1 Fc 223-260

Das N-terminale Fragment IgG1 Fc 223-260 wurde als Thioester benötigt. Die Abspaltung von geschützten Peptidylsäuren vom 2-Cl-Trityl-Linker ist unter schwach sauren Bedingungen möglich.¹²² Die Peptidylsäuren können anschließend zum Thioester umgesetzt werden. Der Thioester IgG1 Fc 223-260 **36** wurde am 2-Cl-Trityl-ChemMatrix-Harz aufgebaut (Abbildung 44a). Zunächst wurde der Linker **30** mit PyBOP an das Aminomethyl-ChemMatrix Harz **31**

gekuppelt. Durch Behandeln des Harzes **32** mit 10 % Acetyl bromid/DCM_{abs} unter Schutzgas wurde Harz **33** erzeugt (Abbildung 43).

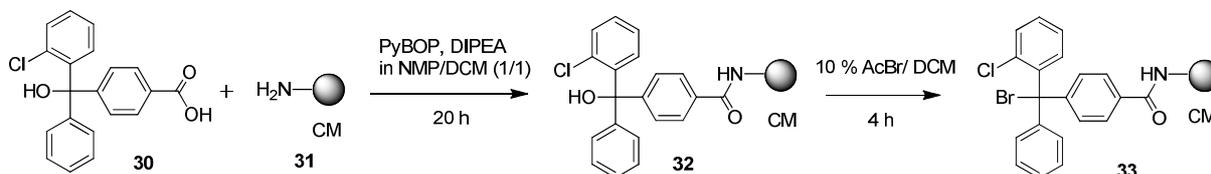


Abbildung 43: Erzeugung des Bromids **33**.

Die erste Aminosäure wurde im Basischen an das Bromid **33** gekuppelt (Abbildung 44a). Die Peptidsverlängerung erfolgte am Peptidsynthesizer. Die geschützten Aminosäuren wurden mit HCTU 30 min gekuppelt. Cys-226 und Cys-229 wurden manuell als symmetrisches Anhydrid gekuppelt.

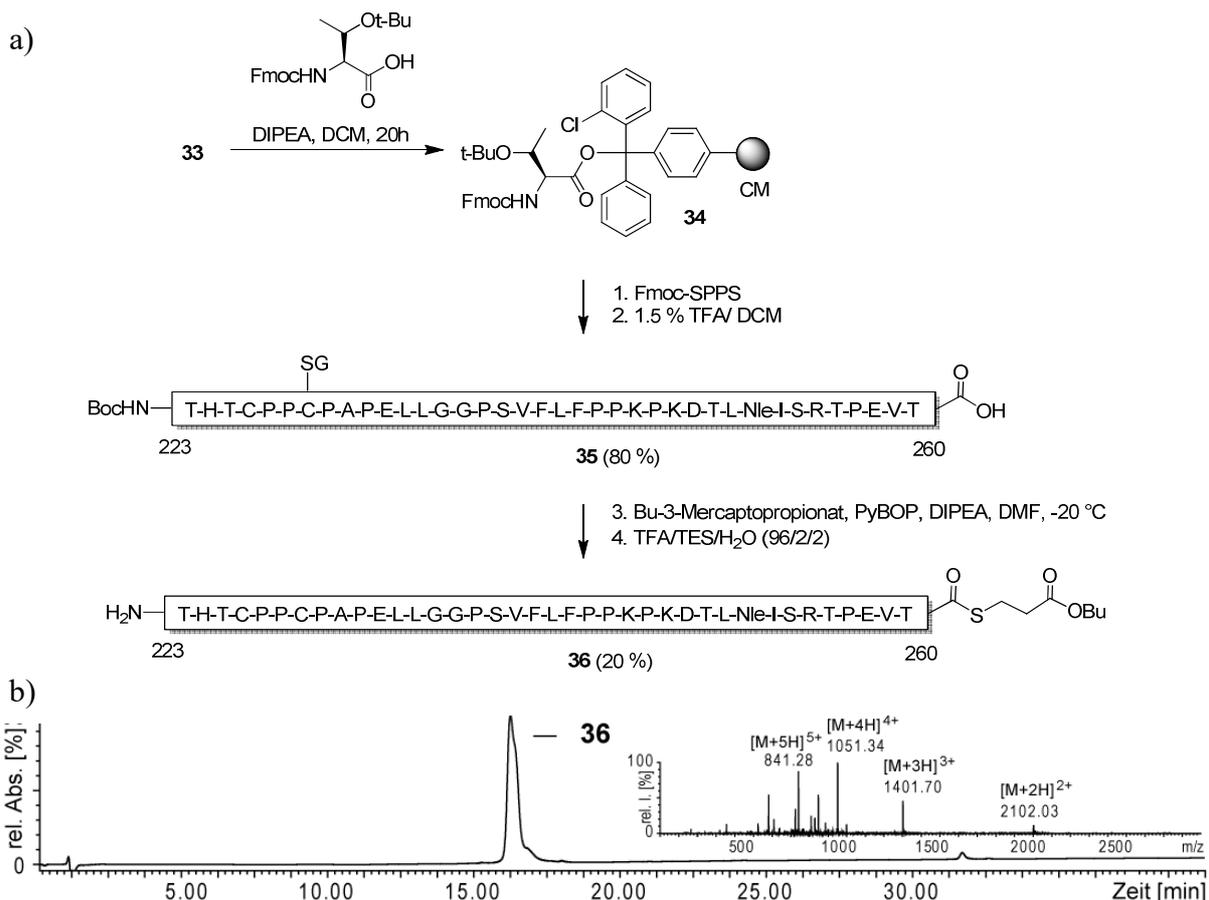


Abbildung 44: a) Synthese des IgG1 Fc 223-260 Thioesters **36** und b) LC-MS von **36** nach RP-HPLC Reinigung.

Da es sich um ein prolinreiches Fragment handelt, wurden keine Pseudoprolindipeptide eingebaut. Proline zeigen eine hohe Tendenz zur Ausbildung von *cis*-Peptidbindungen, dies genügt meist um hydrophobe Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrückenbildungen in der Peptidkette zu reduzieren.

Im Anschluss an die Synthese wurde durch milde Acidolyse die geschützte Peptidylsäure **35** vom Harz abgespalten. Es wurden 375 mg Rohpeptid erhalten. Der Thioester **36** wurde nach *Y. Kajihara et al.* dargestellt.¹⁵¹ Das Rohpeptid **35** wurde in DMF gelöst. Anschließend wurden bei -20 °C 5 eq DIPEA, 30 eq Butyl-3-mercaptopropionat und 5 eq PyBOP zugegeben (Abbildung 44a). Die Mischung wurde 3 h bei -20 °C gerührt. Nach TFA-Behandlung und RP-HPLC Reinigung wurde der Peptidthioester **36** in 20 % Ausbeute erhalten. Die Reinheit wurde durch LC-MS überprüft (Abbildung 44b). Aufgrund der *cis/trans*-Isomerie bei aufeinander folgenden Prolinen in der Peptidsequenz kommt es häufig zur Bildung von Konformeren. Daher war ein zweiter isobarer Peak bzw. eine Schulter im Chromatogramm zu finden.

4.3 Synthese von IgG1 Fc 261-286 Thioestern

Anschließend wurde der IgG1 Fc 261-286 **39** Thioester synthetisiert. Das Peptid IgG1 Fc 261-286 **38** wurde maschinell am 2-Cl-Trityl-ChemMatrix-Harz aufgebaut (Abbildung 45). An Position 267 wurde ein Pseudoprolindipeptid verwendet, um hydrophobe Wechselwirkungen zu reduzieren. Das N-terminale Cystein wurde als Thiazolidin eingebaut. Im Anschluss wurden 317 mg an geschützter Peptidylsäure **38** nach der Abspaltung vom Harz erhalten. Daraus wurde der Thioester **39** synthetisiert. Nach Entschützung und RP-HPLC Reinigung wurde der Peptidthioester **39** erhalten (15 %) (Abbildung 45a). Die Reinheit wurde durch LC-MS kontrolliert (Abbildung 45b).

Zusätzlich wurden alternative Schutzgruppen für das terminale Cystein 261 getestet. Diese Schutzgruppe sollte stabil gegenüber Entschwefelungsbedingungen und selektiv entschützbar sein. Als Alternative zum N-terminalen Thiazolidin wurde Boc-Cys(Acm)-OH¹²³ in die Sequenz eingebaut. Für diese Synthese wurde auf den kommerziell erhältlichen Trityl-Linker am Aminomethyl-ChemMatrix-Harz gewechselt.

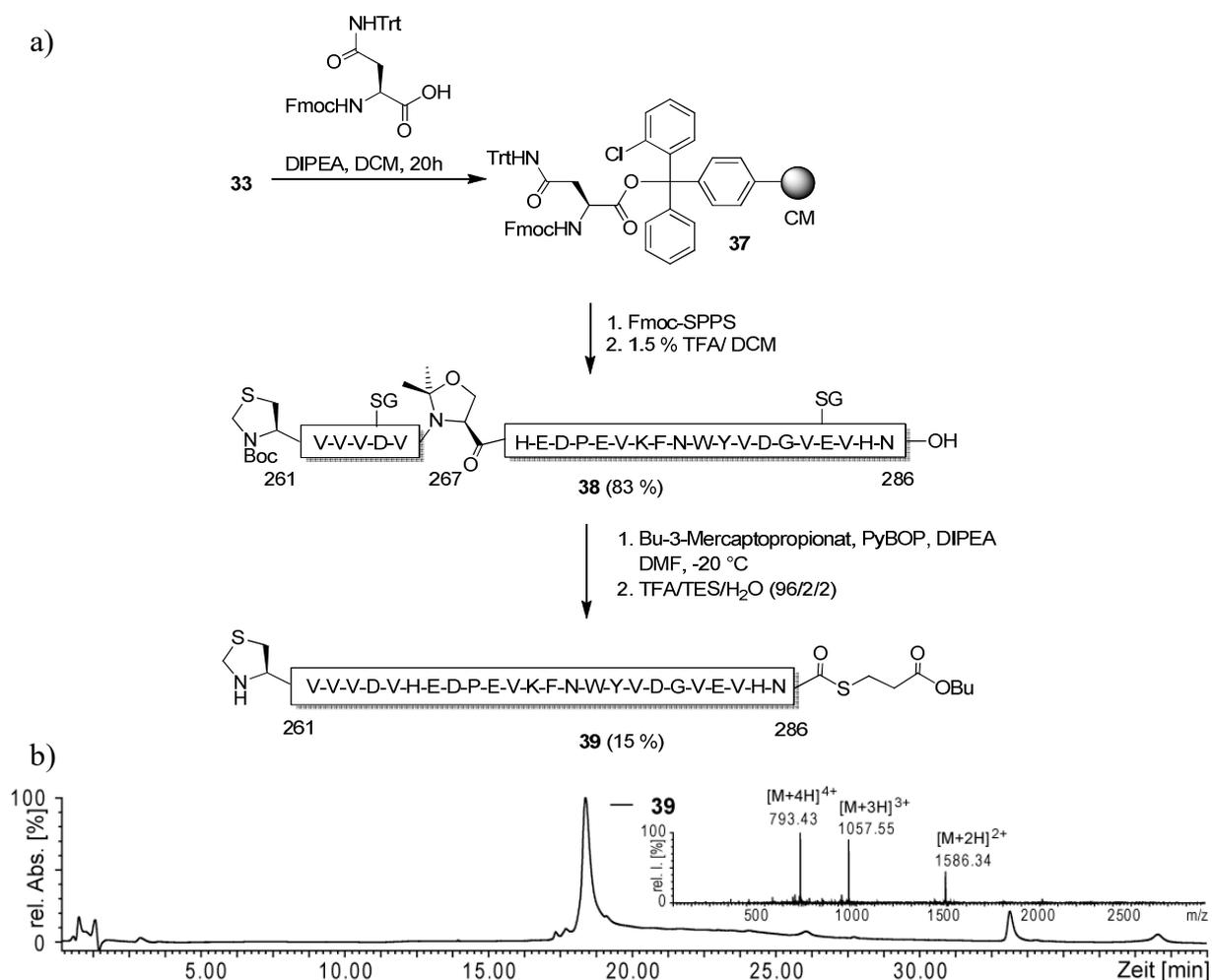


Abbildung 45: a) Synthese und Thioveresterung von IgG1 Fc 261-286 **38** nach Y. Kajihara et al.¹⁵¹ und b) LC-MS des Fc261-286 Thioesters **39** nach RP-HPLC Reinigung.

Die Synthese verschiedener Peptide zeigte, dass die Peptidylsäuren leichter vom Trityllinker als vom 2-Cl-Trityllinker abzuspalten sind. Der –I-Effekt des Chlors in 2 Position bewirkt, dass die Esterbindung zum Linker durch milde Acidolyse schwieriger zu spalten ist. Beim Einbau von C-terminalen Pseudoprolinen sollte jedoch der 2-Cl-Trityllinker verwendet werden, um eine Diketopiperazinbildung zu unterdrücken. Durch Behandeln des Trityl-Harzes **40** mit 10 % Acetylbromid/DCM unter Schutzgas wurde das Bromid **41** erzeugt. Die Peptidsynthese erfolgte analog zu **39** (Abbildung 46a). Der Thioester **42** mit Acetamidomethyl-Schutzgruppe in Position 261 wurde in 40 % Ausbeute und guter Reinheit erhalten (Abbildung 46b). Weiterhin wurde der Peptidthioester **43** mit N-terminaler PhAcM-Schutzgruppe synthetisiert (Abbildung 47a).

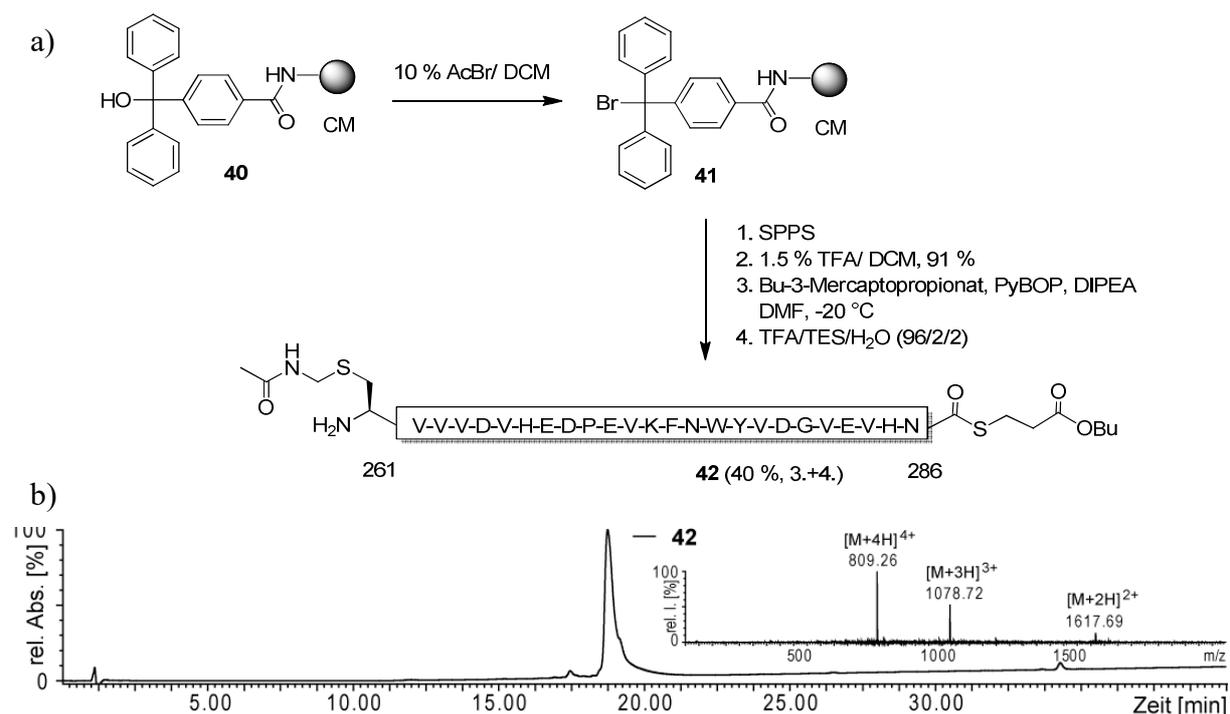


Abbildung 46: a) Synthese und LC-MS des IgG1 Fc 261-286 (AcM) Thioesters **42**.

Die Phacm-Schutzgruppe sollte bei Entschwefelungen ähnlich stabil sein wie die AcM-Schutzgruppe, sie kann jedoch auch in wässrigen Puffersystemen durch Penicillin G Acylase (PGA) (E.C.3.5.1.11) abgespalten werden.^{124,125}

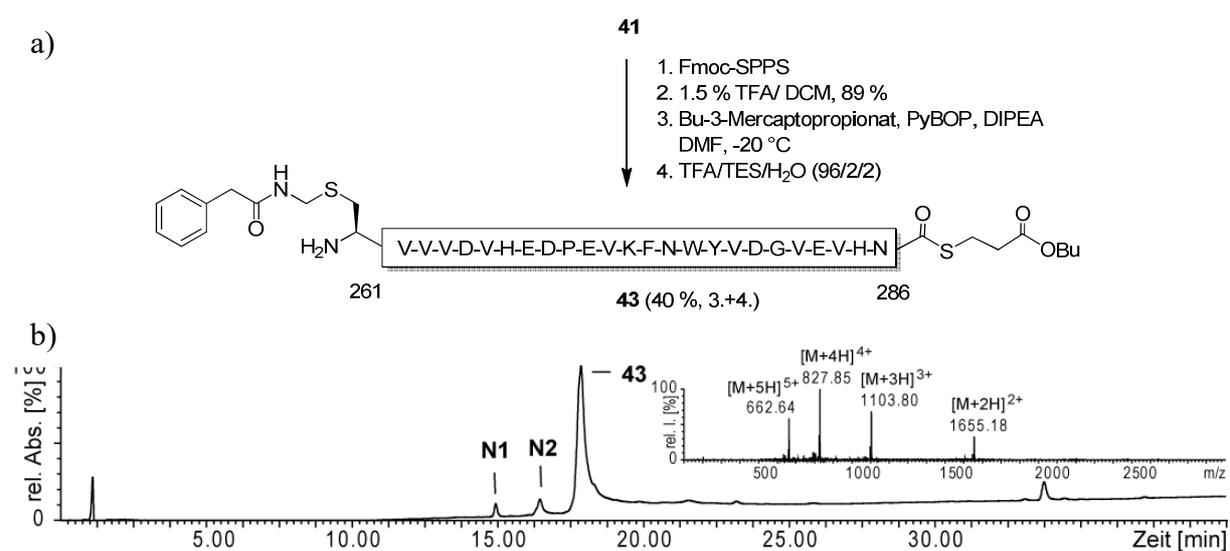


Abbildung 47: a) Synthese und b) LC-MS des Fc 261-286 (PhAcM) Thioesters **43**.

Die Zugabe von organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril oder DMSO verbessert die Löslichkeit von hydrophoben Peptiden unter Erhaltung der Aktivität von PGA. Ein Nachteil der Acm-Gruppe ist die Alkylierung von elektronenreichen aromatischen Aminosäuren, wie Tyrosin und Tryptophan, während der Abspaltung. Die Ausbeute an Thioester **43** betrug 40 %. Die Reinheit wurde mittels LC-MS überprüft (Abbildung 47b). Neben dem Zielprodukt wurde noch die Peptidylsäure **N1** und der Thioester **N2**, bei dem der Butylrest durch Hydrolyse abgespalten wurde, gefunden. Beide Nebenprodukte sind für eine native chemische Ligation nicht hinderlich.

4.4 Synthese von IgG1 Fc 287-320 Glycopeptidhydraziden

Die Glycopeptidsequenz IgG1 Fc 287-320 wurde als C-terminales Hydrazid funktionalisiert. Die Synthese der Peptidylsäure **45** wurde an Trityl-ChemMatrix-Harz durchgeführt (Abbildung 48). An den Positionen 307 und 299 wurde ein Pseudoprolindipeptid verwendet.

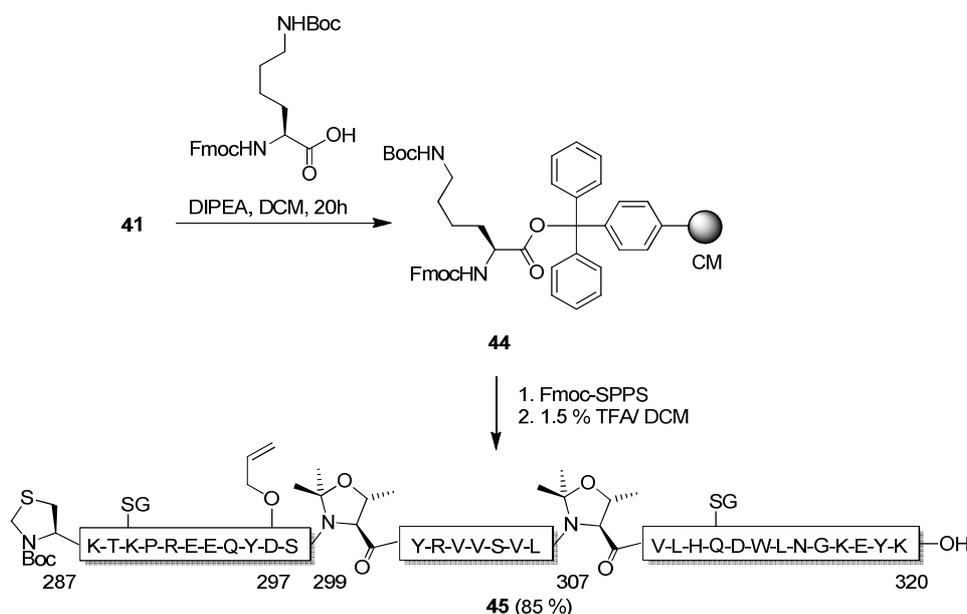


Abbildung 48: Synthese von IgG1 Fc 287-320 **45**.

Das Pseudoprolin in Position 299 dient zur Vermeidung der Aspartimidbildung an der N-Glycosylierungsstelle 297.¹²⁶ An Position 297 wurde ein allylgeschütztes Aspartat verwendet. Das N-terminale Cystein wurde als Thiazolidin eingebaut. Die geschützte Peptidylsäure **45** (518 mg Rohpeptid) wurde durch milde Acidolyse vom Harz abgespalten (Abbildung 48). Anschließend wurde das Hydrazid **46** dargestellt (Abbildung 49a).¹²⁷ Dazu wurde die

Peptidylsäure **45** in DCM gelöst und mit 3 eq *tert*-Butylcarbazat, 2 eq Cl-HOBt und 2 eq DIPEA versetzt. Die Reaktion wurde bei 0 °C durchgeführt.

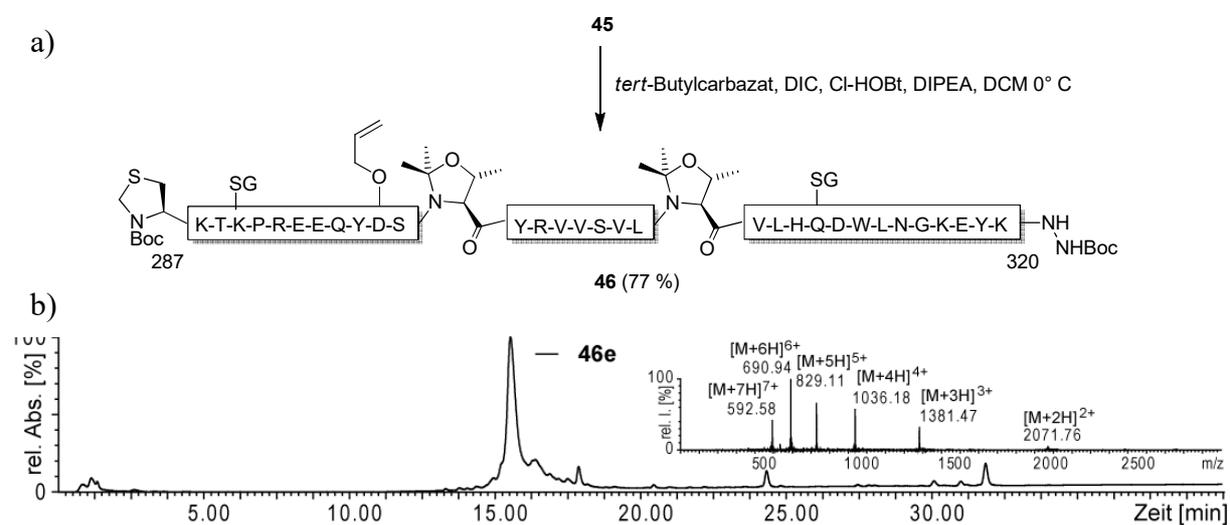


Abbildung 49: a) Synthese des IgG1 Fc 287-320 Hydrazids **46** und b) LC-MS des Fc 287-320 Hydrazids **46e**.

Nach Flash-Chromatographie wurden 404 mg (77 %) Hydrazid **46** in guter Reinheit erhalten. Das entschützte Peptid **46e** wurde durch LC-MS charakterisiert (Abbildung 49b). Der Allylester von **46** wurde unter Verwendung von Pd(PPh₃)₄ in Gegenwart von Phenylsilan und DIPEA in DCM_{abs} selektiv entschützt (Abbildung 50).¹²⁸ Nach Reinigung durch Flash-Chromatographie wurden 319 mg Produkt **49** erhalten, was einer Ausbeute von 80 % entsprach.

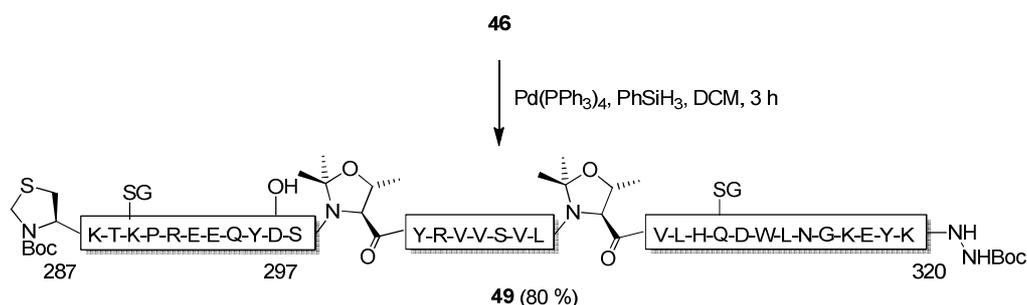


Abbildung 50: Allylesterabspaltung von Fragment IgG1 Fc 287-320 **49**.

Das zur Kupplung an das Peptid **49** benötigte *N*-Glycan wurde aus Eigelb gewonnen und lag als Azid **47** vor.¹²⁹ Daraus wurde zunächst das Glycosylamin durch Reduktion des Glycosylazids **47** mit Propandithiol unter Schutzgasatmosphäre erzeugt (Abbildung 51).¹³⁰

Aufgrund der basischen Reaktionsbedingungen kann die Anomerisierung des Glycosylamins verhindert werden.¹³¹

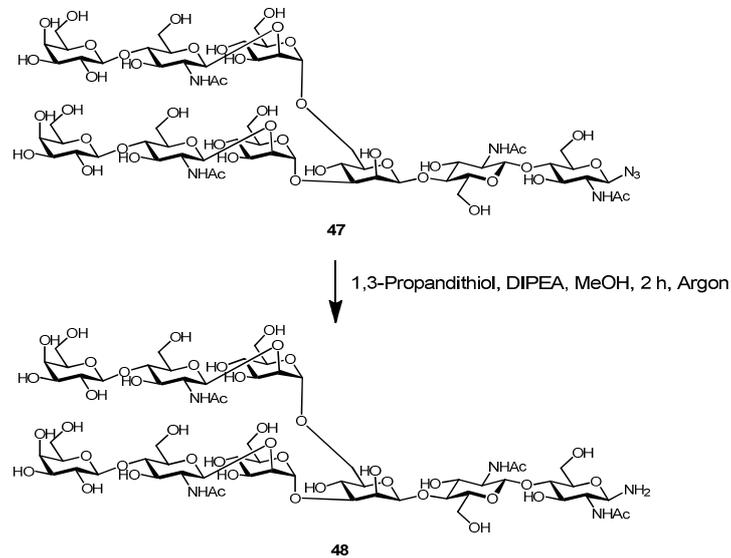
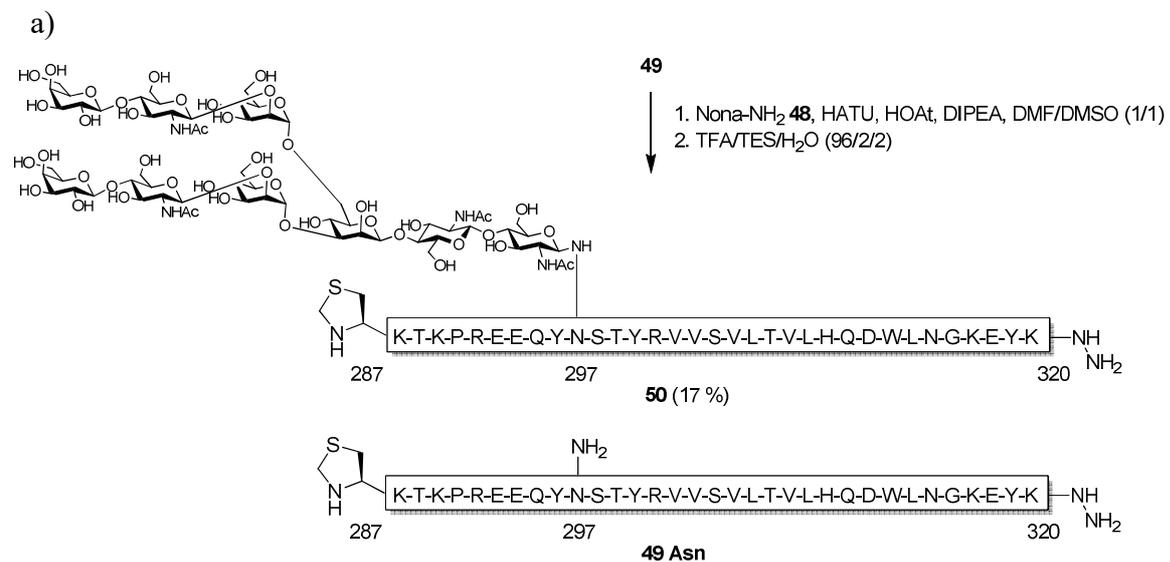


Abbildung 51: Umsetzung des Glycosylazids **47** zum Glycosylamin **48**.

Die freie Carboxylgruppe von **49** wurde aktiviert und mit dem Glycosylamin **48** gekuppelt (Abbildung 52a). Es wurde darauf geachtet, dass die Kupplungslösung basisch war (\sim pH 9). Saure Bedingungen führen zur *in situ* Hydrolyse des Glycosylamins und dadurch zur Bildung von unreaktivem Asparagin **49Asn**.



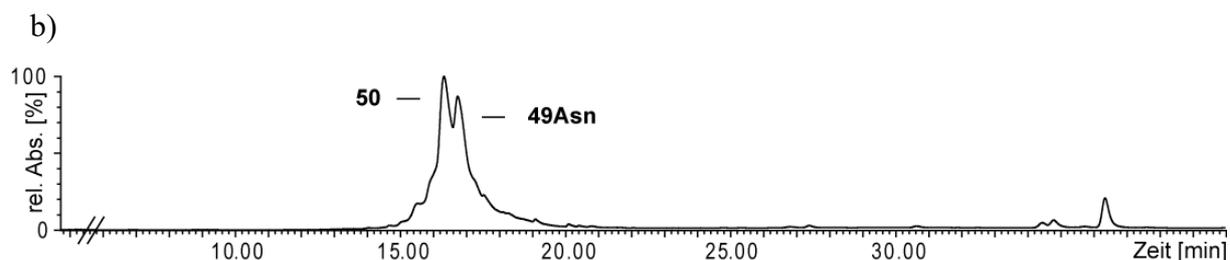


Abbildung 52: a) Darstellung und b) RP-HPLC Chromatogramm von IgG1 Fc 287-320 Nona **50**.

Eine TFA-Behandlung führte zu den entschützten Glycopeptidhydrazid **50**. Laut LC-MS war neben dem Produkt **50** auch Asn-Fragment **49Asn** zu finden (Abbildung 52b). Der Nachweis des Asn-Fragments **49Asn** erfolgte durch hochauflösende Massenspektrometrie. Eine Erhöhung der Äquivalente an Base bzw. mehrmaliges Hinzugeben von Base zur Reaktionslösung konnte die Bildung von **49Asn** nicht verhindern. Die Reinigung erfolgte durch präparative RP-HPLC und ergab eine Ausbeute an Glycopeptidhydrazid **50** von 17 % (Abbildung 53).

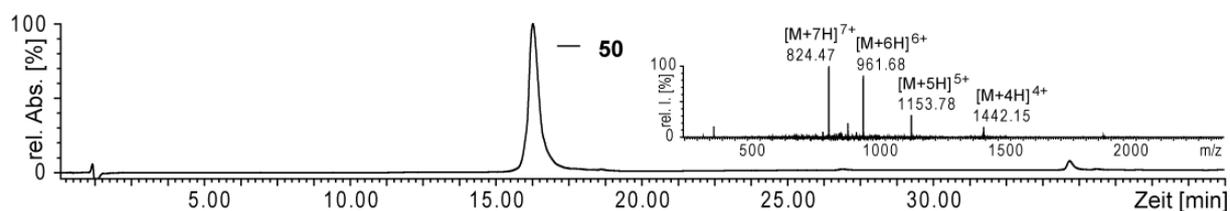


Abbildung 53: LC-MS des Glycopeptidhydrazids IgG1 Fc 287-320 Nona **50**.

Ziel der Synthese von homogenen IgG1 Fc Fragmenten ist auch der Einbau eines biantennären *N*-Glycans mit *bisecting* GlcNAc **52**. Dieses Oligosaccharid sollte eine besonders stabile Bindung des Fc-Fragments an den Fc-Rezeptor ermöglichen.⁶⁶

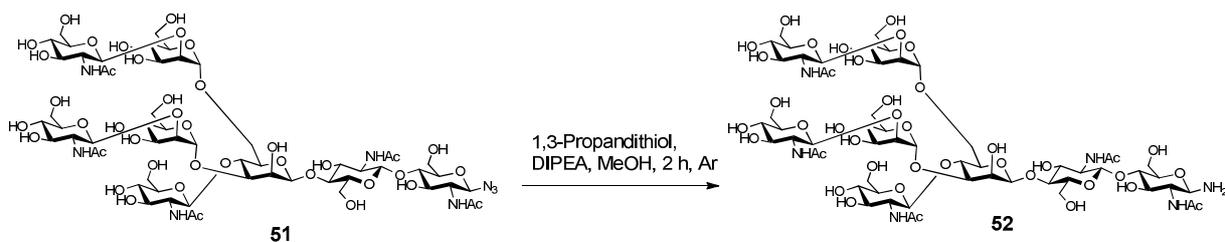


Abbildung 54: Reduktion des Glycosylazids **51** zum Glycosylamin **52**.

Das benötigte biantennäre Glycosylazid **51** mit *bisecting* GlcNAc wurde von *T. Karagiannis* zur Verfügung gestellt.¹³² Dazu wurde das Glycosylamin **52** durch Reduktion von **51** mit Propandithiol erzeugt (Abbildung 54).¹³⁰ Die freie Carboxylgruppe des Peptids **49** wurde aktiviert und mit dem *bisected* Glycosylamin **52** gekuppelt (Abbildung 55a).

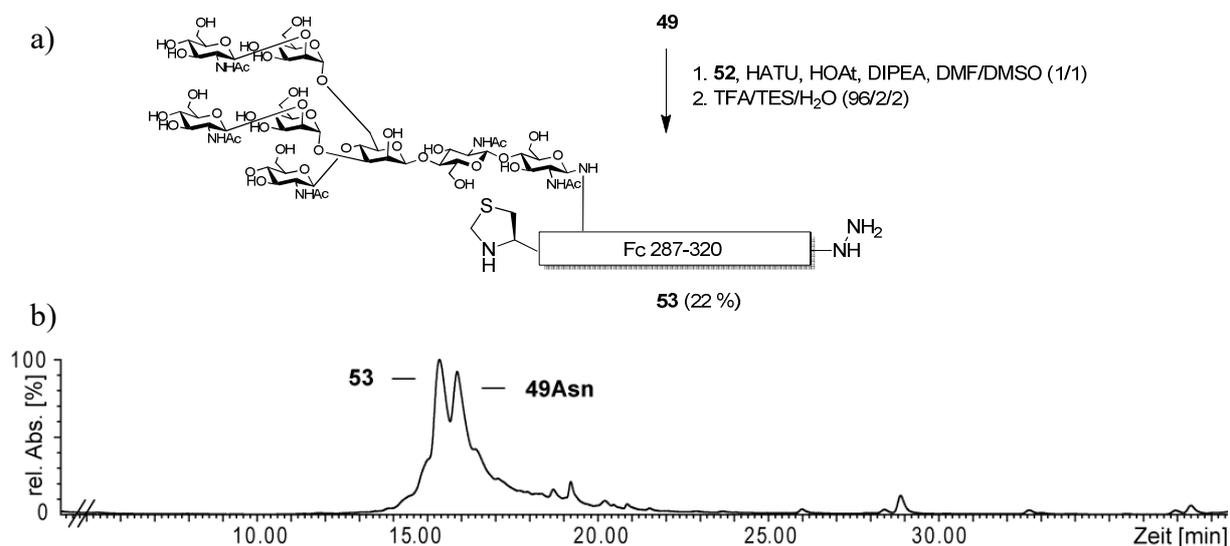


Abbildung 55: a) Kupplung des bisected Oligosaccharids **52** und b) RP-HPLC Chromatogramm der Glykokupplung nach 1 d.

Auch bei der Kupplung des Octasaccharidamins mit *bisecting* GlcNAc **52** entstand das Asn-Fragment **49Asn** als Nebenprodukt (Abbildung 55b). Nach der Entschützung wurde das Glycopeptid **53** durch RP-HPLC gereinigt. Die Ausbeute an Glycopeptid **53** betrug 22 % (Abbildung 56).

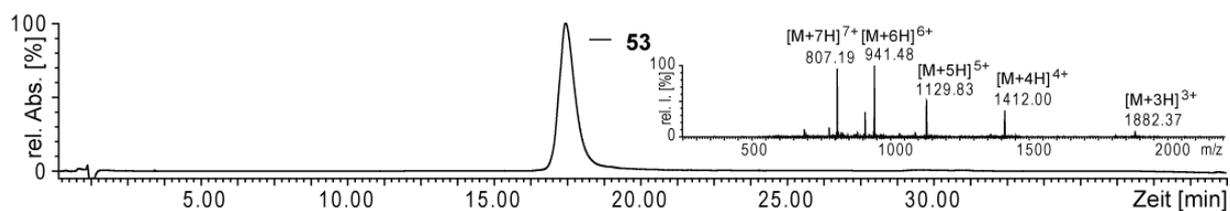


Abbildung 56: LC-MS des Glycopeptids **53** nach RP-HPLC Reinigung.

Zusätzlich sollte ein Fc-Fragment mit *bisected* biantennärem Oligosaccharid und terminalen Galactosen aufgebaut werden. Hierzu wurde das *bisected* Glycopeptid **53** enzymatisch durch β -1,4-Galactosyltransferase verlängert (Abbildung 57a).¹³³

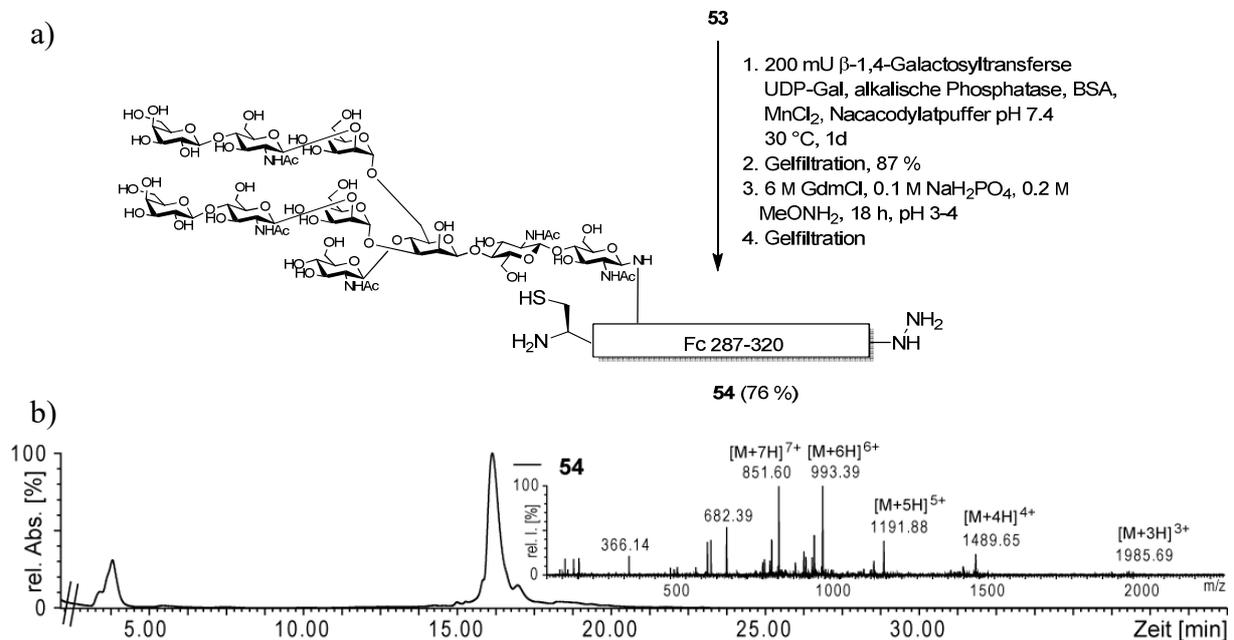


Abbildung 57: a) Enzymatische Verlängerung und b) LC-MS des Fc 287-320 Glycopeptids **54**.

Die β -1,4-Galactosyltransferase aus boviner Milch (E.C.2.4.1.38) ist eine der am besten untersuchten eukaryotischen Glycosyltransferasen.¹³⁴ Das Enzym katalysiert in Gegenwart von UDP-Galactose die Übertragung von Galactose auf die OH-Gruppe in Position 4 von terminalem *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc).¹³⁵ Galactosyltransferasen wurden vielfach zur Verlängerung von *N*-Glycanen¹³⁶ und Glycopeptiden¹³⁷ verwendet.

Der Pufferlösung wurde Rinderserumalbumin (BSA) zugesetzt, um das Enzym zu stabilisieren. Da UDP die Galactosyltransferase inhibiert, wurde alkalische Phosphatase (E.C.3.1.3.1) zugegeben.¹³³ Nach der Reinigung durch Gelfiltration wurde die N-terminale Thiazolidinschutzgruppe mit Mehtoxamin geöffnet.¹³⁸ Die Ausbeute an Glycopeptid **54** belief sich auf 76 %. Laut LC-MS Analyse wurde das Fragment in guter Reinheit erhalten (Abbildung 57b). Das Thiazolidin des Glycopeptids IgG1 Fc 287-320 Nona **50** wurde analog geöffnet (Abbildung 58a).

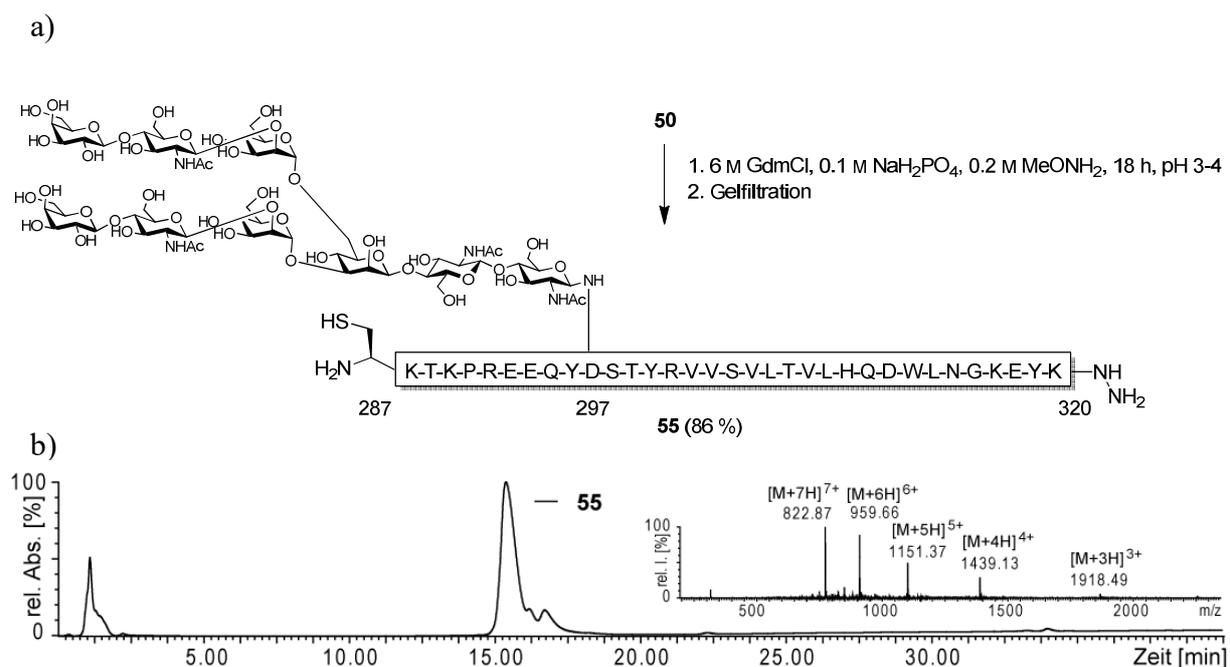


Abbildung 58: a) Öffnung des Thiazolidinrings von Fragment **50** und b) LC-MS des Cys-Peptides **55**.

Das Cysteinfoagment **55** wurde anschließend durch Gelfiltration gereinigt und durch LC-MS analysiert (Abbildung 58b). Die Ausbeute betrug 86 %.

4.5 Ligation zu IgG1 Fc 261-320 Glycopeptidhydraziden

Das Cys-Glycopeptidhydrazid **55** wurde mit den drei Thioestern **39**, **42** und **43** ligiert. (Abbildung 59a). Die Zugabe von MPAA²¹ beschleunigt die Ligation, da ein reaktiverer, aromatischer Thioester gebildet wird. Nach der Ligation wurden die Produkte durch Gelfiltration gereinigt. Die LC-MS Analysen von IgG1 Fc 261-320 (Thz) **56**, IgG1 Fc 261-320 (Acm) **58** und IgG1 Fc 261-320 (PhAcm) **59** sind in Abbildung 59 dargestellt. Die Ausbeute an IgG1 Fc 261-320 Thz **56** betrug 71 %. Die Ausbeute von Fragment **58** wurde nicht bestimmt. Die Ausbeute an IgG1 Fc 261-320 (PhAcm) **59** betrug 93 %.

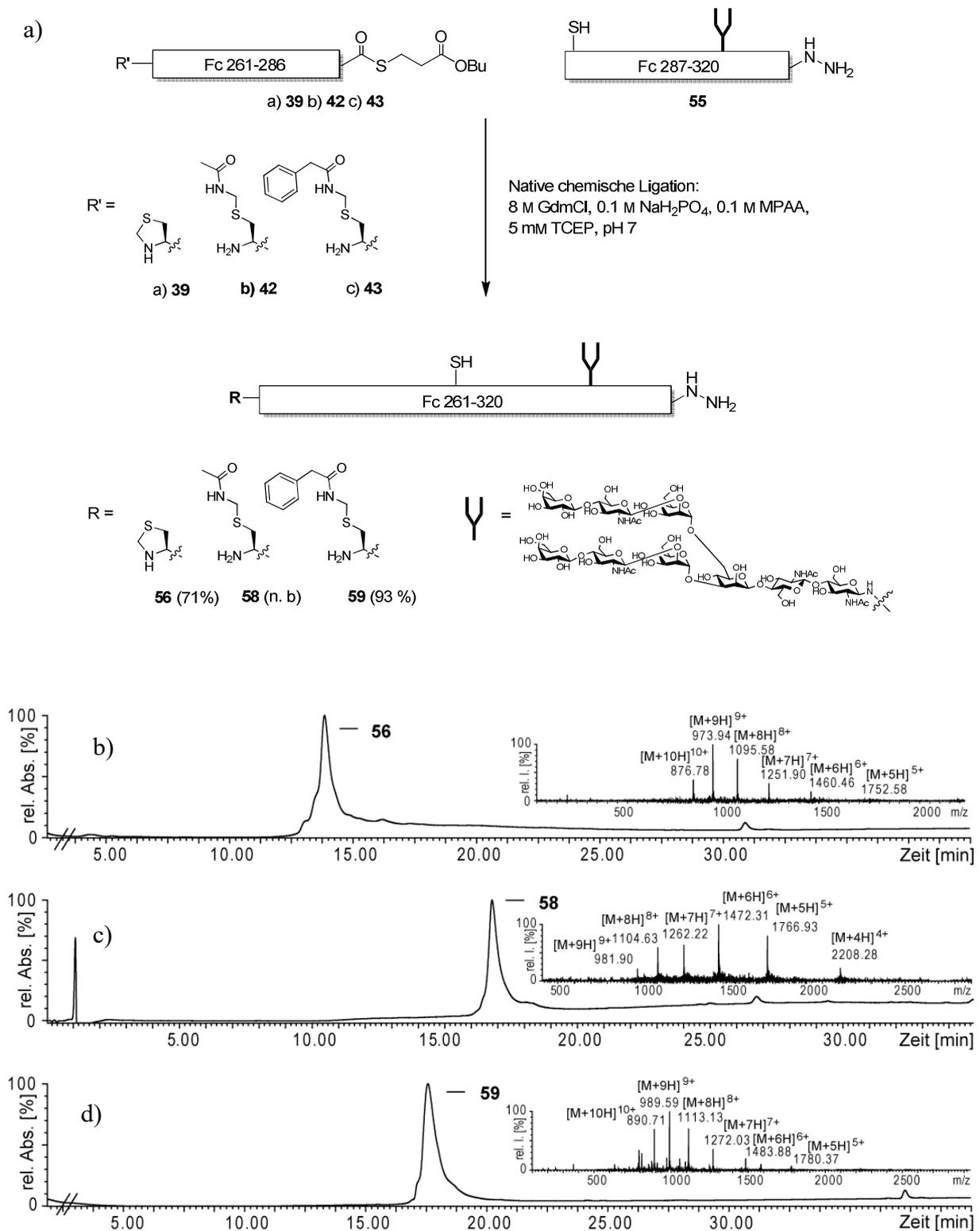


Abbildung 59: a) Native chemische Ligation zu IgG1 Fc 261-320 Glycopeptiden und LC-MS von b) IgG1 Fc 261-320 (Thz) **56**, c) IgG1 Fc 261-320 (AcM) **58** und d) IgG1 Fc 261-320 (PhAcM) **59** nach Gelfiltration.

Das *bisected* Glycopeptid IgG1 Fc 287-320 Deca **54** wurde mit dem Thioester IgG1 Fc 261-286 (PhAcm) **43** ligiert (Abbildung 60a). Nach Gelfiltration und RP-HPLC Reinigung wurde das Glycopeptid IgG1 Fc 261-320 Deca **57** in 20 % Ausbeute erhalten (Abbildung 60b).

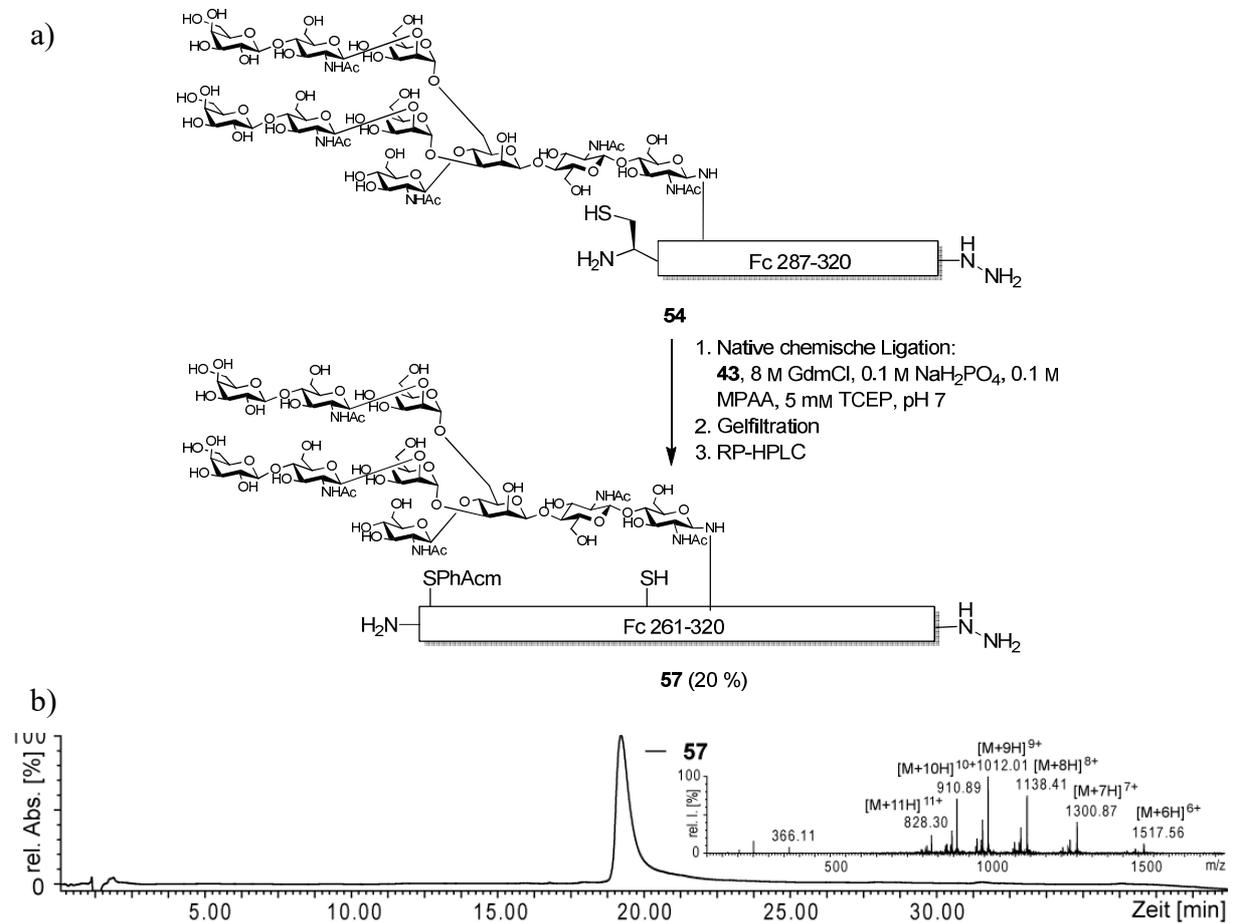


Abbildung 60: a) Ligation zum IgG1 Fc 261-320 Deca Fragment **57** und b) LC-MS von **57** nach Gelfiltration und RP-HPLC.

4.6 Entschwefelung von IgG1 Fc 261-320 Glycopeptiden

Zur selektiven Entschwefelung von Cys-287 der Fragmente, **56**, **58** und **59** nach Danishefsky *et al.* wurden Triscarboxyethylphosphin (TCEP) als Reduktionsmittel und VA-044 als Radikalinitiator verwendet (Abbildung 61a).²⁸ MESNa wurde hinzugegeben, um die Reaktion zu beschleunigen. Die Reaktion stattdessen erfolgte unter Schutzgasatmosphäre bei 35 °C über 18 h. Wurde die Reaktion stattdessen bei RT über 18 h durchgeführt, war die Entschwefelung

nicht vollständig. Es war ein großer Überschuss an Thiol und TCEP notwendig, um die Reaktion zur Vollständigkeit zu bringen.

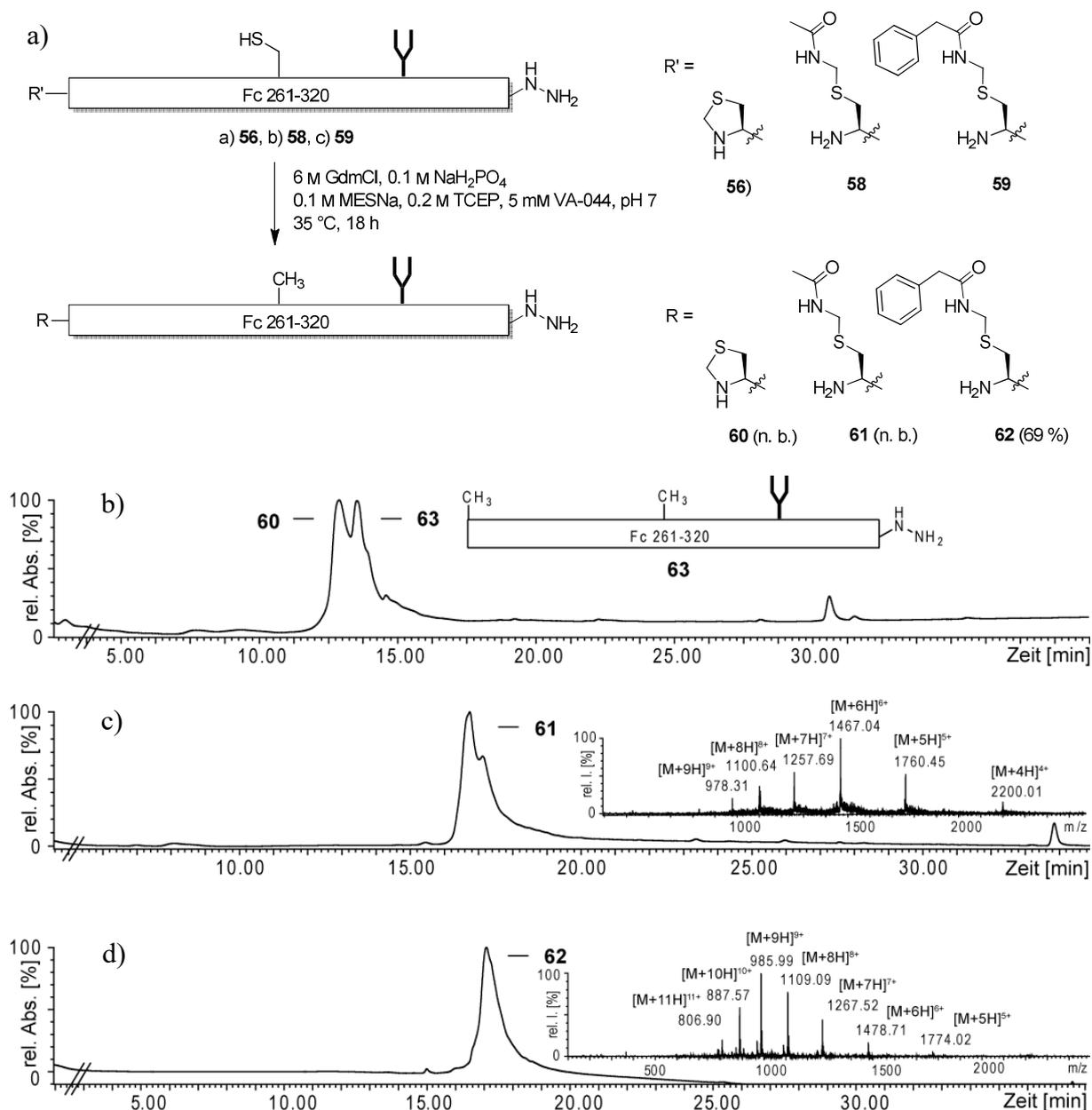


Abbildung 61: a) Entschwefelung der IgG1 Fc 261-320 Glycopeptide und LC-MS von b) IgG1 Fc 261-320 (Thz) **60**; c) IgG1 Fc 261-320 (PhAcm) **62**; d) IgG1 Fc 261-320 (Acm) **61**.

Anschließend wurden die entschwefelten Glycopeptide durch Gelfiltration gereinigt. Beim Thiazolidinfragment IgG1 Fc 261-320 Thz **60** öffnete sich das Thiazolidin schon zu einem geringen Teil vor der Entschwefelung. Unter den Entschwefelungsbedingungen war das

Thiazolidin labil, dadurch wurde das freigesetzte N-terminale Cystein ebenfalls entschwefelt **63** (Abbildung 60b).

Es wurde versucht, das N-terminale Cystein des Hydrazids **64** nach der Ligation als 2-Methyl, 2-Carboxy-Thiazolidin zu schützen (Abbildung 62a). Jedoch reagiert auch das Hydrazid mit Brenztraubensäure zu einem stabilen Hydrazon **66** (Abbildung 62b), wodurch der C-Terminus ebenfalls blockiert ist.

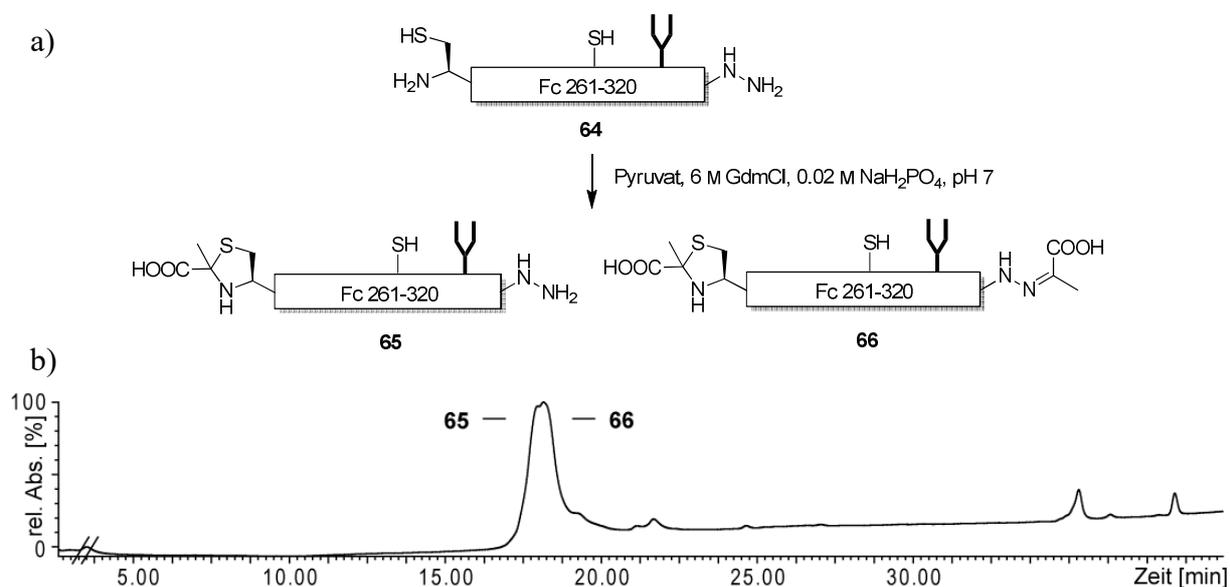


Abbildung 62: a) Umsetzung des N-terminalen Cysteins von Fragment **64** mit Brenztraubensäure und b) RP-HPLC Chromatogramm.

Aufgrund der Labilität des Thiazolidins von Glycopeptid **56** wurde mit den AcM- (**58**) bzw. PhAcM- (**59**) geschützten Fragmenten weitergearbeitet. Die LC-MS Analyse nach der Entschwefelung des IgG1 Fc 261-320 (AcM) Fragments **61** zeigte, dass die AcM-Schutzgruppe unter den Reaktionsbedingungen erwartungsgemäß stabil war (Abbildung 61c).¹³⁹ Die Entschwefelung war vollständig. Die LC-MS Analyse nach der Entschwefelung des IgG1 Fc 261-320 Cys(PhAcM) Fragments **62** zeigte, dass die PhAcM-Schutzgruppe unter den Reaktionsbedingungen ebenfalls stabil und die Reaktion vollständig war (Abbildung 61d). Die Ausbeute betrug 69 %. Das Fragment IgG1 Fc 261-320 Deca **57** wurde analog entschwefelt (Abbildung 63a).

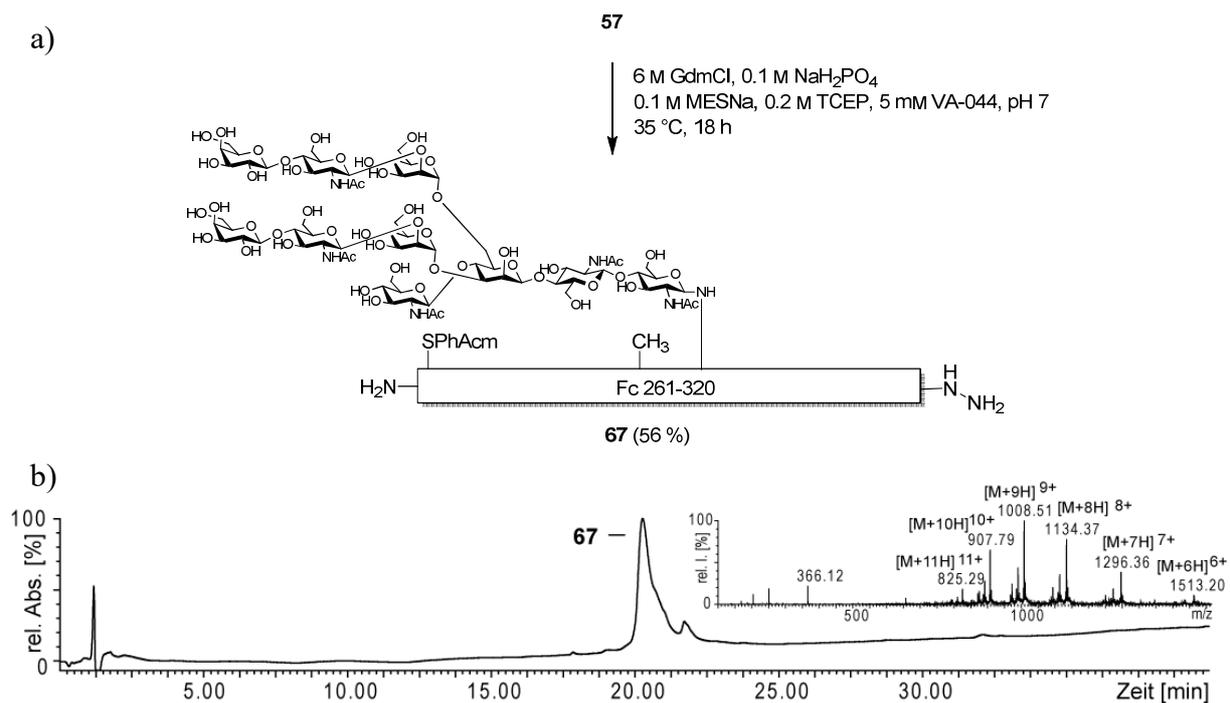


Abbildung 63: a) Entschwefelung von Fragment **57** und b) LC-MS von IgG1 Fc 261-320 (Deca) **67**.

Das LC-MS zeigte die Vollständigkeit dieser Reaktion (Abbildung 63b). Im Massenspektrum sind lediglich Fragmentierungen des Oligosaccharids zu finden.

4.7 Abspaltung der PhAc-Gruppe des 261-320 Glycopeptids

Um eine native chemische Ligation am N-Terminus der Fc 261-320 Glycopeptide **61** und **62** zu ermöglichen, wurde versucht die Ac- und PhAc-Gruppe zu entfernen. *F. Wunderlich* hat während seiner Bachelorarbeit die Entschützung der Ac- bzw. PhAc- Schutzgruppe untersucht.¹⁴⁰ Es stellte sich heraus, dass unter den gleichen Bedingungen die Ac- Schutzgruppe schwieriger zu spalten war als die PhAc Schutzgruppe. Daher wurde die Entschützung der PhAc Gruppen **62** durch AgOAc in TFA getestet. Zu einer 1 mM Lösung von Fc 261-320 Cys(PhAc) **62** in TFA wurden 60 eq AgOAc gegeben (Abbildung 64a). Nach 12 h wurde Ag⁺ durch DTT als Sulfid ausgefällt. Der Anteil an Produkt **68** lag allerdings nur bei ca. 50 %. Das Rohprodukt wurde durch RP-HPLC gereinigt, wonach **68** in einer Ausbeute von 36 % erhalten wurde (Abbildung 64b).

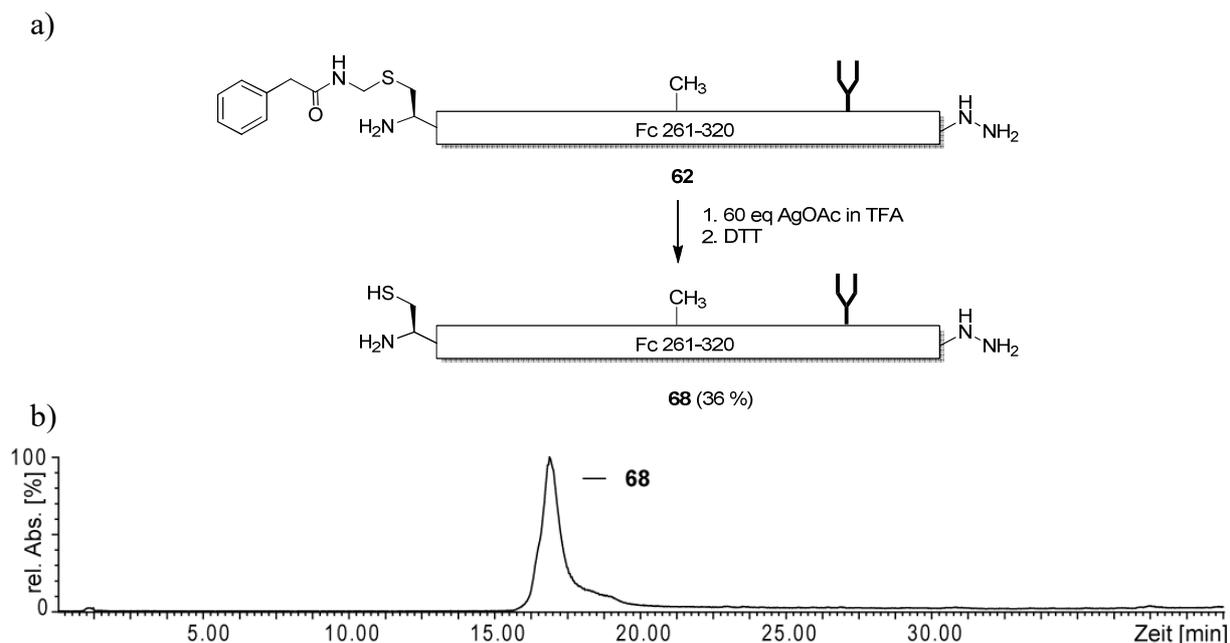


Abbildung 64: a) PhAcM-Abspaltung von IgG1 Fc 261-320 (PhAcM) **62** und b) RP-HPLC Chromatogramm von IgG1 Fc 261-320 **68**.

Eine Ligation des Glycopeptids **68** mit dem IgG1 Fc 223-260 Thioester **36** gelang jedoch nicht. Daher wurde versucht, die PhAcM- Schutzgruppe enzymatisch zu entfernen. *F. Albericio et al.* zeigten, dass PhAcM-Schutzgruppen von Cysteinen im Peptid durch immobilisierte Penicillin G Acylase entfernt werden können.¹²⁴ Das Prinzip ist in Abbildung 65 dargestellt.¹²⁵ Penicillin G Acylase (E.C. 3.5.1.11) ist eine Hydrolase, die spezifisch Phenylacetamidbindungen hydrolysiert. Kommerziell hat PGA große Bedeutung bei der industriellen Produktion von Betalactam Antibiotika wie Penicillin G.

Die enzymatische Abspaltung einer N-terminalen PhAcM-Schutzgruppe wurde an der Peptidylsäure IgG1 Fc 261-286 **69** getestet. Das Peptid wurde in 0.1 M Tris-Puffer bei pH 7 gelöst und anschließend wurden 0.45 U an löslicher PGA hinzugegeben. EDTA wurde verwendet, um eventuell vorhandene Metallionen zu chelatisieren. Zusätzlich wurde DTT als Reduktionsmittel eingesetzt. Die Reaktion wurde 1 h unter Schutzgasatmosphäre inkubiert (Abbildung 66a).

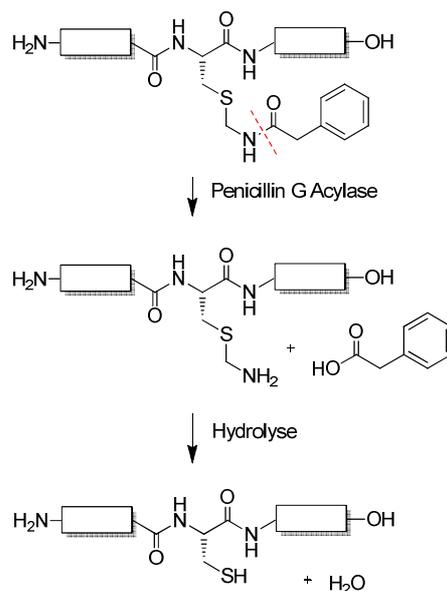


Abbildung 65: Enzymatische Abspaltung der PhAcM Schutzgruppe bei Peptiden durch Penicillin G Acylase

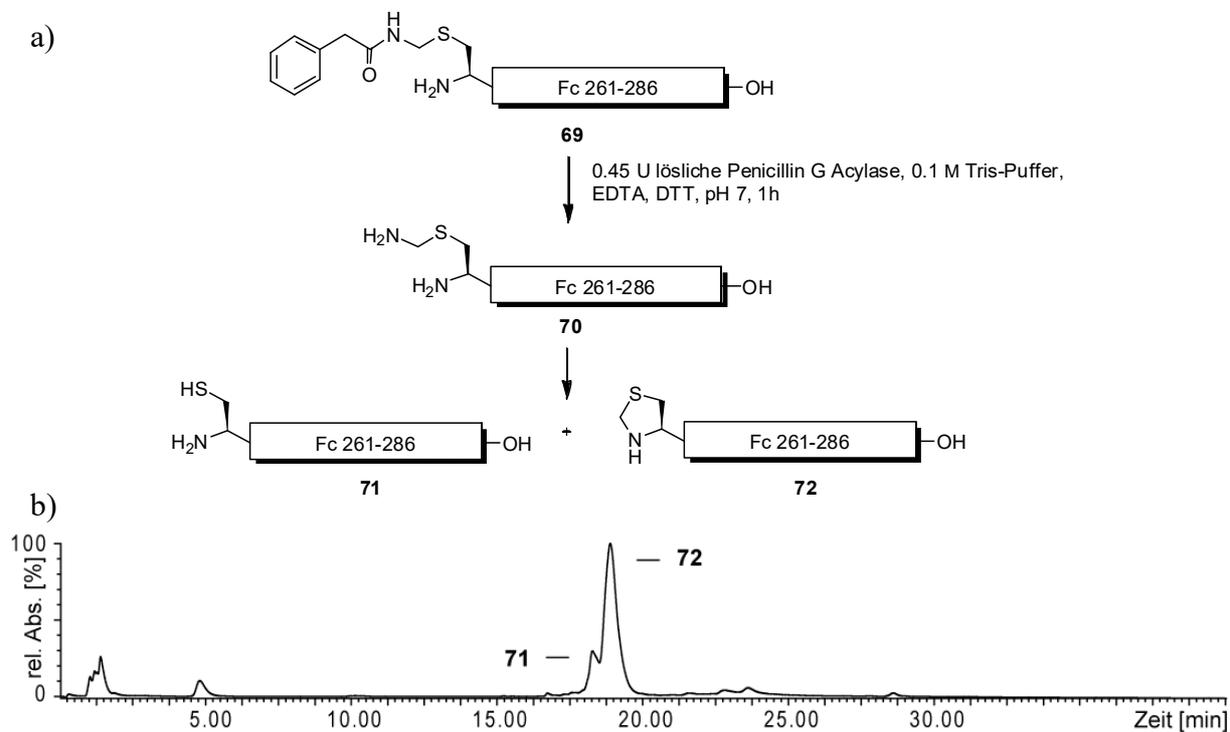


Abbildung 66: a) PhAcM-Entschützung von IgG1 Fc 261-286 **69** durch PGA und b) RP-HPLC Chromatogramm.

Laut LC-MS Analyse wurde neben dem gewünschten Produkt **71** hauptsächlich das Thiazolidinderivat **72** gefunden (Abbildung 66b). Ein Problem bei der Freisetzung von N-terminalen Cysteinen ist, dass generell eine Folgereaktion mit Aldehyden möglich ist. Daher wurde zusätzlich Cystein (20 mM) in die Reaktionslösung gegeben, um die Bildung von Thiazolidinen zu reduzieren. Die enzymatische Spaltung wurde mit dem IgG1 Fc 261-320 Glycopeptid **62** getestet (Abbildung 67a). Dieses Fragment war allerdings in der wässrigen Pufferlösung nicht löslich. PGA kann auch in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln wie MeOH, DMF, NMP verwendet werden.¹²⁵ Zunächst wurde daher 20 % CH₃CN zur Löslichkeitsverbesserung in die Reaktionslösung gegeben. Aufgrund der bleibenden Löslichkeitsprobleme war die Reaktion auch nach mehrmaliger Zugabe von PGA nicht vollständig (Abbildung 67b).

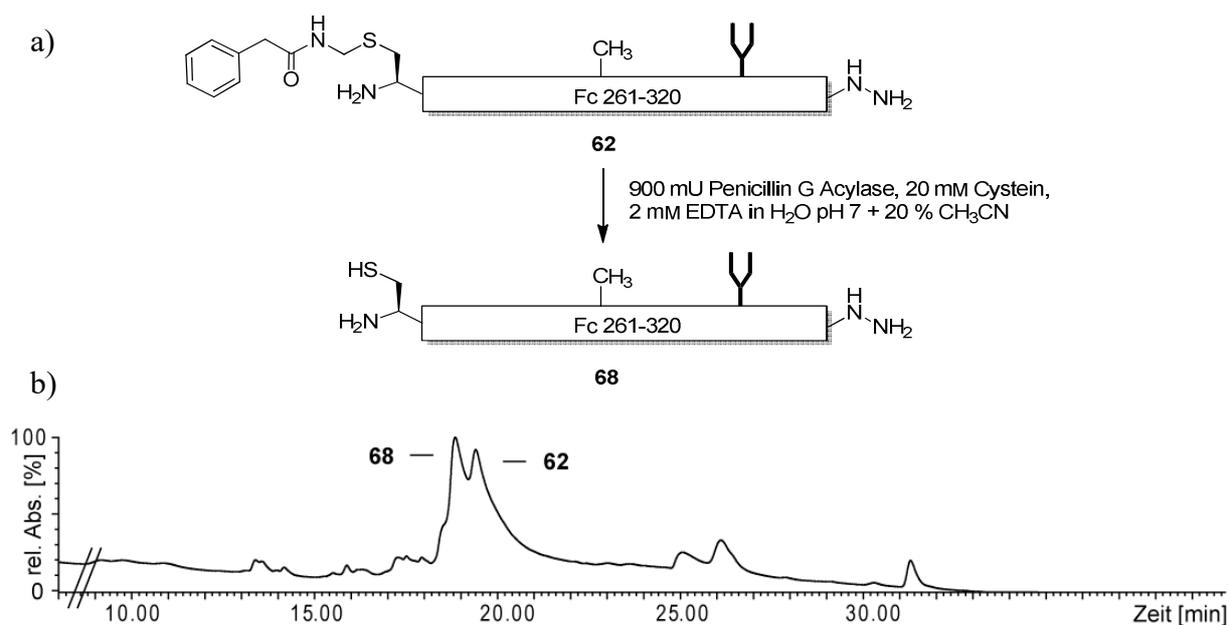


Abbildung 67: Enzymatische Entschützung der PhAcm-Gruppe von **62** und b) RP-HPLC Chromatogramm von **68**.

Schließlich wurde eine Konzentration von 2 M Guanidiniumchlorid in der Reaktionslösung eingestellt, wodurch eine vollständige Löslichkeit von Fragment **62** erzielt wurde (Abbildung 68a). Nach 3 h war die Entschützung vollständig und wurde durch die Zugabe von DTT beendet. Das Rohprodukt wurde durch Gelfiltration gereinigt und ergab das Cysteinfragment IgG1 Fc 261-320 in guter Reinheit und mit 60 % Ausbeute (Abbildung 68b). Der Anteil an gebildetem Thiazolidin **60** war gering.

Anschließend wurde das Hydrazid **73** diazotiert und zum Thioester **74** umgesetzt (Abbildung 70).¹⁴¹ Die anschließende Ligation des Thioesters **74** mit dem rekombinanten Cysteinfragment **75**¹⁴² war jedoch erfolglos. Peptidthioester mit C-terminalen Lysin können ein ϵ -Caprolactam (**76**) bilden, wobei diese Nebenreaktion in diesem Fall wahrscheinlich schon bei der Thiolyse von Peptid **73** begann.¹⁴³

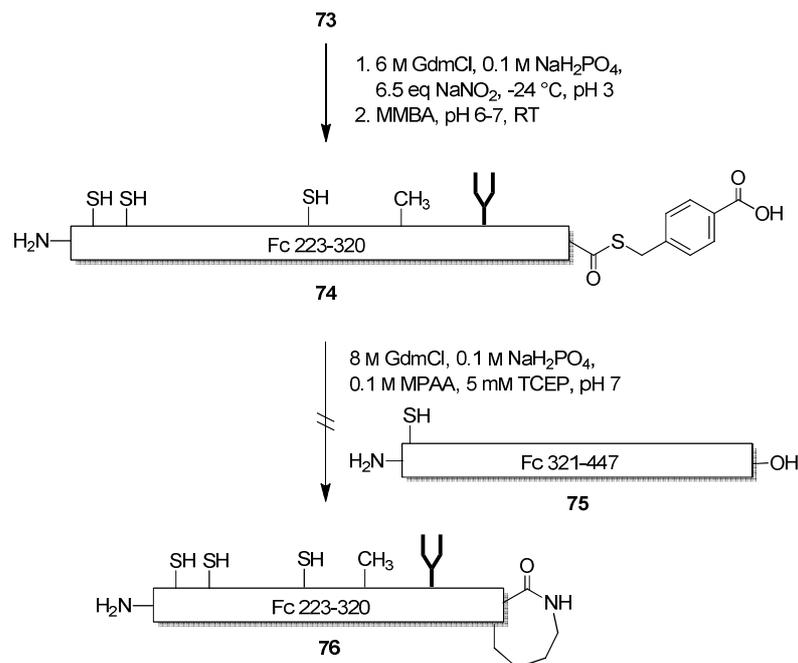


Abbildung 70: Aktivierung des Hydrazids **73** und native chemische Ligation mit dem Cys-Peptid **75**.

Diese Reaktion zum ϵ -Caprolactam **76** ist nicht reversibel und erlaubt keine Ligation. Folglich sollte eine orthogonale Schutzgruppe für das C-terminale Lysin¹⁴³ gesucht werden, um Nebenreaktionen auf der Stufe des Thioesters zu verhindern.

5. Semisynthese von Bikunin

Der therapeutisch eingesetzte Proteaseinhibitor Bikunin diente als Modellproteoglycan, um eine Semisynthese für *N*-glycosylierte Proteoglycane zu entwickeln. Bikunin ist über sechs Disulfidbrücken stabilisiert. Das *N*- und *O*-glycosylierte Bikunin 1-147 **M** sollte durch sequentielle native chemische Ligation¹¹⁸ aufgebaut werden. Dafür sollte der *O*-Glycopeptidthioester **N** und das *N*-Glycopeptidhydrazid **O** bereitgestellt werden. Das Cysteinfragment Bikunin 51-147 **Q** mit *N*-terminalem His₆-SUMO *Tag* sollte durch rekombinante Expression aus *E. coli* gewonnen werden.

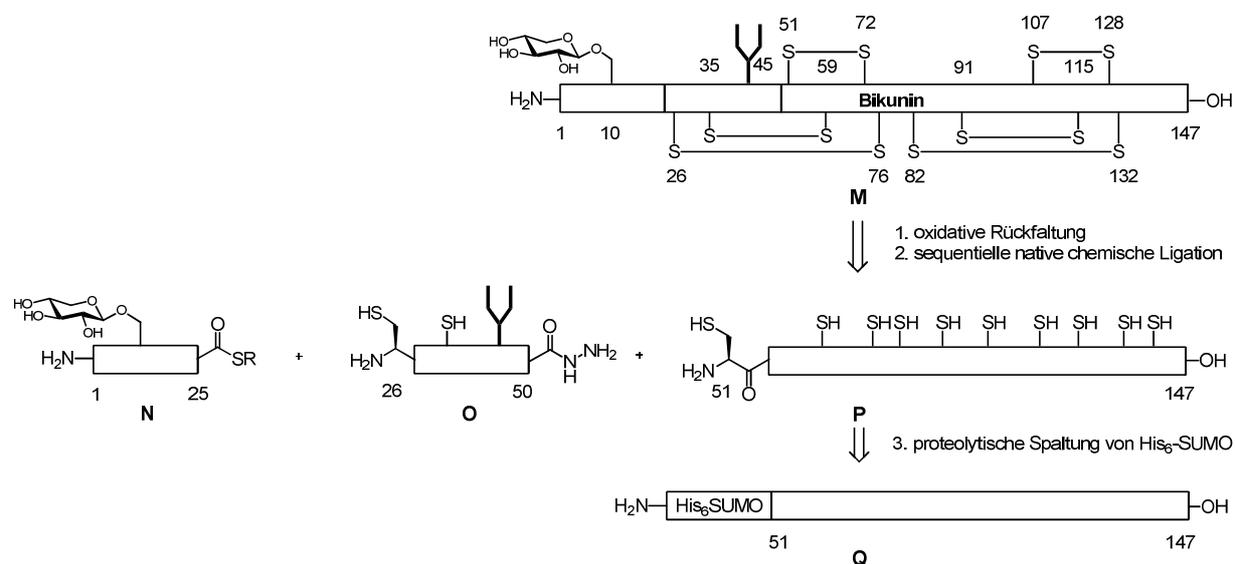


Abbildung 71: Retrosynthese von *N*- und *O*-glycosyliertem Bikunin 1-147 **M**.

5.1 Synthese von Bikunin 1-25 *O*-Glycopeptiden

Die lineare Synthese von Bikunin 1-25 wurde zunächst von *M. Fischer* während einer Bachelorarbeit versucht und war nicht erfolgreich.¹⁴⁴ Folglich wurde eine konvergente Synthese des Bikunin 1-25 Glycopeptids versucht. Um Bikunin 1-25 durch Segmentkondensation zu erhalten, wurden das Bikunin 1-9 Peptid **79** und das Bikunin 10-25 Glycopeptid **86** an der Festphase aufgebaut. Die geschützte Bikunin 1-9 Peptidylsäure **79**

konnte am 2-Cl-Tritylchlorid-Polystyrol-Harz **77** maschinell synthetisiert werden (Abbildung 72a).

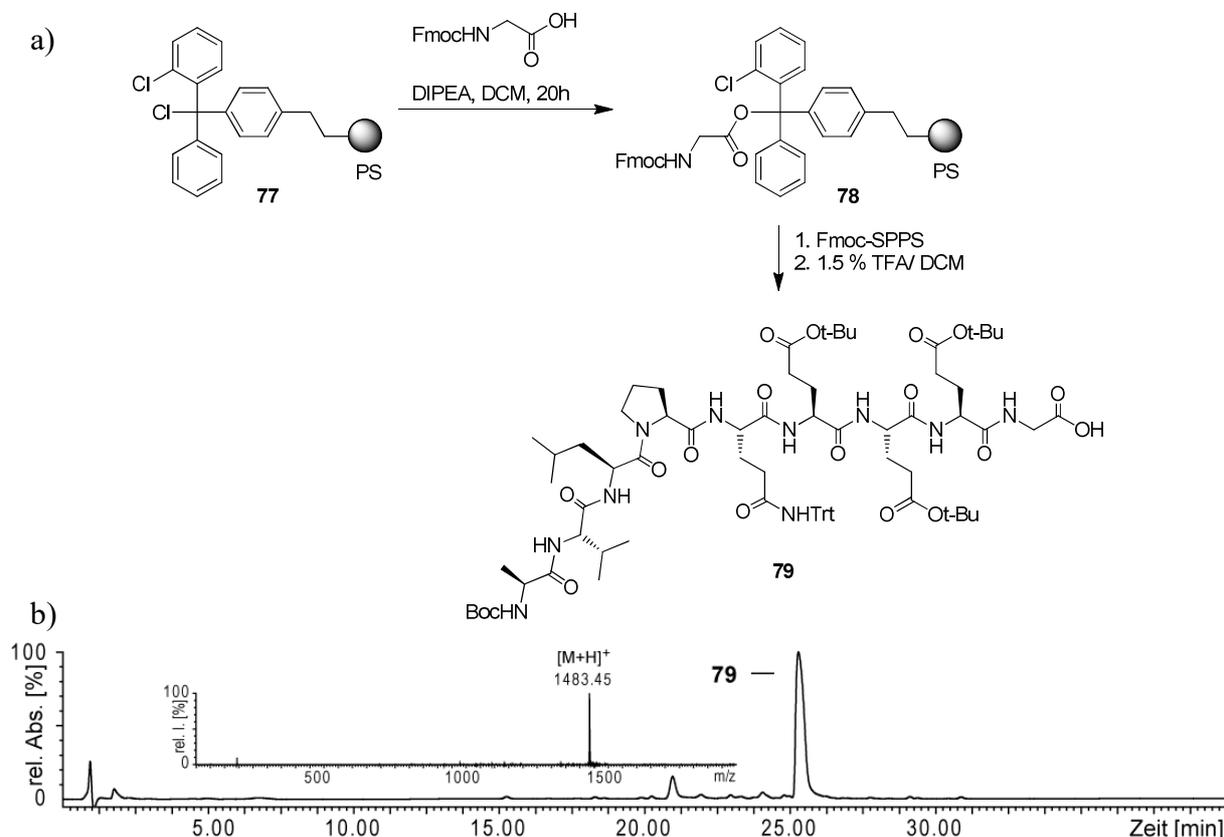


Abbildung 72: a) Synthese und b) LC-MS der geschützten Peptidylsäure Bikunin 1-9 **79**.

Die geschützte Peptidylsäure **79** wurde mit 1.5 % TFA in DCM vom Harz abgespalten. Es wurden 536 mg an Rohpeptid erhalten, was einer Ausbeute von 71 % entsprach. Das Peptidfragment **79** konnte in guter Reinheit erhalten (Abbildung 72b) und wurde in dieser Form zur Fragmentkupplung eingesetzt. Das Fragment Bikunin 11-25 **81** wurde am 2-Cl-Trt-ChemMatrix Harz **33** aufgebaut (Abbildung 73). In den Positionen 20 und 17 wurden Pseudoprolindipeptide eingebaut. In Position 10 des Peptids wurde die Glycosylaminosäure Fmoc-Xyl-Ser-OH **82** eingesetzt. Dieser Baustein wurde von der Arbeitsgruppe *Hung* zur Verfügung gestellt.¹⁴⁵ Ziel war es, an Serin-10 eine Chondroitinsulfatkette aufzubauen. Dies könnte durch chemische oder durch enzymatische Verlängerung der Glycosylaminosäure **82** erfolgen.

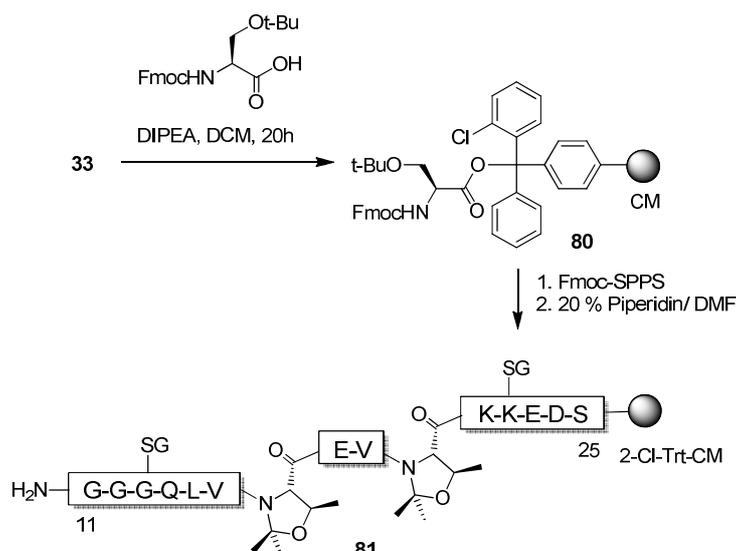


Abbildung 73: Synthese von Bikunin 11-25 **81**.

Eine Schwierigkeit bei der Kupplung von Glycosylaminosäuren ist, dass O-glycosylierte Serin-Bausteine zur basenkatalysierten Racemisierung über den Oxazolone Mechanismus neigen (Abbildung 74).¹⁴⁶

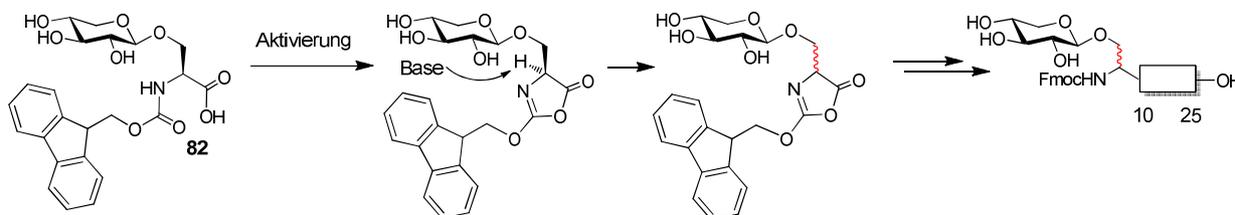


Abbildung 74: Racemisierung der Glycosylaminosäure **82** über den Oxazolone Mechanismus.

Daher wurden verschiedene Bedingungen getestet, um die Glycosylaminosäure **82** an das Fragment Bikunin 11-25 **81** zu koppeln. Zunächst wurde versucht durch milde Aktivierungsbedingungen des Bausteins **82** die Epimerisierung zu minimieren. Die O-Glycosylaminosäure reagierte gut mit Pentafluorphenyltrifluoressigsäure **83** zum Pentafluorphenylester **84** (Abbildung 75).¹⁴⁷ Bei der Kupplung des Pentafluorphenylesters **84** an das Peptid **81** entstand jedoch kaum Produkt.

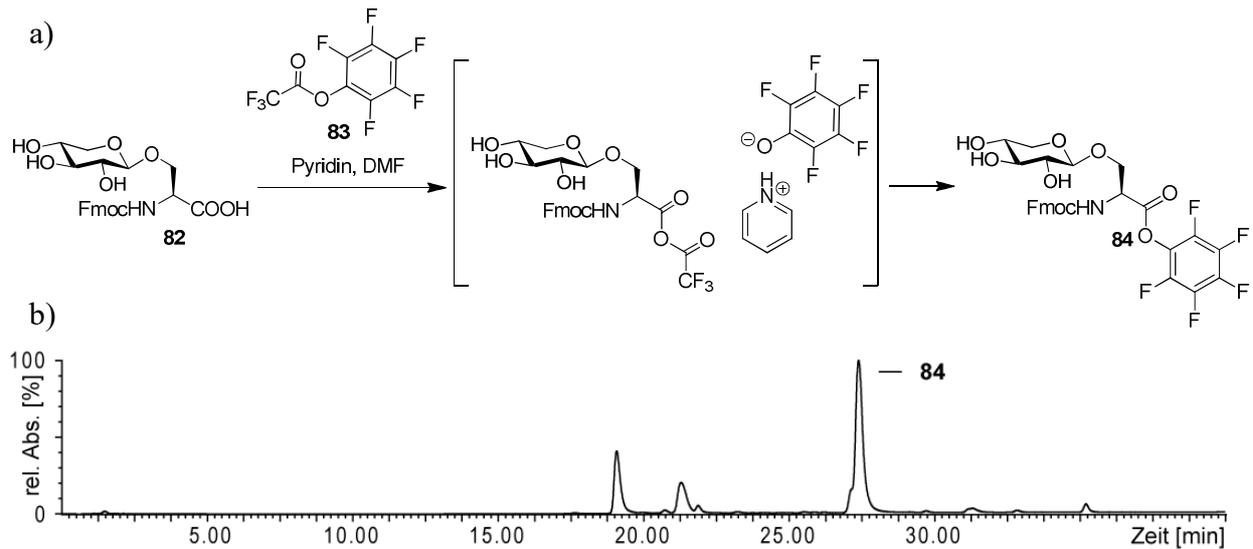


Abbildung 75: a) Darstellung und b) RP-HPLC Chromatogramm des Pentafluorphenylesters **84**.

Daher wurde versucht, die Glycosylaminosäure **82** als symmetrisches Anhydrid zu koppeln (Abbildung 76).¹⁴⁸ Die Aktivierung von **82** erfolgte substöchiometrisch mit DIC. Nach analytischer TFA-Abspaltung vom Harz **86** wurden 24 % an epimerisierten Glycopeptid gefunden (Abbildung 77a). Da sich das Epimer **86a** chromatografisch nur wenig vom Produkt unterscheidet, war diese Aktivierungsmethode nicht geeignet.

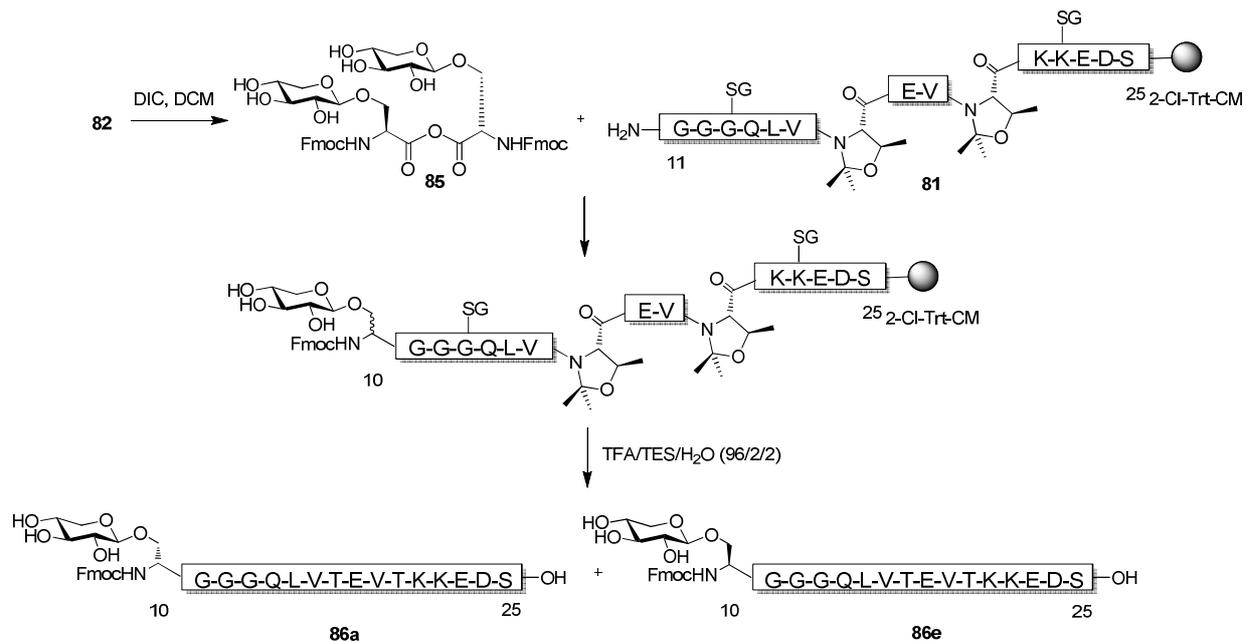


Abbildung 76: Darstellung des symmetrischen Anhydrids **85** und Kupplung an das Harz **81**.

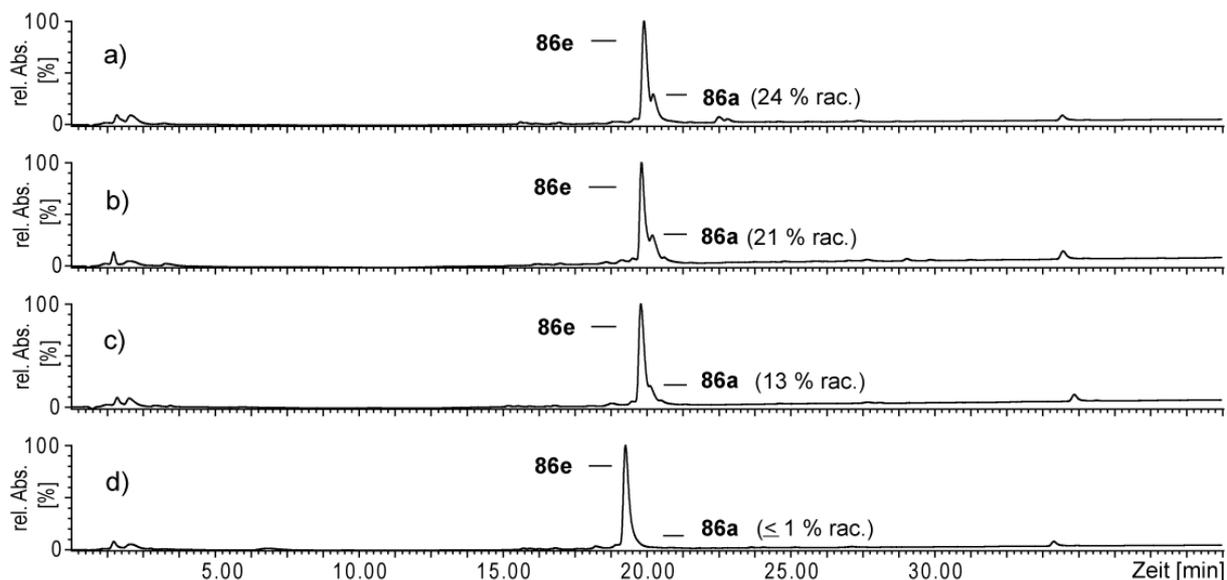


Abbildung 77: RP-HPLC Chromatogramme der Optimierung der Aktivierungsbedingungen von Fmoc-Xyl-Ser-OH **82**; a) Aktivierung durch das symmetrische Anhydrid **85**; b) DIC, HOAt; c) DIC, Cl-HOBt; d) DIC, HOObt.

Anschließend wurde DIC/ HOAt zur Aktivierung von **82** getestet. Das Harz **81** wurde mit 2 eq Fmoc-Xyl-Ser-OH **82**, 2 eq DIC und 2 eq HOAt in DCM/DMF (1:1) für 1.5 h umgesetzt. Die LC-MS Analyse des Produkts zeigte jedoch 21 % an Stereomutation **86a** (Abbildung 77b). Da Kupplungen im sauren Milieu meist zu weniger Epimerisierung führen, wurde Cl-HOBt als Additiv getestet. Die weiteren Bedingungen blieben gleich. Das Harz **81** wurde mit 2 eq Fmoc-Xyl-Ser-OH **82**, 2 eq DIC und 2 eq Cl-HOBt in DCM/DMF (1:1) für 1.5 h umgesetzt. Die LC-MS Analyse zeigte einen Rückgang auf 13 % Stereomutation **86a** (Abbildung 77c).

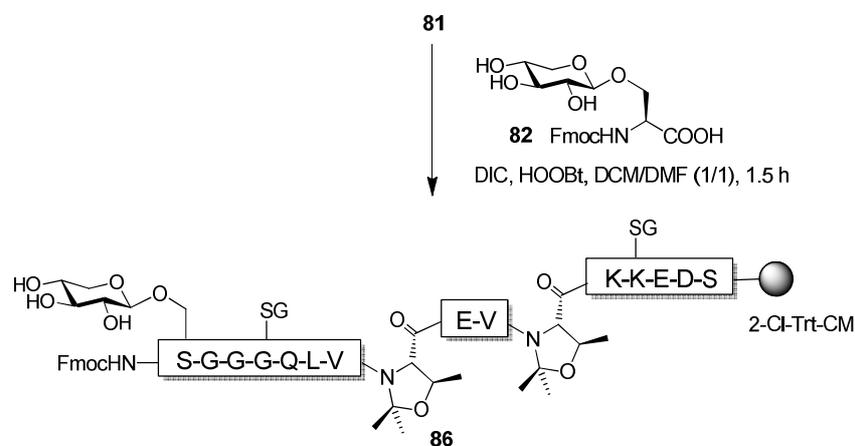


Abbildung 78: Synthese von Bikunin 10-25 **86**.

Schließlich wurde das Additiv HOOBt¹⁴⁹ verwendet, da HOOBt die Racemisierung bei der Peptidsynthese stark reduzieren kann.¹⁵⁰ Es kann jedoch gerade bei einem Überschuss an HOOBt zu einer Nebenreaktion kommen (Abbildung 79).¹⁵⁰ Daher ist es wichtig, die Aminosäure mit dem Carbodiimid vorzuaktivieren.

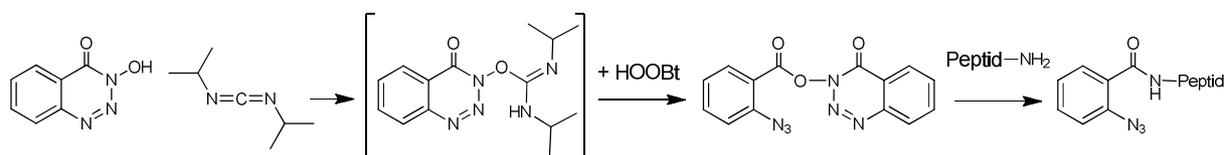


Abbildung 79: Nebenreaktion von HOOBt und DIC bei Kupplungen.

Die Kupplung der *O*-Glycosylaminosäure **82** erfolgte mit 2 eq Fmoc-Xyl-Ser-OH, 2 eq HOOBt und 2 eq DIC in DMF/DCM (1:1) für 1.5 h (Abbildung 78). Diese Kupplungsbedingungen führten nur zu $\leq 1\%$ an Epimerisierung laut LC-MS Analyse (Abbildung 77d). Damit konnte der Kombination aus DIC und HOOBt eine besonders günstige Methode zur Kupplung der Glycosylaminosäure **82** gefunden werden.

Anschließend konnte die Segmentkondensation mit dem Glycopeptid Bikunin 10-25 **86** an der Festphase und der geschützten Peptidylsäure Bikunin 1-9 **79** untersucht werden (Abbildung 80a). Da es sich bei der C-terminalen Aminosäure um ein Glycin handelte, konnte **79** mit PyBOP aktiviert werden. Die Reaktion erfolgte im Mikrowellenreaktor.

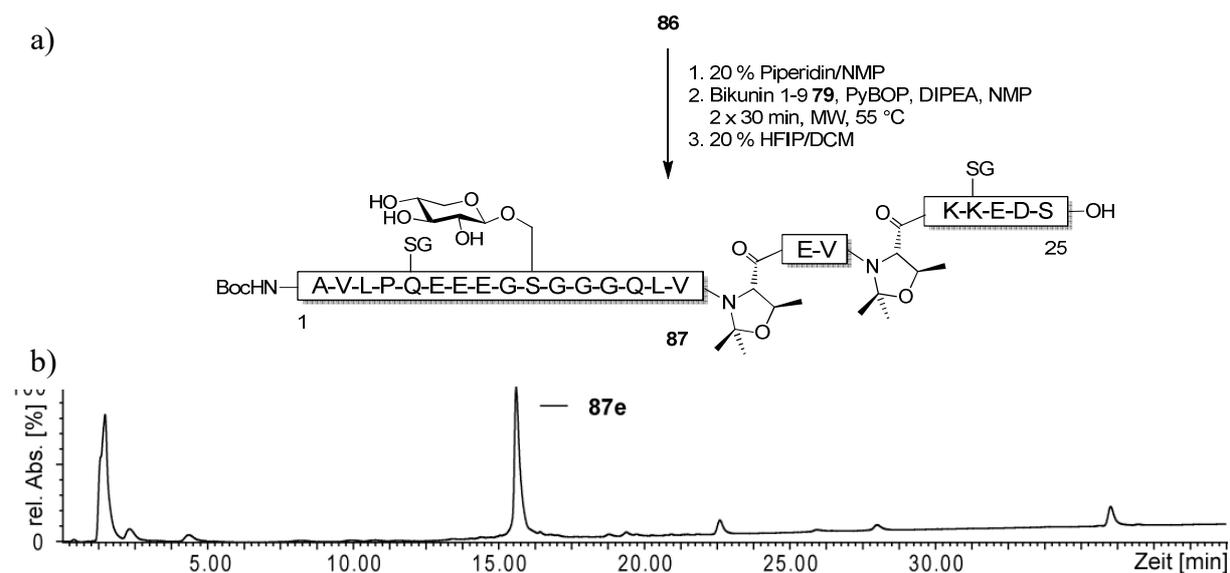


Abbildung 80: a) Darstellung des Bikunin 1-25 Glycopeptids **87** durch Segmentkondensation und b) RP-HPLC Chromatogramm von Bikunin 1-25 **87e**.

Nach einer Testentschützung mit 96 % TFA wurde das entschützte Peptid **87e** analysiert. Die LC-MS Analyse zeigte eine hohe Reinheit des Rohprodukts **87e** (Abbildung 80b). Die geschützte Peptidylsäure **87** wurde mit 20 % HFIP in DCM von der Festphase abgespalten.

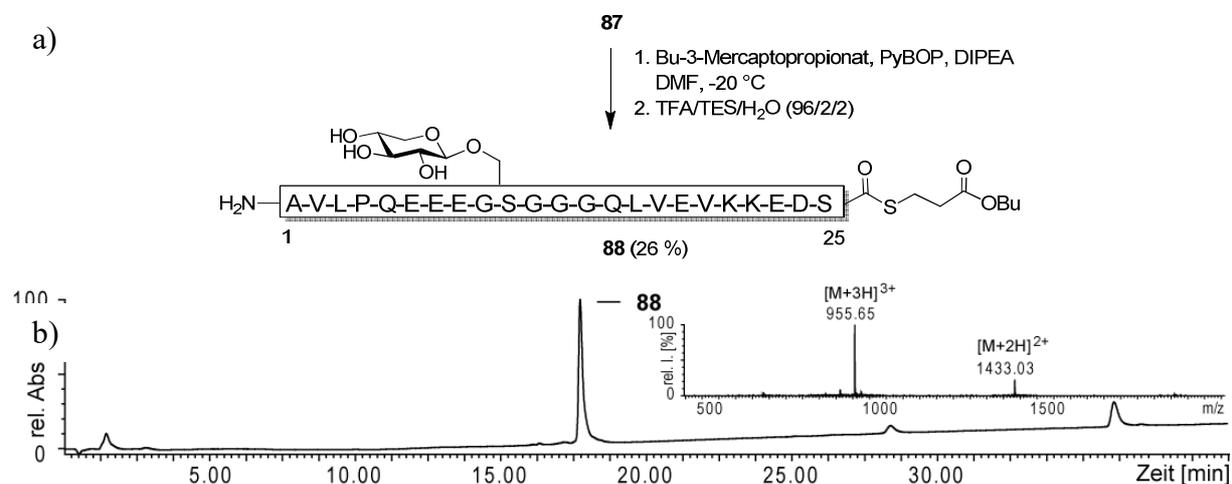


Abbildung 81: a) Synthese und b) LC-MS des Bikunin 1-25 Thioesters **88**.

Der Thioester **88** wurde nach *Y. Kajihara*^[151] dargestellt (Abbildung 81a). Die Reaktion wurde 3 h bei -20 °C belassen. Die relativ kurze Reaktionszeit und die niedrigen Temperaturen verhindern meist die Racemisierung. Anschließend wurde sauer entschützt und durch Gelfiltration von überschüssigem Thiol bzw. Disulfiden befreit. Das Disulfid koeluierte bei der RP-HPLC Reinigung mit dem Produkt und verhinderte eine Abtrennung der Nebenprodukte. Nach RP-HPLC (26 %) zeigte der erhaltene Thioester **88** eine hohe Reinheit (Abbildung 81b).

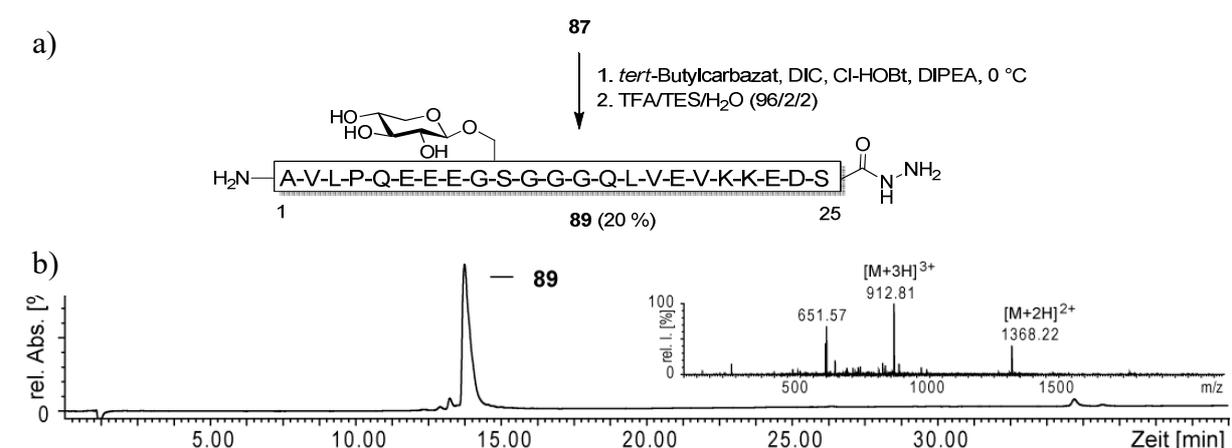


Abbildung 82: a) Darstellung und b) LC-MS des Bikunin 1-25 Hydrazids **89**.

Zusätzlich wurde das *O*-Glycopeptid als Hydrazid synthetisiert. (Abbildung 82a).¹²⁷ Dazu wurde die Peptidylsäure **87** in DCM gelöst und bei 0 °C mit 3 eq *tert*-Butylcarbazat, 2 eq Cl-HOBt und 2 eq DIPEA versetzt. Nach der Entschützung wurde das Hydrazid **89** durch RP-HPLC gereinigt (20 %) (Abbildung 82b).

5.2 Enzymatische Verlängerung von Bikunin 1-25 *O*-Glycopeptidhydraziden

An dem stabilen Bikunin 1-25 Glycopeptidhydrazid **89** sollte versucht werden, Teile der Verknüpfungsregion (*Linkage*) des Proteoglycans (GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1-O-Ser) enzymatisch aufzubauen. Glycosaminoglycane wie Chondroitinsulfat enthalten generell eine Gal- β -1,4-Xyl Verknüpfung mit dem Kernprotein. Die β -1,4-verknüpfte Galactose wird von der Galactosyltransferase β 4GalT7 durch Übertragung von UDP-Glactose auf Xylose übertragen.¹⁵² Diese Reaktion erfolgt bei pH 6-7.5 und benötigt Mn²⁺-Ionen.¹⁵³

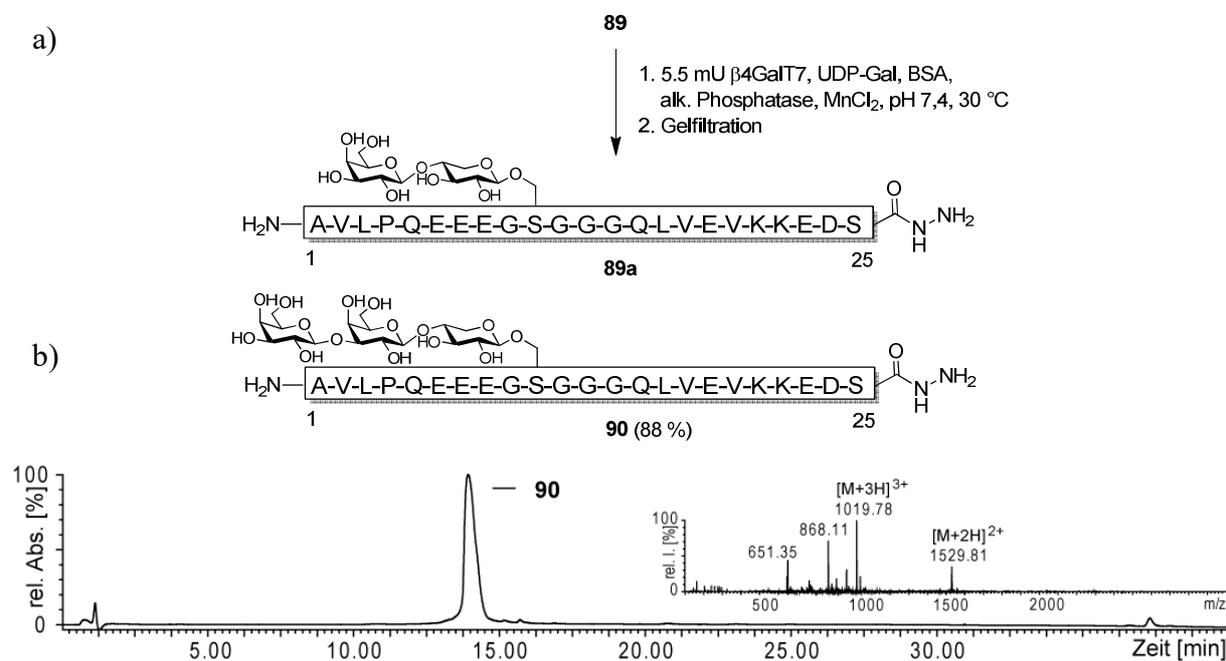


Abbildung 83: a) Enzymatische Galactosylierung von **89** und b) LC-MS von Bikunin 1-25 β 1Xyl4- β 1Gal3- β 1Gal **90**.

Für die enzymatische Verlängerung des Xylosyl-Glycopeptids **89** wurde die Galactosyltransferase β 4GalT7¹⁵⁴ von der Arbeitsgruppe *H. Clausen*¹⁵⁵ zur Verfügung gestellt.

Die Reaktion von **89** mit β 4GalT7 wurde bei pH 7.4 in Gegenwart von Mn^{2+} , BSA, alkalischer Phosphatase und UDP-Galactose bei 30 °C für 1 d inkubiert (Abbildung 83a). Anschließend wurde das Produkt durch Gelfiltration gereinigt und durch LC-MS überprüft (Abbildung 83b). Es war an dieser Stelle unklar, ob die zweite Galactose in der bei Chondroitin notwendigen 1,3- β -glycosidischen Verknüpfung übertragen wurde. Überraschenderweise wurde das erwartete Produkt **89a** nicht gefunden, sondern ausschließlich die Übertragung von zwei Galactosen zu **90** beobachtet. Daher wurde die glycosidische Bindung zwischen den beiden Galactosen durch NMR analysiert (Abbildung 84) und mit Literaturwerten verglichen.¹⁵⁶ Beide Galactoside sind β -konfiguriert ($J_{1',2'} = 7.95$ Hz, $J_{1'',2''} = 7.65$ Hz). Durch die 1,3-glycosidische Bindung zwischen den Galactosen kommt es zu einer Tieffeldverschiebung des C3-Signals der an Xylose gebundenen Galactose (Tabelle 1). Offensichtlich wurde eine zweite Galactosyltransferase (β 3GalT6) coisoliert, welche die zweite Galactose der Verknüpfungsregion überträgt.

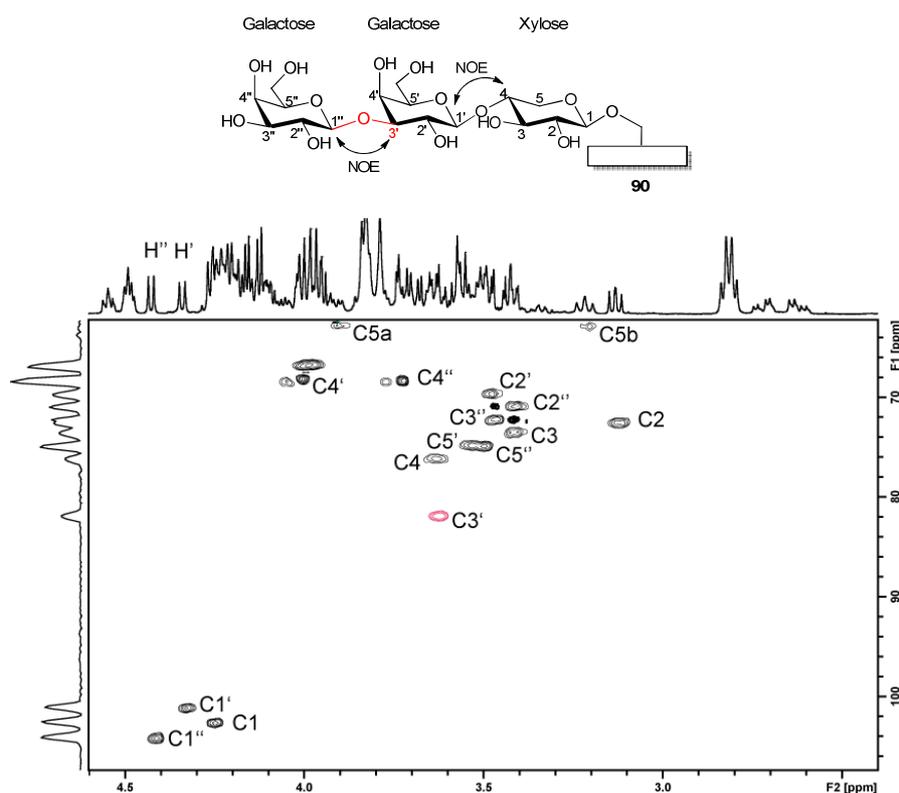


Abbildung 84: HSQC Zuordnung des Trisaccharidteils des Glycopeptids **90**.

Tabelle 1: 500 MHz ^{13}C und ^1H NMR chemische Verschiebungen des Trisaccharids von Bikunin 1-25 Xyl4-1Gal3-1Gal **90** gelöst in D_2O .

XYLOSE	C1	102.6	H1	4.25
	C2	72.5	H2	3.12
	C3	73.5	H3	3.50
	C4	76.2	H4	3.63
	C5	62.7	H5 ¹ /H5 ²	3.91/3.20
GALACTOSE'	C1'	101.2	H1'	4.33
	C2'	69.6	H2'	3.48
	C3'	81.9	H3'	3.63
	C4'	68.2	H4'	4.00
	C5'	74.8	H5'	3.54
GALACTOSE''	C1''	104.2	H1''	4.41
	C2''	70.9	H2''	3.40
	C3''	72.3	H3''	3.47
	C4''	68.3	H4''	3.73
	C5''	75.0	H5''	3.49

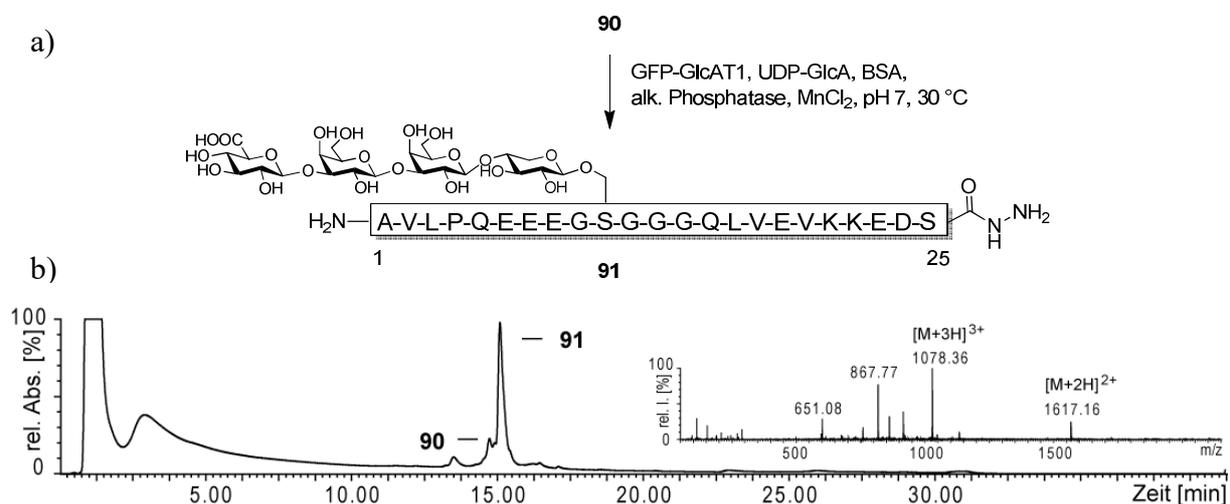


Abbildung 85: a) Darstellung und b) LC-MS von Bikunin 1-25 $\beta\text{1Xyl4-}\beta\text{1Gal3-}\beta\text{1Gal3-}\beta\text{1GlcA}$ **91**.

Da das Trisaccharidglycopeptid **90** die für Proteoglycane charakteristische Trisaccharideinheit aufwies, wurde die enzymatische Übertragung von Glucuronsäure zur Vervollständigung der

Linkage-Region getestet. Die β -1,3-Glucuronyltransferase 3 (GlcAT1) katalysiert den Transfer von Glucuronsäure auf das Trisaccharid Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1-O-Ser. GFP-markiertes GlcAT1 Enzym wurde von der Arbeitsgruppe *Moreman* zur Verfügung gestellt.¹⁵⁷ Für die Enzymaktivität ist Mn^{2+} bis zu einer Konzentration von 2 mM nötig, höhere Konzentrationen reduzieren allerdings die Aktivität.¹⁵⁸ Die Glucuronylierung erfolgte über zwei Tage bei pH 7 und 30 °C (Abbildung 85a) und wurde durch LC-MS überprüft. Nach einem Tag war die Reaktion nicht vollständig (ca. 50 % Umsatz). Nach zwei Tagen war vorwiegend Produkt **91** zu finden und nur ein geringer Teil an Edukt **90** (Abbildung 85b). Hiermit konnte gezeigt werden, dass die *Linkage*-Region am Glycopeptidhydrazid durch die benötigten Glycosyltransferasen aufgebaut werden kann. Gleichzeitig konnte die korrekte Verknüpfung der 1,3-verknüpften Galactosen indirekt bestätigt werden. Die Tetrasaccharidsequenz ist ein guter Ausgangspunkt, um daran später eine Chondroitinsulfatkette enzymatisch aufzubauen.

5.3 Synthese von Bikunin 26-50 *N*-Glycopeptiden

Um *N*-glycosyliertes Bikunin durch native chemische Ligation zugänglich zu machen, wird das *N*-glycosylierte Hydrazid Bikunin 26-50 **O** benötigt. Zunächst wurde die Synthese von Bikunin 26-50 als Hydrazid am Harz untersucht. Nach *K. Barlos et al.* wurde Hydrazin-2-Cl-Trityl-CM-Harz hergestellt.¹⁵⁹ Methionin wurde durch Norleucin ersetzt, um Nebenreaktionen wie Sulfoxidbildung zu vermeiden.

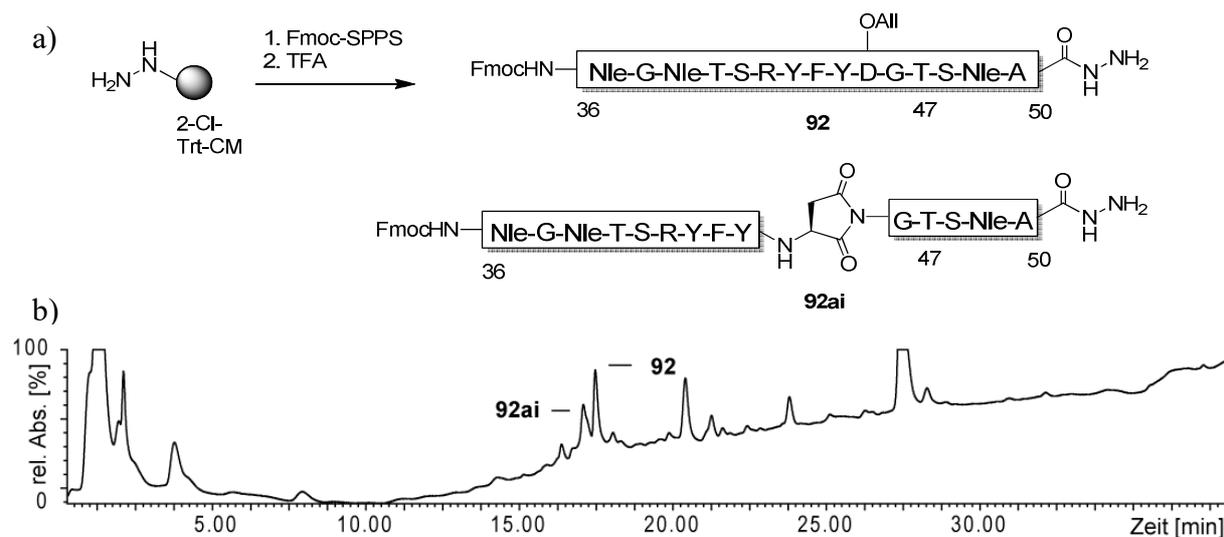


Abbildung 86: a) Synthese und b) RP-HPLC Chromatogramm von Bikunin 36-50 **92**.

Ein allylgeschütztes Aspartat wurde an der Glycosylierungsstelle 45 eingebaut. Um die Aspartimidbildung zu reduzieren, wurde ein Pseudoprolindipeptid in Position 47 vor der Glycosylierungsstelle verwendet. Die LC-MS Analyse von Bikunin 36-50 **92** zeigte, dass ein großer Anteil an Aspartimid **92ai** entstanden war (Abbildung 86b). Das zum Aspartat 45 benachbarte Glycin ist sterisch wenig anspruchsvoll, sodass es trotz des verwendeten Pseudoprolins während der Synthese zur Aspartimidbildung kommen kann (Abbildung 86a). Diese Nebenreaktion nimmt mit jeder basischen Fmoc-Abspaltung zu. Somit musste eine andere Möglichkeit gefunden werden, die Aspartimidbildung zu verhindern.

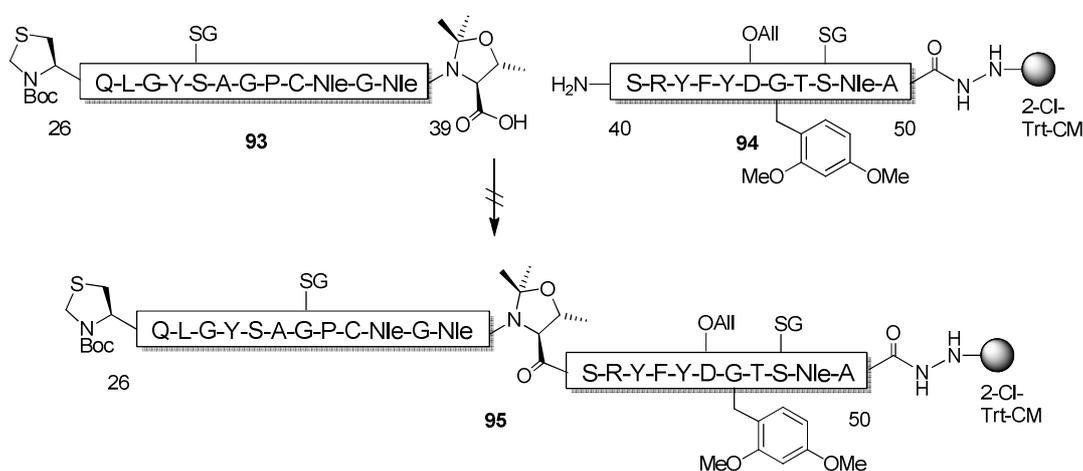


Abbildung 87: Segmentkondensation von Bikunin 26-39 und Bikunin 40-50.

Eine sichere Methode, um die Aspartimidbildung an Asp-45 zu verhindern, wäre die Verwendung einer 2,4-Dimethoxybenzyl *backbone* Schutzgruppe am Amidstickstoff von Gly-46. Diese Schutzgruppe ließ sich in Form der Aminosäure Fmoc-Dmb-Gly-OH einbauen. Die Synthese des Peptidhydrazids Bikunin 26-50 **95** am Harz durch konvergente SPPS wurde im Rahmen der Masterarbeit von C. Graf untersucht. Die separate Fragmentkupplung von Bikunin 26-39 **93** mit einem C-terminalen Pseudoprolin³⁵ und Dmb-geschützten Bikunin 40-50 **94** gelang aufgrund der geringen Löslichkeit von **93** allerdings nicht (Abbildung 87).¹⁶⁰

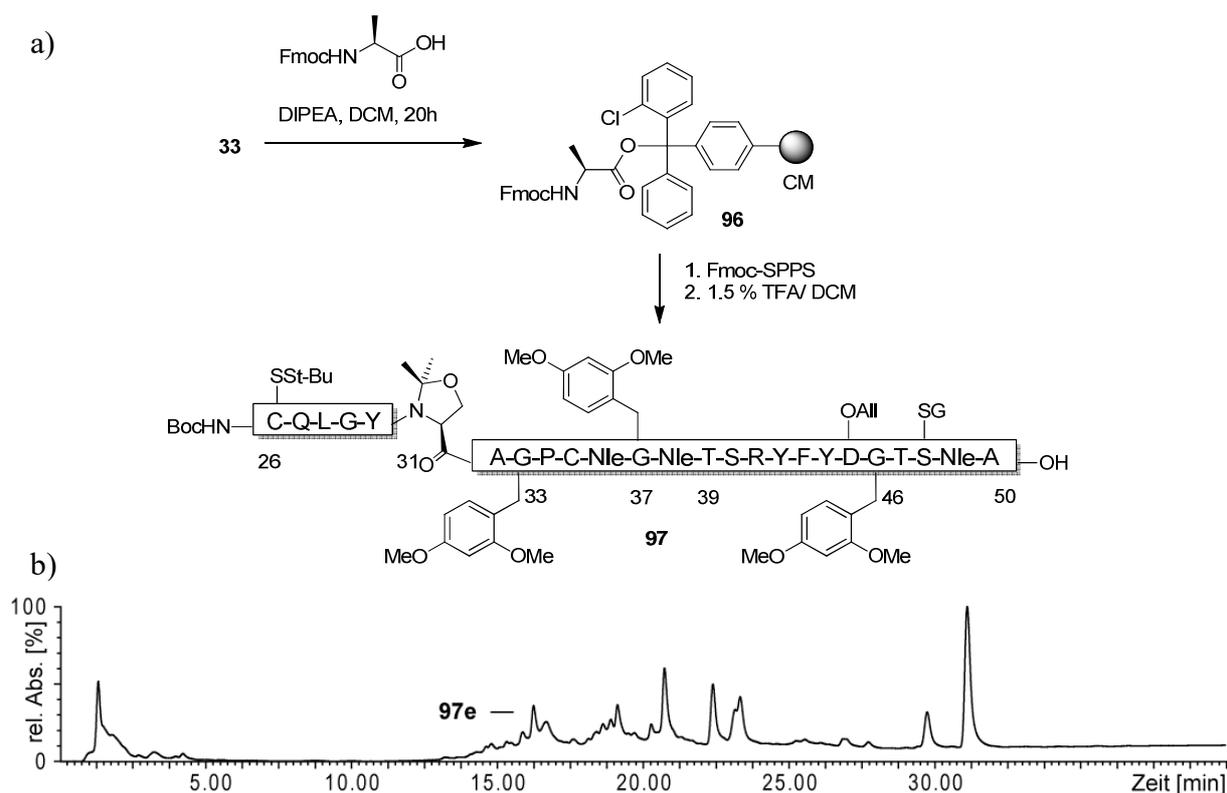


Abbildung 88: a) Synthese von Bikunin 26-50 **97** ohne Pseudoprolin-39 und b) RP-HPLC Chromatogramm von Bikunin 26-50 **97e**.

Daher wurde versucht Bikunin 26-50 **97** linear am Harz aufzubauen und das Hydrazid nachträglich anzubringen (Abbildung 88a). In den Positionen Gly-33, Gly-37 und Gly-46 wurden Dmb-Schutzgruppen eingebaut. Diese Schutzgruppe verhindert die Aspartimidbildung und hat löslichkeitsverbessernde Effekte. In Position 31 wurde ein Pseudoprolindipeptid eingebaut. Das Cystein in Position 26 war als Disulfid geschützt, da ein Thiazolidin während der Entschützung in dieser Position nicht stabil war. Das entschützte Peptid **97e** wurde durch LC-MS überprüft (Abbildung 88b) und zeigte zahlreiche Nebenprodukte. Daher wurde versucht, zusätzlich ein Pseudoprolindipeptid Fmoc-Nle-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH **99** in Position 39 einzubauen. Der Baustein ist kommerziell nicht erhältlich und wurde nach *M. Mutter et al.* hergestellt (Abbildung 89a).¹⁶¹

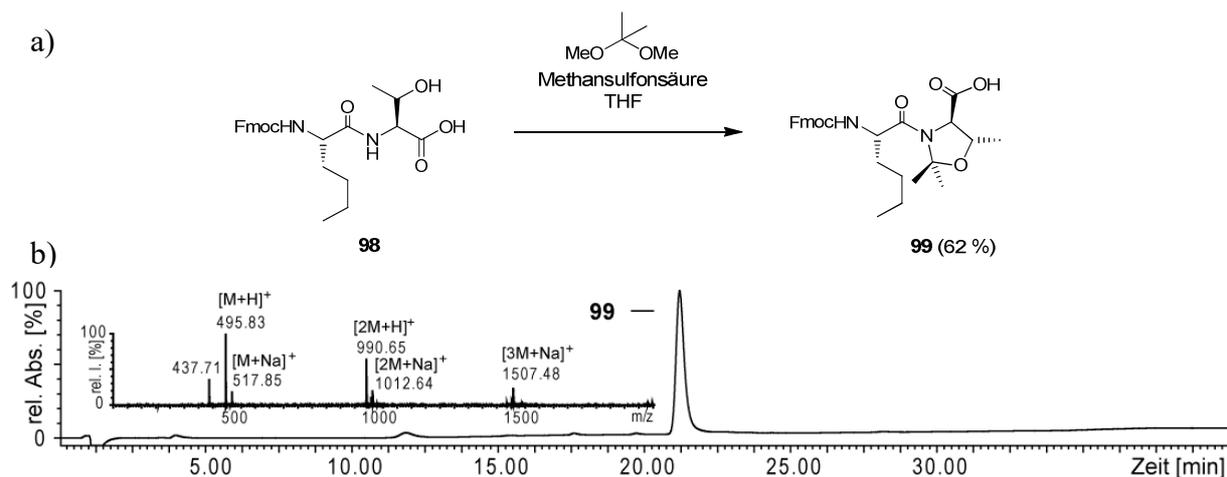


Abbildung 89: a) Synthese und b) LC-MS von Fmoc-Nle-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-OH **99**.

Das Dipeptid **98** wurde in THF_{abs} gelöst und mit 2,2-Dimethoxypropan und Methansulfonsäure als Katalysator versetzt. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches lag bei 4-5. Die Reaktion wurde 20 h bei 85 °C unter Rückfluss und Schutzgas gerührt. Durch Zugabe von Triethylamin wurde die Reaktion beendet. Das Rohprodukt **99** wurde durch Flash-Chromatographie gereinigt (62 %) und zeigte eine gute Reinheit (Abbildung 89b). Anschließend wurde die Synthese von Bikunin 26-50 **100** mit dem Pseudoprolindipeptid **99** in Position 39 durchgeführt (Abbildung 90).

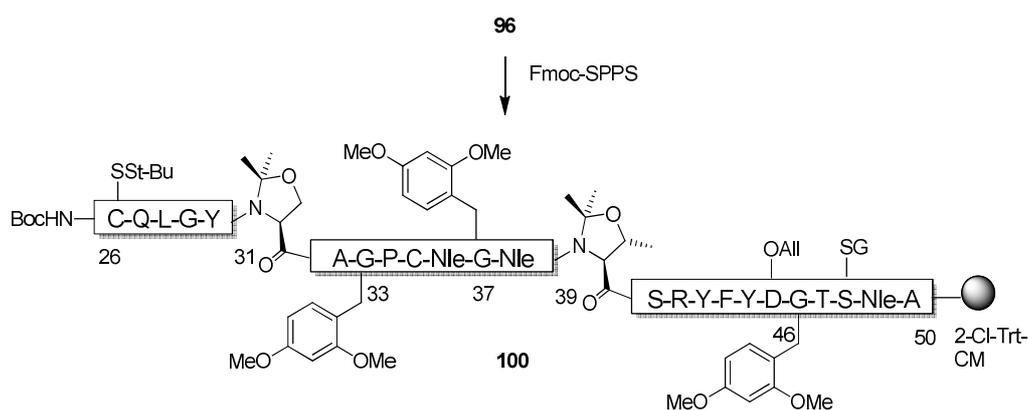


Abbildung 90: Synthese des geschützten Bikunin 26-50 Fragments **100** mit Pseudoprolin an Position 39.

Eine LC-MS Analyse von Fragment **100e** gelang aufgrund von Aggregation und geringer Löslichkeit nicht. Daher wurde versucht zunächst einen Zucker zu koppeln, um die Löslichkeit des Fragments **100** zu erhöhen.

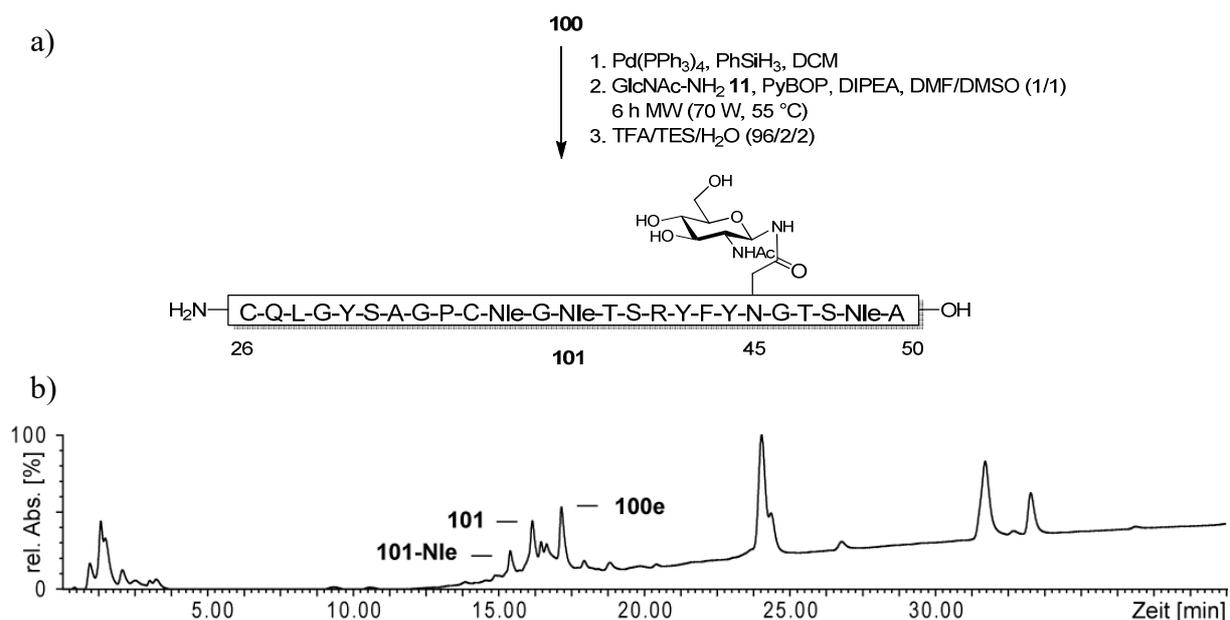


Abbildung 91: a) Glycokupplung von GlcNAc an der Festphase und b) RP-HPLC Chromatogramm von **101**.

Der Allylester von Asp-45 wurde an der Festphase entschützt und anschließend GlcNAc-NH₂ **11** an die freie Carboxylgruppe gekuppelt (Abbildung 90a). Aufgrund der Aggregationstendenz des Fragments wurde die Glycokupplung im Mikrowellenreaktor durchgeführt. Laut LC-MS wurde das Zielprodukt **101** gebildet (Abbildung 91b). Es wurde außerdem eine Deletion von Nle-36 gefunden (**101-Nle**), die aufgrund der erschwerten Kupplung an Dmb-Gly entstand. Daher wurde später auf Dmb-Gly in Position 37 verzichtet. Desweiteren wurde auch allylgeschütztes Aspartat in Position 45 gefunden **100e**. Dies zeigte, dass die Desallylierung an der Festphase nicht vollständig war. Da das Fragment eventuell an der Festphase aggregierte und dadurch die Entschützung des Allylesters und die Zuckerkupplung nicht vollständig waren, wurden diese Reaktionen in Lösung versucht. Dazu wurde die geschützte Peptidylsäure von der Festphase **100** abgespalten und das C-terminale Hydrazid **102** generiert (Abbildung 92a). Dieses wurde desallyliert und mit GlcNAc-NH₂ **11** in Lösung gekuppelt. Die Desallylierung und die Glycokupplung verliefen fast vollständig, allerdings waren laut LC-MS noch viele Nebenprodukte zu finden (Abbildung 92b). Eine HPLC-Reinigung des Glycopeptids **103** gelang nicht.

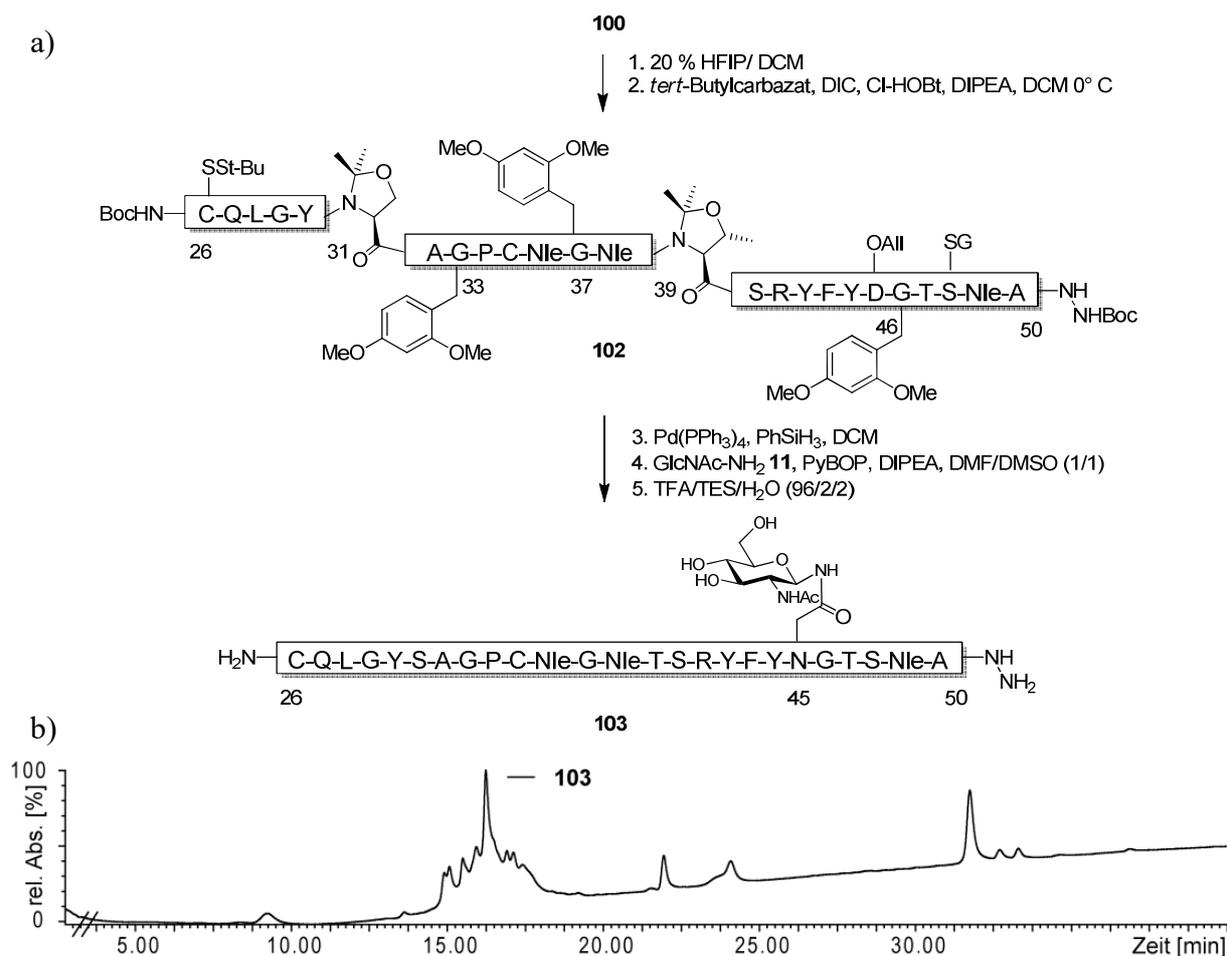


Abbildung 92: a) Glycokupplung von GlcNAc-NH₂ **11** in Lösung und b) RP-HPLC Chromatogramm von **103**.

Auf Basis der gesammelten Erfahrungen erfolgte eine weitere Optimierung der Synthese von Bikunin 26-50 an der Festphase (Abbildung 93a). Auf die Dmb-Schutzgruppe in Position 37 wurde verzichtet. Cys-35 wurde als disulfidgeschütztes Cystein eingebaut, um Oxidationen und Disulfidbrückenbildung zu vermeiden. Die Synthese wurde maschinell an Trityl-ChemMatrix Harz **41** durchgeführt. Die Kupplungen der Aminosäuren Fmoc-Asp(OAll)-OH und Fmoc-Ala-OH an das Dmb-Glycin erfolgten mit PyBOP und verlängerter Reaktionszeit. Das Pseudoprolin Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH sowie Fmoc-Nle-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH **99** wurden mit PyBOP gekuppelt. Die restlichen Aminosäuren wurden durch HCTU aktiviert. Fmoc-Cys(*St*-Bu)-OH wurde als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Die geschützte Peptidylsäure **104** wurde durch milde Acidolyse vom Harz abgespalten. Es wurden 158 mg Rohpeptid erhalten. Nach analytischer TFA-Entschützung konnte das Fragment **104e** per LC-MS analysiert werden (Abbildung 93b). Der Anteil an Nebenprodukten konnten erheblich reduziert werden.

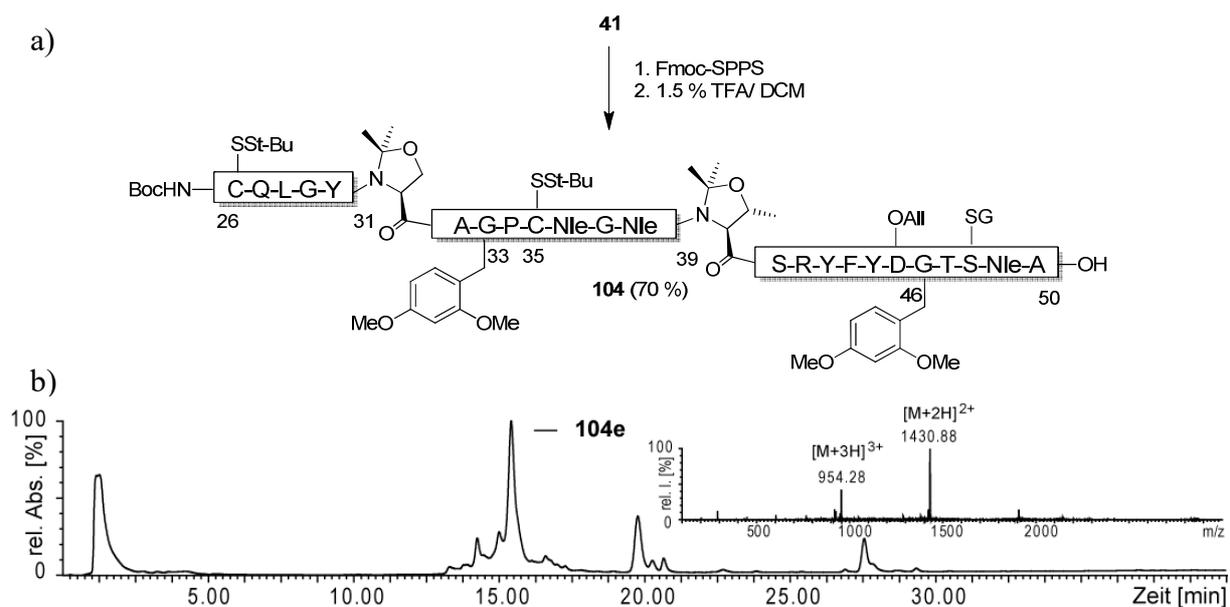


Abbildung 93: a) Synthese von Bikunin 26-50 **104** am Trityl-CM Harz **41** und b) LC-MS des entschützten Peptids **104e**.

Anschließend wurde **104** in das Hydrazid **105** umgewandelt (Abbildung 94a).¹⁶² Dazu wurde die Peptidylsäure **104** in DCM gelöst und mit 3 eq *tert*-Butylcarbazat, 2 eq Cl-HOBt und 2 eq DIPEA versetzt. Die Reaktion wurde bei 0 °C gerührt. Das Hydrazid **105** wurde durch Flash-Chromatographie gereinigt. Es wurden 91 % an Produkt **105** in guter Reinheit erhalten (Abbildung 94b).

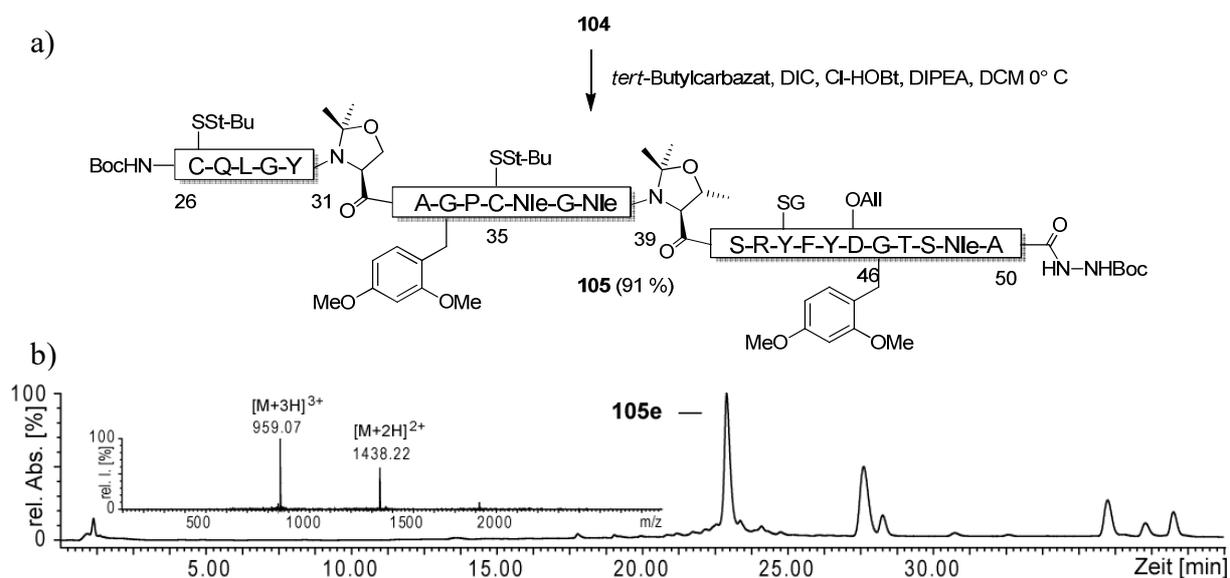


Abbildung 94: a) Synthese des Bikunin 26-50 Hydrazids **105** und b) LC-MS des entschützten Bikunin 26-50 Hydrazids **105e**.

Nach *Gomez-Vidal et al.* wurde der Allylester von **105** unter Verwendung von immobilisierten Pd⁰ in Gegenwart von Phenylsilan in DCM_{abs} entschützt (Abbildung 95a).¹²⁸ Es handelt sich dabei um mikroverkapseltes Palladium (Pd EnCat™)¹⁶³ auf einer porösen Polyurea Matrix.

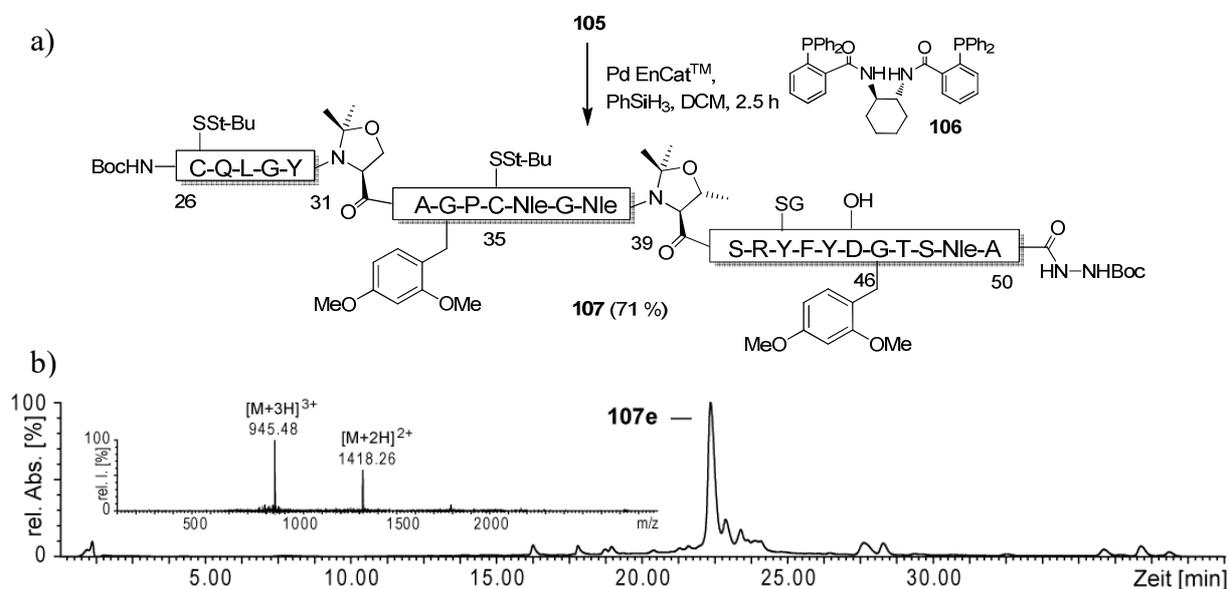


Abbildung 95: a) Desallylierung zu Bikunin 26-50 **107** und b) LC-MS des entschützten Bikunin 26-50 Hydrazids **107e**.

Damit ist eine einfachere Reinigung der Reaktionslösung gewährleistet und die Kontamination der Produkte durch Palladium wird minimiert. Als Ligand wurde der (*R,R*)-DACH-phenyl Trost Ligand¹⁶⁴ **106** zugegeben, der als vierzähliger Chelatligand fungiert. Nach 2.5 h unter Schutzgasatmosphäre wurde die Reaktionslösung abfiltriert, extrahiert und durch Flash-Chromatographie gereinigt. Es wurden 104 mg Produkt **107** erhalten, was einer Ausbeute von 71 % entsprach. Laut LC-MS lag Bikunin 26-50 Asp **107e** in guter Reinheit vor (Abbildung 95b).

Die Synthese des Glycopeptids **108** erfolgte durch Aktivierung des Peptids **107** mit HATU und Kupplung an das Nonasaccharidamin **48** (Abbildung 96a). Das Dmb-Glycin vor der Glycosylierungsstelle verhinderte eine Aspartimidbildung. Es wurde darauf geachtet, dass die Kupplungslösung basisch war (~pH 9).

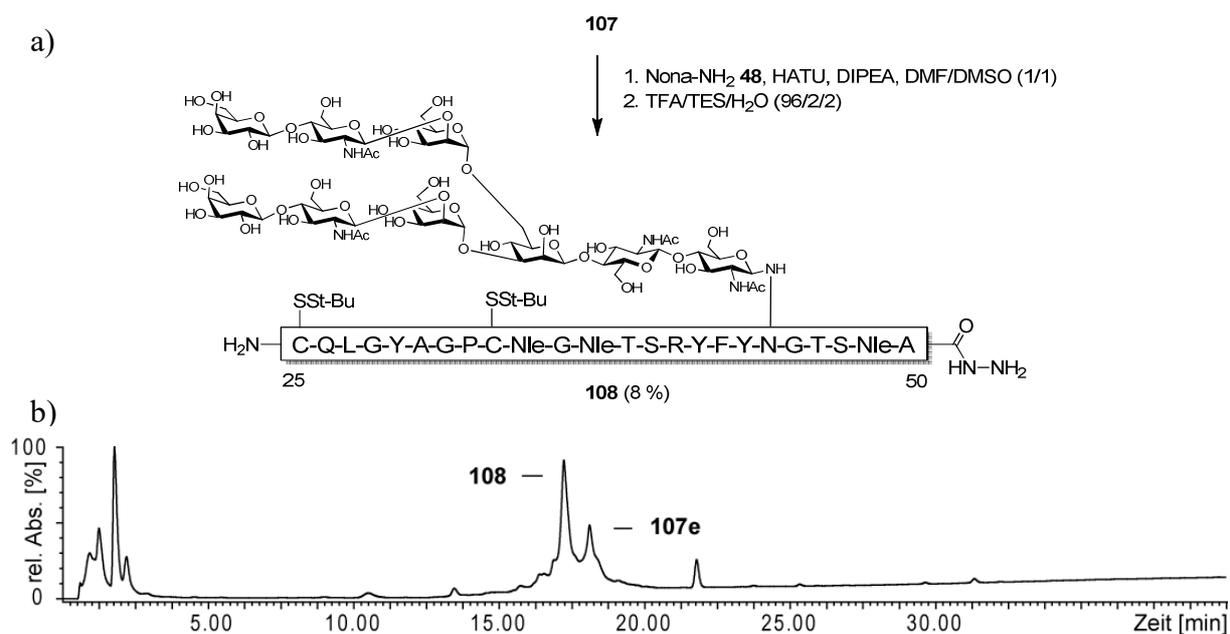


Abbildung 96: a) Synthese und b) RP-HPLC Chromatogramm von Bikunin 26-50 Nona **108**.

Nach vier Tagen wurde eine Entschützung mit TFA vorgenommen und die Produkte wurden durch LC-MS analysiert (Abbildung 96b). Neben dem Glycopeptid Bikunin 26-50 Nona **108** war noch Edukt **107e** vorhanden. Nach präparativer RP-HPLC Reinigung wurde Bikunin 26-50 Nona **108** in 8 % Ausbeute erhalten. Laut LC-MS waren noch leichte Verunreinigungen vorhanden (Abbildung 97).

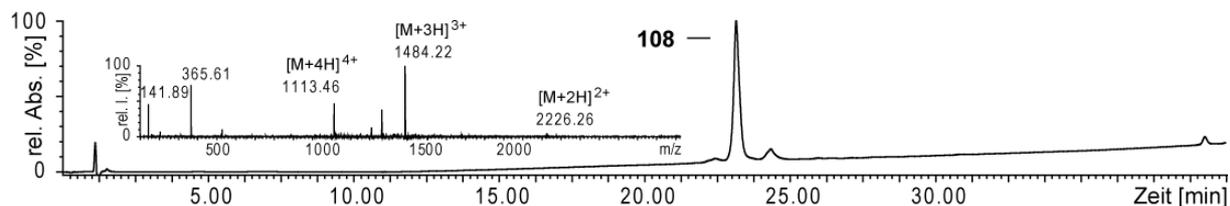


Abbildung 97: LC-MS von Bikunin 26-50 Nona **108** nach RP-HPLC Reinigung.

L. Perkams entwickelte im Zuge seiner Dissertation eine Methode, um das Nonasaccharidazid **47** in höherer Qualität zu erhalten.¹⁶⁵ Das daraus gewonnene Glycosylamin **48** wurde ebenfalls an Bikunin 26-50 Asp **107** gekuppelt (Abbildung 98a).

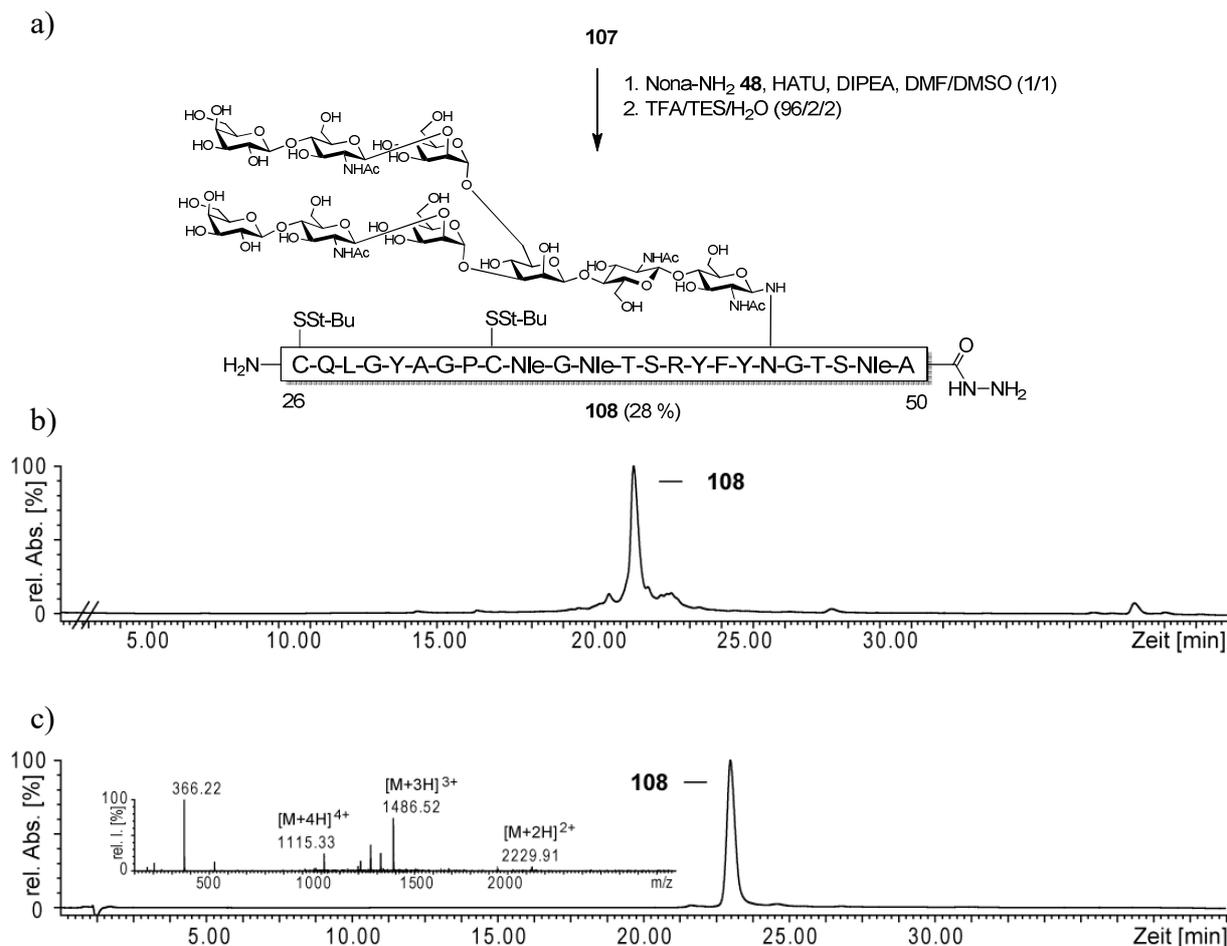


Abbildung 98: a) Darstellung und b) RP-HPLC Chromatogramm des Glycopeptids **108**; c) LC-MS von Bikunin 26-50 Nona **108** nach RP-HPLC Reinigung.

Bereits nach einem Tag war die Umsetzung laut LC-MS vollständig (Abbildung 98b). Nach RP-HPLC Reinigung wurde das Glycopeptid **108** in 28 % Ausbeute erhalten. Da sich die Nebenprodukte leichter abtrennen ließen, konnte auch die Reinheit des Produkts erhöht werden (Abbildung 98c). Die Reinheit der *N*-Glycanazide trägt wesentlich dazu bei, die Qualität und Ausbeuten an Glycopeptiden zu verbessern.

Untersuchungen der Struktur des *N*-Glycans von Bikunin aus humanem Urin ergaben, dass es sich um ein biantennäres *N*-Glycan des komplexen Typs handelt, das α -2,6 verknüpfte Sialinsäuren trägt.⁷⁸ Daher wurde das *N*-Glycopeptid **108** mit der bakteriellen 2,6-Sialyltransferase (E.C.2.4.99.1) aus *Photobacterium Damsela*¹⁶⁶ sialyliert. Der Vorteil dieses Enzyms ist eine hohe Substrattoleranz.¹⁶⁷ Für chemoenzymatische Sialylierungen von *N*-Glycanen und *N*-Glycopeptiden wurde das Enzym bereits verwendet.^{136,137}

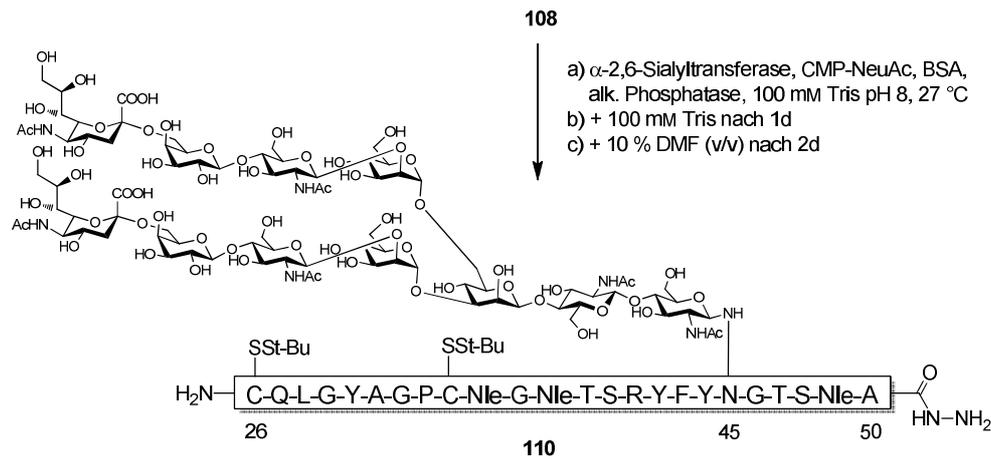


Abbildung 99: α -2,6-Sialylierung des Glycopeptids Bikunin 26-50 **108**.

Das Glycopeptid Bikunin 26-50 Nona **108** (0.4 mM) wurde in 100 mM Tris-Puffer bei pH 8 gelöst. Anschließend wurden nacheinander BSA, 3 U alkalische Phosphatase, 8 eq CMP-NeuAc als Dinatriumsalz und 50 mU α -2,6-Sialyltransferase hinzugegeben (Abbildung 99). Nach 18 h bei 27 °C waren laut LC-MS Edukt **108**, einfach sialyliertes Glycopeptid **109**, sowie Produkt **110** zu annähernd gleichen Teilen zu finden (Abbildung 100a).

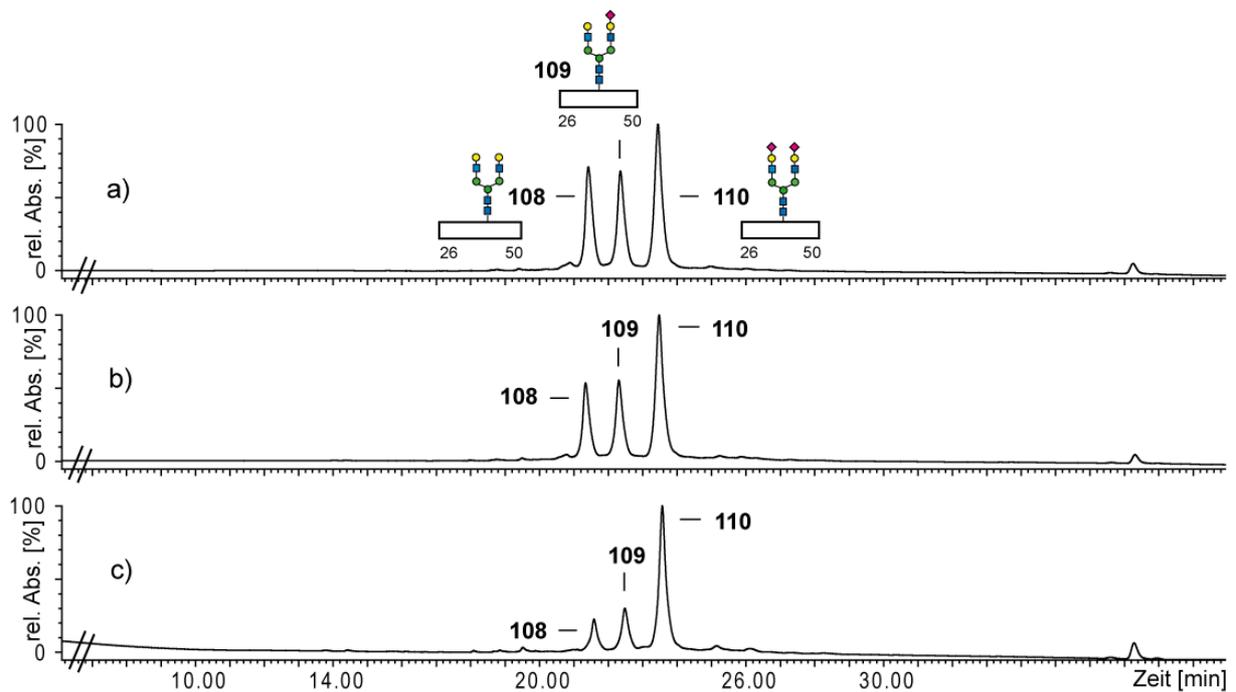


Abbildung 100: RP-HPLC Chromatogramme der Optimierung der enzymatischen α -2,6-Sialylierung von Bikunin 26-50 **110**.

Vermutlich war das Glycopeptid aufgrund seines hydrophoben Charakters in 100 mM Tris Puffer nicht gut löslich und somit für die enzymatische Reaktion nicht gut zugänglich. Daher wurde die Reaktion auf eine Glycopeptidkonzentration von 0.3 mM verdünnt. Dadurch konnte der Anteil an Produkt **110** leicht erhöht werden (Abbildung 100b). Da die Konzentration an Glycopeptid bereits relativ niedrig war, wurde nach zwei Tagen Reaktionszeit testweise DMF (10 % v/v) hinzugefügt, um die Löslichkeit des hydrophoben Glycopeptids zu verbessern. Dies zeigte einen merklichen Effekt (Abbildung 100c), da anschließend weniger unvollständig sialyliertes Glycopeptid zu finden war. Das Enzym toleriert geringe Mengen an DMF offensichtlich gut. Anschließend wurden das Enzym und Salze durch Gelfiltration abgetrennt und das Rohprodukt durch RP-HPLC gereinigt (Abbildung 101). Auf einer Hydro C18 HPLC Säule von YMC ließen sich das Edukt **108** und das einfach sialylierte Zwischenprodukt **109** problemlos trennen.

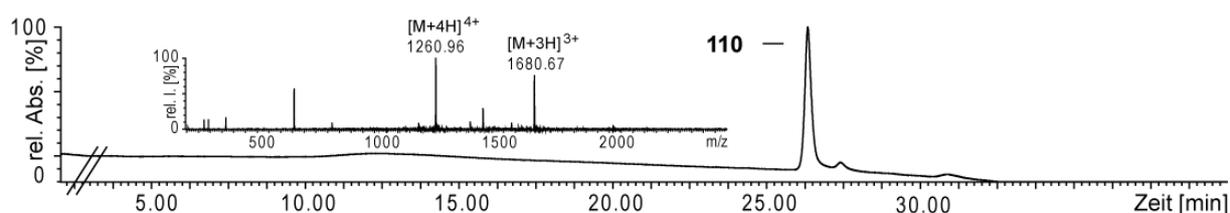


Abbildung 101: LC-MS von Bikunin 26-50 Undeca **110** nach HPLC Reinigung.

Die HPLC Trennung wurde unter Zusatz von Ameisensäure durchgeführt (anstelle von TFA), um die Hydrolyse der säurelabilen Sialoside zu vermeiden. Eine Ausbeute wurde nicht bestimmt, da es sich nur um eine Testreaktion handelte. Somit konnte gezeigt werden, dass sich sowohl die Glycopeptidhydrazide Bikunin 1-25 **89** und 26-50 **108** durch geeignete Glycosyltransferasen verlängern lassen.

5.4 Synthese von *N*- und *O*-glycosylierten Bikunin 1-50 Fragmenten

Um die Reaktivität des *O*-Glycopeptidthioesters Bikunin 1-25 **88** zu untersuchen, wurde dieser mit dem *N*-Glycopeptid **108** durch native chemische Ligation verknüpft (Abbildung 102a). Die Reaktion wurde in 8 M GdmCl mit 100 mM MPAA und 5 mM TCEP durchgeführt. Der Thioester **88** wurde im Überschuss (1.5 eq) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von zwei Tagen wurde die Ligation durch Zugabe von 100 mM DTT gestoppt.

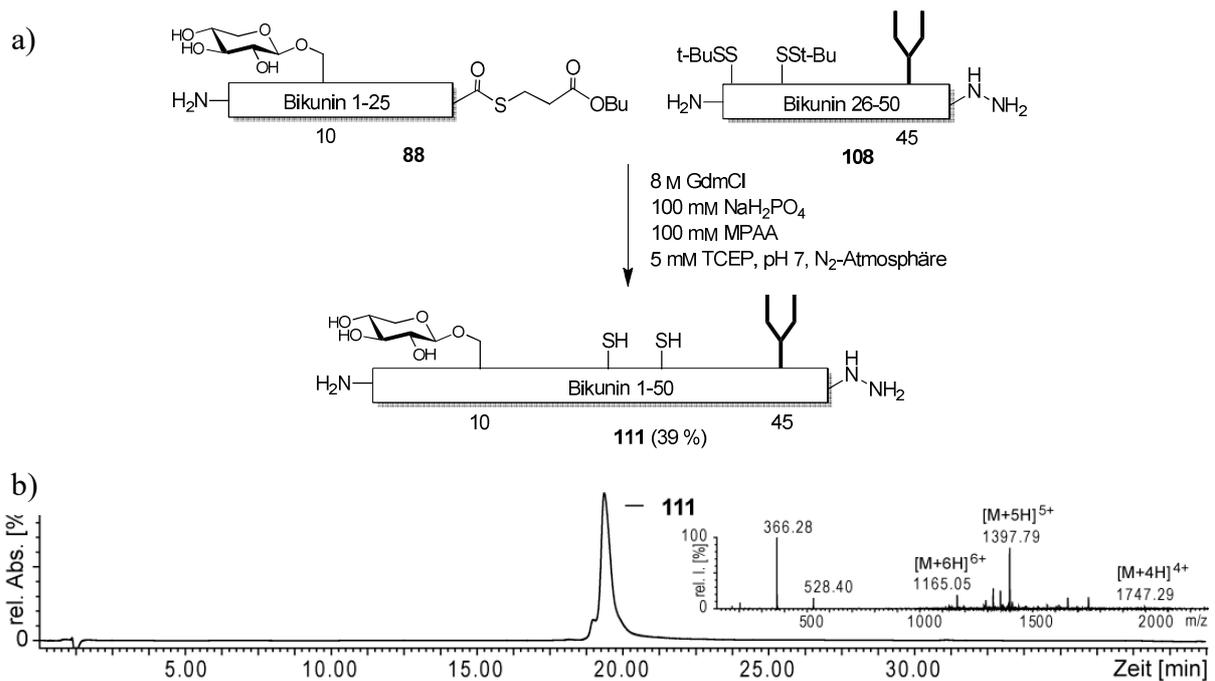


Abbildung 102: a) Native chemische Ligation und b) LC-MS von Bikunin 1-50 **111**.

Anschließend wurden Salze und Thiole durch Gelfiltration entfernt. Das Produkt **111** wurde durch RP-HPLC gereinigt (39 % Ausbeute) und per LC-MS analysiert (Abbildung 102b).

Zur enzymatischen Sialylierung wurde das Fragment Bikunin 1-50 Nona **111** in 100 mM Tris-Puffer bei pH 8 gelöst. Das Glycopeptid war bei einer Konzentration von 1 mM gut löslich. Anschließend wurden nacheinander BSA, 2 U alkalische Phosphatase, 24 eq CMP-NeuAc als Dinatriumsalz und 60 mU α -2,6-Sialyltransferase hinzugegeben. Die Reaktion wurde 18 h bei 30 °C geschüttelt (Abbildung 103a). Laut LC-MS waren hauptsächlich das Zielprodukt **113**, wenig Edukt **111** sowie einfach sialyliertes Glycopeptid **112** zu finden (Abbildung 103b). Das Edukt **111** und das Zwischenprodukt **112** sind vom Produkt **113** chromatographisch trennbar, obwohl es sich um ein langes Glycopeptid aus 50 Aminosäuren handelt. Von generellem Vorteil war dabei, dass das Fragment Bikunin 1-50 **111** besser löslich war als das hydrophobe Bikunin 26-50 Fragment **108**. Da die Nebenprodukte gut abgetrennt werden konnten, wurden weitere enzymatische Reaktionen am Bikunin 1-50 Fragment **113** durchgeführt.

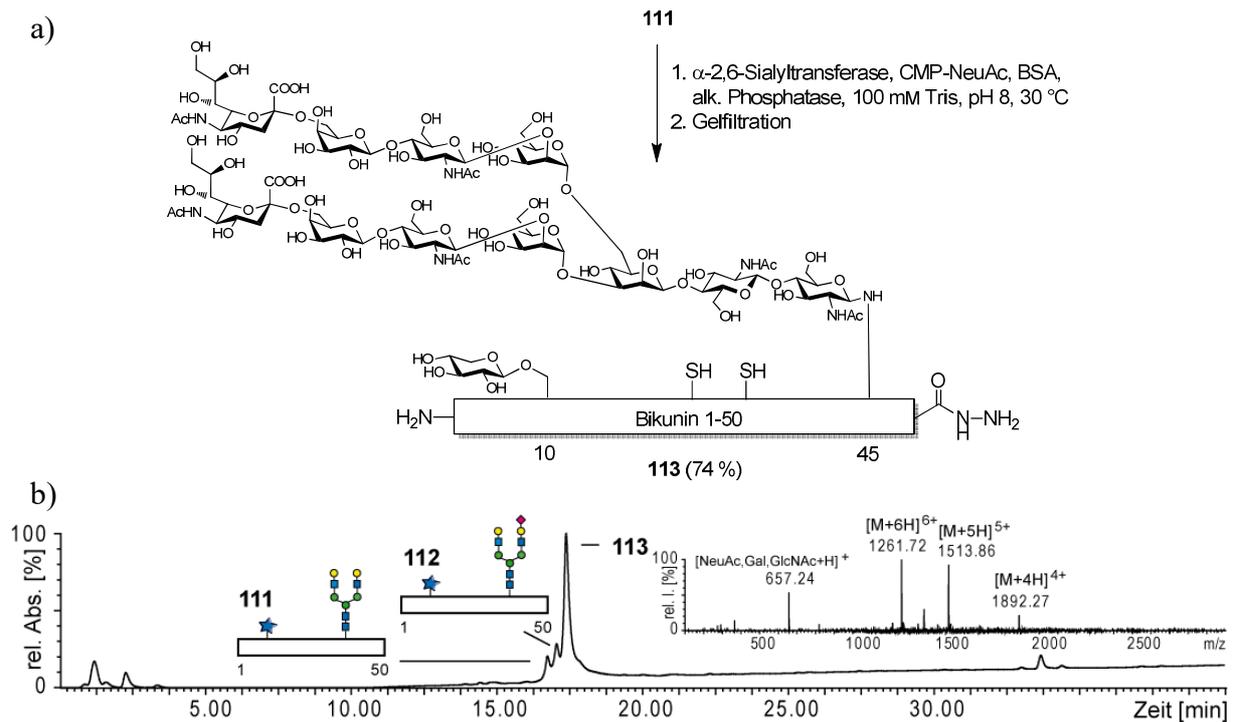
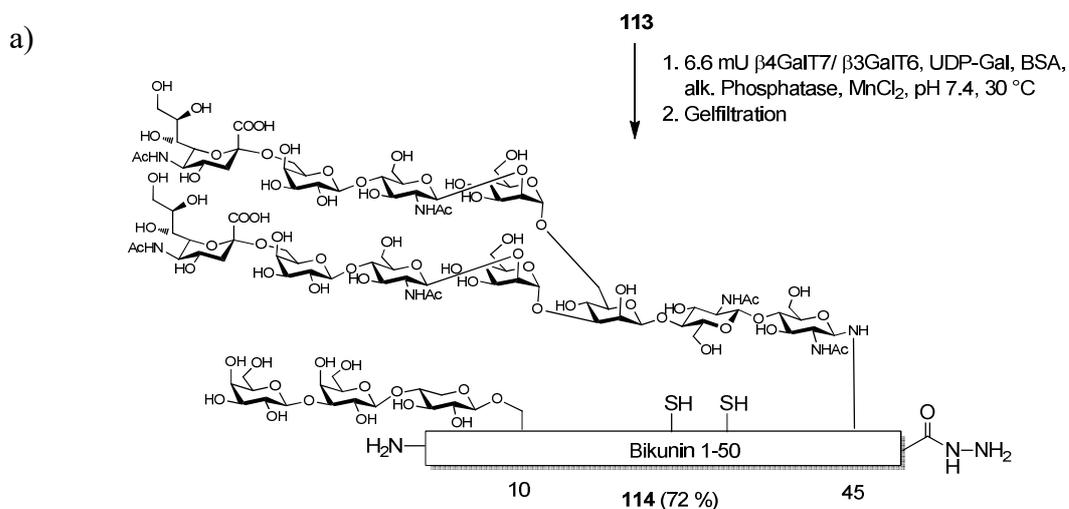


Abbildung 103: a) α -2,6-Sialylierung von **111** und b) LC-MS von Bikunin 1-50 Undeca **113** nach Gelfiltration.

Für die enzymatische Verlängerung der Xylose von **113** wurde die Mischung aus Galactosyltransferasen β 4GalT7 und β 3GalT6 (H. Clausen¹⁵⁵) eingesetzt. Die Reaktion wurde bei pH 7.4 in Gegenwart von Mn^{2+} , BSA, alkalischer Phosphatase und 4 eq UDP-Gal bei 30 °C für 1 d inkubiert (Abbildung 104a).



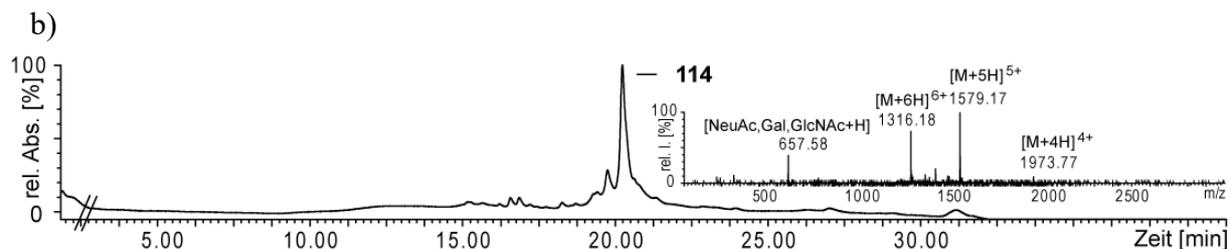


Abbildung 104: a) Galactosylierung und Bikunin 1-50 **113** und b) LC-MS von Bikunin 1-50 **114** nach Gelfiltration.

Die LC-MS Analyse ergab einen hohen Umsatz (Abbildung 104b). Nebenprodukte gingen z. T. auf die unvollständige Sialylierung zurück. Nach der Abtrennung von Enzymen und Salzen durch Gelfiltration wurde **114** in 72 % Ausbeute erhalten. Das Glycopeptid Bikunin 1-50 **113** stellt ein gutes Substrat für die Galactosyltransferasen dar, da die Umsetzung besser war als beim Bikunin 1-25 Fragment **89**. Zum vollständigen Aufbau des Tetrasaccharids der *Linkage*-Region wurde die mit GFP-fusionierte Glucuronyltransferase (GlcAT1) der Arbeitsgruppe *Moreman* eingesetzt.¹⁵⁷ Die Reaktion erfolgte über zwei Tage bei pH 7 und 30 °C (Abbildung 105a).

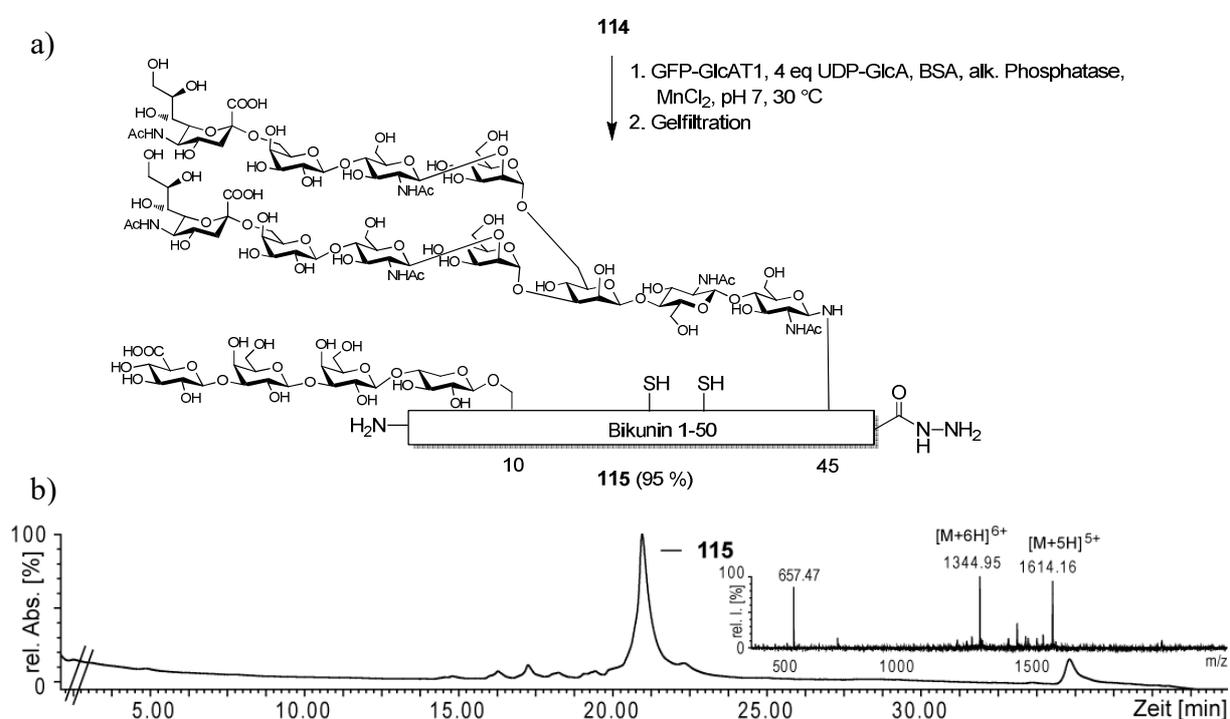


Abbildung 105: a) Glucuronylierung von Bikunin 1-50 **114** und b) LC-MS Bikunin 1-50 **115** nach Gelfiltration und RP-HPLC.

Im Gegensatz zur Glucuronylierung von Bikunin 1-25 **90** war die Umsetzung des Bikunin 1-50 Fragments **114** bereits nach einem Tag vollständig. Nebenprodukte wurden per RP-HPLC abgetrennt (Abbildung 105b). Damit konnte gezeigt werden, dass sich *N*- und *O*-Glycosylierungen auch in einem Glycopeptid mit einer Länge von 50 Aminosäuren selektiv durch Glycosyltransferasen einbringen lassen. Trotz der Länge des Glycopeptids lassen sich kohlenhydratbasierte Nebenprodukte chromatographisch noch gut abtrennen.

5.5 Synthese von *N*- und *O*-glycosyliertem Bikunin 1-147

Um das Vollgängenglycoprotein Bikunin 1-147 aufzubauen, wurde die native chemische Ligation ausgehend von dem Bikunin 1-50 Glycopeptidhydrazid **111** untersucht.

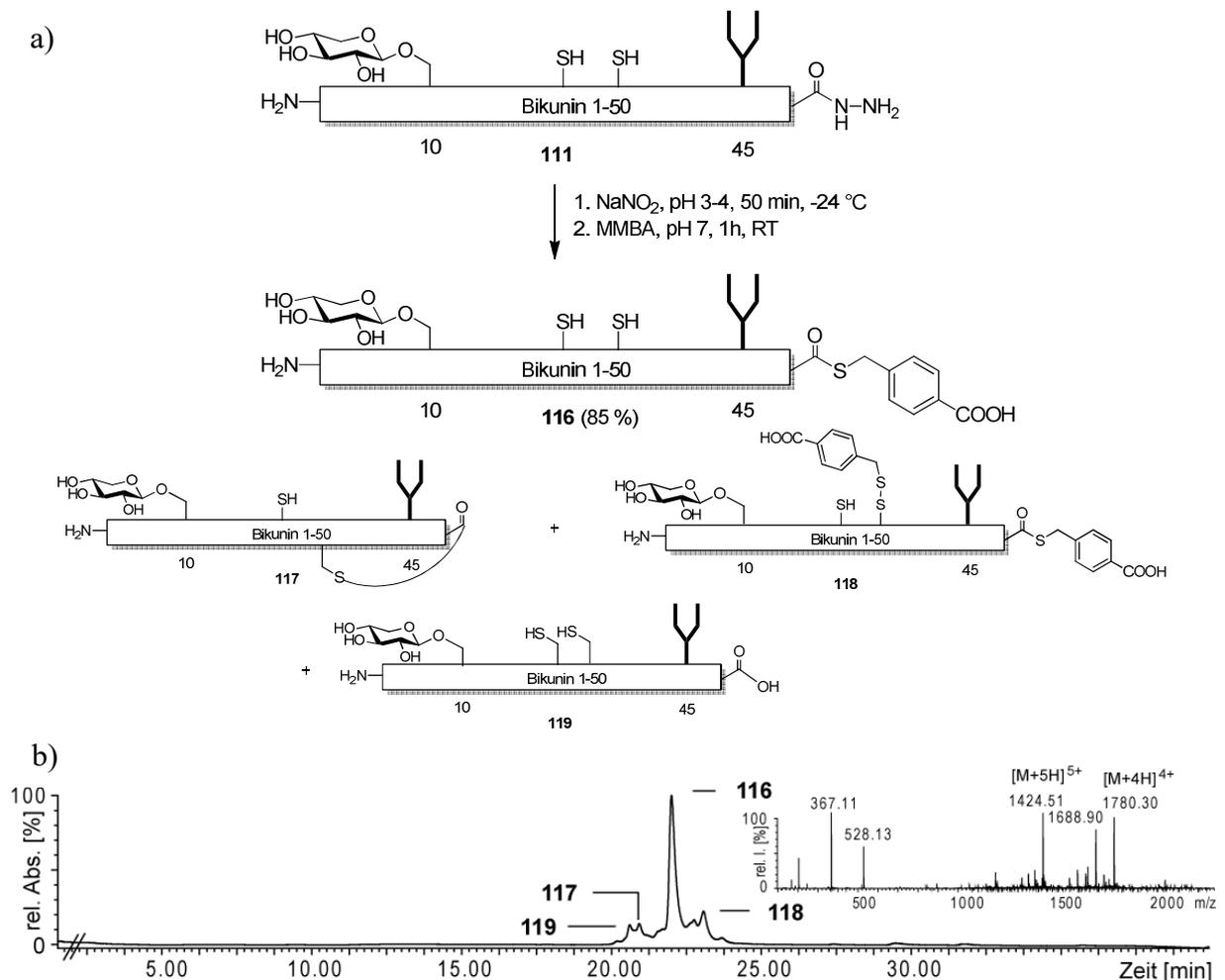


Abbildung 106: a) Diazotierung und Thioveresterung von Bikunin 1-50 **111** und b) RP-HPLC Chromatogramm von Bikunin 1-50 MMBA **116**.

Es erfolgte zunächst eine Diazotierung des Hydrazids **111** und anschließende Umsetzung zum Thioester **116** (Abbildung 106a).¹⁴¹ Nach *A. Reif et al.* wurde MMBA für die Thiolyse verwendet, wobei ein relativ stabiler benzylischer Thioester und nur geringfügig Nebenprodukte entstanden.¹⁶⁸ Durch LC-MS ließen sich die Nebenprodukte Thiolacton **117**, Peptidylsäure **119** und gemischtes Disulfid **118** identifizieren (Abbildung 106b).

Das Fragment Bikunin 51-147 **120** wurde im Zuge der Masterarbeiten von *A. Dawood*¹⁶⁹ und *D. Rau*¹⁷⁰ rekombinant aus *E. coli* gewonnen und mit dem durch Gelfiltration gereinigten Thioester **116** ligiert (Abbildung 107a). Die Ligation wurde nach einer Reaktionszeit von zwei Tagen durch Zugabe von 100 mM DTT gestoppt. Laut LC-MS wurde das gewünschte Reaktionsprodukt Bikunin 1-147 **121** erhalten (Abbildung 107b).

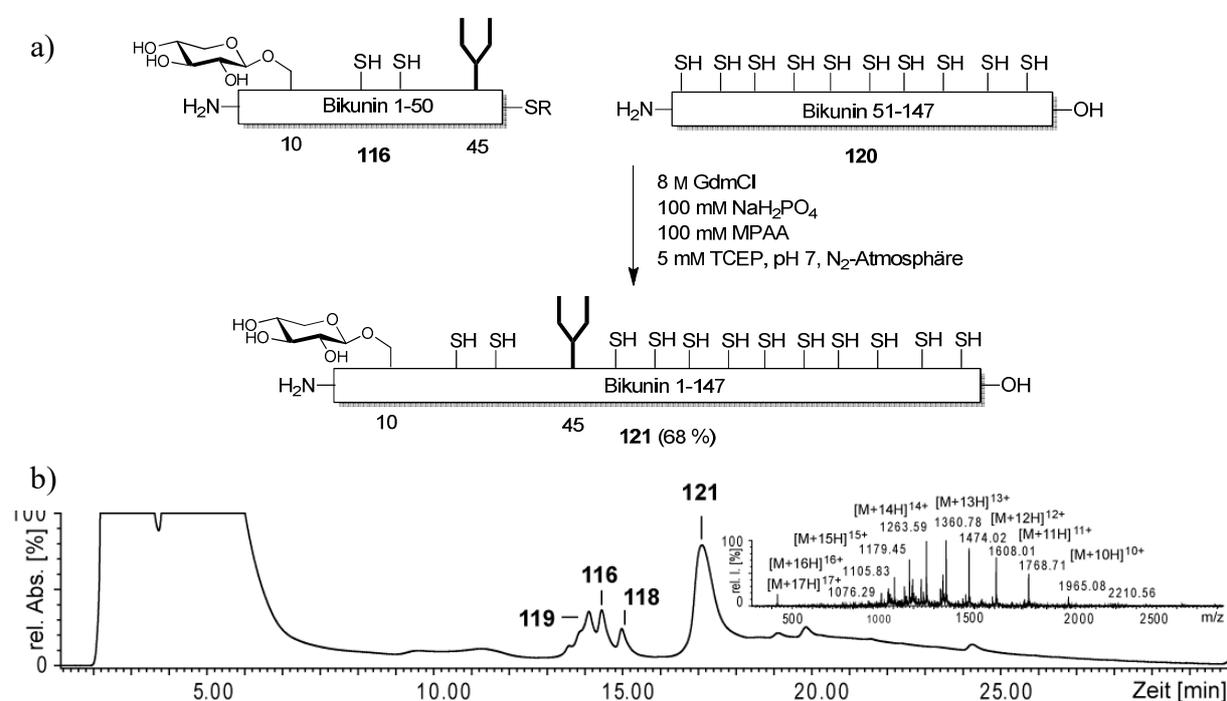


Abbildung 107: a) Native chemische Ligation zu Bikunin 1-147 **121** und b) LC-MS von **121** aus der Ligationlösung.

Um Bikunin 1-147 auch mit enzymatisch verlängerten *N*- und *O*-Glycanen zugänglich zu machen, wurde die native chemische Ligation mit dem Bikunin 1-50 **115** Hydrazid untersucht. Es erfolgte eine Diazotierung des Hydrazids von Fragment **115** und anschließende Umsetzung zum Thioester (Abbildung 108a).¹⁴¹ Die Sialinsäuren waren gegenüber dem niedrigen pH-Wert aufgrund der niedrigen Temperatur stabil. Durch LC-MS wurde die Vollständigkeit der Reaktion überprüft. Der Thioester **122** war nur gering in 20-50 % CH₃CN/H₂O löslich und

konnte daher nicht gereinigt werden. Die geringe Löslichkeit könnte auch auf eine Disulfidbildung der freien Cysteine zurückzuführen sein.

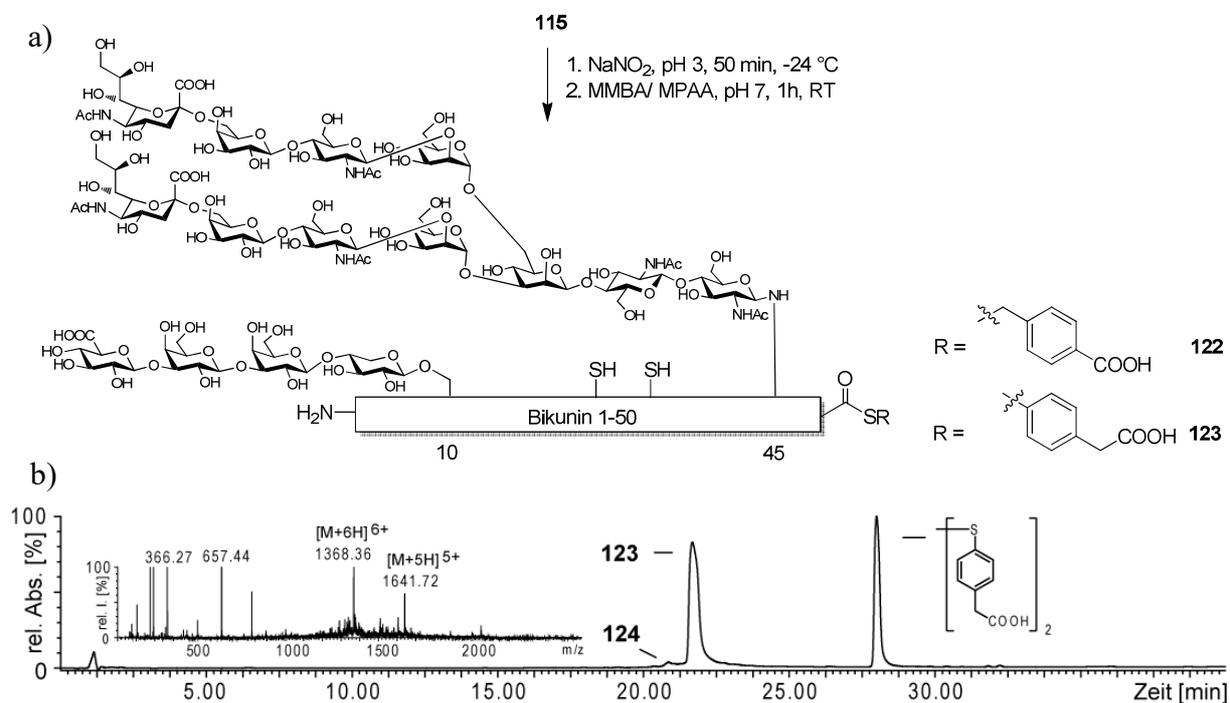


Abbildung 108: a) Diazotierung und Thiolyse des glycosylierten Bikunins 1-50 **115** und b) LC-MS von Bikunin 1-50 MPAA **123**.

Um die schwierige Reinigung des Thioesters **22** zu umgehen, wurde die Diazotierung von **115**, Thiolyse und native chemische Ligation durch eine *one pot* Reaktion versucht.¹⁴¹ Dabei wurde der MPAA-Thioester hergestellt (Abbildung 108a), um die Umesterung bei der Ligation zu beschleunigen. Außerdem wurden nur 4 eq statt 6.5 eq NaNO_2 eingesetzt, da überschüssiges Nitrit intermediär nicht entfernt werden konnte. Die Bildung des MPAA-Thioesters **123** konnte durch LC-MS nachgewiesen werden (Abbildung 108b). Als Nebenprodukt war das Thiolacton **124** zu finden. Daneben wurden MPAA-Disulfide und deren Addukte gefunden. Mit dem rohen Thioester **123** wurde eine native chemische Ligation mit dem Cysteinfragment **125** durchgeführt (Abbildung 109a). Das LC-MS zeigte nach 4 d nur eine geringe Bildung des gewünschten Produkts **126** (Abbildung 109b).

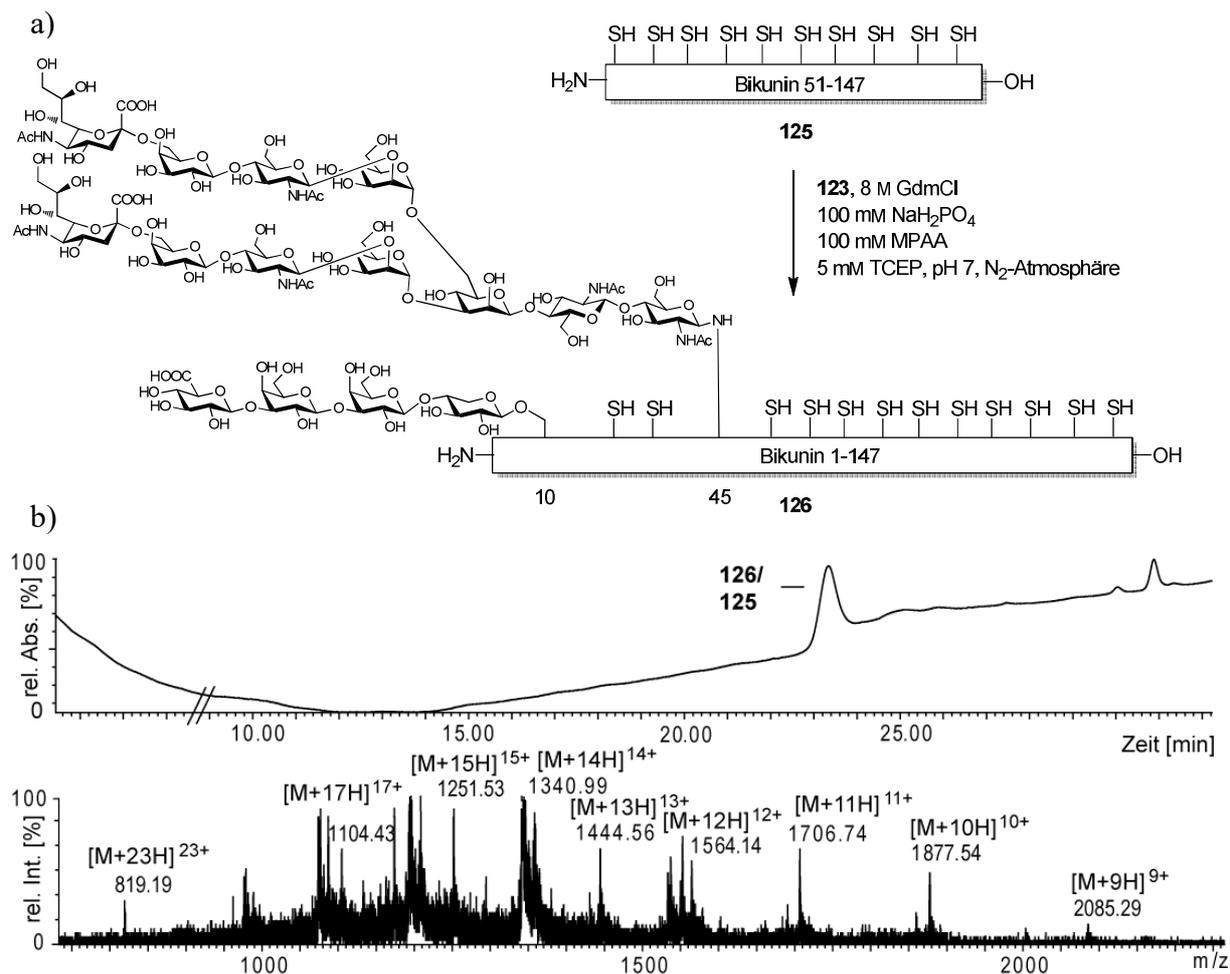


Abbildung 109: a) Native chemische Ligation zum Bikunin 1-147 Fragment **126** und b) LC-MS von **126** aus der Ligationslösung.

Ausbeuteverluste bei der Herstellung des Thioesters können durch Oxidation des Bikunin 1-50 Fragments **115** an den freien Cysteinen auftreten. Daher sollte versucht werden, die zwei freien Cysteine selektiv zu schützen, bevor das Fragment enzymatisch verlängert wird. Als mögliche Schutzgruppen könnten gemischte Disulfide eingesetzt werden.¹¹⁹ Bei der Ligation werden diese Schutzgruppen entfernt. Es ist allerdings schwierig anhand der ersten zwei Testligationen Schlussfolgerungen zu ziehen, weshalb die Ligation zum Glycopeptid **121** trotz freier Cysteine gelang und die Ligation zum Glycopeptid **126** nicht erfolgreich war. Eventuell hatte die Enzymreaktion einen Einfluss auf die Cysteine in Peptid **115**. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die *Linkage*-Region am Glycopeptidhydrazid **115** durch Glycosyltransferasen aufgebaut werden kann. An der Tetrasaccharidsequenz sollte sich auch eine Chondroitinsulfatkette enzymatisch anbringen lassen. Damit stellen diese Ergebnisse erste Beiträge der noch wenig untersuchten chemoenzymatischen Synthese von Proteoglycanen dar.

5.6 Rückfaltung und Aktivitätstests vom semisynthetischen Bikunin 121

Die Rückfaltung eines denaturierten Proteins ist von verschiedenen Parametern abhängig, wie der Temperatur, dem pH-Wert, zugesetzten Thiolen, niedermolekularen Substanzen und Salzen. Nicht denaturierende Konzentrationen an chaotrophen Salzen, wie GdmCl, können einen positiven Einfluss auf die Faltung haben. Bei der Expression von glycosyliertem Bikunin in Säugerzellen ist die Bildung von Aggregaten relativ hoch.¹⁷⁵ Dies mindert die Aktivität des Proteins. Daher wurden verschiedene Methoden entwickelt, um denaturiertes Bikunin zurückzufalten. Anhand dieser experimentellen Details wurden die Bedingungen für die Rückfaltung des semisynthetischen Bikunins 1-147 **121** gewählt (Abbildung 110).¹⁷⁵ Der Ligationsansatz mit **121** wurde unter anaeroben Bedingungen mit einem argininhaltigen Puffer schnell auf 1 M GdmCl verdünnt und anschließend gegen 1 M GdmCl, 100 mM DTT und Arginin dialysiert. Dadurch wurde das Thiol MPAA entfernt, das sonst gemischte Disulfide mit den 12 Cysteinen von **121** ausbildete und die Rückfaltung behinderte. Die Rückfaltung von Bikunin **121** wurde in Gegenwart von 0.5 M L-Arginin durchgeführt.¹⁷¹ L-Arginin ist ein häufig verwendetes Additiv bei Rückfaltungen, wobei der Wirkmechanismus unklar ist. L-Arginin wirkt leicht destabilisierend auf Proteine¹⁷², vergleichbar mit Chaotropen wie GdmCl. Es ist anzunehmen, dass L-Arginin für eine bessere Löslichkeit der Intermediate während der Faltung sorgt.

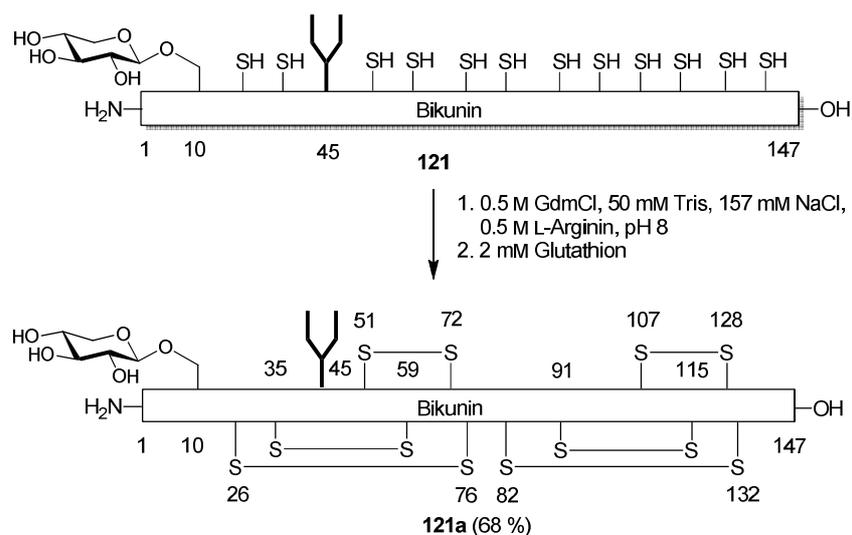


Abbildung 110: Oxidative Rückfaltung von Bikunin 1-147 **121**.

Um die Bildung von Aggregaten möglichst gering zu halten, wurde eine niedrige Proteinkonzentration von 0.5 mg/mL gewählt.¹⁷³ Als Redoxsystem¹⁷⁴ wurde nach 24 h Glutathion (GSH) zugesetzt, um ein *reshuffling* der Disulfide zu ermöglichen. Zusätzlich wurde die Proteinlösung zwei Tage an Luftsauerstoff inkubiert. Die Oxidation des Proteins konnte massenspektrometrisch verfolgt werden. Das rückgefaltete Bikunin **121a** wurde durch Gelfiltration und RP-HPLC gereinigt und per LC-MS analysiert (Abbildung 112b).

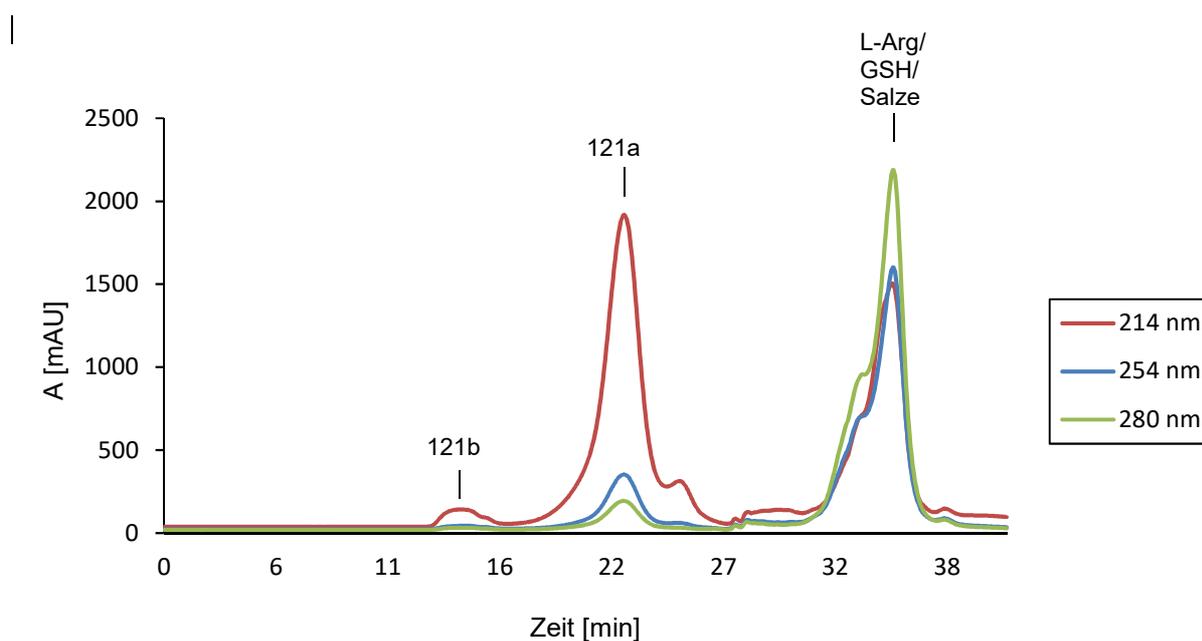


Abbildung 111: Chromatogramm der Gelfiltration von Bikunin 1-147 **121a**.

Der Anteil von Aggregaten **121b** nach der oxidativen Rückfaltung war laut Gelfiltration sehr gering (Abbildung 111). Außerdem verschob sich die Anzahl der Ladungen bei ESI-MS Messungen von hohen Ladungszahlen von **121** (denaturiert) (Abbildung 112a) zu niedrigeren Ladungszahlen von **121a** (oxidiert), da sich die Oberflächenstruktur des Proteins änderte. Die Abtrennung des Cys-Peptids Bikunin 51-147 **120** durch RP-HPLC konnte nicht vollständig erreicht werden. Die isolierte Ausbeute an **121a** nach Ligation, oxidativer Rückfaltung und Reinigung betrug 68 %.

Aus dem CD-Spektrum ließ sich die Faltung des Proteins erkennen (Abbildung 112c). Das Referenz-CD-Spektrum zeigte ähnliche Kurven (Abbildung 112d).¹⁷⁵

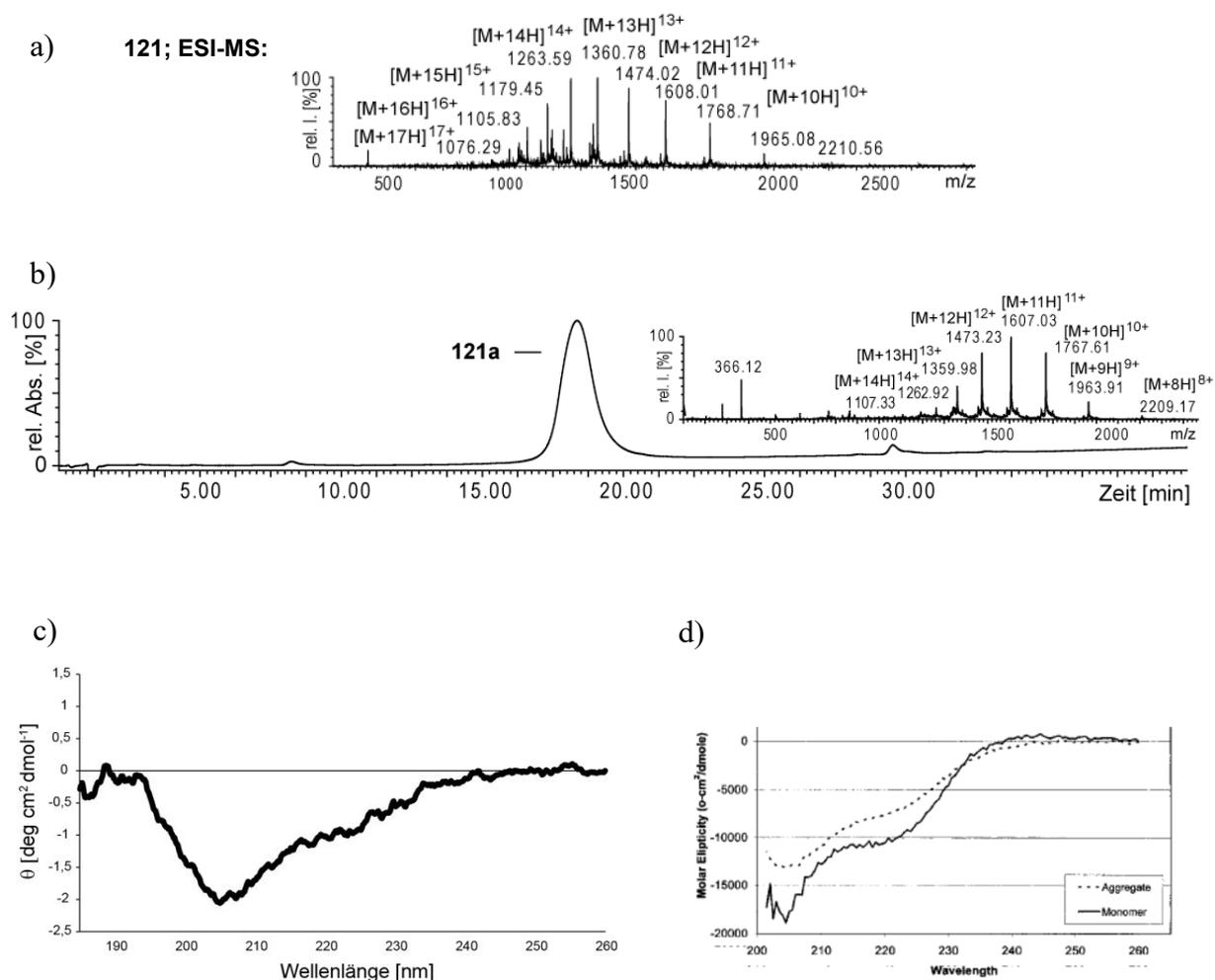


Abbildung 112: a) ESI-MS von reduziertem Bikunin 1-147 **121**; b) LC-MS von **121a** nach RP-HPLC Reinigung und c) CD-Spektrum von gereinigtem Bikunin 1-147 **121a** (15 mM), in 10 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 8.5, 25 °C. d) CD Spektrum von rekombinant gewonnenem Bikunin.¹⁷⁵

Durch Ultrazentrifugation wurde gezeigt, dass natives Bikunin in Lösung als Monomer vorliegt.¹⁷⁶ Bikunin verhält sich bei der Gelfiltration wie ein globuläres Protein und bei SDS-PAGE wie ein Protein größerer Molekularmasse.¹⁷⁷ Entsprechende Effekte wurden bei der Gelfiltration und der elektrophoretischen Analyse von **121a** beobachtet (Abbildung 113).

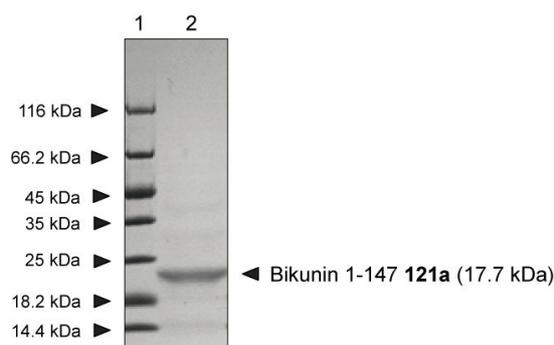


Abbildung 113: SDS-Gelelektrophorese von Bikunin 1-147 **121a** (17.7 kDa) (Bahn 2). Bahn 1: MW Standard.

Da die CD-Spektren des semisynthetischen Bikunins **121a** wenig aussagekräftig waren, wurde die biologische Aktivität als Trypsininhibitor getestet.¹⁷⁸ Die Aktivität von Trypsin kann durch die Spaltung von *N*-Benzoyl-D,L-Arginin-*p*-nitroanilid (BAPNA) nachgewiesen werden (Abbildung 114). Dabei entsteht *p*-Nitroanilin, dessen Konzentration bei einer Wellenlänge von 410 nm spektroskopisch nachgewiesen werden kann. Indirekt kann so eine Inhibitor-Aktivität von Bikunin 1-147 **121a** gegenüber Trypsin gemessen werden (Abbildung 115). Es wurden 1 µg, 2 µg und 5 µg semisynthetisches Bikunin **121a** mit 25 µg Trypsin inkubiert und anschließend wurde BAPNA zugegeben.

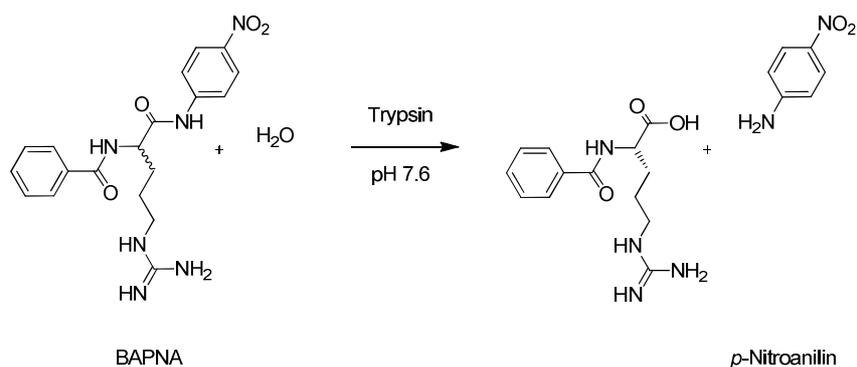


Abbildung 114: Nachweisreaktion der Aktivität von Trypsin.

Die Absorption bei 410 nm wurde über 10 min gemessen. Zum Vergleich wurde kommerzielles Bikunin aus humanem Urin von Biorbyt (1000 IU/mg) verwendet. Die Aktivität des semisynthetischen Bikunins 1-147 **121a** lag bei ca. 50 % der Bikuninpräparation von Biorbyt. Allerdings war die genaue Struktur des Bikunins von Biorbyt nicht bekannt. Je nach

Fragmentierung von Bikunin schwankt die Stärke und Spezifität der Inhibition.¹⁷⁹ Daher war es schwierig, einen genauen Vergleich aufzustellen.

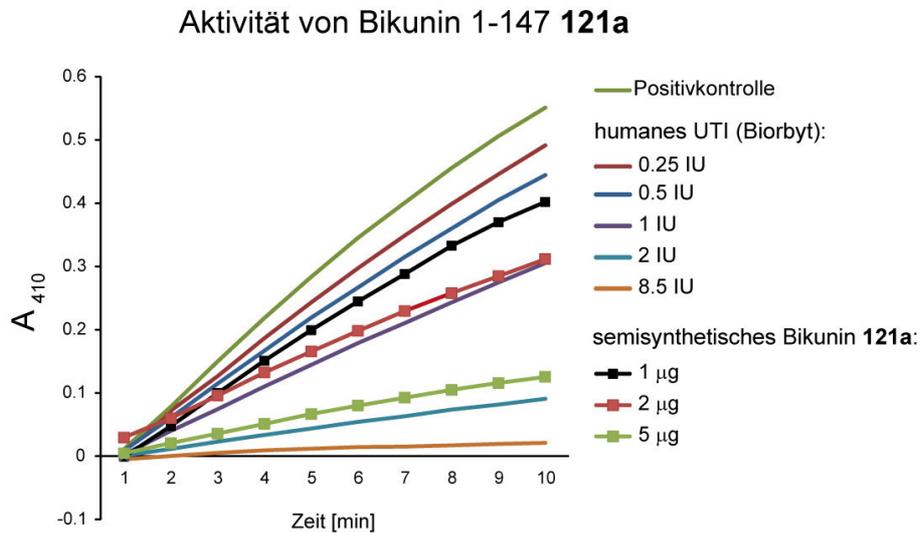
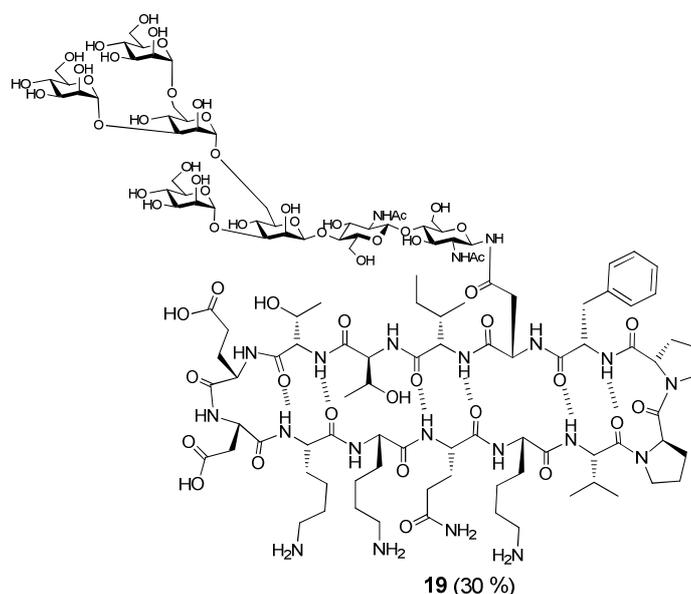


Abbildung 115: Inhibitoraktivität von Bikunin 1-147 **121a** gegen Trypsin.

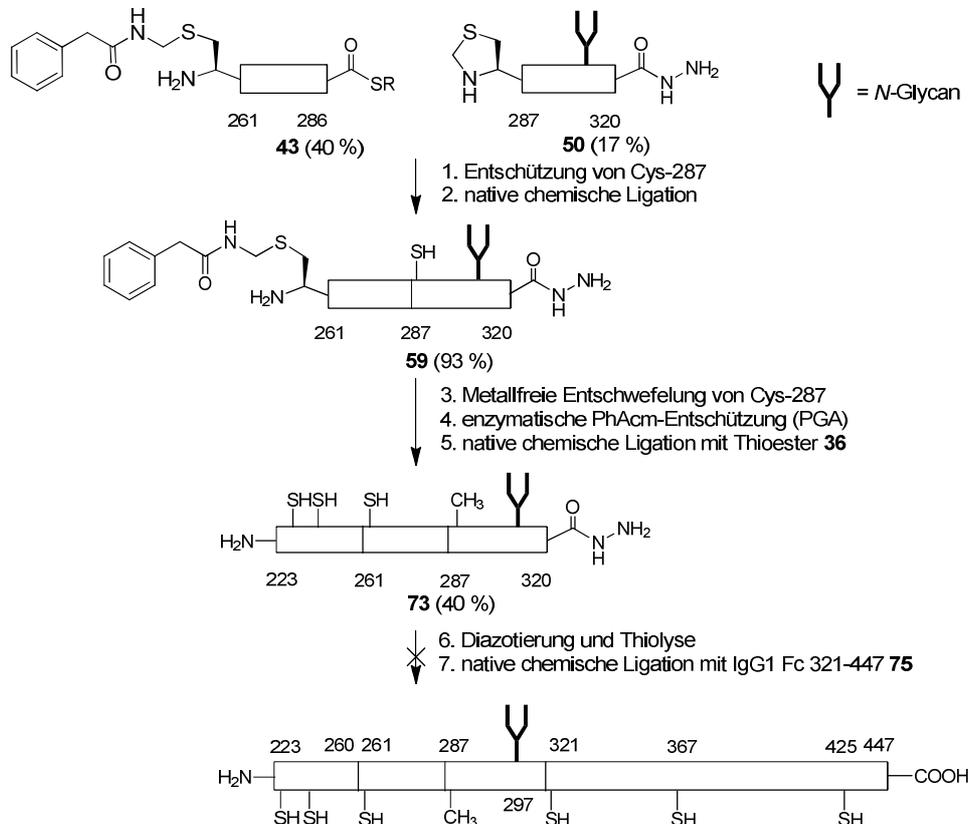
Damit wurde erstmals eine semisynthetische Methode zur Darstellung eines biologisch aktiven *Core*-Proteoglycans entwickelt. Dies stellt eine Erweiterung der Synthesemethoden von Proteoglycanen dar.

6. Zusammenfassung

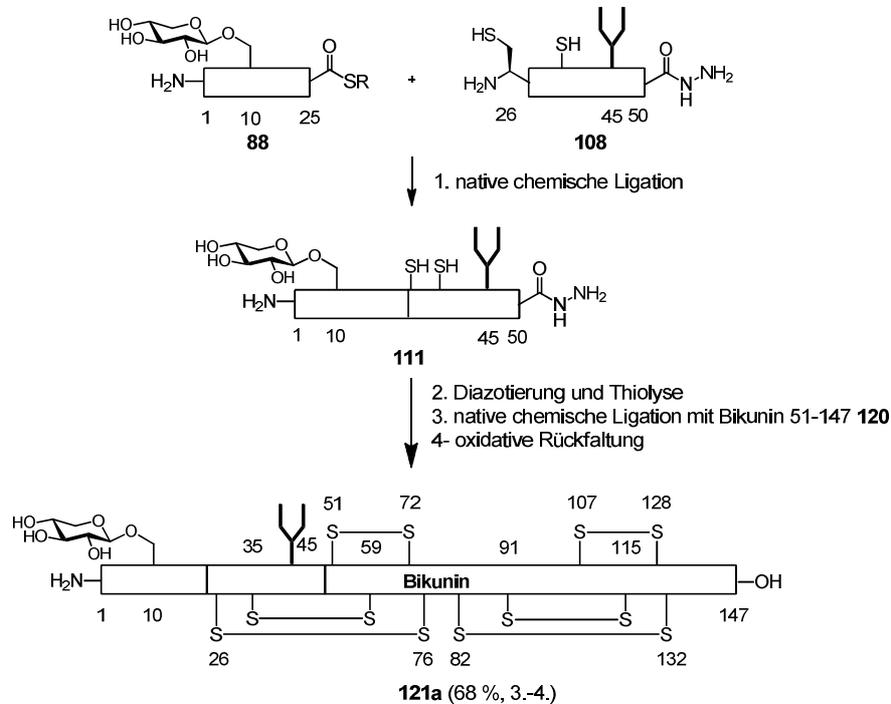
Durch die konvergente Glycopeptidsynthese ist es möglich, Bibliotheken von Glycopeptiden zu synthetisieren, Anhand solcher Glycopeptidbibliotheken können Struktur-Wirkungsbeziehungen untersucht werden. Das HIV-1 Oberflächenprotein gp120 ist stark glycosyliert und wird selektiv von breitneutralisierenden, monoklonalen Antikörpern (z. B. PG9) erkannt. Es wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe *Robinson*¹¹¹ ein glycosyliertes HIV-1 B/C Loop Mimetikum von Phe-159 bis Ala-172 des CAP45⁵³ Strangs synthetisiert. Um den β -Turn in **12** zu stabilisieren, wurde das Templat D-Pro/ L-Pro verwendet.¹⁸⁰ Ein Pseudoprolindipeptid wurde vor die Glycosylierungsstelle Asn-160 eingebaut, um die Aspartimidbildung bei der Synthese zu reduzieren.¹²⁶ Das Peptid **7** (1.8 mM) wurde mit HATU/HOAt zyklisiert, anschließend desallyliert und neben GlcNAc-NH₂ **11** wurde auch Man₅GlcNAc₂-NH₂ **14** gekuppelt. Beide Mimetika **12** und **15** wurden jedoch nicht vom Antikörper PG9 erkannt, da das Peptidrückgrad keinen stabilen β -Hairpin aufwies. Daraufhin wurde Alanin-172 durch Valin ersetzt, außerdem wurden Arginin-166 und Leucin-165 entfernt. Dies führte zum optimierten Glycopeptid **19**, das vom Antikörper PG9 erkannt wurde. Zur Darstellung von Biokonjugaten durch Click-Kupplung wurde ein Glycopeptid aufgebaut. Das Biotin-Konjugat **25** wurde durch Cu^I-katalysierte Addition¹¹³ des Alkins **23** an das Azid **22** erhalten. Das V1/V2 Mimetikum könnte an einem geeigneten Carrier auf diese Weise immobilisiert werden.



In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe *Lichtenstein*¹¹⁶ wurde die Synthese von einheitlich glycosylierten IgG 1 Fc-Fragmenten verfolgt. Es wird vermutet, dass der Abbau von Motorneuronen bei ALS Patienten mit der Struktur der *N*-Glycane des Fc-Teils von ALS spezifischen Antikörpern zusammenhängt.⁷³ Es soll die Wechselwirkung von unterschiedlich glycosylierten Fc-Fragmenten mit Fc-Rezeptoren untersucht werden. Die Peptidthioester IgG1 Fc 223-260 **36** und IgG1 Fc 261-286 **43** wurden durch SPPS, das Glycopeptidhydrazid IgG1 Fc 287-320 **50** durch konvergente Glycopeptidsynthese synthetisiert. Außerdem wurde Fc 287-320 **53** mit *bisected N*-Glycan dargestellt. Das Glycopeptid IgG1 Fc 261-286 **59** war durch Entschützung des Glycopeptids **50** und anschließender nativer chemischer Ligation mit dem Thioester **43** zugänglich. Durch metallfreie Entschwefelung²⁸ wurde aus Cys-287 das native Alanin erhalten. Während der Entschwefelung war das native Cys-261 mit einer PhAcM-Gruppe geschützt. Die PhAcM-Gruppe wurde anschließend enzymatisch durch Penicillin G Acylase^{124,125} in 2 M GdmCl entfernt. Die Thiolyse des Hydrazids **73** und anschließende Ligation mit dem Cystein-Fragment **75** gelang jedoch aufgrund der ϵ -Caprolactambildung des C-terminalen Lysins des Thioesters **74** nicht.



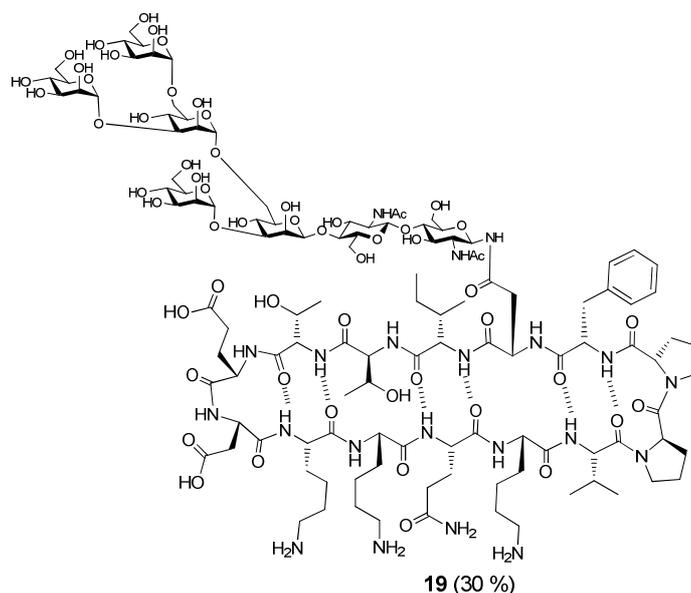
Die Untersuchung von Proteoglycanen ist von Bedeutung, da veränderte Glycosaminoglycane negative Folgen für die menschliche Gesundheit haben können.¹⁸¹ Es wurde die Semisyntese des Modellproteoglycans Bikunin untersucht.



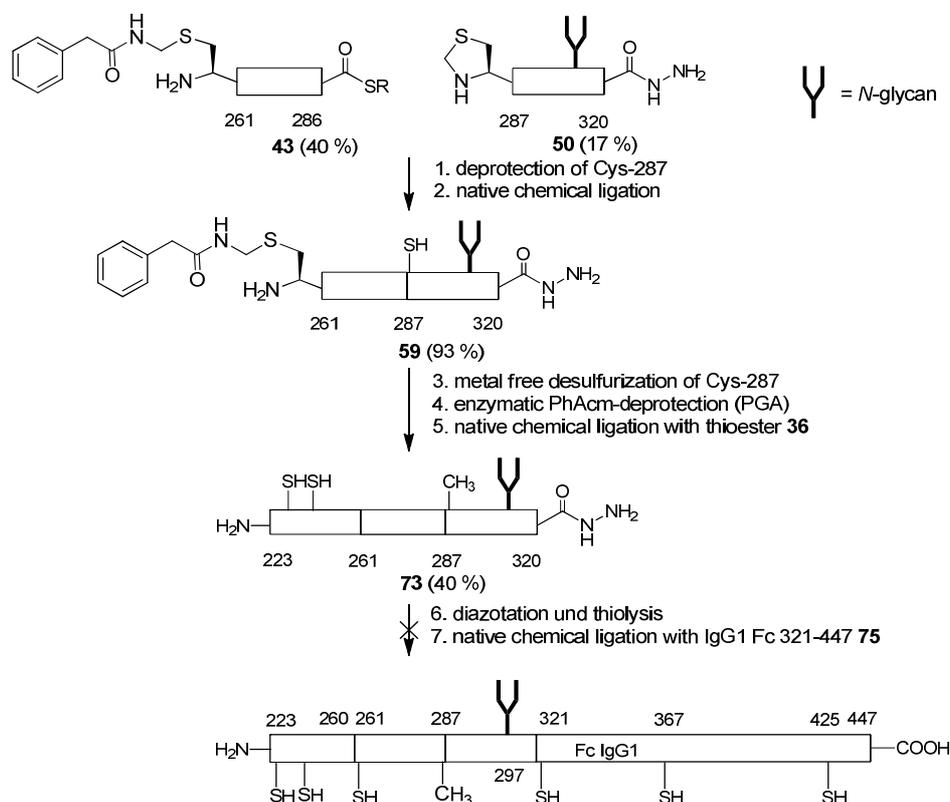
Bikunin wurde in drei Peptide unterteilt. Das *O*-Glycopeptid Bikunin 1-25 **88** und das *N*-Glycopeptid Bikunin 26-50 **108** wurden als Thioester bzw. als Hydrazid synthetisiert. Die Kupplungsbedingungen von der racemisierungsanfälligen *O*-Glycosylaminosäure **82** wurden optimiert.¹⁴⁶ Das *N*-Glycopeptid wurde konvergent unter Verwendung des Glycosylamins **48** erhalten. Das Cysteinfragment Bikunin 51-147 **120** mit N-terminalem His₆-SUMO *Tag* wurde durch rekombinante Expression aus *E. coli* hergestellt und durch enzymatische Spaltung des His₆-SUMO *Tags* freigesetzt. Die Verknüpfung des Thioesters **88** mit dem *N*-Glycopeptid **108** ergab Bikunin 1-50 **111**. Das *N*- und *O*-glycosylierte Bikunin 1-147 **121** konnte nach Umwandlung des Hydrazids **111** zum Thioester und nativer chemischer Ligation mit Bikunin 51-147 **120** erhalten werden. Nach oxidativer Rückfaltung wurde Bikunin **121a** erhalten, das inhibitorische Aktivität gegenüber Trypsin zeigte.

7. Summary

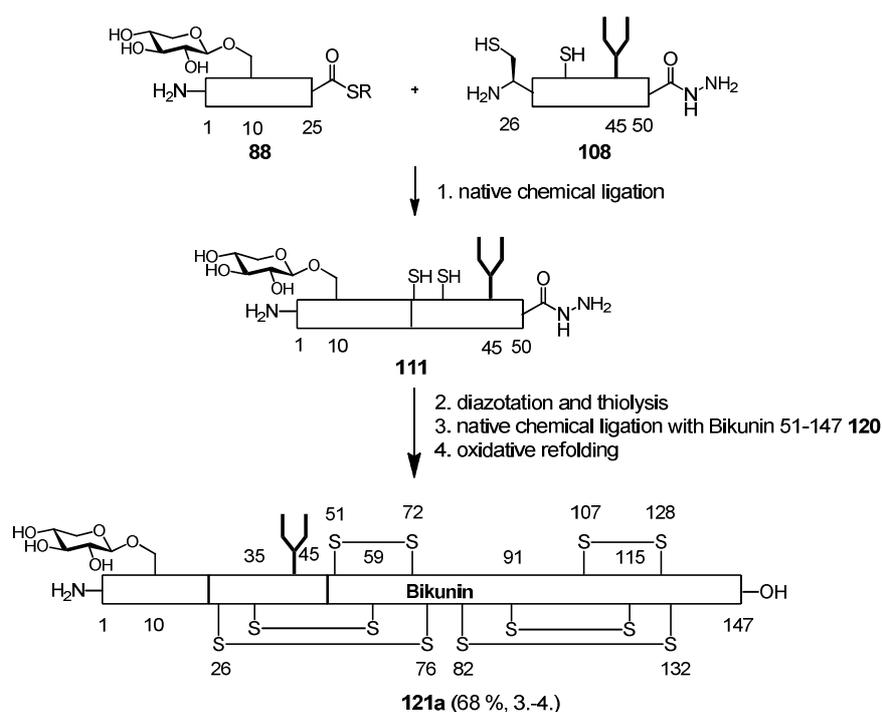
Using the convergent glycopeptide synthesis it is possible to synthesize libraries of homogeneously glycosylated peptides. By means of these homogeneous glycoforms the structure-activity relationship can be investigated. The HIV-1 envelop protein gp120 is highly glycosylated. This represents a target for selective recognition through broadly neutralizing, monoclonal antibodies (PG9). In the context of HIV-1 vaccine design glycopeptide mimetics of gp120 could be synthesized, which are recognized by antibodies like PG9.^{56,57} In cooperation with the research group of *J. A. Robinson*¹¹¹ the synthesis of a glycosylated HIV-1 B/C loop mimetic of CAP45⁵³ from Phe-159 to Ala-172 was pursued. In order to stabilize the β -turn of **12**, the template D-Pro/L-Pro¹⁸⁰ was incorporated. A pseudoproline dipeptide was incorporated adjacent to the glycosylation site Asn-160 in order to reduce aspartimide formation.¹²⁶ The peptide **7** (1.8 mM) was cyclised with HATU/HOAt and subsequently desallylated. Afterwards GlcNAc-NH₂ **11** and Man₅GlcNAc₂-NH₂ **14** respectively was coupled. Both mimetics **12** and **15** were not recognized by the antibody PG9, since the peptide backbone did not form a stable β -hairpin structure. Consequently, alanine-172 was replaced with valine and arginine-166 and Leucin-165 were removed. This led to the optimised glycopeptide **19**, which was recognized by the antibody PG9. In the context of the synthesis of bioconjugates via click chemistry a glycopeptide was obtained. The conjugate **25** was obtained by a copper(I) catalysed cycloaddition of the alkyne **23** to the azide **22**. The V1/V2 mimetic was then immobilised on an appropriate carrier.



In cooperation with the *R. G. Lichtenstein* research group the synthesis of a library of homogeneously glycosylated IgG1 Fc-fragments was pursued. The assumption is that death of neuronal cells in ALS patients is related to the structure of the *N*-glycans conjugated to the Fc of ALS-specific antibodies.⁷³ The interaction of glycosylated Fc-fragments and its Fc-receptors should be investigated. The peptide thioesters IgG1 Fc 223-260 **36** and IgG1 Fc 261-286 **43** were synthesized by solid phase peptide synthesis. The glycopeptide hydrazide **50** was obtained by convergent glycopeptide synthesis. Besides IgG1 Fc 287-320 **53** with bisected *N*-glycan was obtained. The glycopeptide IgG1 Fc 261-286 **59** was accessible by the deprotection of the glycopeptide **50** and subsequent native chemical ligation with the thioester **43**. By metal free desulfurization²⁸ the Cys-287, which was incorporated in order to enable a NCL, was converted to a native Alanine. During desulfuration the native Cys-261 was protected by a PhAcM group. Subsequent deprotection of the PhAcM group was performed enzymatically by Penicillin G Acylase^{124,125} in 2 M GdmCl. Thiolysis of the hydrazide **73** and the last NCL with the Cys-fragment **75** was not successful, because of the ϵ -caprolactam formation of the C-terminal lysine of the thioester **74**.



The investigation of the glycosaminoglycans of proteoglycans is important, since deficient GAG's causes human diseases.¹⁸¹ Herein the semisynthesis of the core proteoglycan bikunin was described. Bikunin was split into three fragments. The *O*-glycopeptide bikunin 1-25 **88** and the *N*-glycopeptide bikunin 26-50 **108** was synthesized as a thioester or hydrazide. The coupling condition of the *O*-glycosyl aminoacid **82** was optimized in order to prevent racemization.¹⁴⁶ The *N*-glycopeptide was obtained in a convergent approach by use of the glycosylamine **48**. The Cys-fragment bikunin 51-147 **120** was recombinantly expressed in *E. coli* and liberated by enzymatic removal of the His₆-SUMO tag. The native chemical ligation of the thioester **88** and the Cys-fragment **108** led to bikunin 1-50 **111**. Finally, the *N*- and *O*-glycosylated bikunin 1-147 **121** was achieved after the conversion of the hydrazide **111** to the thioester **116** and the subsequent native chemical ligation with bikunin 51-147 **120**. After oxidative refolding bikunin **121a** was obtained, which showed activity against trypsin.



8. Experimenteller Teil

8.1 Allgemeines

Die Lösungsmittel in technischer Qualität wurden vor der Verwendung durch Destillation gereinigt. Das Absolutieren von DCM erfolgte über Phosphorpentoxid und von THF über Natrium/Benzophenon. Die Lösungsmittel DMF und NMP in p.a. Qualität wurden über Molekularsieb gelagert. Das verwendete Wasser war von HPLC-Qualität. Die Mischungsverhältnisse von Lösungsmitteln werden im Syntheseprotokoll als Volumenanteile (v/v) angegeben. Für die quantitative Bestimmung des Beladungsgrades und für die Messung der Absorption von *para*-Nitroanilin wurde ein Spektralphotometer Specord 2000 von Analytik Jena benutzt.

Die LC-MS-Analysen wurden mit einem Micromass LCT ESI-TOF-Massenspektrometer mit LC-Kupplung durchgeführt. Als HPLC-Anlage wurde eine Agilent HP 1100 Anlage mit Photodiodendetektor von 200 bis 300 nm eingesetzt. Die LC-Trennungen erfolgten über eine RP-Säule YMC-Pack Hydro C18 12 nm, S-3 μm (50×2.1 mm), YMC-Pack Pro C8 12 nm, S-3 μm (50×2.1 mm), YMC-Pack Pro C4 30 nm, S-3 μm (50×2.1 mm) bzw. YMC Ultra HT Hydro C18 12 nm, S-2 μm (30×2 mm). Ein Lineargradient aus Acetonitril/Wasser + 0.1 % Ameisensäure wurde zur Elution verwendet.

Desweiteren erfolgten MS-Analysen mit einem Q Exactive™ Orbitrap Massenspektrometer. Für analytische und präparative Trennungen wurde eine Pharmacia Äkta Basic HPLC-Anlage mit einer Pharmacia Biotech P-900 Gradientenpumpe und einem Pharmacia Biotech UV-900 Detektor verwendet. Die UV-Absorption erfolgte bei 214, 254 und 280 nm. Für präparative *reversed-phase* HPLC erfolgten die Trennungen über eine RP-Säule Ascentis C18 (250×10 mm) und RP-Säule YMC-Pack Hydro C18 (150×10 mm). Ein Lineargradient aus Acetonitril/Wasser + 0.1 % TFA bzw. Acetonitril/Wasser + 0.1 % HCOOH wurde zur Elution verwendet. Gelpermeationschromatographietrennungen erfolgten über eine Superdex Peptide® PE Säule (300×10 mm) mit 30 % bzw. 50 % Acetonitril/Wasser + 0.1 % TFA bzw. HCOOH als Laufmittel.

Für die organische Gelpermeationschromatographie wurde DCM absolutiert und filtriert (Porengröße des Filters: $0.45 \mu\text{m}$). Es wurde eine Agilent 1200-Anlage mit einem Photodiodendetektor der Serie 1100 verwendet. Die UV-Absorption wurde bei 214, 254 und 280 nm detektiert. Als Gelmaterial diente Biobeads SX-1 (980×25 mm). Festphasenextraktionen erfolgten über SepPak Classic C18 Silica-Säulen, 5 g, $55\text{-}105 \mu\text{m}$. Als

Lösungsmittel dienten Eluens A Wasser (0.1 % Ameisensäure) und Eluens B Acetonitril (0.1 % Ameisensäure).

NMR-Spektren werden an einem Bruker Avance DRX-500-FT-Spektrometer gemessen. Als Lösungsmittel und interner Standard wurden $[D_6]$ -DMSO ($\delta(^1H) = 2.49$ ppm bzw. D_2O) verwendet. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm) und wurden in ppm angegeben. Die Zuordnung erfolgte anhand von Spektrensätzen bestehend aus 1H , ^{13}C , HH-COSY, HH-TOCSY, NOESY, HMQC-COSY Experimenten.

Dünnschichtchromatographien wurden mit Aluminiumfertigfolien (Alugram Sil G/UV254) der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Die Detektion erfolgte zum einen über Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, zum anderen durch ein Anfärbereagenz. Dieses besteht aus einer Mischung aus gleichen Teilen 1 M Schwefelsäure und 0.2 %-iger ethanolischer Resorcinmonomethyletherlösung. Darin wurden die DC-Platten eingetaucht und in einem Heißluftstrom entwickelt.

Die automatische Festphasenpeptidsynthese wurde an dem Peptidsynthesizer Tribute mit IntelliSynth™ UV-Monitoring bei 301 nm von Protein Technologies, Inc. durchgeführt. Es wurden 45 mL Reaktionsgefäße verwendet und unter Stickstoffatmosphäre gearbeitet. Kupplungen im Mikrowellenreaktor erfolgten in einem μ CHEMIST-Gerät der Firma MLS (Leutkirch, Deutschland) mit faseroptischer Temperaturkontrolle. Die angegebenen Watt-Werte beziehen sich auf die maximal eingestrahlte Leistung. Zur Flashchromatographie wurde ein GRACE Reveleris® iES-Flash-System mit einem ELS-Detektor verwendet. Zudem erfolgte die Detektion durch Absorptionsmessung bei 254 nm und 280 nm.

Die Arbeiten unter anaeroben Bedingungen wurden in einer anaeroben Glovebox von COY Laboratory Products Inc. (Michigan, USA) durchgeführt.

Die Boc-geschützten Aminosäuren, teils die Fmoc-geschützten Aminosäuren, das Kupplungsreagenz PyBOP, teils Fmoc-geschützte Pseudoprolindipeptide, Fmoc-Asp(OAll)-OH und Fmoc-Dmb-Gly-OH wurden von der Firma Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz) bezogen. Zum Teil wurden Pseudoprolindipeptide von BACHEM (Schweiz) verwendet. Die Kupplungsreagenzien HCTU, Cl-HOBt, das 2-Cl-Tritylchlorid-PS-Harz sowie einige Fmoc-geschützte Aminosäuren wurden von Iris Biotech (Marktredwitz, Deutschland) erworben. Das verwendete HATU und HOAt wurden von Carbolution Chemicals GmbH erhalten. Das ChemMatrix-Harz und das Trt-ChemMatrix-Harz wurden von PCAS (St-Jean-sur-Richelieu, Kanada) bezogen. Die Reagenzien DIC, TES wurden von Acros (Geel, Belgien), Acetylbromid und DIPEA von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. $Pd(PPh_3)_4$, $Pd^{II}EnCat^{\circledR}$ 30 (0.04 mmol/g), TFA, HFIP, Fmoc-Cys(St-Bu)-OH, Boc-Cys(St-Bu)-OH, *tert*-Butylcarbazat,

*n*Bu-3-Mercaptopropionat, 1,3-Propanedithiol und Hexamethylenimin Sigma Aldrich bezogen und Phenylsilan von Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland) erworben. Hydrazinhydrat wurde von Merck (Hohenbrunn, Deutschland) bezogen. Das für die Synthese verwendete DMF, NMP und Pyridin hatte Peptidsynthesequalität, das verwendete Piperidin hatte z. S.-Qualität. Als Reaktoren für die manuelle Festphasensynthese wurden 2, 5, 10 und 20 mL Polypropylenspritzen mit PE-Fritten (25 μ m) von MultiSynTech GmbH (Witten, Deutschland) verwendet. *Human urinary trypsin inhibitor* (UTI) aus humanem Urin von Biorbyt (Cambridge), Trypsin aus boviner Pancreas und *N* α -Benzoyl-D,L-Arginin-4-Nitroanilin (BAPNA) wurden von Sigma Aldrich erhalten. α -2,6-Sialyltransferase aus *Photobacterium damsela*, exprimiert in *E. coli* wurde ebenfalls von Sigma Aldrich bezogen. CMP-NeuAc und alkalische Phosphatase (*from calf intestine*) stammte von Roche. BSA (*from bovine milk*) wurde von New England Biolabs Inc. bezogen. Die Galactosyltransferasen β 4GalT7 und β 3GalT6 wurden von der Arbeitsgruppe *H. Clausen* (Copenhagen Center for Glycomics, Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Copenhagen) zur Verfügung gestellt. GFP-markiertes GlcAT1 Enzym wurde von der Arbeitsgruppe *K. Moreman* (Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia) die *O*-Glycosylaminosäure Fmoc-Xyl-Ser-OH **81** wurde von der Arbeitsgruppe *S. C. Hung* (Genomics Research Center, Taiwan) zur Verfügung gestellt.

8.2 Versuche zu Kapitel 3.1

Fmoc-Phe-2-Chlor-Trityl-Polystyrol-Harz 7a

81.4 mg (0.2 mmol, 1 eq) Fmoc-Phe-OH werden in 2 mL DCM gelöst und mit 179.8 μ L (1.5 mmol, 5 eq) DIPEA versetzt. Die Lösung wird zu 300.1 mg (0.21 mmol, $B_H = 0.701$ mmol/g) vorgequollenem 2-Chlor-Trityl-PS-Harz **77**, das sich in einem Spritzenreaktor befindet, aufgezogen. Die Reaktionslösung wird 20 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Harz **7a** gewaschen (2 \times NMP, 3 \times DCM) und mit einer Lösung aus DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1) 3 \times 2 min geschüttelt. Das Harz **7a** wird erneut 2 \times mit NMP und 3 \times mit DCM gewaschen. Eine Fmoc-Bestimmung wird nicht durchgeführt, da das Fmoc bereits während der Synthese abspaltet.

Fmoc-Asp(OAll)-Ile-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Thr(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Leu-Arg(Pbf)-Asp(t-Bu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Ala-pro-Pro-Phe-OH 7

Es werden mit 330.01 mg Harz **7a** weitergearbeitet. Die Kupplung der Aminosäuren an das Fmoc-Phe-2-Chlor-Trityl-Polystyrol-Harz **7a** (0.201 mmol, $B_H = 0.602$ mmol/g) erfolgt im Peptidsynthesizer.

Tabelle 2: Kupplungssequenz für die Synthese von **7**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Kupplungsdauer [min]
Pro	Fmoc-Pro-OH	354.1	30
pro	Fmoc-pro-OH	353.9	45
Ala- 172	Fmoc-Ala-OH	345.9	30
Lys-171	Fmoc-Lys(Boc)-OH	492.4	30
Gln- 170	Fmoc-Gln(Trt)-OH	641.5	30
Lys- 169	Fmoc-Lys(Boc)-OH	492.4	30
Lys- 168	Fmoc-Lys(Boc)-OH	492.4	30
Asp-167	Fmoc-Asp(t-Bu)-OH	432.1	30
Arg-166	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	681.7	30
Leu-165	Fmoc-Leu-OH	371.8	30
Glu-164	Fmoc-Glu(t-Bu)-OH	446.3	30
Thr-163	Fmoc-Thr(t-Bu) -OH	418.2	30
Thr-162, Ile-161	Fmoc-Ile-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-OH	312.3	45
Asp-160	Fmoc-Asp(OAll)-OH	248.9	45

Zu den eingewogenen Aminosäuren und Aktivierungsreagenzien werden im Synthesizer je 4.0 mL einer 0.4 M DIPEA in DMF-Lösung gegeben. Die Aminosäuren (1.1 mmol, 5 eq) werden mit 434.5 mg HCTU (1.1 mmol, 5 eq) aktiviert. Von Fmoc-Asp(OAll)-OH und Fmoc-Ile-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-OH (0.7 mmol, 3 eq) werden mit 327.9 mg PyBOP (0.6 mmol, 3 eq) aktiviert. Die Kupplungsdauer und Aktivierungsbedingungen der jeweiligen Aminosäuren sind aus Tabelle 2 zu entnehmen. Im Anschluss an die Synthese wird das Harz mit 4 mL 20 % Piperidin/DMF behandelt und 5 \times mit DMF und 3 \times mit DCM gewaschen. Anschließend wird das Harz mit einer Abspaltungslösung aus 80 mL 1.5 % TFA und 2 % TES in DCM 10 \times 2 min gewaschen und anschließend 3 \times mit DCM gewaschen. Die Filtrate werden in einem Kolben gesammelt, worin 2.7 mL DIPEA (1 eq bezogen auf TFA) vorgelegt werden, eingengt und im

Hochvakuum getrocknet. Das Rohpeptid wird in 200 mL DCM gelöst und 3 × mit je 200 mL einer gesättigten NaCl-Lösung extrahiert. Die wässrigen Phasen werden rückextrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, eingengt, in 20 mL 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Es wird eine analytische TFA-Abspaltung 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % H₂O) und das Peptid **7e** durch LC-MS analysiert. Die Ausbeute beträgt 201.1 mg (0.1 mmol, 78 %), bezogen auf die theoretische Beladung des geschützten Peptids an der Festphase. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C 18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 10 → 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

H-Asp(OAll)-Ile-Thr-Thr-Glu-Leu-Arg-Asp-Lys-Lys-Gln-Lys-Ala-pro-Pro-Phe-OH 7e

C₈₇H₁₄₃N₂₃O₂₆ (1927.20),

ESI-MS: M_{ber} = 1926.06; M_{gef} = 1927.97 (M + H)⁺, 964.42 (M + 2H)²⁺, 642.93 (M + 3H)³⁺.

Cyclo-Asp(OAll)-Ile-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Thr(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Leu-Arg(Pbf)-Asp(t-Bu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Ala-pro-Pro-Phe- 8

200.1 mg Peptid (0.1 mmol, 1 eq) **7** werden in 41.7 mL DMF (c = 1.8 mM) gelöst. Anschließend werden 85.6 mg HATU (0.3 mmol, 3 eq), 153.7 mg HOAt (0.3 mmol, 3 eq) und 64.4 μL DIPEA (0.3 mmol, 3 eq) hinzugegeben. Die Reaktion wird 1.5 h gerührt, anschließend eingengt und im HV getrocknet. Das Rohpeptid wird in DCM gelöst und der Niederschlag wird abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand durch organische Gelpermeationschromatographie gereinigt. Es wird eine analytische TFA-Abspaltung 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % H₂O) und das Peptid **8e** durch LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C 18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 10 → 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

Cyclo-Asp(OAll)-Ile-Thr-Thr-Glu-Leu-Arg-Asp-Lys-Lys-Gln-Lys-Ala-pro-Pro-Phe- 8e

C₈₇H₁₄₁N₂₃O₂₅ (1909.19),

Ausbeute: 148.10 mg (0.074 mmol, 71 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} = 1908.05; M_{gef} = 1910.51 (M + H)⁺, 955.73 (M + 2H)²⁺, 637.15 (M + 3H)³⁺, 478.15 (M + 4H)⁴⁺.

Cyclo-Asp-Ile-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Thr(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Leu-Arg(Pbf)-Asp(t-Bu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Ala-pro-Pro-Phe- 9

Es werden 148.1 mg des geschützten Peptids **8** (74.0 μmol , 1 eq) in einen 10 mL Spitzkolben gegeben und in 1.3 mL absolutem DCM gelöst. Unter Schutzgasatmosphäre werden 29.5 mg $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (37.0 μmol , 0.5 eq) und 75.7 μL PhSiH_3 (0.9 mmol, 12 eq) zugegeben. Die Reaktion wird 3 h im Dunkeln gerührt. Die Reaktion wird eingengt und danach in 5 mL Methanol suspendiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert. Zum Überstand werden 3 mL H_2O zugegeben und wiederum wird der Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wird eingengt und gefriergetrocknet. Es wird eine analytische TFA-Abspaltung 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % H_2O) und das Peptid **9e** durch LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C 18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

Cyclo-Asp-Ile-Thr-Thr-Glu-Leu-Arg-Asp-Lys-Lys-Gln-Lys-Ala-pro-Pro-Phe- 9e

$\text{C}_{84}\text{H}_{137}\text{N}_{23}\text{O}_{25}$ (1869.13),

Ausbeute: 49.8 mg (26.6 μmol , 36 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 1868.02$; $M_{\text{gef}} = 1870.50$ ($M + \text{H}$)⁺, 935.28 ($M + 2\text{H}$)²⁺, 623.85 ($M + 3\text{H}$)³⁺, 468.40 ($M + 4\text{H}$)⁴⁺.

Cyclo-Asn(GlcNAc)-Ile-Thr-Thr-Glu-Leu-Arg-Asp-Lys-Lys-Gln-Lys-Ala-pro-Pro-Phe-CO- 12

Es werden 20.0 mg des desallylierten Peptids **9** (10.7 μmol , 1 eq) in einen Langhalskolben mit Schraubseptum gegeben. Danach werden 6.7 mg HATU (26.8 μmol , 2.5 eq), 2.4 mg HOAt (26.8 μmol , 2.5 eq) und 4.8 μL DIPEA (42.8 μmol , 4 eq) in 175.0 μL DMSO/DMF (1/1) (40 mM) zugegeben und 20 min gerührt. Anschließend werden 3.9 mg GlcNAc-NH_2 **11** (26.8 μmol , 2.5 eq) zugegeben. Der Kolben wird unter Argon gesetzt und die Reaktion 2 d bei RT gerührt. Die Reaktion wird per LC-MS kontrolliert. Die Reaktion wird im Hochvakuum eingengt. Der Rückstand wird in 2 mL 96 % TFA, 2 % TES und 2 % H_2O gelöst und 2 h geschüttelt. Das Glycopeptid **12** wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether ausgefällt (15 min bei -24 °C) und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekandiert und das Präzipitat 2 \times mit kaltem Diethylether gewaschen. Die Rohsubstanz wird über eine Ascentis C18 Säule (250 \times 10 mm) mit einem Gradienten von 5 bis 50 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 55 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden

gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm ($50 \times 2.1 \text{ mm}$); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient $0 \rightarrow 60 \%$ B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{92}\text{H}_{151}\text{N}_{25}\text{O}_{29}$ (2071.33),

Ausbeute: 6.9 mg (3.3 μmol , 31 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 2070.11$; $M_{\text{gef}} = 2071.55$ ($M + H$)⁺, 1036.21 ($M + 2H$)²⁺, 690.79 ($M + 3H$)³⁺, 518.62 ($M + 4H$)⁴⁺.

O-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-O-{ α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O-[α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-O-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)}-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosylamin α -Man-1,3-{ α -Man-1,3-[α -Man-1,6]- α -Man-1,6}- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-NH₂) **14**

2.3 mg (1.9 μmol , 1 eq) Glycosylazid **13** werden in 0.4 mL MeOH_{abs} gelöst. Dann werden 3.2 μL (18.5 μmol , 10 eq) DIPEA und 180.1 μL (0.4 mmol, 180 eq) 1,3-Propandithiol hinzugegeben. Die Reaktion wird 7 h unter Argonatmosphäre gerührt. Der Reaktionsverlauf wird per DC überprüft. Das Produkt **14** wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether ausgefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Präzipitat 2 h im Hochvakuum getrocknet.

$\text{C}_{46}\text{H}_{79}\text{N}_3\text{O}_{35}$ (1234.12),

13 $R_f = 0.46$ (Isopropanol/1 M NH₄OAc 2:1)

14 $R_f = 0.29$ (Isopropanol/1 M NH₄OAc 2:1).

Cyclo-Asn(Man₅GlcNAc₂)-Ile-Thr-Thr-Glu-Leu-Arg-Asp-Lys-Lys-Gln-Lys-Ala-pro-Pro-Phe-
15

Es werden 4.5 mg des desallylierten Peptids (1.5 μmol , 1 eq) **9** in einen Langhalskolben mit Schraubseptum gegeben. Danach werden 0.9 mg HATU (2.3 μmol , 1.5 eq), 0.3 mg HOAt

(2.3 μmol , 1.5 eq) und 1.1 μL DIPEA (6.1 μmol , 4 eq) in 46.3 μL DMSO/DMF (1/1) (40 mM) zugegeben und 20 min gerührt. Anschließend werden 2.3 mg $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-NH}_2$ **14** (1.9 μmol , 1.2 eq) zugegeben. Der Kolben wird unter Argon gesetzt und 2 d bei RT gerührt. Die Reaktion wird per LC-MS kontrolliert. Die Reaktion wird im Hochvakuum eingengt. Der Rückstand wird in 2 mL 96 % TFA, 2 % TES und 2 % H_2O gelöst und 2 h geschüttelt. Das Glycopeptid **15** wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether ausgefällt (15 min bei -24°C) und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Präzipitat 2 \times mit kaltem Diethylether gewaschen. Die Rohsubstanz wird über eine Ascentis C18 Säule (250 \times 10 mm) mit einem Gradienten von 5 bis 40 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 55 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 0 \rightarrow 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{130}\text{H}_{215}\text{N}_{26}\text{O}_{59}$ (3086.24),

Ausbeute: 1.2 mg (0.4 μmol , 25 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 3084.46$; $M_{\text{gef}} = 1543.41$ ($M + 2\text{H}$)²⁺, 1029.24 ($M + 3\text{H}$)³⁺, 762.26 ($M + 4\text{H}$)⁴⁺.

8.3 Versuche zu Kapitel 3.2

Fmoc-Pro-2-Chlor-Trityl-Polystyrol-Harz 7b

95.6 mg (0.3 mmol, 1 eq) Fmoc-Pro-OH werden in 3 mL DCM/NMP (1/1) gelöst und mit 242.2 μL (1.5 mmol, 5 eq) DIPEA versetzt. Die Lösung wird zu 404.7 mg (0.282 mmol, $B_{\text{H}} = 0.7$ mmol/g) vorgequollenem 2-Chlor-Trityl-PS-Harz **77**, das sich in einem Spritzenreaktor befindet, aufgezogen. Die Reaktionslösung wird 20 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Harz **7b** gewaschen (2 \times NMP, 3 \times DCM) und mit einer Lösung aus DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1) für 3 \times 2 min geschüttelt. Das Harz **7b** wird erneut 2 \times mit NMP und 3 \times mit DCM gewaschen. Eine Fmoc-Bestimmung wird nicht durchgeführt, da das Fmoc bereits während der Synthese abspaltet.

*Fmoc-Phe-Asp(OAll)-Ile-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-Thr(*t*-Bu)-Glu(*t*-Bu)-Asp(*t*-Bu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln(*Trt*)-Lys(Boc)-Val-pro-Pro-OH 17*

Es werden mit 380.10 mg Harz **7b** weitergearbeitet. Die Kupplung der Aminosäuren an das Harz **7b** (0.232 mmol, $B_H = 0.603$ mmol/g) erfolgt im Peptidsynthesizer. Zu den eingewogenen Aminosäuren und Aktivierungsreagenzien werden im Synthesizer je 3 mL einer 0.4 M DIPEA in DMF-Lösung gegeben.

Tabelle 3: Kupplungssequenz für die Synthese des geschützten V1/V2 Mimetikums **17**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Kupplungsdauer [min]
pro	Fmoc-D-Pro-OH	389.1	45
Val-172	Fmoc-Val-OH	390.3	30
Lys- 71	Fmoc-Lys(Boc)-OH	538.7	30
Gln-170	Fmoc-Gln(Trt)-OH	702.3	30
Lys- 169	Fmoc-Lys(Boc)-OH	538.7	30
Lys-168	Fmoc-Lys(Boc)-OH	538.7	30
Asp-167	Fmoc-Asp(t-Bu)-OH	452.7	30
Glu-164	Fmoc-Glu(t-Bu)-OH	168.3	30
Thr-163	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH	337.3	30
Thr-162, Ile-161	Fmoc-Ile-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	341.3	45
Asp-160	Fmoc-Asp(OAll)-OH	272.8	45
Phe-159	Fmoc-Phe-OH	426.1	30

Die Aminosäuren (1.2 mmol, 5 eq) werden mit 455.1 mg HCTU (1.2 mmol, 5 eq) aktiviert. Fmoc-Asp(OAll)-OH und Fmoc-Ile-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH (0.7 mmol, 3 eq) werden mit 359.1 mg PyBOP (0.7 mmol, 3 eq) aktiviert. Die Kupplungsdauer und Aktivierungsbedingungen der jeweiligen Aminosäuren sind aus Tabelle 3 zu entnehmen. Im Anschluss an die Synthese wird das Harz mit 4 mL 20 % Piperidin/DMF behandelt, 5 \times mit DMF und 3 \times mit DCM gewaschen. Anschließend wird das Fragment mit einer Abspaltungslösung aus 4 mL 1.5 % TFA und 2 % TES in DCM für 10 \times 2 min gewaschen und anschließend 3 \times mit DCM gewaschen. Die Filtrate werden in einem Kolben gesammelt, worin 2.7 mL DIPEA (1 eq bezogen auf TFA) vorgelegt werden, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohpeptid wird in 200 mL DCM gelöst und 3 \times mit je 200 mL einer gesättigten NaCl-Lösung extrahiert. Die wässrigen Phasen werden rückextrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, eingengt, in 20 mL 1,4-

Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Die Ausbeute beträgt 601.1 mg (0.2 mmol, 80 %), bezogen auf die theoretische Beladung des geschützten Peptids an der Festphase.

*Cyclo-Phe-Asp(OAll)-Ile-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Thr(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Asp(t-Bu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Val-pro-Pro- **17b***

601.1 mg Peptid **17** (0.2 mmol, 1 eq) werden in 111 mL DMF ($c = 1.8$ mM) gelöst. Anschließend werden 409.3 mg HATU (0.6 mmol, 3 eq), 103.7 mg HOAt (0.6 mmol, 3 eq) und 181.2 μ L DIPEA (0.8 mmol, 4 eq) hinzugegeben. Die Reaktion wird 1.5 h gerührt, anschließend eingengt und im HV getrocknet. Die Rohsubstanz wird in 200 mL DCM gelöst und $3 \times$ mit je 200 mL einer 2 M NH_4HCO_3 -Lösung extrahiert. Die wässrigen Phasen werden rückextrahiert. Die organischen Phasen werden vereint und eingengt. Das Rohpeptid wird in DCM gelöst und der Niederschlag abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand eingengt und durch organische Gelpermeationschromatographie gereinigt.

$\text{C}_{126}\text{H}_{188}\text{N}_{18}\text{O}_{29}$ (2418.94),

Ausbeute: 342.67 mg (0.134 mmol, 67 %), weißer Feststoff.

*Cyclo-Phe-Asp-Ile-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Thr(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Asp(t-Bu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Val-pro-Pro- **18***

Es werden 66.5 mg des geschützten Peptids **17b** (27.5 μ mol, 1 eq) in einen 10 mL Spitzkolben gegeben und in 688.0 μ L absolutem DCM gelöst. Unter Schutzgasatmosphäre werden 15.9 mg $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (14.0 μ mol, 0.5 eq) und 40.7 μ L PhSiH_3 (0.6 mmol, 12 eq) zugegeben. Die Reaktion wird 3 h im Dunkeln gerührt. Die Reaktion wird eingengt und danach in 5 mL Methanol suspensiert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert. Zum Überstand werden 3 mL H_2O zugegeben und wiederum wird der Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wird eingengt und gefriergetrocknet. Die Rohsubstanz wird in DCM gelöst und durch organische Gelpermeationschromatographie gereinigt. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C8 S-3 μ m (50×2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 40 \rightarrow 90 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{118}\text{H}_{176}\text{N}_{18}\text{O}_{27}$ (2378.88),

Ausbeute: 26.9 mg (11.3 μmol , 41 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 2377.35$; $M_{\text{gef}} = 2136.60$ (M-Acetonid, -2Boc, +H)⁺, 968.79 (M-Trt, -2Boc + 2H)²⁺.

Cyclo-Phe-Asn(Man₅GlcNAc₂)-Ile-Thr-Thr-Glu-Asp-Lys-Lys-Gln-Lys-Val-pro-Pro- 19

Es werden 4.0 mg des desallylierten Peptids (1.7 μmol , 1 eq) in einen Langhalskolben mit Schraubseptum gegeben. Danach werden 1.0 mg HATU (2.5 μmol , 1.5 eq), 0.3 mg HOAt (2.5 μmol , 1.5 eq) und 1.2 μL DIPEA (6.7 μmol , 4 eq) in 42.0 μL DMSO/DMF (1/1) (40 mM) zugegeben und 20 min gerührt. Anschließend werden 2.5 mg Glycosylamin **14** zugegeben. Der Kolben wird unter Argon gesetzt und die Reaktion 2 d bei RT gerührt. Nach 1 d wird mit 1.0 mg HATU (2.5 μmol , 1.5 eq), 0.3 mg HOAt (2.5 μmol , 1.5 eq) und 1.2 μL DIPEA (6.7 μmol , 4 eq) nachaktiviert. Die Reaktion wird per LC-MS kontrolliert. Die Reaktion wird im Hochvakuum eingengt. Der Rückstand wird in 2 mL 96 % TFA, 2 % TES und 2 % H₂O gelöst und 2 h geschüttelt. Das Glycopeptid **19** wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether ausgefällt (15 min bei -24 °C) und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Präzipitat 2 \times mit kaltem Diethylether gewaschen. Die Rohsubstanz wird über eine Ascentis C18 Säule (250 \times 1 mm) mit einem Gradienten von 5 bis 40 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 55 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₁₂₀H₁₉₅N₂₁O₅₇ (2843.94),

Ausbeute: 1.4 mg (0.501 μmol , 30 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 2842.30$; $M_{\text{gef}} = 1423.02$ (M + 2H)²⁺, 949.04 (M + 3H)³⁺.

8.4 Versuche zu Kapitel 3.3

Fmoc-4-Azido-Pro(2S,4R)-2-Chlor-trityl-Polystyrol-Harz 7c

152.8 mg (0.4 mmol, 1 eq) Fmoc-4-Azido-Pro(2S,4R)-OH werden in 2 ml DCM gelöst und mit 276.5 μL (1.6 mmol, 4 eq) DIPEA versetzt. Die Lösung wird zu 403.7 mg (0.4 mmol, B_H =

1.0 mmol/g) vorgequollenem 2-Chlor-Trityl-PS-Harz **77**, das sich in einem Spritzenreaktor befindet, aufgezogen. Die Reaktionslösung wird 20 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Harz **7c** gewaschen (2 × NMP, 3 × DCM). Eine Fmoc-Bestimmung wird nicht durchgeführt, da das Fmoc bereits während der Synthese abspaltet.

*Fmoc-Phe-Asp(OAll)-Ile-Thr($\psi^{Me,Me}$ pro)-Thr(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Asp(t-Bu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Val-pro-4-Azido-Pro(2S,4R)-OH **20***

Die Kupplung der Aminosäuren an das Fmoc-4-Azido-Pro(2S,4R)-2-Chlor-Trityl-Polystyrol-Harz **7c** (0.4 mmol, $B_H = 1.0$ mmol/g) erfolgt im Peptidsynthesizer. Zu den eingewogenen Aminosäuren und Aktivierungsreagenzien werden im Synthesizer je 2 mL einer 0.4 M DIPEA in DMF-Lösung gegeben. Die Aminosäuren (2.0 mmol, 5 eq) werden mit 834.9 mg HCTU (2.0 mmol, 5 eq) aktiviert. Fmoc-Asp(OAll)-OH und Fmoc-Ile-Thr($\psi^{Me,Me}$ pro)-OH (1.2 mmol, 3 eq) werden mit 630.0 mg PyBOP (1.2 mmol, 3 eq) aktiviert. Die Kupplungsdauer und Aktivierungsbedingungen der jeweiligen Aminosäuren sind aus Tabelle 4 zu entnehmen. Im Anschluss an die Synthese wird das Harz mit 4 mL 20 % Piperidin/DMF behandelt, 5 × mit DMF und 3 × mit DCM gewaschen. Anschließend wird das Harz mit einer Abspaltungslösung aus 5 mL 1.5 % TFA und 2 % TES in DCM 10 × 2 min gewaschen und anschließend 3 × mit DCM gewaschen. Die Filtrate werden in einem Kolben gesammelt, worin 2.66 mL DIPEA (1 eq bezogen auf TFA) vorgelegt werden, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohpeptid wird in 200 mL DCM gelöst und 3 × mit je 200 mL einer gesättigten NaCl-Lösung extrahiert. Die wässrigen Phasen werden rückextrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, eingengt, in 20 mL 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Es werden 240.8 mg Rohprodukt erhalten.

*Tabelle 4: Kupplungssequenz für die Synthese des geschützten V1/V2 Mimetikums mit Azidoprolin **20**.*

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Kupplungsdauer [min]
pro	Fmoc-pro-OH	680.9	45
Val-172	Fmoc-Val-OH	684.9	30
Lys- 171	Fmoc-Lys(Boc)-OH	945.4	30

Gln- 170	Fmoc-Gln(Trt)-OH	1232.4	30
Lys-169	Fmoc-Lys(Boc)-OH	945.4	30
Lys-168	Fmoc-Lys(Boc)-OH	945.4	30
Asp-167	Fmoc-Asp(t-Bu)-OH	830.4	30
Glu-164	Fmoc-Glu(t-Bu)-OH	858.7	30
Thr-163	Fmoc-Thr(t-Bu) -OH	802.2	30
Thr-162 , Ile-161	Fmoc-Ile-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	598.9	45
Asp-160	Fmoc-Asp(OAll)-OH	478.8	45
Phe-159	Fmoc-Phe-OH	781.8	30

Es wird eine analytische TFA-Abspaltung 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % H₂O) und das Peptid durch LC-MS charakterisiert. Die Ausbeute beträgt 240.8 mg (0.05 mmol, 80 %), bezogen auf die theoretische Beladung des geschützten Peptids an der Festphase.

Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C 18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

NH₂-Phe-Asp(OAll)-Ile-Thr-Thr-Glu-Asp-Lys-Lys-Gln-Lys-Val-pro-4-Azido-Pro(2S,4R)-OH
20e

C₂₃₆H₃₂₃N₂₉O₄₈S₄ (4459.26 g/mol).

Cyclo-Phe-Asp(OAll)-Ile-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Thr(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Asp(t-Bu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Val-pro-4-Azido-Pro(2S,4R)- **20C**

240.8 mg Peptid **20** (0.05 mmol, 1 eq) werden in 53.7 mL DMF (c = 1.8 mM) gelöst. Anschließend werden 110.2 mg HATU (0.1 mmol, 3 eq), 39.4 mg HOAt (0.1 mmol, 3 eq) und 66.1 μL DIPEA (0.4 mmol, 4 eq) hinzugegeben. Die Reaktion wird 1.5 h gerührt, anschließend eingengt und im HV getrocknet. Die Rohsubstanz wird in 200 mL DCM gelöst und 3 \times mit jeweils 200 mL einer 2 M NH₄HCO₃-Lösung extrahiert. Die wässrigen Phasen werden rückextrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, eingengt, in 20 mL 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Die Rohsubstanz wird durch Flash-Chromatographie (Reveleris® iES, Kartuschengröße 40 g, DCM/MeOH, 0 \rightarrow 10 %, 30 min, 36 mL/min) gereinigt werden. Die Fraktionen mit der Zielverbindung werden eingengt, in 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet.

C₂₃₆H₃₂₁N₂₉O₄₇S₄ (2459.96 g/mol),

Ausbeute: 90.2 mg (36.3 μmol, 48 %).

Cyclo-Phe-Asp-Ile-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Thr(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Asp(t-Bu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Val-pro-4-Azido-Pro(2S,4R)- 21

Es werden 90.2 mg des geschützten Peptids (36.3 μmol, 1 eq) in einen 10 mL Spitzkolben gegeben und in 908.8 μL absolutem DCM gelöst. Unter Schutzgasatmosphäre werden 15.9 mg Pd(PPh₃)₄ (7.3 μmol, 0.2 eq) und 53.6 μL PhSiH₃ (0.4 mmol, 12 eq) zugegeben. Die Reaktion wird 3 h im Dunkeln gerührt und anschließend eingeeengt. Die Rohsubstanz wird durch Flash-Chromatographie (Reveleris® iES, Kartuschengröße 40 g, DCM/MeOH, 0 → 10 %, 30 min, 36 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit der Zielverbindung werden eingeeengt, in 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Es wird eine analytische TFA-Abspaltung 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % H₂O) und das Peptid **21e** durch LC-MS charakterisiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C 18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 10 → 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

Cyclo-Phe-Asp-Ile-Thr-Thr-Glu-Asp-Lys-Lys-Gln-Lys-Val-pro-4-Azido-Pro(2S,4R)- 21e

C₁₂₃H₁₈₃N₂₁O₂₉ (2419.89),

Ausbeute: 40.6 mg (16.8 μmol, 46 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} = 2418.35; M_{gef} = 2419.91 (M + H)⁺, M_{gef} = 1211.35 (M + 2H)²⁺.

Cyclo-Phe-Asn(Man₅GlcNAc₂)-Ile-Thr-Thr-Glu-Asp-Lys-Lys-Gln-Lys-Val-pro-4-Azido-Pro(2S,4R)- 22

Es werden 4.1 mg des desallylierten Peptids (1.6 μmol, 1 eq) **21** in einen Langhalskolben mit Schraubseptum gegeben. Danach werden 0.9 mg HATU (2.4 μmol, 1.5 eq), 0.3 mg HOAt (2.4 μmol, 1.5 eq) und 0.5 μL DIPEA (6.4 μmol, 4 eq) in 39.7 μL DMSO/DMF (1/1) (40 mM) zugegeben und 20 min gerührt. Anschließend werden 1.9 mg Glycosylamin **14** (1.6 μmol, 1 eq) zugegeben. Der Kolben wird unter Argon gesetzt und der Reaktionsansatz 2 d bei RT gerührt. Nach 1 d wird mit 0.9 mg HATU (2.4 μmol, 1.5 eq), 0.3 mg HOAt (2.4 μmol, 1.5 eq) und 0.5 μL DIPEA (6.4 μmol, 4 eq) nachaktiviert. Die Reaktion wird per LC-MS kontrolliert. Die

Reaktion wird im Hochvakuum eingengt. Der Rückstand wird in 2.0 mL 96 % TFA, 2 % TES und 2 % H₂O gelöst und 2 h geschüttelt. Das Glycopeptid **22** wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether ausgefällt (15 min bei -24 °C) und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Präzipitat 2 × mit kaltem Diethylether gewaschen. Die Rohsubstanz wird über eine Ascentis C18 Säule (250 × 10 mm) mit einem Gradienten von 5 bis 40 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 55 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 → 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₁₂₀H₁₉₅N₂₄O₅₇ (2885.96),

Ausbeute: 1.2 mg (0.4 μmol, 25 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} = 2884.31; M_{gef} = 1442.84 (M + 2H)²⁺, 961.93 (M + 3H)³⁺.

Biotinkonjugat 25

3.88 μg [Cu(CH₃CN)₄]PF₃ (0.010 μmol, 0.1 eq), gelöst in DMSO, und 7.76 μg TGTA **24** (10.0 nmol, 0.1 eq), gelöst in H₂O, werden 30 min bei RT inkubiert. 0.3 mg Azid **23** (0.1 μmol, 1 eq) werden in 4.0 μL H₂O gelöst (25 mM) und mit 0.2 mg Alkin **22** (0.3 μmol, 6 eq) versetzt. Hierzu wird die Lösung des Kupferkatalysators gegeben und 20 h bei RT inkubiert. Der Reaktionsverlauf wird durch Dünnschichtchromatographie überprüft. Das Rohprodukt wird per Gelpermeationschromatographie (Superdex Peptide[®] PE Säule 300 × 10 mm) mit 30 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C8 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 → 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₁₃₃H₂₁₃N₂₇O₅₉S (3166.32),

25 R_f = 0.70 (Isopropanol/1 M NH₄OAc 2:1),

22 R_f = 0.19 (Isopropanol/1 M NH₄OAc 2:1),

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 3164.42$; $M_{\text{gef}} = 1584.45$ ($M + 2H$)²⁺, 1056.62 ($M + 3H$)³⁺.

8.5 Versuche zu Kapitel 4.1

(R,S) 2-Chlor-4'-carboxy-triphenylmethanol **30**

10.5 g (52.923 mmol, 1 eq) *p*-Brombenzoesäure **26** werden in einem 1 L Zweihalskolben mit Innenthermometer in 400 mL absolutem THF und 100 mL absolutem *n*-Hexan gelöst, unter Argonatmosphäre wurde eine Temperatur von -78 °C eingestellt. Anschließend werden unter ständigem Rühren 21.7 mL (114.9 mmol, 2.2 eq) 5.3 M *n*-Butyllithium in *n*-Hexan (die Konzentration wurde zuvor durch Titration mit Diphenylelessigsäure überprüft) zur Lösung zuge tropft. Die Temperatur wird bei -78 °C gehalten. Die Reaktionslösung wird 60 min bei -78 °C gerührt. Danach werden 56.6 g (1.1 mol, 5 eq) 2-Chlorbenzophenon **28**, gelöst in 150 mL absolutem THF, zugegeben. Man lässt das Gemisch unter Rühren auf RT erwärmen. Nach 90 min wird die Reaktionslösung unter Rühren zu 500 mL 0.1 M HCl gegeben (pH > 10). Nach Extrahieren mit Diethylether (5 × 250 mL) wird die organische Phase mit 1 M Natronlauge (2 × 100 mL) extrahiert und verworfen. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 100 mL Diethylether gewaschen. Die wässrigen Phasen werden vereint und mit 50 mL 5 M HCl unter Rühren auf einen pH-Wert von 2 angesäuert. Es entsteht ein weißer Niederschlag. Die Suspension wird viermal mit je 300 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert, eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird in 60 % Acetonitril/Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Es werden 12.1 g Rohprodukt erhalten, welches aus 600 mL einer Lösung aus Cyclohexan/Essigsäureethylester (10/1) umkristallisiert wird. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C8 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 40 → 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$C_{20}H_{15}ClO_3$ (338.78),

Ausbeute: 10.0 g (29.0 μmol, 56 %), weiße, nadelförmige Kristalle,

$R_f = 0.61$ (Cyclohexan/Essigester 1/1),

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 338.07$, $M_{\text{gef}} = 337.62$ ($M - H$)⁻, 676.28 ($2M - H$)⁻.

8.6 Versuche zu Kapitel 4.2

Fmoc-Thr(t-Bu)-2-Chlor-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz 34

Unter Argonatmosphäre werden 332.5 mg (0.3 mmol, $B_H = 0.6$ mmol/g) Harz **32** mit 8 mL 10 % AcBr/DCM_{abs} versetzt und 3 h inkubiert. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz **33** gewaschen (5×10 mL DCM_{abs}). Es werden 270.3 mg (0.7 mmol, 5 eq) Fmoc-Thr(t-Bu)-OH in 3 mL DCM_{abs} gelöst und 115.6 μ L (0.7 mmol, 5 eq) DIPEA hinzugefügt. Die Lösung wird zum Harz **33** gegeben und 20 h inkubiert. Das Harz **34** wird in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und gewaschen ($2 \times$ NMP, $3 \times$ DCM). Harz **34** wird mit einer Mischung aus DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1) gewaschen (3×2 min). Anschließend wird das Harz **34** mit $2 \times$ NMP, $3 \times$ DCM gewaschen.

Boc-Thr(t-Bu)-His(Trt)-Thr(t-Bu)-Cys(Trt)-Pro-Pro-Cys(Trt)-Pro-Ala-Pro-Glu(Ot-Bu)-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser(t-Bu)-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys(Boc)-Pro-Lys(Boc)-Asp(Ot-Bu)-Thr(t-Bu)-Leu-Nle-Ile-Ser(t-Bu)-Arg(Pbf)-Thr(t-Bu)-Pro-Glu(Ot-Bu)-Val-OH 35 (IgG1 Fc 223-260 geschützt)

Harz **34** wird in ein 45 mL Reaktionsgefäß für den Synthesizer überführt. Um die Fmoc-Schutzgruppen zu entfernen, wird das Harz im Synthesizer mit 20 % Piperidin in DMF versetzt. Die Aminosäuren (0.7 mmol, 5 eq) werden mit 279.2 mg (0.7 mmol, 5 eq) HCTU aktiviert. 4 mL einer 0.4 M DIPEA/DMF-Lösung werden jeweils vom Synthesizer zugegeben. In Tabelle 5 sind die jeweiligen Kupplungsbedingungen dargestellt.

Tabelle 5: Kupplungssequenz für die Synthese von IgG1 Fc 223-260 **35**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Kupplungs- dauer [min]	Aktivierungsmittel
Val-259	Fmoc-Val-OH	229.1	30	HCTU
Glu-258	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	287.2	30	HCTU
Pro-257	Fmoc-Pro-OH	227.7	30	HCTU
Thr-256	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH	268.3	30	HCTU
Arg-255	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	437.9	30	HCTU

Ser-254	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	258.8	30	HCTU
Ile-253	Fmoc-Ile-OH	238.5	30	HCTU
Nle-252	Fmoc-Nle-OH	238.5	30	HCTU
Leu-251	Fmoc-Leu-OH	238.5	30	HCTU
Thr-250	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH	268.3	30	HCTU
Asp-249	Fmoc-Asp(t-Bu)-OH	277.7	30	HCTU
Lys-248	Fmoc-Lys(Boc)-OH	161.1	30	HCTU
Pro-247	Fmoc-Pro-OH	227.7	30	HCTU
Lys-246	Fmoc-Lys(Boc)-OH	161.1	30	HCTU
Pro-245	Fmoc-Pro-OH	227.7	30	HCTU
Pro-244	Fmoc-Pro-OH	227.7	30	HCTU
Phe-243	Fmoc-Phe-OH	261.5	30	HCTU
Leu-242	Fmoc-Leu-OH	238.5	30	HCTU
Phe-241	Fmoc-Phe-OH	261.5	30	HCTU
Val-240	Fmoc-Val-OH	229.1	30	HCTU
Ser-239	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	258.8	30	HCTU
Pro-238	Fmoc-Pro-OH	227.7	30	HCTU
Gly-237	Fmoc-Gly-OH	200.7	30	HCTU
Gly-236	Fmoc-Gly-OH	200.7	30	HCTU
Leu-235	Fmoc-Leu-OH	238.5	30	HCTU
Leu-234	Fmoc-Leu-OH	238.5	30	HCTU
Glu-233	Fmoc-Glu(t-Bu)-OH	287.2	30	HCTU
Pro-232	Fmoc-Pro-OH	227.7	30	HCTU
Ala-231	Fmoc-Ala-OH	210.2	30	HCTU
Pro-230	Fmoc-Pro-OH	227.7	30	HCTU
Cys-229	Fmoc-Cys(Trt)-OH	790.7	180	DIC
Pro-228	Fmoc-Pro-OH	227.7	30	HCTU
Pro-227	Fmoc-Pro-OH	227.7	30	HCTU

Cys-226	Fmoc-Cys(Trt)-OH	790.7	180	DIC
Thr-225	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH	268.3	30	HCTU
His-224	Fmoc-His(Trt)-OH	418.3	30	HCTU
Thr-223	Boc-Thr(t-Bu)-OH	185.8	30	HCTU

Cys-226 und Cys-229 werden manuell als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Hierzu werden 790.7 mg Fmoc-Cys(Trt)-OH (10 eq) in 2.0 mL DCM und 0.6 mL DMF gelöst und mit DIC (0.7 mmol, 5 eq) versetzt. Die Reaktion wird 20 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wird die Lösung abfiltriert und das Filtrat eingeeengt. Danach wird der Rückstand in 3.0 mL DMF gelöst und zum Harz gegeben. Die Reaktionszeit beträgt 3 h. Nach Reaktionsende wird das Harz **35a** mit NMP (2 ×) und DCM (3 ×) gewaschen. Es wird eine analytische TFA-Abspaltung für 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC-H₂O) und das Peptid wird durch LC-MS charakterisiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 20 → 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

H-Thr-His-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Nle-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-OH **35e**

C₁₈₆H₂₉₅N₄₅O₅₂S₂ (4057.73),

ESI-MS: M_{ber.}: 4055.13; M_{gef.}: 2029.91 (M + 2H)²⁺, 1353.42 (M + 3H)³⁺, 1015.26 (M + 4H)⁴⁺, 812.41 (M + 5H)⁵⁺.

H-Thr-His-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Nle-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-S(CH₂)₂COOnBu

36

(IgG1 Fc 223-260 Thioester)

Das Harz **35a** wird mit 20.0 mL einer Abspalllösung (20 % HFIP, 10 % TFE, 2 % TES in DCM) geschüttelt (1 × 20 min, 3 × 2 min). Dann wird 3 × mit DCM nachgewaschen. Die Filtrate werden in Kolben gesammelt, eingeeengt, im HV eingeeengt und gefriergetrocknet. Anschließend wird das Harz mit 5.0 mL 1.5 % TFA/DCM geschüttelt (5 × 2 min) und ebenfalls 10 × 2 min mit DCM gewaschen. Die Filtrate werden in einem Kolben gesammelt, worin

2.6 mL DIPEA vorgelegt ist, eingeengt, im HV eingeengt und gefriergetrocknet. Es werden insgesamt 375.1 mg Rohpeptid erhalten. Zu 55.0 mg Rohpeptid (10.5 μmol , 1 eq) werden 51.7 μL (0.3 mmol, 30 eq) Butyl-3-mercaptopropionat und 9.0 μL (52.5 μmol , 5 eq) DIPEA in 2.0 mL DMF gegeben. Nachdem die Reaktionslösung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min gerührt wurde, werden 27.3 mg (52.5 μmol , 5 eq) PyBOP hinzugegeben und für 3 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wird der Thioester durch TFA-Abspaltung (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC- H_2O) entschützt. Durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether wird die Rohsubstanz ausgefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert, das Präzipitat im HV getrocknet, anschließend in 5 mL 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Anschließend wird per HPLC über eine Ascentis C18 (250 \times 10 mm) Säule mit einem Gradienten von 20 bis 50 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 60 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 20 \rightarrow 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{193}\text{H}_{307}\text{N}_{45}\text{O}_{53}\text{S}_3$ (4201.97),

Ausbeute: 9.0 mg (2.1 μmol , 20 %) weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} : 4199.19; M_{gef} : 2102.03 ($M + 2\text{H}$) $^{2+}$, 1401.07 ($M + 3\text{H}$) $^{3+}$, 1051.34 ($M + 4\text{H}$) $^{4+}$, 841.28 ($M + 5\text{H}$) $^{5+}$.

8.7 Versuche zu Kapitel 4.3

Fmoc-Asn(Trt)-2-Cl-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz 37

Unter Argonatmosphäre werden 307.0 mg (0.2 mmol, $B_{\text{H}} = 0.5\text{ mmol/g}$) Harz **32** mit 8.0 mL 10 % AcBr/ DCM_{abs} versetzt und für 3 h inkubiert. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz **33** gewaschen (5 \times 10.0 mL DCM_{abs}). Es werden 464.0 mg (0.7 mmol, 5 eq) Fmoc-Asn(Trt)-OH in 3.0 mL DCM_{abs} gelöst und 133.4 μL (0.7 mmol, 5 eq) DIPEA hinzugefügt. Die Lösung wird zum Harz **33** gegeben und 20 h inkubiert. Das Harz **37** wird in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und gewaschen (2 \times NMP, 3 \times DCM).

Boc-Thz-Val-Val-Val-Asp(Ot-Bu)-Val-Ser($\psi^{Me,Me}pro$)-His(Trt)-Glu(Ot-Bu)-Asp(Ot-Bu)-Pro-Glu(Ot-Bu)-Val-Lys(Boc)-Phe-Asn(Trt)-Trp(Boc)-Tyr(t-Bu)-Val-Asp(Ot-Bu)-Gly-Val-Glu(Ot-Bu)-Val-His(Trt)-Asn(Trt)-OH 38

(IgG1 Fc 261-286 Thz geschützt)

Harz **37** wird in ein 45 mL Reaktionsgefäß für den Synthesizer überführt. Um die Fmoc-Schutzgruppen zu entfernen, wird das Harz im Synthesizer mit 20 % Piperidin in DMF versetzt. Die Aminosäuren (0.8 mmol, 5 eq) werden mit 227.5 mg (0.8 mmol, 5 eq) HCTU und 4 mL 0.4 M DIPEA/DMF versetzt. Die Aminosäuren Fmoc-Val-Ser($\psi^{Me,Me}pro$)-OH und Boc-Thz-OH (0.5 mmol, 3 eq) werden mit 234.1 mg (0.5 mmol, 3 eq) PyBOP in 4 mL 0.4 M DIPEA/DMF versetzt. In Tabelle 6 sind die jeweiligen Kupplungsbedingungen dargestellt. Nach Reaktionsende wird das Harz mit NMP (2 ×) und DCM (3 ×) gewaschen, bevor die maschinelle Synthese fortgesetzt wird.

Tabelle 6: Kupplungssequenz für die Synthese von IgG1 Fc 261-286 Thz 38.

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Kupplungs- dauer [min]	Aktivierungs- mittel
His-285	Fmoc-His(Trt)-OH	340.8	30	HCTU
Val-284	Fmoc-Val-OH	186.7	30	HCTU
Glu-283	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	234.0	30	HCTU
Val-282	Fmoc-Val-OH	186.7	30	HCTU
Gly-281	Fmoc-Gly-OH	163.5	30	HCTU
Asp-280	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH	226.3	30	HCTU
Val-279	Fmoc-Val-OH	186.7	30	HCTU
Tyr-278	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	252.8	30	HCTU
Trp-277	Fmoc-Trp(Boc)-OH	289.6	30	HCTU
Asn-276	Fmoc-Asn(Trt)-OH	328.1	30	HCTU
Phe-275	Fmoc-Phe-OH	213.1	30	HCTU
Lys-274	Fmoc-Lys(Boc)-OH	257.7	30	HCTU
Val-273	Fmoc-Val-OH	186.7	30	HCTU
Glu-272	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	234.0	30	HCTU

Pro-271	Fmoc-Pro-OH	185.6	30	HCTU
Asp-270	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH	160.5	30	HCTU
Glu-269	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	234.0	30	HCTU
His-268	Fmoc-His(Trt)-OH	340.0	30	HCTU
Ser-267, Val-266	Fmoc-Val-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-OH	153.9	45	PyBOP
Asp-265	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH	160.5	30	HCTU
Val-264	Fmoc-Val-OH	186.7	30	HCTU
Val-263	Fmoc-Val-OH	186.7	30	HCTU
Val-262	Fmoc-Val-OH	186.7	30	HCTU
Cys-261	Boc-Thz-OH	77.0	45	PyBOP

Das Harz wird mit 5 mL einer Abspaltlösung (1.5 % TFA, 2 % TES in DCM) versetzt (10 × 2 min). Anschließend wird 3 × mit DCM nachgewaschen. Die Filtrate werden in einem Kolben mit 3 mL DIPEA gesammelt und eingengt. Dann wird das Rohpeptid in DCM gelöst, 3 × mit H₂O extrahiert. Die organische Phase wird eingengt, in 10 mL 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Es werden 317.1 mg Rohpeptid (0.1 mmol, 83 %) erhalten. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 20 → 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

H-Thz-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-OH **38e**

(IgG1 Fc 261-286 Thz entschützt)

C₁₃₆H₁₉₆N₃₄O₄₃S (3027.28),

ESI-MS: M_{ber.}: 3025.39; M_{gef.}: 1514.61 (M + 2H)²⁺, 1010.03 (M + 3H)³⁺, 757.80 (M + 4H)⁴⁺.

H-Thz-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-S(CH₂)₂COOnBu **39**

(IgG1 Fc 261-286 Thz Thioester)

Zu 49.7 mg Rohpeptid **38** (10.5 μmol , 1 eq) werden 51.2 μL (0.3 mmol, 30 eq) Butyl-3-mercaptopropionat und 9.0 μL (52.5 μmol , 5 eq) DIPEA in 3.0 mL DMF gegeben. Nachdem die Reaktionslösung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min gerührt wurde, werden 27.3 mg PyBOP (52.5 μmol , 5 eq) hinzugegeben und für 3 h bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Anschließend wird das Rohpeptid durch TFA-Abspaltung (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC- H_2O , 15.0 mL) 2 h entschützt. Durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether wird die Rohsubstanz ausgefällt und abzentrifugiert. Das Präzipitat wird im HV getrocknet, anschließend in 5.0 mL 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Anschließend wird das Rohprodukt per RP-HPLC über eine Ascentis C18 (250 \times 10 mm) Säule mit einem Gradienten von 20 bis 50 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 60 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 20 \rightarrow 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{143}\text{H}_{208}\text{N}_{34}\text{O}_{44}\text{S}_2$ (3171.51),

Ausbeute: 5.1 mg (1.2 μmol , 15 %) weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} : 3169.45; M_{gef} : 1586.34 ($M + 2\text{H}$) $^{2+}$, 1057.55 ($M + 3\text{H}$) $^{3+}$, 793.43 ($M + 4\text{H}$) $^{4+}$.

Fmoc-Asn(Trt)-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz 41a

Unter Argonatmosphäre werden 502.7 mg (0.2 mmol, $B_{\text{H}} = 0.3\text{ mmol/g}$) Harz **40** mit 8 mL 10 % AcBr/ DCM_{abs} versetzt und 3 h inkubiert. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz **41** gewaschen (5 \times 10 mL DCM_{abs}). Es werden 464.9 mg (0.8 mmol, 5 eq) Fmoc-Asn(Trt)-OH in 3 mL DCM_{abs} gelöst und 133.4 μL (0.8 mmol, 5 eq) DIPEA hinzugefügt. Die Lösung wird zum Harz **41** gegeben und 20 h inkubiert. Das Harz **41a** wird in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und gewaschen (2 \times NMP, 3 \times DCM).

Boc-Cys(Acm)-Val-Val-Val-Asp(Ot-Bu)-Val-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-His(Trt)-Glu(Ot-Bu)-Asp(Ot-Bu)-Pro-Glu(Ot-Bu)-Val-Lys(Boc)-Phe-Asn(Trt)-Trp(Boc)-Tyr(t-Bu)-Val-Asp(Ot-Bu)-Gly-Val-Glu(Ot-Bu)-Val-His(Trt)-Asn(Trt)-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz 41b
(IgG1 Fc 261-286 geschützt)

Das Fmoc-Asn(Trt)-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz **41a** wird in ein 45 mL Reaktionsgefäß für den Synthesizer überführt. Um die Fmoc-Schutzgruppen zu entfernen, wird das Harz im Synthesizer mit 20 % Piperidin in DMF versetzt. Die Aminosäuren (0.8 mmol, 5 eq) werden mit HCTU (0.8 mmol, 5 eq) in 4 mL 0.4 M DIPEA/DMF versetzt. In Tabelle 7 sind die jeweiligen Kupplungsbedingungen dargestellt. Cys-261 wird manuell als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Hierzu werden 790.7 mg Boc-Cys(Acm)-OH (1.6 mmol, 10 eq) in 2 mL DCM und 0.6 mL DMF gelöst und mit 123.1 DIC (0.8 mmol, 5 eq) versetzt. Die Reaktion wird 20 min bei 0°C gerührt. Anschließend wird die Lösung abfiltriert und das Filtrat eingengt. Danach wird der Rückstand in 3.0 mL DMF gelöst und zum Harz aufgezogen. Die Reaktionszeit beträgt 3 h. Nach Reaktionsende wird das Harz mittels NMP (2 ×) und DCM (3 ×) gewaschen, bevor die maschinelle Synthese fortgesetzt wird.

Tabelle 7: Kupplungssequenz für die Synthese von IgG1 Fc 261-286 Cys(Acm) **41b**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Kupplungs- dauer [min]	Aktivierungs- mittel
His-285	Fmoc-His(Trt)-OH	489.6	30	HCTU
Val-284	Fmoc-Val-OH	268.1	30	HCTU
Glu-283	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	336.1	30	HCTU
Val-282	Fmoc-Val-OH	268.1	30	HCTU
Gly-281	Fmoc-Gly-OH	434.9	30	HCTU
Asp-280	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH	325.1	30	HCTU
Val-279	Fmoc-Val-OH	268.1	30	HCTU
Tyr-278	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	362.0	30	HCTU
Trp-277	Fmoc-Trp(Boc)-OH	415.9	30	HCTU
Asn-276	Fmoc-Asn(Trt)-OH	471.4	30	HCTU
Phe-275	Fmoc-Phe-OH	306.1	30	HCTU
Lys-274	Fmoc-Lys(Boc)-OH	370.2	30	HCTU
Val-273	Fmoc-Val-OH	268.1	30	HCTU
Glu-272	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	336.1	30	HCTU

Pro-271	Fmoc-Pro-OH	226.5	30	HCTU
Asp-270	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH	325.1	30	HCTU
Glu-269	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	336.1	30	HCTU
His-268	Fmoc-His(Trt)-OH	489.6	30	HCTU
Ser-267, Val-266	Fmoc-Val-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-OH	249.5	45	PyBOP
Asp-265	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH	325.1	30	HCTU
Val-264	Fmoc-Val-OH	268.1	30	HCTU
Val-263	Fmoc-Val-OH	268.1	30	HCTU
Val-262	Fmoc-Val-OH	268.1	30	HCTU
Cys-261	Boc-Cys(Acm)-OH	461.9	180	DIC

Das Harz wird mit 5 mL einer Abspaltlösung (1.5 % TFA, 2 % TES in DCM) versetzt (10 × 2 min). Anschließend wird 3 × mit DCM nachgewaschen. Die Filtrate werden in einem Kolben mit 3 mL DIPEA gesammelt und eingengt. Dann wird das Rohpeptid in DCM gelöst, 3 × mit H₂O extrahiert. Die organische Phase wird eingengt, in 10 mL 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Es werden 656.0 mg (0.1 mmol, 91 %) Rohpeptid erhalten. Es wird eine analytische TFA-Abspaltung 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC-H₂O) und das Peptid durch LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 20 → 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

H-Cys(Acm)-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-OH 41e

(IgG1 Fc 261-286 Cys(Acm) entschützt)

C₁₃₈H₂₀₁N₃₅O₄₄S (3086.35),

ESI-MS: M_{ber}: 3084.43; M_{gef}: 1544.00 (M + 2H)²⁺, 1029.58 (M + 3H)³⁺, 772.52 (M + 4H)⁴⁺.

H-Cys(Acm)-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-S(CH₂)₂COOnBu 42

(IgG1 Fc 261-286 Cys(Acm) Thioester)

Zu 107.3 mg Rohpeptid (22.7 μmol , 1 eq) werden 110.6 μL (0.7 mmol, 30 eq) Butyl-3-mercaptopropionat und 19.4 μL (113.5 μmol , 5 eq) DIPEA in 3 mL DMF gegeben. Nachdem die Reaktionslösung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min gerührt wurde, werden 59.0 mg PyBOP (113.5 μmol , 5 eq) hinzugegeben und für 3 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wird der Thioester **42** durch TFA-Abspaltung (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC- H_2O , 15.0 mL) 2 h entschützt. Durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether wird die Rohsubstanz ausgefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert. Die TFA-Abspaltung (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC- H_2O) wird nochmals wiederholt. Das Präzipitat wird im HV getrocknet, anschließend in 5 mL 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Anschließend wird das Rohprodukt per RP-HPLC über eine Ascentis C18 (250 \times 10 mm) Säule mit einem Gradienten von 20 bis 50 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 60 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{145}\text{H}_{213}\text{N}_{35}\text{O}_{45}\text{S}_2$ (3230.58),

Ausbeute: 29.1 mg (9.1 μmol , 40 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} : 3228.49; M_{gef} : 1617.69 ($M + 2\text{H}$) $^{2+}$, 1078.72 ($M + 3\text{H}$) $^{3+}$, 809.26 ($M + 4\text{H}$) $^{4+}$.

Fmoc-Asn(Trt)-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz 41a

Unter Argonatmosphäre werden 322.0 mg (0.2 mmol, $B_{\text{H}} = 0.5\text{ mmol/g}$) Harz **40** mit 8 mL 10 % AcBr/ DCM_{abs} versetzt und 3 h inkubiert. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz **41** gewaschen (5 \times 10.0 mL DCM_{abs}). Es werden 445.5 mg (0.8 mmol, 5 eq) Fmoc-Asn(Trt)-OH in 3 mL DCM_{abs} gelöst und 128.4 μL (0.8 mmol, 5 eq) DIPEA hinzugefügt. Die Lösung wird zum Harz **41** gegeben und 18 h inkubiert. Das Harz **41a** wird in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und gewaschen (2 \times NMP, 3 \times DCM).

Boc-Cys(PhAcm)-Val-Val-Val-Asp(Ot-Bu)-Val-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-His(Trt)-Glu(Ot-Bu)-Asp(Ot-Bu)-Pro-Glu(Ot-Bu)-Val-Lys(Boc)-Phe-Asn(Trt)-Trp(Boc)-Tyr(t-Bu)-Val-Asp(Ot-Bu)-Gly-Val-Glu(Ot-Bu)-Val-His(Trt)-Asn(Trt)-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz 41c (IgG1 Fc 261-286 PhAcm geschützt)

Das Fmoc-Asn(Trt)-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz **41a** wird in ein 45 mL Reaktionsgefäß für den Synthesizer überführt. Um die Fmoc-Schutzgruppen zu entfernen wird das Harz im Synthesizer mit 20 % Piperidin in DMF versetzt. Die Aminosäuren (0.8 mmol, 5 eq) werden mit 308.9 mg (0.8 mmol, 5 eq) HCTU in 3.5 mL 0.4 M DIPEA/DMF versetzt. Die Aminosäure Fmoc-Val-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH (0.5 mmol, 3 eq) wird mit 233.1 mg (0.5 mmol, 3 eq) PyBOP in 3 mL 0.4 M DIPEA/DMF versetzt. In Tabelle 8 sind die jeweiligen Kupplungsbedingungen dargestellt. Cys-261 wird manuell als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Hierzu werden 585.3 mg Boc-Cys(PhAcM)-OH (1.6 mmol, 10 eq) in 2 mL DCM und 0.6 mL DMF gelöst und mit 136.7 μL DIC (0.8 mmol, 5 eq) versetzt. Die Reaktion wird 20 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wird die Lösung abfiltriert und das Filtrat eingengt. Danach wird der Rückstand in 3 mL DMF gelöst und zum Harz aufgezogen. Die Reaktionszeit beträgt 3 h. Nach Reaktionsende wird das Harz mittels NMP (2 \times) und DCM (3 \times) gewaschen, bevor die maschinelle Synthese fortgesetzt wird.

Tabelle 8: Kupplungssequenz für die Synthese von IgG1 Fc 261-286 Cys(PhAcM) **41c**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Kupplungs- dauer [min]	Aktivierungs- reagenz
His-285	Fmoc-His(Trt)-OH	462.7	30	HCTU
Val-284	Fmoc-Val-OH	253.4	30	HCTU
Glu-283	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	317.7	30	HCTU
Val-282	Fmoc-Val-OH	253.4	30	HCTU
Gly-281	Fmoc-Gly-OH	221.9	30	HCTU
Asp-280	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH	307.2	30	HCTU
Val-279	Fmoc-Val-OH	253.4	30	HCTU
Tyr-278	Fmoc-Tyr(Ot-Bu)-OH	343.2	30	HCTU
Trp-277	Fmoc-Trp(Boc)-OH	393.2	30	HCTU
Asn-276	Fmoc-Asn(Trt)-OH	445.5	30	HCTU

Phe-275	Fmoc-Phe-OH	289.3	30	HCTU
Lys-274	Fmoc-Lys(Boc)-OH	349.8	30	HCTU
Val-273	Fmoc-Val-OH	253.4	30	HCTU
Glu-272	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	317.7	30	HCTU
Pro-271	Fmoc-Pro-OH	251.9	30	HCTU
Asp-270	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH	307.3	30	HCTU
Glu-269	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	317.7	30	HCTU
His-268	Fmoc-His(Trt)-OH	462.7	30	HCTU
Ser-267, Val-266	Fmoc-Val- Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-OH	208.9	50	PyBOP
Asp-265	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH	307.3	30	HCTU
Val-264	Fmoc-Val-OH	253.4	30	HCTU
Val-263	Fmoc-Val-OH	253.4	30	HCTU
Val-262	Fmoc-Val-OH	253.4	30	HCTU
Cys-261	Boc-Cys(PhAcm)-OH	275.1	180	DIC

Das Harz wird mit 5 mL einer Abspaltlösung (1.5 % TFA, 2 % TES in DCM) versetzt (10 × 2 min). Anschließend wird 3 × mit DCM nachgewaschen. Die Filtrate werden in einem Kolben mit 3 mL DIPEA gesammelt und eingengt. Dann wird das Rohpeptid in DCM gelöst, 3 × mit H₂O extrahiert und gefriergetrocknet. Die organische Phase wird eingengt, in 10 mL 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Es werden 543.9 mg (114.0 μmol , 89 %) Rohpeptid erhalten. Es wird eine analytische TFA-Abspaltung 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC-H₂O) und das Peptid wird durch LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 10 → 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

H-Cys(PhAcm)-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-OH 41d

IgG1 Fc 261-286 Cys(PhAcm) entschützt

C₁₄₄H₂₀₅N₃₅O₄₄S (3162.44),

ESI-MS: M_{ber.}: 3160.46; M_{gef.}: 1581.54 (M + 2H)²⁺, 1054.64 (M + 3H)³⁺, 791.24 (M + 4H)⁴⁺.

H-Cys(PhAcM)-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-S(CH₂)₂COOnBu **43**

(IgG1 Fc 261-286 Cys(PhAcM) Thioester)

Zu 100.4 mg Rohpeptid (21.5 μ mol, 1 eq) werden 102.5 μ L (0.6 mmol, 30 eq) Butyl-3-mercaptopropionat und 18.0 μ L (105.2 μ mol, 5 eq) DIPEA in 2 mL DMF gegeben. Nachdem die Reaktionslösung bei -20 °C für 10 min gerührt wurde, werden 54.8 mg PyBOP (105.2 μ mol, 5 eq) hinzugegeben und für 3 h bei -20 °C gerührt. Anschließend wird der Thioester durch TFA-Abspaltung (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC-H₂O, 15.0 mL) für 2 h entschützt. Durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether wird die Rohsubstanz ausgefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert. Die TFA-Abspaltung (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC-H₂O) wird nochmals wiederholt. Das Präzipitat wird im HV getrocknet, anschließend in 5 mL 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Anschließend wird das Rohprodukt per RP-HPLC über eine Ascentis C18 (250 \times 10 mm) Säule mit einem Gradienten von 20 bis 50 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 60 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μ m (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₁₅₁H₂₁₇N₃₅O₄₅S₂ (3306.68),

Ausbeute: 28.4 mg (8.6 μ mol, 40 %) weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber.}: 3304.52; M_{gef.}: 1655.18 (M + 2H)²⁺, 1103.80 (M + 3H)³⁺, 827.85 (M + 4H)⁴⁺, 662.64 (M + 5H)⁵⁺.

8.8 Versuche zu Kapitel 4.4

Fmoc-Lys(Boc)-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz **44**

Unter Argonatmosphäre werden 355.5 mg (0.1 mmol, B_H = 0.3 mmol/g) Harz **40** mit 8 mL 10 % AcBr/DCM_{abs} versetzt und 3 h inkubiert. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz **41** gewaschen (5 \times 10 mL DCM_{abs}). Es werden 258.2 mg (0.6 mmol, 5 eq) Fmoc-Lys(Boc)-OH in 3 mL DCM_{abs} gelöst und 94.3 μ L (0.5 mmol, 5 eq) DIPEA hinzugefügt. Die Lösung wird zum Harz **41** gegeben und 20 h inkubiert. Das Harz **44** wird in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und gewaschen (2 \times NMP, 3 \times DCM).

Boc-Thz-Lys(Boc)-Thr(t-Bu)-Lys(Boc)-Pro-Arg(Pbf)-Glu(Ot-Bu)-Glu(Ot-Bu)Gln(Trt)-Tyr(t-Bu)-Asp(OAll)-Ser(t-Bu)-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Tyr(t-Bu)-Arg(Pbf)-Val-Val-Ser(t-Bu)-Val-Leu-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Val-Leu-His(Trt)-Gln(Trt)-Asp(t-Bu)-Trp(Boc)-Leu-Asn(Trt)-Gly-Lys(Boc)-Glu(t-Bu)-Tyr(t-Bu)-Lys(Boc)-OH 45

(IgG1 Fc 287-320 geschützt)

Das Harz **44** wird in ein 45 mL Reaktionsgefäß für den Synthesizer überführt. Um die Fmoc-Schutzgruppen zu entfernen, wird das Harz im Synthesizer mit 20 % Piperidin in DMF versetzt. Die Aminosäuren (0.6 mmol, 5 eq) werden mit 734.6 mg (0.5 mmol, 5 eq) HCTU in 4 mL 0.4 M DIPEA/DMF versetzt. Die Aminosäuren Fmoc-Asp(OAll)-OH, Fmoc-Ser(t-Bu)-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-OH, Fmoc-Leu-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-OH und Boc-Thz-OH (0.3 mmol, 3 eq) werden mit 554.35 mg (0.3 mmol, 3 eq) PyBOP aktiviert. In Tabelle 9 sind die jeweiligen Kupplungsbedingungen dargestellt.

Tabelle 9: Kupplungssequenz für die Synthese von IgG1 Fc 287-320 **45**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Kupplungs- dauer [min]	Aktivierungs- mittel
Tyr-319	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	816.1	30	HCTU
Glu-318	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	755.6	30	HCTU
Lys-317	Fmoc-Lys(Boc)-OH	831.9	30	HCTU
Gly-316	Fmoc-Gly-OH	527.9	30	HCTU
Asn-315	Fmoc-Asn(Trt)-OH	1059.6	30	HCTU
Leu-314	Fmoc-Leu-OH	627.5	30	HCTU
Trp-313	Fmoc-Trp(Boc)-OH	935.1	30	HCTU
Asp-312	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH	730.7	30	HCTU
Gln-311	Fmoc-Gln(Trt)-OH	1084.4	30	HCTU
His-310	Fmoc-His(Trt)-OH	1100.4	30	HCTU
Leu-309	Fmoc-Leu-OH	627.5	30	HCTU
Val-308	Fmoc-Val-OH	602.7	30	HCTU
Thr-307, Leu-306	Fmoc-Leu-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-OH	526.9	45	PyBOP

Val-305	Fmoc-Val-OH	602.7	30	HCTU
Ser-304	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	680.6	30	HCTU
Val-303	Fmoc-Val-OH	602.7	30	HCTU
Val-302	Fmoc-Val-OH	602.7	30	HCTU
Arg-301	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	1152.1	30	HCTU
Tyr-300	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	816.1	30	HCTU
Thr-299, Ser-298	Fmoc-Ser-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	558.9	45	PyBOP
Asp-297	Fmoc-Asp(OAll)-OH	421.3	45	PyBOP
Tyr-296	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	816.1	30	HCTU
Gln-295	Fmoc-Gln(Trt)-OH	1084.4	30	HCTU
Glu-294	Fmoc-Glu(t-Bu)-OH	755.6	30	HCTU
Glu-293	Fmoc-Glu(t-Bu)-OH	755.6	30	HCTU
Arg-292	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	1152.1	30	HCTU
Pro-291	Fmoc-Pro-OH	599.1	30	HCTU
Lys-290	Fmoc-Lys(Boc)-OH	831.9	30	HCTU
Thr-289	Fmoc-Thr(t-Bu)OH	705.9	30	HCTU
Lys-288	Fmoc-Lys(Boc)-OH	831.9	30	HCTU
Cys-287	Boc-Thz-OH	831.9	45	PyBOP

Das Harz wird mit 50 mL einer Abspaltlösung (1.5 % TFA, 2 % TES in DCM) versetzt (10 × 2 min). Anschließend wird 3 × mit DCM nachgewaschen. Die Filtrate werden in einem Kolben mit 3 mL DIPEA gesammelt und eingengt. Dann wird das Rohpeptid in DCM gelöst und 3 × mit einer gesättigten NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird eingengt, in 10.0 mL 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Es werden 518.8 mg (75.0 μmol , 85 %) des Rohpeptids erhalten.

$\text{C}_{187}\text{H}_{290}\text{N}_{50}\text{O}_{56}\text{S}$ (4166.67).

*Boc-Thz-Lys(Boc)-Thr(t-Bu)-Lys(Boc)-Pro-Arg(Pbf)-Glu(Ot-Bu)-Glu(Ot-Bu)Gln(Trt)-Tyr(t-Bu)-Asp(OAll)-Ser(t-Bu)-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Tyr(t-Bu)-Arg(Pbf)-Val-Val-Ser(t-Bu)-Val-Leu-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Val-Leu-His(Trt)-Gln(Trt)-Asp(t-Bu)-Trp(Boc)-Leu-Asn(Trt)-Gly-Lys(Boc)-Glu(t-Bu)-Tyr(t-Bu)-Lys(Boc)-NH-NHBoc **46***

(IgG1 Fc 287-320 Hydrazid geschützt)

Es werden 518.8 mg Peptidylsäure **45** (75.0 mmol, 1 eq), 61.3 mg *tert*-Butylcarbazat (0.2 mmol, 3 eq), 52.5 mg Cl-HOBt (0.2 mmol, 2 eq) und 12.9 μ L DIPEA (0.2 μ mol, 2 eq) in 5 mL absolutem DCM gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt. Danach werden 48.2 μ L DIC (0.2 mmol, 2 eq) zugegeben. Die Reaktion wird 18 h gerührt und die Temperatur wird langsam von 0 °C auf RT erhöht. Die Lösung wird anschließend eingeeengt. Die Rohsubstanz wird durch Flash-Chromatographie (Reveleris® iES, Kartuschengröße 40 g, DCM/MeOH, 0 \rightarrow 15 %, 40 min, 36 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit der Zielverbindung werden eingeeengt, in 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Es wird eine analytische TFA-Abspaltung für 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC-H₂O) und das Peptid **46e** wird durch LC-MS-Analyse charakterisiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μ m (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

*H-Thz-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asp(OAll)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ **46e***

(IgG1 Fc 287-320 Hydrazid entschützt)

C₁₈₇H₂₉₂N₅₂O₅₅S (4180.70),

Ausbeute: 404.3 mg (57.8 μ mol, 77 %),

ESI-MS: M_{ber.}: 4178.14; M_{gef.}: 2091.58 (M + 2H)²⁺, 1394.52 (M + 3H)³⁺, 1046.11 (M + 4H)⁴⁺, 837.03 (M + 5H)⁵⁺, 697.58 (M + 5H)⁵⁺, 598.22 (M + 6H)⁶⁺.

*Boc-Thz-Lys(Boc)-Thr(t-Bu)-Lys(Boc)-Pro-Arg(Pbf)-Glu(Ot-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Gln(Trt)-Tyr(t-Bu)-Asp-Ser(t-Bu)-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Tyr(t-Bu)-Arg(Pbf)-Val-Val-Ser(t-Bu)-Val-Leu-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Val-Leu-His(Trt)-Gln(Trt)-Asp(t-Bu)-Trp(Boc)-Leu-Asn(Trt)-Gly-Lys(Boc)-Glu(t-Bu)-Tyr(t-Bu)-Lys(Boc)-trityl-NH-NHBoc **49***

(IgG1 Fc 287-320 Asp Hydrazid geschützt)

404.3 mg des geschützten Peptidhydrazids **46** (57.8 μmol , 1 eq) in einen 10.0 mL Spitzkolben angesetzt und in 714.6 μL absolutem DCM gelöst. Unter Schutzgasatmosphäre werden 6.6 mg $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (11.6 μmol , 0.2 eq) und 42.3 μL PhSiH_3 (0.7 mmol, 12 eq) zugegeben. Die Reaktion wird 3 h im Dunkeln gerührt. Die Lösung wird eingeeengt. Die Rohsubstanz wird durch Flash-Chromatographie (Reveleris® iES, Kartuschengröße 40 g, DCM/MeOH, 0 \rightarrow 10 %, 30 min, 36 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit der Zielverbindung werden eingeeengt, in 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Es wird eine analytische TFA-Abspaltung durchgeführt und das erhaltene Peptid **39e** per LC-MS charakterisiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

H-Thz-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asp-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ 49e
(IgG1 Fc 287-320 Asp Hydrazid entschützt)

$\text{C}_{184}\text{H}_{288}\text{N}_{52}\text{O}_{55}\text{S}$ (4140.64)

Ausbeute: 319.3 mg (45.9 μmol , 80 %),

ESI-MS: M_{ber} : 4138.11; M_{gef} : 2071.76 ($M + 2\text{H}$)²⁺, 1381.47 ($M + 3\text{H}$)³⁺, 1036.18 ($M + 4\text{H}$)⁴⁺, 829.11 ($M + 5\text{H}$)⁵⁺, 690.94 ($M + 5\text{H}$)⁵⁺, 592.58 ($M + 6\text{H}$)⁶⁺.

*O- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O-2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosylamin **48***

β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-NH₂

16.3 mg (9.8 μmol , 1 eq) Glycosylazid **47** werden in 1 mL MeOH_{abs} gelöst. Dann werden 16.7 μL (97.5 μmol , 10 eq) DIPEA und 58.1 μL (585.0 μmol , 60 eq) 1.3-Propandithiol hinzugegeben. Die Reaktion wird 2 h unter Argonatmosphäre gerührt. Der Reaktionsverlauf wird mittels DC überprüft. Das Produkt **48** wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether

ausgefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Präzipitat 2 h im Hochvakuum getrocknet.

$C_{62}H_{105}N_5O_{45}$ (1640.50),

47 $R_f = 0.50$ (Isopropanol/1 M NH_4OAc 2:1),

48 $R_f = 0.11$ (Isopropanol/1 M NH_4OAc 2:1).

H-Thz-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Nona)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ 50

(IgG1 Fc 287-320 Nona Hydrazid entschützt)

Es werden 44.5 mg des desallylierten Peptidhydrazids **49** (6.5 μ mol, 1 eq) in einen Langhalskolben mit Schraubseptum gegeben. Danach wird eine Lösung aus 3.7 mg HATU (9.8 μ mol, 1.5 eq) und 4.5 μ L DIPEA (26.1 μ mol, 4 eq) in 244 μ L DMSO/DMF (1/1) zugegeben und 15 min gerührt. Anschließend werden 16.0 mg (9.8 μ mol, 1 eq) Glycosylamin **48** zugegeben. Der Kolben wird unter Argon gesetzt und der Reaktionsansatz 4 d bei RT gerührt. Nach 2 h wird mit 3.7 mg HATU (9.8 μ mol, 1.5 eq) und 4.5 μ L DIPEA (26.1 μ mol, 4 eq) nachaktiviert. Nach 1 d wird mit 3.7 mg HATU (9.8 μ mol, 1.5 eq) und 4.5 μ L DIPEA (26.1 μ mol, 4 eq) nachaktiviert. Die Reaktion wird per LC-MS kontrolliert. Die Lösung wird im Hochvakuum eingeengt. Der Rückstand wird in 4 mL 96 % TFA, 2 % TES und 2 % H_2O gelöst und 2 h geschüttelt. Das Glycopeptid **50** wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether ausgefällt (15 min bei -24 °C) und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Präzipitat 2 \times mit kaltem Diethylether gewaschen. Der Rückstand wird in 30 % Acetonitril/ H_2O + 0.1 % Ameisensäure gelöst und gefriergetrocknet. Die Rohsubstanz wird durch RP-HPLC über eine Ascentis C18 Säule (250 \times 10 mm) mit einem Gradienten von 20 bis 40 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 55 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μ m (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₂₄₆H₃₉₁N₅₇O₉₉S (5763.12),

Ausbeute: 6.2 mg (1.1 μmol, 17 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} = 5759.70; M_{gef} = 2882.05 (M + 2H)²⁺, 1921.78 (M + 3H)³⁺, 1441.63 (M + 4H)⁴⁺, 1153.45 (M + 5H)⁵⁺, 961.23 (M + 6H)⁶⁺, 824.01 (M + 7H)⁷⁺.

O-(2-Acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)]-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*-α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-*O*-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosylamin **52**

(β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,3-[β-GlcNAc-1,4]-[β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,6]-β-Man-1,4-β-GlcNAc-1,4-β-GlcNAc-NH₂)

15.3 mg (9.9 μmol, 1 eq) Glycosylazid **51** werden in 1 mL MeOH_{abs} gelöst. Dann werden 17.7 μL (98.7 μmol, 10 eq) DIPEA und 60.1 μL (595.0 μmol, 60 eq) 1,3-Propanedithiol hinzugegeben. Die Reaktion wird 2 h unter Argonatmosphäre gerührt. Der Reaktionsverlauf wird per DC überprüft. Das Produkt **52** wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether ausgefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Präzipitat 2h im Hochvakuum getrocknet.

C₆₂H₁₀₅N₅O₄₅ (1619.41),

51 R_f = 0.55 (Isopropanol/1 M NH₄OAc 2:1),

52 R_f = 0.26 (Isopropanol/1 M NH₄OAc 2:1).

NH-Thz-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Octa)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ **53**
(IgG1 Fc 287-320 Octa Hydrazid entschützt)

Es werden 45 mg des desallylierten Peptidhydrazids **49** (6.6 μmol, 1 eq) in einen Langhalskolben mit Schraubseptum gegeben. Danach wird eine Lösung aus 3.8 mg HATU (9.9 μmol, 1.5 eq) und 4.5 μL DIPEA (26.3 μmol, 4 eq) in 207 μL DMSO/DMF (1/1) zugegeben und 15 min gerührt. Anschließend werden 15.0 mg (9.9 μmol, 1.5 eq) Glycosylamin

52 zugegeben. Der Kolben wird unter Argon gesetzt und der Reaktionsansatz 2 d bei RT gerührt. Nach 2 h wird mit 3.8 mg HATU (9.9 μmol , 1.5 eq) und 4.5 μL DIPEA (26.3 μmol , 4 eq) nachaktiviert. Nach 1 d wird wiederum mit 3.8 mg HATU (9.9 μmol , 1.5 eq) und 4.5 μL DIPEA (26.3 μmol , 4 eq) nachaktiviert. Die Reaktion wird per LC-MS kontrolliert. Die Lösung wird im Hochvakuum eingengt. Der Rückstand wird in 4 mL 96 % TFA, 2 % TES und 2 % H_2O gelöst und 2 h geschüttelt. Das Glycopeptid **53** wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether ausgefällt (15 min bei $-24\text{ }^\circ\text{C}$) und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Präzipitat 2 \times mit kaltem Diethylether gewaschen. Der Rückstand wird in 30 % Acetonitril/ H_2O + 0.1 % Ameisensäure gelöst und gefriergetrocknet. Die Rohsubstanz wird durch RP-HPLC über eine Hydro C18 Säule (150 \times 10 mm) mit einem Gradienten von 20 bis 40 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 55 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{242}\text{H}_{384}\text{N}_{58}\text{O}_{94}\text{S}$ (5642.04),

Ausbeute: 8.0 mg (1.4 μmol , 22 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 5638.68$; $M_{\text{gef}} = 1882.37 (M + 3H)^{3+}$, $1412.00 (M + 4H)^{4+}$, $1129.83 (M + 5H)^{5+}$, $941.48 (M + 6H)^{6+}$, $807.19 (M + 7H)^{7+}$.

H-Thz-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Deca)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ 54

(IgG1 Fc 287-320 Deca Hydrazid entschützt)

2.0 mg (0.4 μmol , 1 eq) Glycopeptid **53** und 3 eq UDP-Galactose werden in 354.5 μL Nacacodylat-Puffer (20 mM, pH 7.4) gelöst. Dann werden nacheinander 2 μL BSA (einer Stammlösung aus 10 mg/mL BSA), 2 μL alkalische Phosphatase (2 U), 1.4 μL MnCl_2 (1 mM) und schließlich 200 mU β -1,4-Galactosyltransferase (E.C.2.4.1.38) zugegeben. Die Reaktion wird 18 h bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Das Rohprodukt wird per Gelpermeationschromatographie über eine Superdex Peptide[®] PE 30/100 Säule (300 \times 10 mm) mit 50 % MeCN/ H_2O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS:

Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{254}\text{H}_{404}\text{N}_{58}\text{O}_{104}\text{S}$ (5966.32),

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 5962.78$; $M_{\text{gef}} = 1493.19 (M + 4\text{H})^{4+}$, $1194.86 (M + 5\text{H})^{5+}$, $995.80 (M + 6\text{H})^{6+}$, $853.60 (M + 7\text{H})^{7+}$.

NH₂-Cys-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Deca)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ 54

(IgG1 Fc 287-320 Deca Hydrazid Cys entschützt)

2.0 mg (0.3 μmol , 1 eq) des Glycopeptids werden in 200 μL eines Puffers, bestehend aus 6 M Guanidiniumchlorid, 0.1 M Natriumdihydrogenphosphat und 0.2 M Methoxamin, pH 3.4, gelöst und für 1 d inkubiert. Das Rohprodukt wird per Gelpermeationschromatographie über eine Superdex Peptide[®] PE 30/100 Säule (300 \times 10 mm) mit 50 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{253}\text{H}_{404}\text{N}_{58}\text{O}_{104}\text{S}$ (5954.31)

Ausbeute: 1.6 mg (251.0 nmol, 76 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 5950.78$; $M_{\text{gef}} = 1985.69 (M + 3\text{H})^{3+}$, $1489.63 (M + 4\text{H})^{4+}$, $1191.79 (M + 5\text{H})^{5+}$, $993.38 (M + 6\text{H})^{6+}$, $851.53 (M + 7\text{H})^{7+}$.

H-Cys-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Nona)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ 55

(IgG1 Fc 287-320 Nona Hydrazid entschützt)

6.2 mg (1.0 μmol , 1 eq) des glycosylierten Peptids **50** werden in 600 μL eines Puffers, bestehend aus 6 M Guanidiniumchlorid, 0.1 M Natriumdihydrogenphosphat und 0.2 M Methoxamin, pH 3.5, gelöst und 1 d inkubiert. Das Rohprodukt wird per

Gelpermeationschromatographie über eine Superdex Peptide[®] PE Säule (300 × 10 mm) mit 50 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 → 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₂₄₅H₃₉₁N₅₇O₉₉S (5751.11)

Ausbeute: 5.2 mg (0.9 μmol, 83 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} = 5747.70; M_{gef} = 1918.49 (M + 3H)³⁺, 1439.13 (M + 4H)⁴⁺, 1151.37 (M + 5H)⁵⁺, 959.66 (M + 6H)⁶⁺, 822.87 (M + 7H)⁷⁺.

8.9 Versuche zu Kapitel 4.5

H-Thz-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Cys-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Nona)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ 56

(IgG1 Fc 261-320 Nona Hydrazid entschützt)

3.3 mg (1.5 eq, 1.0 μmol) des Thioesters **39** werden in 100 μL eines Ligationspuffers, bestehend aus 8 M Guanidiniumchlorid, 0.1 M Natriumdihydrogenphosphat, 0.1 M MPAA und 5 mM TCEP, pH 7, gelöst und zu 4.0 mg (0.7 μmol, 1 eq) des Cysteinfragments **55** gegeben. Die Reaktion wird 2 d in der anaeroben Glovebox inkubiert. Anschließend werden 0.2 mg DTT zugegeben. Das Rohprodukt wird nach 1 h per Gelpermeationschromatographie über eine Superdex Peptide[®] PE Säule (300 × 10 mm) mit 50 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 → 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₃₈₀H₅₈₅N₉₁O₁₄₁S₂ (8748.37)

Ausbeute: 4.3 mg (0.5 μmol, 71 %)

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 8743.08$; $M_{\text{gef}} = 1752.58 (M + 5H)^{5+}$, $1460.46 (M + 6H)^{6+}$, $1251.90 (M + 7H)^{7+}$, $1095.58 (M + 8H)^{8+}$, $973.94 (M + 9H)^{9+}$, $876.78 (M + 10H)^{10+}$.

NH₂-Cys(PhAcm)-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Cys-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Deca)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ 57

(IgG1 Fc 261-320 Deca Hydrazid entschützt)

1.4 mg (0.4 μmol , 1.5 eq) des Thioestes **43** werden in 100 μL eines Ligationpuffers, bestehend aus 8 M Guanidiniumchlorid, 0.1 M Natriumdihydrogenphosphat, 0.1 M MPAA und 5 mM TCEP, pH 7, gelöst und zu 1.6 mg (0.3 μmol , 1 eq) des Cysteinfragments **54** gegeben. Die Reaktion wird 2 d in der anaeroben Glovebox inkubiert. Anschließend werden 0.1 M DTT zugegeben. Das Rohprodukt wird nach 1 h per Gelpermeationschromatographie über eine Superdex Peptide[®] PE 30/100 Säule (300 \times 10 mm) mit 50 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Anschließend wird durch RP-HPLC über eine Hydro C18 Säule (150 \times 10 mm) mit einem Gradienten von 20 bis 50 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 55 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{397}\text{H}_{605}\text{N}_{92}\text{O}_{148}\text{S}_2$ (9098.71)

Ausbeute: 0.5 mg (55.0 nmol, 20 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 9093.21$; $M_{\text{gef}} = 1820.86 (M + 5H)^{5+}$, $1517.56 (M + 6H)^{6+}$, $1300.87 (M + 7H)^{7+}$, $1138.41 (M + 8H)^{8+}$, $1012.01 (M + 9H)^{9+}$, $910.89 (M + 10H)^{10+}$.

H-Cys(Acm)-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Cys-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Nona)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ 58

(IgG1 Fc 261-320 Nona Hydrazid entschützt)

4.4 mg (1.4 μmol , 1.5 eq) des Thioesters **42** werden in 250 μL eines Ligationspuffers, bestehend aus 8 M Guanidiniumchlorid, 0.1 M Natriumdihydrogenphosphat, 0.1 M MPAA und 5 mM TCEP, pH 7, gelöst und zu 5.3 mg (0.9 μmol , 1 eq) des Cysteinfragments **55** gegeben. Die Reaktion wird 2 d in der anaeroben Glovebox inkubiert. Anschließend werden 0.1 M DTT zugegeben. Das Rohprodukt wird nach 1 h per Gelpermeationschromatographie über eine Superdex Peptide[®] PE Säule (300 \times 10 mm) mit 50 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min. Aufgrund von Störungen während der Chromatographie konnten nur 0.72 mg Produkt erhalten werden.

C₃₈₃H₅₉₀N₉₂O₁₄₂S₂ (8819.44)

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 8814.12$; $M_{\text{gef}} = 1766.97 (M + 5H)^{5+}$, $1472.52 (M + 6H)^{6+}$, $1262.22 (M + 7H)^{7+}$, $1104.63 (M + 8H)^{8+}$.

H-Cys(PhAcm)-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Cys-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Nona)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ 59

(IgG1 Fc 261-320 Nona Hydrazid entschützt)

2.8 mg (1.5 eq, 0.8 μmol) des Thioesters **43** werden in 100 μL eines Ligationspuffers, bestehend aus 8 M Guanidiniumchlorid, 0.1 M Natriumdihydrogenphosphat, 0.1 M MPAA und 5 mM TCEP, pH 7, gelöst und zu 3.2 mg (1 eq, 0.6 μmol) des Cysteinfragments **45** gegeben. Die Reaktion wird 2 d in der anaeroben Glovebox inkubiert. Anschließend werden 0.2 mg DTT zugegeben. Das Rohprodukt wird nach 1 h per Gelpermeationschromatographie über eine Superdex Peptide[®] PE Säule (300 \times 10 mm) mit 50 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₃₈₉H₅₉₄N₉₂O₁₄₂S₂ (8895.54)

Ausbeute: 4.7 mg (0.5 μmol, 93 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} = 8890.15; M_{gef} = 1780.37 (M + 5H)⁵⁺, 1483.88 (M + 6H)⁶⁺, 1272.03 (M + 7H)⁷⁺, 1113.13 (M + 8H)⁸⁺, 989.59 (M + 9H)⁹⁺, 990.71 (M + 10H)¹⁰⁺.

8.10 Versuche zu Kapitel 4.6

H-Thz-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Nona)-Ser-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ 60

(IgG1 Fc 261-320 Nona Ala Hydrazid entschützt)

Zu 0.5 mg des Fragments **56** werden 50 μL eines Entschwefelungspuffers, bestehend aus 6 M Guanidiniumchlorid, 0.2 M Natriumdihydrogenphosphat, 0.2 M TCEP, 0.1 M MESNa und 5 mM VA-004 bei pH 7 gegeben. Die Reaktion wird bei 37 °C 21 h inkubiert. Das Rohprodukt wird per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 20 → 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₃₈₁H₅₈₄N₉₀O₁₄₂S (8729.30)

ESI-MS: M_{ber} = 8724.10; M_{gef} = 1456.42 (M + 6H)⁶⁺, 1248.67 (M + 7H)⁷⁺, 1092.53 (M + 8H)⁸⁺, 971.27 (M + 9H)⁹⁺, 874.27 (M + 10H)¹⁰⁺.

H-2-methyl-2-carboxyl-Thz-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Cys-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Nona)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ 65

(IgG1 Fc 261-320 Nona Hydrazid entschützt)

Zu 1.0 mg des Peptids **64** werden 200 μL eines Puffers, bestehend aus 6 M Guanidiniumchlorid und 0.02 M Natriumdihydrogenphosphat, pH 7 gegeben. Anschließend werden 378.7 μL (50 eq, 5.5 μmol) Pyruvat hinzugegeben. Die Reaktion wird bei RT über Nacht inkubiert. Das

Rohprodukt wird per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50×2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{383}\text{H}_{586}\text{N}_{90}\text{O}_{144}\text{S}_2$ (8819.40)

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 8814.07$; $M_{\text{gef}} = 1471.36 (M + 6H)^{6+}$, $1261.35 (M + 7H)^{7+}$, $1103.74 (M + 8H)^{8+}$, $981.15 (M + 9H)^{9+}$.

H-Cys(Acm)-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Nona)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ **61**

(IgG1 Fc 261-320 Nona Ala Hydrazid entschützt)

Zu 0.5 mg des Fragments **58** werden 50 μL eines Entschwefelungspuffers, bestehend aus 6 M Guanidiniumchlorid, 0.2 M Natriumdihydrogenphosphat, 0.2 M TCEP, 0.1 M MESNa und 5 mM VA-004, pH 7 gegeben. Die Reaktion wird bei 35 $^{\circ}\text{C}$ über Nacht inkubiert. Das Rohprodukt wird per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50×2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{383}\text{H}_{590}\text{N}_{92}\text{O}_{142}\text{S}$ (8787.38)

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 8782.15$; $M_{\text{gef}} = 1760.68 (M + 5H)^{5+}$, $1467.04 (M + 6H)^{6+}$, $1257.57 (M + 7H)^{7+}$, $1100.58 (M + 8H)^{8+}$, $978.35 (M + 9H)^{9+}$.

H-Cys(PhAcm)-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Nona)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ **62**

(IgG1 Fc 261-320 Nona Ala Hydrazid entschützt)

Zu 3.7 mg des Fragments **59** (0.4 μmol , 1 eq) werden 366 μL eines Entschwefelungspuffers, bestehend aus 6 M Guanidiniumchlorid, 0.2 M Natriumdihydrogenphosphat, 0.2 M TCEP, 0.1 M MESNa und 5 mM VA-004, pH 7 gegeben. Die Reaktion wird in der anaeroben Glovebox bei 35 °C über Nacht inkubiert. Das Rohprodukt wird per Gelpermeationschromatographie über eine Superdex Peptide[®] PE 30/100 Säule (300 \times 10 mm) mit 50 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₃₈₉H₅₉₄N₉₂O₁₄₂S (8863.47)

Ausbeute: 2.5 mg (0.3 μmol , 69 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 8858.18$; $M_{\text{gef}} = 1773.99 (M + 5H)^{5+}$, $1478.33 (M + 6H)^{6+}$, $1267.40 (M + 7H)^{7+}$, $1109.08 (M + 8H)^{8+}$, $985.97 (M + 9H)^{9+}$, $887.46 (M + 10H)^{10+}$.

NH₂-Cys(PhAcm)-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Deca)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ **67**

(IgG1 Fc 261-320 Deca Ala Hydrazid entschützt)

Zu 0.5 mg des Fragments **57** (55.5 nmol, 1 eq) werden 50 μL eines Entschwefelungspuffers, bestehend aus 6 M Guanidiniumchlorid, 0.2 M Natriumdihydrogenphosphat, 0.2 M TCEP, 0.1 M MESNa und 5 mM VA-004, pH 7 gegeben. Die Reaktion wird in der anaeroben Glovebox bei 35 °C über Nacht inkubiert. Das Rohprodukt wird per Gelpermeationschromatographie über eine Superdex Peptide[®] PE 30/100 Säule (300 \times 10 mm) mit 50 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₃₉₇H₆₀₅N₉₂O₁₄₈S (9066.64)

Ausbeute: 0.3 mg (31.0 nmol, 56 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 9061.24$; $M_{\text{gef}} = 1512.35 (M + 6H)^{6+}$, $1296.30 (M + 7H)^{7+}$, $1134.40 (M + 8H)^{8+}$, $1008.51 (M + 9H)^{9+}$, $907.79 (M + 10H)^{10+}$.

8.11 Versuche zu Kapitel 4.7

H-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Nona)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ 68

(IgG1 Fc 261-320 Cys Hydrazid)

Es werden 0.5 mg (56.0 nmol, 1 eq) des Peptids **62** in 50 μL TFA gelöst. Anschließend werden 0.6 mg AgOAc (3.375 μmol , 60 eq) zugegeben und die Reaktion 12 h inkubiert. Schließlich werden 1 mg DTT zugegeben und 10 min geschüttelt. Danach wird die Lösung 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand im HV eingengt und mit Diethylether ausgefällt. Danach wird das Peptid **68** in 20 % $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ gelöst. Das Rohprodukt wird durch RP-HPLC über eine Ascentis C18 Säule (100 \times 4.6 mm) mit einem Gradienten von 10 bis 40 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 35 min bei einer Flussrate von 1 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösemittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{380}\text{H}_{583}\text{N}_{91}\text{O}_{141}\text{S}$ (8717.29),

Ausbeute: 0.2 mg (20.0 nmol, 36 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 8712.11$; $1454.12 (M + 6H)^{6+}$, $1245.66 (M + 7H)^{7+}$, $1090.57 (M + 8H)^{8+}$.

H-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-OH 70

(IgG1 Fc 261-286 Cys)

Zu 0.1 mg des Peptids **69** (32.0 μmol , 1 eq) werden 120 μL 100 mM Tris-Puffer pH 7, 0.1 mg EDTA (0.2 μmol , 6.3 eq) und 0.1 mg DTT (0.2 μmol , 6.3 eq) gegeben. Es werden anschließend

450 mU Penicillin G Acylase (E.C.3.5.1.11), Sigma Aldrich, aus *E. coli*) zugegeben. Die Reaktion wird in einer anaeroben Glovebox 1 h inkubiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm , 30 nm (50×2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{135}\text{H}_{196}\text{N}_{34}\text{O}_{43}\text{S}$ (3015.27)

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 3013.39$; $M_{\text{gef}} = 1508.23$ ($M + 2\text{H}$)²⁺, 1005.80 ($M + 3\text{H}$)³⁺, 754.61 ($M + 4\text{H}$)⁴⁺.

H-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Nona)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ **68**

(IgG1 Fc 261-320 Nona Ala Cys Hydrazid entschützt)

Zu 0.5 mg des Fragments **62** werden 120 μL einer Lösung, bestehend aus 20 % $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 20 mM Cystein, 8 % DMF, pH 8, gegeben. Es werden anschließend 200 mU Penicillin G Acylase (E.C.3.5.1.11, Sigma Aldrich, aus *E. coli*) zugegeben. Nach 2 h werden erneut 200 mU Penicillin G Amidase zugegeben. Die Reaktion wird in einer anaeroben Glovebox über Nacht inkubiert. Anschließend werden 1.5 mg DTT zugegeben.

Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C4 S-3 μm , 30 nm (50×2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{380}\text{H}_{584}\text{N}_{90}\text{O}_{142}\text{S}$ (8717.29)

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 8712.10$; $M_{\text{gef}} = 1745.03$ ($M + 5\text{H}$)⁵⁺, 1454.08 ($M + 6\text{H}$)⁶⁺, 1246.66 ($M + 7\text{H}$)⁷⁺, 1090.89 ($M + 8\text{H}$)⁸⁺, 969.84 ($M + 9\text{H}$)⁹⁺, 872.96 ($M + 10\text{H}$)¹⁰⁺.

NH₂-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Nona)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ **68**

(IgG1 Fc 261-320 Nona Ala Cys Hydrazid entschützt)

Zu 2.36 mg des Peptids **62** (0.3 μmol , 1 eq) werden 50 μL eines Puffers bestehend aus 6 M Guanidiniumchlorid und 0.1 M NaH_2PO_4 bei pH 7 gegeben. Es werden 7.3 U Penicillin G Acylase (E.C.3.5.1.11, Sigma Aldrich, aus *E. coli*) mit 50 μL 0.1 M NaH_2PO_4 , 20 mM Cystein, 2 mM EDTA, pH 7 versetzt und 3 min inkubiert. Anschließend wird die Penicillin G Acylase zum gelösten Peptid **61** gegeben. Schließlich wird mittels des Puffers aus 0.1 M NaH_2PO_4 , 20 mM Cystein und 2 mM EDTA, pH 7, eine Konzentration von 2 M Guanidiniumchlorid eingestellt. Die Peptidkonzentration beträgt 0.9 mM. Die Reaktion wird in einer anaeroben Glovebox 3 h inkubiert. Anschließend werden 2 mg DTT zugegeben. Es werden danach 1 mL 30 % $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ + 0.1 % HCOOH hinzugefügt. Die Rohsubstanz wird durch RP-HPLC über eine Protein RP Säule (150 \times 10 mm) mit einem Gradienten von 20 bis 50 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 55 min bei einer Flussrate von 2 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C4 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{380}\text{H}_{584}\text{N}_{90}\text{O}_{142}\text{S}$ (8717.29)

Ausbeute: 1.4 mg (0.2 μmol , 60 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 8712.10$; $M_{\text{gef}} = 1744.18$ (M + 5H)⁵⁺, 1453.66 (M + 6H)⁶⁺, 1246.13 (M + 7H)⁷⁺, 1090.42 (M + 8H)⁸⁺, 969.27 (M + 9H)⁹⁺, 872.50 (M + 10H)¹⁰⁺.

8.10 Versuche zu Kapitel 4.8

NH₂-Thr-His-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Nle-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Cys-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Nona)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NH-NH₂ **73**
(IgG1 Fc 223-320 Nona Hydrazid entschützt)

1.2 mg des Thioesters **36** (1.5 eq, 0.3 μmol) werden in 50 μL eines Ligationspuffers, bestehend aus 8 M Guanidiniumchlorid, 0.1 M Natriumdihydrogenphosphat, 0.1 M MPAA und 5 mM TCEP, pH 7, gelöst und zu 1.7 mg (1 eq, 0.19 μmol) des Cysteinfragments **68** gegeben. Die

Reaktion wird 3 d in einer anaeroben Glovebox inkubiert. Anschließend werden 0.1 M DTT zugegeben. Das Rohprodukt wird durch RP-HPLC über eine Protein-RP Säule (150 × 10 mm) mit einem Gradienten von 20 bis 50 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 55 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C4 S-3 μm , 30 nm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 20 → 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{566}\text{H}_{877}\text{N}_{135}\text{O}_{193}\text{S}_3$ (12757.00),

Ausbeute: 1.0 mg (79.0 nmol, 40 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 12749.21$; $M_{\text{gef}} = 1822.87$ (M + 7H)⁷⁺, 1595.21 (M + 8H)⁸⁺, 1417.98 (M + 9H)⁹⁺, 1276.31 (M + 10H)¹⁰⁺, 1160.36 (M + 11H)¹¹⁺, 1063.81 (M + 12H)¹²⁺, 982.03 (M + 13H)¹³⁺, 911.90 (M + 14H)¹⁴⁺, 851.15 (M + 15H)¹⁵⁺.

H-Thr-His-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Nle-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val--Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Cys-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn(Nona)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-MMBA 74
(IgG1 Fc 223-320 Nona Thioester entschützt)

Zu 0.9 mg (71.0 nmol, 1 eq) des Peptids **73** werden 23 μL eines Puffers, bestehend aus 6 M Guanidiniumchlorid, 0.2 M Natriumdihydrogenphosphat und 0.02 M Natriumnitrit, pH 3.5 gegeben. Die Reaktion wird 50 min bei -24 °C inkubiert. Anschließend werden 1.7 mg MMBA (4.6 μmol , 65 eq) zugegeben und die Reaktionslösung mit 1 M NaOH auf pH 6-7 eingestellt. Bei RT wird die Reaktionslösung 1 h inkubiert. Das Rohprodukt wird durch RP-HPLC über eine Supelco Discovery Bio Wide Pore C5 Säule (150 × 4.6 mm) mit einem Gradienten von 20 bis 50 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 55 min bei einer Flussrate von 1 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C4 S-3 μm , 30 nm, (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 20 → 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₅₇₄H₈₈₁N₁₃₃O₁₉₅S₄ (12885.20).

8.11 Versuche zu Kapitel 5.1

Fmoc-Gly-2-Chlor-Trityl-Polystyrol-Harz 78

148.7 mg (0.5 mmol, 1 eq) Fmoc-Gly-OH werden in 2 ml NMP/DCM (1/1) gelöst und es werden 342.4 µL (1.1 mmol, 4 eq) DIPEA hinzugefügt. Die Lösung wird zu 500.1 mg (0.5 mmol, B_H = 1.0 mmol/g) vorgequollenem 2-Chlor-Trityl-PS-Harz **77**, das sich in einem 10 mL Spritzenreaktor befindet, aufgezogen. Die Reaktionslösung wird 20 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Harz **78** gewaschen (2 × NMP, 3 × DCM) und mit einer Lösung aus DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1) 3 × 2 min geschüttelt. Das Harz wird erneut 2 × mit NMP und 3 × mit DCM gewaschen.

Boc-Ala-Val-Leu-Pro-Gln(Trt)-Glu(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Gly-OH 79

(Bikunin 1-9, geschützt)

Das Harz **78** wird in einen 45 mL Reaktor überführt. Die Aminosäuren (2.0 mmol, 5 eq) werden mit 808.8 mg (2.0 mmol, 5 eq) HCTU aktiviert. Die Synthesebedingungen sind in Tabelle 10 nachzulesen. Bei jedem Kupplungsschritt werden im Synthesizer 3 mL 0.4 M DIPEA/DMF-Lösung hinzugefügt.

Tabelle 10: Kupplungssequenz für die Synthese von Bikunin 1-9 **79**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Kupplungs- dauer [min]	Aktivierungsmittel
Glu-8	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	831.8	30	HCTU
Glu-7	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	831.8	30	HCTU
Glu-6	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	831.8	30	HCTU
Gln-5	Fmoc-Gln(Trt)-OH	1193.9	30	HCTU
Pro-4	Fmoc-Pro-OH	659.6	30	HCTU

Leu-3	Fmoc-Leu-OH	690.9	30	HCTU
Val-2	Fmoc-Val-OH	663.5	30	HCTU
Ala-1	Fmoc-Ala-OH	369.91	30	HCTU

Es wird eine analytische TFA-Abspaltung (1.5 % TFA in DCM) durchgeführt und das geschützte Peptidfragment **79** durch LC-MS analysiert. Anschließend wird das Harz mit einer Abspalllösung aus 4 mL 20 % HFIP, 10 % TFE und 2 % TES in DCM versehen (1 × 20 min, 10 × 2 min) und danach 3 × mit DCM gewaschen. Die Filtrate werden in Kolben gesammelt, eingengt, im Hochvakuum getrocknet, in 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Es werden 535.9 mg Rohprodukt erhalten. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C8 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 40 % bis 95 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$C_{77}H_{112}N_{10}O_{19}$ (1481.77),

Ausbeute: 535.9 mg (0.4 mol, 71 %), weißer Feststoff,

M_{ber} : 1480.81; M_{gef} : 1483.45 (M+H)⁺.

Fmoc-Ser(t-Bu)-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz 80

Unter Argonatmosphäre werden 544.6 mg (0.2 mmol, $B_H = 0.3$ mmol/g) Harz **32** mit 8 mL 10 % AcBr/DCM_{abs} versetzt und 3 h inkubiert. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz **33** gewaschen (5 × 10 mL DCM_{abs}). Es werden 323.3 mg (1.4 mmol, 5 eq) Fmoc-Ser(t-Bu)-OH in 3 mL DCM_{abs} gelöst und 144.4 μL (1.4 mmol, 5 eq) DIPEA hinzugefügt. Die Lösung wird zum Harz gegeben und 20 h inkubiert. Das Harz wird in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und gewaschen (2 × NMP, 3 × DCM).

Fmoc-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln(Trt)-Leu-Val-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-Glu(t-Bu)-Val-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(t-Bu)-Asp(t-Bu)-Ser(t-Bu)-2-Chlor-trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz 86

(Bikunin 10-25, geschützt)

Das Harz **80** wird in ein 45 mL Reaktionsgefäß für den Synthesizer überführt und mit 20 % Piperidin in DMF versetzt. Anschließend wird das Harz mit 6 × mit DMF gewaschen. Die Aminosäuren (1.4 mmol, 5 eq) werden mit 345.4 mg (1.4 mmol, 5 eq) HCTU, gelöst in 4 mL 0.4 M DIPEA/DCM, aktiviert. Die Aminosäure Fmoc-Val-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH (0.5 mmol, 3 eq) wird mit 266.7 mg (0.5 mmol, 3 eq) PyBOP, gelöst in 4 mL 0.4 M DIPEA/DCM-Lösung, aktiviert. In Tabelle 11 sind die jeweiligen Kupplungsbedingungen dargestellt.

Tabelle 11: Kupplungssequenz für die Synthese von Bikunin 11-24.

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Kupplungs- dauer [min]	Aktivierungs- mittel
Asp-24	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH	343.6	30	HCTU
Glu-23	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	355.3	30	HCTU
Lys-22	Fmoc-Lys(Boc)-OH	391.2	30	HCTU
Lys-21	Fmoc-Lys(Boc)-OH	253.9	30	HCTU
Thr-20, Val-19	Fmoc-Val-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	240.8	45	PyBOP
Glu-18	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	355.3	30	HCTU
Val-17, Thr-16	Fmoc-Val-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	240.8	45	PyBOP
Leu-15	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	295.1	30	HCTU
Gln-14	Fmoc-Gln(Trt)-OH	509.9	30	HCTU
Gly-13	Fmoc-Gly-OH	248.3	30	HCTU
Gly-12	Fmoc-Gly-OH	248.3	30	HCTU
Gly-11	Fmoc-Gly-OH	248.3	30	HCTU

327.63 mg Harz werden in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und gewaschen (2 × NMP, 3 × DCM). Zu 54.1 mg (0.1 mmol, 2 eq) Fmoc-Xyl-Ser-OH **82** werden 19.1 mg (0.1 mmol, 2 eq) HOObt in 2 mL DMF/DCM (1/1) gegeben und anschließend mit 18.4 μ L (0.1 mmol, 2 eq) DIC versetzt. Die Lösung wird in den Spritzenreaktor mit Harz aufgezogen und für 1.5 h bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz gewaschen (2 × NMP, 3 × DCM). Es wird eine analytische TFA-Abspaltung 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 %

HPLC-H₂O) und das Peptid **88e** durch LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50×2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 10 % bis 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

H-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-OH **86e**

(*Bikunin 10-25, entschützt*)

C₈₇H₁₃₃N₁₉O₃₄ (1989.09),

ESI-MS: M_{ber.}: 1987.93; M_{gef.}: 994.89 (M+2H)²⁺, 1989.81 (M+H)⁺.

Fmoc-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln(Trt)-Leu-Val-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-Glu(t-Bu)-Val-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(t-Bu)-Asp(t-Bu)-Ser(t-Bu)-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz **86**

(*Bikunin 10-25, geschützt*)

20.6 mg Harz **81** werden in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und gewaschen (2 \times NMP, 3 \times DCM). Zu 3.8 mg (8.2 μmol , 2 eq) Fmoc-Xyl-Ser-OH **82** werden 1.1 mg (8.2 μmol , 2 eq) HOAt in 0.5 mL DCM/DMF (1/1) gegeben und anschließend mit 1.3 μL (8.2 μmol , 2 eq) DIC versetzt. Die Lösung wird in den Spritzenreaktor mit Harz aufgezogen und 1.5 h bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz gewaschen (2 \times NMP, 3 \times DCM). Es wird eine analytische TFA-Abspaltung für 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC-H₂O) und das Peptid **86e** durch LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50×2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 20 \rightarrow 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

H-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-OH **86e**

(*Bikunin 10-25, entschützt*)

C₈₇H₁₃₃N₁₉O₃₄ (1989.09)

ESI-MS: M_{ber.}: 1987.93; M_{gef.}: 994.21 (M+2H)²⁺, 1988.50 (M+H)⁺.

*Fmoc-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln(Trt)-Leu-Val-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-Glu(t-Bu)-Val-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(t-Bu)-Asp(t-Bu)-Ser(t-Bu)-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz **86***

(Bikunin 10-25, geschützt)

19.8 mg Harz **81** werden in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und gewaschen (2 × NMP, 3 × DCM). Zu 3.58 mg (8.0 μmol, 2 eq) Fmoc-Xyl-Ser-OH **82** werden 1.3 mg (8.0 μmol, 2 eq) Cl-HOBt in 0.5 mL DCM/DMF (1/1) gegeben und anschließend mit 1.2 μL (8.0 μmol, 2 eq) DIC versetzt. Die Lösung wird in den Spritzenreaktor mit Harz aufgezogen und 1.5 h bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz gewaschen (2 × NMP, 3 × DCM). Es wird eine analytische TFA-Abspaltung 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC-H₂O) und das Peptid **86e** durch LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 20 % bis 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

*H-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-OH **86e***

(Bikunin 10-25, entschützt)

C₈₇H₁₃₃N₁₉O₃₄ (1989.09)

ESI-MS: M_{ber.}: 1987.93; M_{gef.}: 993.15 (M+2H)²⁺, 1986.40 (M+H)⁺.

*Fmoc-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln(Trt)-Leu-Val-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-Glu(t-Bu)-Val-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(t-Bu)-Asp(t-Bu)-Ser(t-Bu)-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz **86***

(Bikunin 10-25, geschützt)

20.1 mg Harz **81** werden in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und gewaschen (2 × NMP, 3 × DCM). Fmoc-Xyl-Ser-OH **82** wird als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Hierzu werden 9.0 mg (20.0 μmol, 5 eq) Fmoc-Xyl-Ser-OH **82** bei 0 °C in 0.5 mL DCM und 0.1 mL DMF gelöst und mit 1.5 μL DIC (10.0 μmol, 2.5 eq) versetzt. Die Reaktion wird 20 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wird die Lösung abfiltriert und das Filtrat eingengt. Danach wird der Rückstand in 0.5 mL DMF gelöst und zum Harz aufgezogen. Die Reaktionszeit beträgt 3 h. Nach Reaktionsende wird das Harz mittels NMP (2 ×) und DCM (3 ×) gewaschen. Es wird eine analytische TFA-Abspaltung 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC-H₂O) und das Peptid **86e** mittels LC-MS-Analyse charakterisiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-

MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50×2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 20 \rightarrow 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

H-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-OH **86e**

(*Bikunin 10-25, entschützt*),

$\text{C}_{87}\text{H}_{133}\text{N}_{19}\text{O}_{34}$ (1989.09),

ESI-MS: M_{ber} : 1987.93; M_{gef} : 993.63 ($M+2H$)²⁺, 1986.40 ($M+H$)⁺.

Fmoc-Xyl-Ser-OPfp **84**

1.8 mg (4.0 μmol , 2 eq) Fmoc-Xyl-Ser-OH **82** werden in 50 μL DMF gelöst. Dann werden 0.4 μL (4.4 μmol , 1.1 eq) Pyridin und 1.3 μL (80.0 μmol , 20 eq) Pentafluorophenyltrifluoracetat zugegeben. Der Reaktionsansatz wird 18 h gerührt. Anschließend werden zur Reaktionslösung 100 μL Essigsäureethylester gegeben und 3 \times mit 0.1 N HCL Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird getrocknet. und durch LC-MS charakterisiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C8 S-3 μm (50×2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 30 \rightarrow 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{F}_5\text{NO}_9$ (625.49),

Ausbeute: 0.6 mg, (0.9 μmol , 23 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} : 625.14; M_{gef} : 1249.14 ($2M+H$)⁺, 1874.24 ($3M+H$)⁺.

Fmoc-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln(Trt)-Leu-Val-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Glu(t-Bu)-Val-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(t-Bu)-Asp(t-Bu)-Ser(t-Bu)-trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz **86**

(*Bikunin 10-25, geschützt*)

1.3 mg Harz **81** werden in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und gewaschen (2 \times NMP, 3 \times DCM). Zu 0.6 mg (0.2 μmol , 1 eq) Fmoc-Xyl-Ser-OPfp **84** werden 0.1 mg (0.6 μmol , 2.5 eq) HOAt in 0.5 mL DCM/DMF (1/1) gegeben und anschließend mit 0.1 μL (0.6 μmol , 2.5 eq) DIPEA versetzt. Die Lösung wird in den Spritzenreaktor mit Harz aufgezogen und 2 h

bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz gewaschen ($2 \times$ NMP, $3 \times$ DCM). Es wird eine analytische TFA-Abspaltung für 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC-H₂O) und das Peptid **85e** durch LC-MS charakterisiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50×2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 20 \rightarrow 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

H-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-OH **86e**

(*Bikunin 10-25, entschützt*)

C₈₇H₁₃₃N₁₉O₃₄ (1989.09)

ESI-MS: M_{ber.}: 1987.93; M_{gef.}: 993.68 (M+2H)²⁺.

Boc-Ala-Val-Leu-Pro-Gln(Trt)-Glu(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Glu(t-Bu)-Gly-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln(Trt)-Leu-Val-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Glu(t-Bu)-Val-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(t-Bu)-Asp(t-Bu)-Ser(t-Bu)-OH **87**

(*Bikunin 1-25, geschützt*)

Das Harz **86** wird mit 20 % Piperidin in NMP für 15 min geschüttelt. Dann wird $4 \times$ mit NMP und $3 \times$ mit DCM gewaschen. 394.3 mg (0.1 mmol) Harz **86**-Fmoc werden mit 174.5 mg (0.1 mmol, 2 eq) Bikunin 1-9 Fragment **79**, 61.3 mg (0.1 mmol, 2 eq) PyBOP und 40.3 μL (0.5 mmol, 4 eq) DIPEA versetzt. Die Reaktion wird 30 min in der Synthesemikrowelle (55 °C, 70 W) geschüttelt. Anschließend wird mit 2 eq PyBOP und 4 eq DIPEA in 1 mL NMP nachaktiviert und die Reaktion 30 min in der Synthesemikrowelle (50 °C, 70 W) geschüttelt. Danach wird das Harz $2 \times$ mit NMP und $3 \times$ mit DCM gewaschen. Das Harz wird mit 20 mL einer Abspalllösung (20 % HFIP, 10 % TFE, 2 % TES in DCM) geschüttelt (1×20 min, 3×2 min). Dann wird $3 \times$ mit DCM nachgewaschen. Die Filtrate werden im Kolben gesammelt, eingengt, im HV eingengt, in 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Es werden 94.1 mg des Peptids **87** erhalten. Es wird eine analytische TFA-Abspaltung 1 h durchgeführt (96 % TFA, 2 % TES, 2 % HPLC-H₂O) und das Peptid **87e** durch LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50×2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

H-Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-OH **87e**

(*Bikunin 1-25, entschützt*),

C₁₁₃H₁₈₇N₂₉O₄₈ (2719.86),

ESI-MS: M_{ber} = 2718.31; M_{gef} = 1360.52 (M+2H)²⁺, 907.52 (M+3H)³⁺.

NH₂-Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-S(CH₂)₂COOnBu **88**

(*Bikunin 1-25 Thioester*)

Zum Peptid **87** werden 125.5 µL (0.8 mmol, 30 eq) Butyl-3-mercaptopropionat, 22 µL (0.1 mmol, 5 eq) DIPEA in 1 mL DMF gegeben. Nachdem die Reaktionslösung bei -20 °C für 10 min gerührt wurde, werden 67.0 mg PyBOP (0.1 mmol, 5 eq) hinzugegeben und für 3 h bei -20 °C gerührt. Anschließend wird eine TFA-Abspaltung mit 5 mL 96 % TFA, 2 % TES und 2 % HPLC-H₂O durchgeführt. Mit 10.0 mL kaltem Diethylether wird das Rohprodukt ausgefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert, das Präzipitat im HV getrocknet, gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Man erhält 112.3 mg Rohprodukt. Das Rohprodukt wird per Gelpermeationschromatographie (Superdex Peptide® PE 300 × 7.5 mm) mit 30 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.25 mL/min gereinigt. Die Rohsubstanz wird durch RP-HPLC über eine Ascentis C18 Säule (250 × 10 mm) mit einem Gradienten von 5 bis 30 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 55 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 µm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 10 → 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₁₂₀H₁₉₉N₂₉O₄₉S (2864.09),

Ausbeute: 24.0 mg (8.4 µmol, 26 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} = 2862.37; M_{gef} = 1432.98 (M + 2H)²⁺, 955.67 (M + 3H)³⁺.

H-Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-NH₂ **89**

(Bikunin 1-25 Hydrazid entschützt)

Es werden 101.4 mg Peptidylsäure **87** (27.8 μmol , 1 eq) in 3 mL absolutem DCM und 500 μL DMF gelöst und 11.0 mg *tert*-Butylcarbazat (83.2 μmol , 3 eq), 9.4 mg Cl-HOBt (55.5 μmol , 2 eq) und 9.5 μL DIPEA (55.5 μmol , 2 eq) zugegeben. Die Reaktion wird bei 0 °C gerührt. Danach werden 8.7 μL DIC (55.5 μmol , 2 eq) zugegeben. Die Reaktion wird 18 h gerührt und die Temperatur wird langsam von 0 °C auf RT erhöht. Die Reaktion wird anschließend eingengt. Der Rückstand wird in 5 mL 96 % TFA, 2 % TES und 2 % H₂O gelöst und 1.5 h geschüttelt. Das Glycopeptid **89** wird durch Zugabe von 6 mL kaltem Diethylether ausgefällt (15 min bei -24 °C) und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Präzipitat 2 \times mit kaltem Diethylether gewaschen. Der Rückstand wird in 20 % Acetonitril/H₂O + 0.1 % Ameisensäure gelöst und gefriergetrocknet. Die Rohsubstanz wird durch RP-HPLC über eine Ascentis C18 Säule (250 \times 10 mm) mit einem Gradienten von 10 bis 40 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 55 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 70 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₁₁₃H₁₈₉N₃₁O₄₇ (2733.89),

Ausbeute: 15.0 mg (5.5 μmol , 20 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} = 2732,34; M_{gef} = 1368.22 (M + 2H)²⁺, 912.81 (M + 3H)³⁺.

8.12 Versuche zu Kapitel 5.2

H-Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-(Xyl-Gal-Gal)-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-NHNH₂ 90

(Bikunin 1-25 Xyl Gal Gal Hydrazid entschützt)

Es werden 4 Reaktionen mit je 2.1 mg (0.4 μmol , 1 eq) Glycopeptid **89** folgendermaßen angesetzt. 2.1 mg (0.8 μmol , 1 eq) Glycopeptid **89** werden in 1 mL (5.5 mU β 4GalT7 (E.C. 2.4.1.133), β 3GalT6 (E.C.2.4.1.134)) Enzymlösung mit Bis-Tris Puffer, 1 M NaCl (pH 7) gelöst. Dann werden nacheinander 3.0 μL BSA (einer Stammlösung aus 10 mg/mL BSA), 5.0 μL alkalische Phosphatase (5 U) (E.C.3.1.3.1), 2.4 μL MnCl₂ (aus einer 0.5 M Stammlösung) und schließlich 0.5 mg UDP-Galactose (Dinatriumsalz) zugegeben. Die

Reaktion wird bei 30 °C 18 h inkubiert. Das Rohprodukt wird per Gelpermeationschromatographie (Superdex Peptide[®] PE 30/100 Säule 300 × 10 mm) mit 30 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 → 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₁₂₅H₂₀₉N₃₁O₅₇ (3058,17),

Ausbeute: 8.4 mg (2.7 μmol, 88 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} = 3056.44; M_{gef} = 1529.81 (M + 2H)²⁺, 1019.78 (M + 3H)³⁺.

H-Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-Xyl(Gal-Gal-GlcA)-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-NHNH₂ 91

(Bikunin 1-25 Xyl Gal Gal GlcA Hydrazid entschützt)

0.1 mg (30.0 μmol, 1 eq) Glycopeptid **90** werden in 50 μL (0.9 mg/mL GFP markierte GlcAT1 (E.C. 2.4.1.135)) in 25 mM HEPES, 300 mM NaCl und 300 mM Imidazol, pH 7, Enzymlösung gelöst. Dann werden nacheinander 2.0 μL BSA (einer Stammlösung aus 10 mg/mL BSA), 2.0 μL alkalische Phosphatase (2 U) (E.C.3.1.3.1), 0.5 μL MnCl₂ und schließlich 0.1 mg UDP-GlcA (Trinatriumsalz) zugegeben. Die Reaktion wird 18 h bei 30 °C inkubiert. Das Rohprodukt **91** wird per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 → 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₁₃₁H₂₁₇N₃₁O₆₃ (3234.29),

ESI-MS: M_{ber} = 3232.47; M_{gef} = 1618.49 (M + 2H)²⁺, 1078.97 (M + 3H)³⁺.

8.12 Versuche zu Kapitel 5.3

H₂N-NH-2-Chlor-Triyl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz 92a

545.5 mg (0.3 mmol, $B_H = 0.6$ mmol/g) Harz **32** werden in einen 40 mL Langhalskolben gegeben. Unter Argonatmosphäre werden 8 mL 10 %ige AcBr/DCM-Lösung zugegeben und 3 h inkubiert. Anschließend wird das Harz **33** 5 × mit je 8 mL absolutem DCM und 3 × mit DMF gewaschen. Die Reaktion wird auf 0 °C gekühlt. 64.4 µL (1.3 mmol, 4 eq) Hydrazinhydrat werden zu 5 mL DMF gegeben und mit 171.2 µL (1.0 mmol, 3 eq) Triethylamin versetzt. Die Lösung wird zum Harz gegeben und 20 h bei 4 °C inkubiert. Das Harz wird mit DCM in eine Spritze überführt. Die Reaktion wird in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und das Harz mit DMF (5 ×), DCM (5 ×) und 3 × mit einer Lösung aus 30 mL 0.5 % (m/v) Cl-HOBt in NMP/DCM (1/1) gewaschen.

Fmoc-Nle-Gly-Nle-Thr-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asp(OAll)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-NH-NH-2-Chlor-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz 92
(Bikunin 36-50, entschützt)

Die Kupplung von Ala-50 erfolgt zu 3 eq mit 154.2 µL (1.0 mmol, 3 eq) DIC und 167.9 mg (1.0 mmol, 3 eq) Cl-HOBt, gelöst in NMP/DCM (1/1). Für die Fmoc-Abspaltungen werden 20 % Piperidin in NMP + 0.1 % Triton-X 100 verwendet. Das Harz wird 15 min in der Lösung geschüttelt. Anschließend wird mit NMP (5 ×) und DCM (5 ×) gewaschen. Die Fmoc-Abspaltungen nach der Kupplung von Fmoc-Asp(OAll)-OH erfolgen 2 × 10 min mit jeweils 3 mL einer Lösung aus HMi/N-MP/Cl-HOBt/NMP (4/50/4/142). Nach jeder Aminosäurekupplung erfolgt ein Capping mit einer Lösung aus NMP/Ac₂O/DIPEA (48/3/1) für 20 min. Die Aminosäuren (1.0 mmol, 3 eq) werden mit 409.6 mg (1.0 mmol, 3 eq) HCTU, 167.9 mg (1.0 mmol, 3 eq) Cl-HOBt und 424.5 µL (7.4 mmol, 7.5 eq) DIPEA, gelöst in NMP/DCM (1/1), aktiviert. Nach der Kupplung von Fmoc-Asp(OAll)-OH wird mit 96.5 mg (12.0 µmol, $B_H = 0.1$ mmol/g) Harz weitergearbeitet. Fmoc-Gly-Thr($\psi^{Me,Me}$ pro)-OH und Fmoc-Asp(OAll)-OH (0.1 mmol, 2 eq) werden mit 104.1 mg (0.1 mmol, 2 eq) PyBOP und 68.5 µL (0.2 mmol, 4 eq) DIPEA, gelöst in NMP/DCM (1/1), aktiviert. Die Kupplungsbedingungen der jeweiligen Aminosäuren sind aus Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Kupplungssequenz für die Synthese des geschützten Bikunin 36-50 Fragments 92.

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Kupplungsdauer [h]	Aktivierungs- reagenz
Ala-50	Fmoc-Ala-OH	325.9	4	DIC

Nle-49	Fmoc-Nle-OH	409.6	3.5	HCTU
Ser-48	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	230.0	3.5	HCTU
Thr-47, Gly-46	Fmoc-Gly- Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	175.4	3.5	PyBOP
Asp-45	Fmoc-Asp(OAll)-OH	79.1	21	PyBOP
Tyr-44	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	27.6	2.5	HCTU
Phe-43	Fmoc-Phe-OH	15.5	3	HCTU
Tyr-42	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	27.6	2.5	HCTU
Arg-41	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	23.4	4.5	HCTU
Ser-40	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	13.8	2.5	HCTU
Thr-39	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH	14.3	4	HCTU
Nle-38	Fmoc-Nle-OH	14.1	2	HCTU
Gly-37	Fmoc-Gly-OH	13.0	3	HCTU
Nle-36	Fmoc-Nle-OH	14.1	2	HCTU

Vom Harz wird eine analytische TFA-Abspaltung (96 % TFA, 2 % H₂O, 2 % TES) durchgeführt und das erhaltene Peptid **91** per LC-MS charakterisiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure); Gradient: Lineargradient 30 \rightarrow 95 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₉₄H₁₃₀N₂₀O₂₅ (1940.16),

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 1938.95$; $M_{\text{gef}} = 1941.74$ (M + H)⁺, 971.49 (M + 2H)²⁺.

Fmoc-Ala-2-Chlor-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz 96

363.6 mg (0.2 mmol, B_H = 0.6 mmol/g) Harz **32** werden in einen 40 mL Langhalskolben gegeben und unter Argonatmosphäre werden 8 mL einer 10 %igen AcBr/DCM-Lösung zugegeben und 3 h inkubiert. Anschließend wird das Harz **33** 5 \times mit je 8 mL absolutem DCM gewaschen. 329.2 mg (1.0 mmol, 5 eq) Fmoc-Ala-OH werden in 3 mL 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Danach wird die Aminosäure in 3 mL DCM gelöst und mit 171.2 μL (1.0 mmol, 5 eq) DIPEA versetzt. Die Lösung wird zum Harz gegeben und 20 h inkubiert. Das Harz wird mit DCM in eine Spritze überführt. Der Reaktionsansatz wird in einen 10 mL

Spritzenreaktor überführt und mit absolutem DCM (5 ×) gewaschen. Der Beladungsgrad beträgt 0.3 mmol/g, was einer Ausbeute von 52 % entspricht.

*Boc-Cys(St-Bu)-Gln(Trt)-Leu-Gly-Tyr(t-Bu)-Ser($\Psi^{Me,Me}$ pro)-Ala-(Dmb)Gly-Pro-Cys(Trt)-Nle-(Dmb)Gly-Nle-Thr(t-Bu)-Ser(t-Bu)-Arg(Pbf)-Tyr(t-Bu)-Phe-Tyr(t-Bu)-Asp(OAll)-(Dmb)Gly-Thr(t-Bu)-Ser(t-Bu)-Nle-Ala-OH **97***

(Bikunin 26-50, geschützt)

Die Kupplung der Aminosäuren 26-49 an das Harz **96** (30.0 μ mol, $B_H = 0.3$ mmol/g) erfolgt maschinell in einem Peptidsynthesizer mit 4 mL einer 0.4 M DIPEA/ DMF-Lösung. Die Kupplungsdauer und Aktivierungsbedingungen der jeweiligen Aminosäuren sind aus Tabelle 13 zu entnehmen. Die Aminosäuren (0.5 mmol, 5 eq) werden mit 186.2 mg HCTU (0.5 mmol, 5 eq) aktiviert. Fmoc-(Dmb)Gly-OH, Fmoc-Asp(OAll)-OH und Fmoc-Tyr(t-Bu)-Ser($\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH (0.3 mmol, 3 eq) werden mit 140.5 mg PyBOP (0.3 mmol, 3 eq) aktiviert. Cys-35 wird als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Hierzu werden 831.1 mg Fmoc-Cys(Trt)-OH (0.9 mmol, 10 eq) bei 0 °C in 2 mL DCM und 0.6 mL DMF gelöst und mit 23.3 μ L DIC (0.5 mmol, 5 eq) versetzt. 309.4 mg Boc-Cys(St-Bu)-OH (0.9 mmol, 10 eq) wird ebenfalls bei 0 °C in 2 mL DCM und 0.6 mL DMF gelöst und mit 70 μ L DIC (0.5 mmol, 5 eq) versetzt. Die Reaktion wird 20 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wird die Lösung abfiltriert und das Filtrat eingengt. Danach wird der Rückstand in 3 mL DMF gelöst und zum Harz aufgezogen. Die Reaktionszeit beträgt 3 h. Nach Reaktionsende wird das Harz mit NMP (2 ×) und DCM (3 ×) gewaschen, bevor die maschinelle Synthese fortgesetzt wird.

Tabelle 13: Kupplungssequenz für die Synthese des geschützten Bikunin 26-49 Fragments.

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Kupplungsdauer [min]	Aktivierungs- reagenz
Nle-49	Fmoc-Nle-OH	150.4	30	HCTU
Ser-48	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	272.0	30	HCTU
Thr-47	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH	282.0	30	HCTU
Gly-46	Fmoc-(Dmb)Gly-OH	190.4	30	PyBOP
Asp-45	Fmoc-Asp(OAll)-OH	168.3	90	PyBOP
Tyr-44	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	326.0	30	HCTU
Phe-43	Fmoc-Phe-OH	274.8	30	HCTU

Tyr-42	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	326.1	30	HCTU
Arg-41	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	460.3	30	HCTU
Ser-40	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	272.0	30	HCTU
Thr-39	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH	282.0	30	HCTU
Nle-38	Fmoc-Nle-OH	150.4	30	HCTU
Gly-37	Fmoc-(Dmb)Gly-OH	190.4	30	PyBOP
Nle-36	Fmoc-Nle-OH	150.4	90	HCTU
Cys-35	Fmoc-Cys(Trt)-OH	831.1	180	DIC
Pro-34	Fmoc-Pro-OH	337.4	30	HCTU
Gly-33	Fmoc-(Dmb)Gly-OH	447.7	30	PyBOP
Ala-32	Fmoc-Ala-OH	329.2	30	HCTU
Ser-31, Tyr-30	Fmoc-Tyr(t-Bu)- Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-OH	586.3	60	PyBOP
Gly-29	Fmoc-Gly-OH	297.3	30	HCTU
Leu-28	Fmoc-Leu-OH	353.4	30	HCTU
Gln-27	Fmoc-Gln(Trt)-OH	610.7	30	HCTU
Cys-26	Boc-Cys(St-Bu)-OH	309.4	180	DIC

Nach der Synthese wird das Peptidylharz mit DCM in einen Spritzenreaktor überführt und mit NMP (2 ×) und DCM (3 ×) gewaschen. Die Gesamtkupplungsausbeute entspricht einem theoretischen Beladungsgrad von 0.2 mmol/g.

$\text{C}_{236}\text{H}_{323}\text{N}_{29}\text{O}_{48}\text{S}_4$ (4459.26 g/mol).

Fmoc-Nle-Thr-OH 98

500 mg 2-Cl-Trityl-Polystyrolharz (0.5 mmol, $B_{\text{H}} = 1.0$ mmol/g) werden in einem 20 mL Spritzenreaktor in DCM vorgequollen. Es werden 199.0 mg Fmoc-Thr(t-Bu)-OH (0.5 mmol, 1 eq) eingewogen, in 4.0 mL DCM/NMP (1/1) gelöst, 428.0 μL DIPEA (2.5 mmol, 5 eq) zugegeben und zum Harz gegeben. Die Reaktionsmischung wird 20 h geschüttelt. Anschließend wird das Harz mit NMP (2 ×) und DCM (3 ×) gewaschen. Das Harz wird 15 min mit einer Lösung aus 20 % Piperidin in DMF behandelt und anschließend wieder mit NMP (5 ×) und DCM (3 ×) gewaschen. Es werden 259.0 mg Fmoc-Nle-OH (0.7 mmol, 2 eq), 303.0 mg HCTU (0.7 mmol, 2 eq) und 124.0 mg Cl-HOBt (0.7 mmol, 2 eq) sowie 376.0 μL DIPEA

(2.2 mmol, 6 eq) in 4.0 mL DCM/NMP (1/1) gelöst, zum Harz aufgezogen und 3 h geschüttelt. Im Anschluss wird mit NMP (2 ×) und DCM (3 ×) gewaschen. Zum Harz werden 10 mL TFA/TES/H₂O (96/2/2) gegeben und 2 h geschüttelt. Das Filtrat wird gesammelt, eingengt und im Anschluss im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in 100 mL DCM gelöst und 3 × mit 100 mL Wasser extrahiert. Die organische Phase wird eingengt, im Hochvakuum getrocknet, in 1,4-Dioxan gelöst und 3 × gefriergetrocknet.

Fmoc-Nle-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-OH 99

2.0 g (4.4 mmol, 1 eq) Dipeptid **98** werden in einen Dreihalskolben überführt und in 35.6 mL absolutem THF gelöst. Es wird unter Argonatmosphäre gearbeitet. Es wird eine Lösung aus 4 mL absolutem THF, 9.2 mL (75.2 mmol, 16 eq) 2,2-Dimethoxypropan und 55.1 μL (0.9 mmol, 0.18 eq) Methansulfonsäure zugegeben. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches liegt bei 4-5. Die Mischung wird 20 h bei 85 °C unter Rückfluss und Schutzgas gerührt. Eine Kontrolle der Reaktion erfolgt per DC (Laufmittel: DCM/MeOH 10/1) und LC-MS. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes wird eine Lösung aus 856.0 μL absolutem THF und 145.0 μL (1.0 mmol, 0.2 eq) Triethylamin zugegeben und 10 min gerührt. Das Reaktionsgemisch wird im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in 200 mL Essigsäureethylester gelöst und 3 × mit 300 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen werden jeweils mit 200 mL Essigsäureethylester rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet. 1.8 g Rohsubstanz werden erhalten. Es werden 4x je maximal 400 mg-500 mg Rohsubstanz durch Flash-Chromatographie (Reveleris® iES, Kartuschengröße 80 g, DCM/MeOH, 0 → 10 %, 40 min, 60 mL/min) gereinigt. Das erhaltene Dipeptid **99** wird per LC-MS charakterisiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C8, S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 50 → 95 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₂₈H₃₄N₂O₆ (494.58),

Ausbeute: 1.35 g (2.7 mmol, 62 %), weißer Feststoff,

R_f = 0.60 (DCM/MeOH 10/1),

ESI-MS: M_{ber} = 494.24; M_{gef} = 495.83 (M + H)⁺, 517.85 (M + Na)⁺, 990.65 (2M + H)⁺, 1012.64 (2M + Na)⁺, 1507.48 (3M + Na)⁺.

*2-Acetamid-2-desoxy- β -D-glucoopyranosylamin 11**(β -GlcNAc-NH₂)*

In einem 100 mL Rundkolben werden 18 mg Natrium in 6 mL absolutem MeOH gelöst. 495.0 mg acetylgeschütztes GlcNAc-N₃ **11a** werden in 4 mL MeOH gelöst und zur Natrium-MeOH-Lösung hinzugegeben. Die Lösung wird 30 min bei RT gerührt. Die Vollständigkeit wird durch Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel Hexan/Aceton (1/1) überprüft. Die Neutralisierung der basischen NaOMe-Lösung erfolgt mit sauren Ionenaustauscher (Amberlyst). Die Lösung wird anschließend über Celite filtriert und es wird mit MeOH nachgewaschen. Das Filtrat wird eingeeengt und im HV getrocknet. In einem 50 mL Schlenk-Kolben werden 85 mg Pd auf Aktivkohle eingewogen und unter Argonatmosphäre mit 5 mL absolutem MeOH versetzt. Der Kolben wird erst 3 × mit H₂ und dann 3 × mit Argon gespült. Der Zucker wird in 20 mL absolutem MeOH gelöst und zur Reaktionslösung hinzugegeben. Der Kolben wird 3 × mit H₂ gespült. Die Lösung rührt 2.5 h bei RT. Anschließend wird der Kolben 3 × mit Argon belüftet. Die Lösung wird über Celite abfiltriert und mit absolutem MeOH nachgewaschen. Das Filtrat wird eingeeengt und im HV getrocknet. Das Produkt **5** wird in H₂O gelöst und gefriergetrocknet. Die Umsetzung von Glycosylazid zum Glycosylamin wird per DC (Laufmittel DCM/MeOH (2/1)) und NMR überprüft.

C₈H₁₆N₂O₃ (220.22 g/mol),

Ausbeute: 252.2 mg (1.2 mmol, 87 %), weißer Feststoff,

R_f = 0.41 (DCM/MeOH 2/1).

*Boc-Cys(St-Bu)-Gln(Trt)-Leu-Gly-Tyr(t-Bu)-Ser($\Psi^{Me,Me}$ pro)-Ala-(Dmb)Gly-Pro-Cys(Trt)-Nle-(Dmb)Gly-Nle-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-Ser(t-Bu)-Arg(Pbf)-Tyr(t-Bu)-Phe-Tyr(t-Bu)-Asp(OAll)-(Dmb)Gly-Thr(t-Bu)-Ser(t-Bu)-Nle-Ala-2-Chlor-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz **100***

(Bikunin 26-50, geschützt)

An das Harz **96** (30.0 μ mol, B_H = 0.3 mmol/g) werden die Aminosäuren 26-49 maschinell in einem Peptidsynthesizer mit 4 mL einer 0.4 M DIPEA/DMF-Lösung gekuppelt. Die Aminosäuren (0.15 mmol, 5 eq) werden mit 186.2 mg HCTU (0.15 mmol, 5 eq) aktiviert. Die Kupplungsdauer und Aktivierungsbedingungen der jeweiligen Aminosäuren sind aus Tabelle 14 zu entnehmen. Allerdings wird Cys-35 manuell als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Dazu werden 511.3 mg Fmoc-Cys(Trt)-OH (0.3 mmol, 10 eq) bei 0 °C in 1.5 mL DCM und

0.4 mL DMF gelöst und mit 23.3 μ L DIC (0.2 mmol, 5 eq) versetzt. Die Reaktion wird 20 min bei 0°C gerührt. Anschließend wird die Lösung abfiltriert und das Filtrat eingengt. Danach wird der Rückstand in 3 mL DMF gelöst und zum Harz aufgezogen. Die Reaktionszeit beträgt 3 h. Anschließend wird das Harz mit NMP (2 \times) und DCM (3 \times) gewaschen, bevor die Synthese fortgesetzt wird.

Tabelle 14: Kupplungssequenz für die Synthese des geschützten Bikunin 26-50 Fragments.

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Kupplungs- dauer [min]	Aktivierungs- reagenz
Nle-49	Fmoc-Nle-OH	150.5	30	HCTU
Ser-48	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	272.0	30	HCTU
Thr-47	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH	282.0	30	HCTU
Gly-46	Fmoc-(Dmb)Gly-OH	190.5	30	PyBOP
Asp-45	Fmoc-Asp(OAll)-OH	168.3	90	PyBOP
Tyr-44	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	326.1	30	HCTU
Phe-43	Fmoc-Phe-OH	274.9	30	HCTU
Tyr-42	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	326.1	30	HCTU
Arg-41	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	460.3	30	HCTU
Ser-40	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	272.0	30	HCTU
Thr-39, Nle-38	Fmoc-Nle-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	129.4	60	PyBOP
Gly-37	Fmoc-(Dmb)Gly-OH	190.4	30	PyBOP
Nle-36	Fmoc-Nle-OH	150.4	90	HCTU
Cys-35	Fmoc-Cys(Trt)-OH	831.1	180	DIC
Pro-34	Fmoc-Pro-OH	337.4	30	HCTU
Gly-33	Fmoc-(Dmb)Gly-OH	447.7	30	PyBOP
Ala-32	Fmoc-Ala-OH	329.2	60	HCTU
Ser-31, Tyr-30	Fmoc-Tyr(t-Bu)-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	586.7	60	PyBOP
Gly-29	Fmoc-Gly-OH	297.3	30	HCTU
Leu-28	Fmoc-Leu-OH	353.4	30	HCTU
Gln-27	Fmoc-Gln(Trt)-OH	610.7	30	HCTU
Cys-26	Boc-Cys(St-Bu)-OH	309.4	180	DIC

92.8 mg Boc-Cys(St-Bu)-OH (0.3 mmol, 10 eq) wird bei 0 °C in 2 mL DCM und 0.6 mL DMF gelöst und mit 23.3 µL DIC (0.2 mmol, 5 eq) versetzt. Die Reaktion wird 20 min bei 0°C gerührt. Anschließend wird die Lösung abfiltriert und das Filtrat eingengt. Danach wird der Rückstand in 3 mL DMF gelöst und zum Harz aufgezogen. Die Reaktionszeit beträgt 3 h. Nach Reaktionsende wird das Harz mit NMP (2 ×) und DCM (3 ×) gewaschen. Es wird mit der theoretischen Beladung $B_H = 0.2$ mmol/g fortgefahren.

H-Cys(St-Bu)-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-Nle-Gly-Nle-Thr-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn(β-GlcNAc)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-OH 101

(Bikunin 26-50 GlcNAc, entschützt)

10.8 mg geschütztes Peptidylharz **100** werden mit 1.38 mg Pd(PPh₃)₄, 8.5 µL PhSiH₃ in 69.1 µL absolutem DCM versetzt. Der Spritzenreaktor wird 1 h bei RT geschüttelt. Nach Reaktionsende wird das Harz mit absolutem DCM (3 ×), NMP (3 ×) und DCM (3 ×) gewaschen. Anschließend werden 1.0 mg (4.3 µmol, 2.5 eq) GlcNAc-NH₂ **11**, 0.1 mg (4.3 µmol, 2.5 eq) PyBOP und 4.7 µL (6.9 µmol, 4 eq) DIPEA in 500 µL DMSO/DMF (1/1) dazugegeben. Die Kupplung erfolgt 6 h im Mikrowellenreaktor (70 W, 55°C). Anschließend wird das Reaktionsgemisch 15 h bei RT geschüttelt. Für eine Testabspaltung wird das Harz 1 h mit 96 % TFA, 2 % TES und 2 % H₂O versetzt, die Lösung abfiltriert und das Glycopeptid **97** per LC-MS analysiert. Analytische Bedingungen für LC-MS: Säule Hydro C18 S-3µm (50 x 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 30 → 90 % B in 30 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₁₂₉H₁₉₇N₃₁O₄₁S₃ (2934.32 g/mol),

ESI-MS: $M_{ber} = 2942.34$; $M_{gef} = 1468.09$ (M + 2H)²⁺, 979.38 (M + 3H)³⁺.

Boc-Cys(St-Bu)-Gln(Trt)-Leu-Gly-Tyr(t-Bu)-Ser(Ψ^{Me,Me}pro)-Ala-(Dmb)Gly-Pro-Cys(Trt)-Nle-(Dmb)Gly-Nle-Thr(Ψ^{Me,Me}pro)-Ser(t-Bu)-Arg(Pbf)-Tyr(t-Bu)-Phe-Tyr(t-Bu)-Asp(OAll)-(Dmb)Gly-Thr(t-Bu)-Ser(t-Bu)-Nle-Ala-NH-NHBoc 102

(Bikunin 26-50 Hydrazid, geschützt)

Das Harz **100** wird mit einer Lösung aus jeweils 2 mL DCM/HFIP (80/20) 20 × 2 min geschüttelt und das geschützte Peptid abgespalten. Die Filtrate werden gesammelt, eingengt

und im HV getrocknet. Das Rohprodukt wird in 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Es werden 306.6 mg (68.8 μmol , 41 %) Rohprodukt erhalten. 242.9 mg (54.5 μmol , 1 eq) Peptidylsäure werden in 1.2 mL DCM gelöst. Hierzu werden 21.6 mg (163.4 μmol , 3 eq) *tert*-Butylcarbazat, 18.5 mg (108.9 μmol , 2 eq) Cl-HOBt und 18.7 μL (108.9 μmol , 2 eq) DIPEA gegeben. Die Lösung wird unter Rühren auf 0 °C gekühlt und es werden 16.98 μL (109.0 μmol , 2 eq) DIC hinzuzufügt. Der Reaktionsverlauf wird mit DC (Laufmittel DCM/MeOH (7:1)) überprüft. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie (Reveleris® iES, Kartuschengröße 40 g, DCM/MeOH, 0 \rightarrow 15 %, 35 min, 36 mL/min) gereinigt.

$\text{C}_{241}\text{H}_{333}\text{N}_{31}\text{O}_{49}\text{S}_4$ (4573.34 g/mol),

Ausbeute: 163.6 mg (35.8 μmol , 66 %), weißer Feststoff,

$R_f = 0.81$ (DCM/MeOH (7:1)).

*Boc-Cys(St-Bu)-Gln(Trt)-Leu-Gly-Tyr(t-Bu)-Ser($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Ala-(Dmb)Gly-Pro-Cys(Trt)-Nle-(Dmb)Gly-Nle-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Ser(t-Bu)-Arg(Pbf)-Tyr(t-Bu)-Phe-Tyr(t-Bu)-Asp-(Dmb)Gly-Thr(t-Bu)-Ser(t-Bu)-Nle-Ala-NH-NHBoc **102a***

(Bikunin 26-50 Hydrazid, allylentschützt)

Es werden 43.7 mg (9.8 μmol , 1 eq) geschütztes Bikunin 26-50 Hydrazid **102** in einen 50 mL Spitzkolben eingewogen und in 244 μL DCM und 50 μL DMF gelöst. Hierzu werden unter Argonatmosphäre 14.5 μL (117.5 μmol , 12 eq) PhSiH_3 und 4.5 mg (3.9 μmol , 0.4 eq) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ gegeben. Die Lösung wird 3 h im Dunkeln gerührt. Der Reaktionsverlauf wird per DC (Laufmittel DCM/MeOH (7/1)) verfolgt. Nach Reaktionsende wird das Produkt im HV getrocknet. Das Produkt wird in 20 mL MeOH/H₂O (1/1) suspendiert. Es wird 25 min bei 4000 rpm zentrifugiert (ALC multispeed centrifuge PK 121). Der Überstand wird in einen Rundkolben überführt und eingeengt. Das Produkt wird im HV getrocknet, in 1,4-Dioxan gelöst und gefriergetrocknet.

$\text{C}_{238}\text{H}_{329}\text{N}_{31}\text{O}_{49}\text{S}_4$ (4533.31),

Ausbeute: 40.7 mg (8.9 μmol , 91 %), weißer Feststoff,

$R_f = 0.7$ (DCM/MeOH (7:1)).

NH₂-Cys(St-Bu)-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-Nle-Gly-Nle-Thr-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn(β -GlcNAc)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-NH-NH₂ 103

(Bikunin 26-50 GlcNAc Hydrazid entschützt)

Es werden 10.0 mg (2.25 μ mol, 1 eq) allylentschütztes Peptid **102a** in 140.5 μ L DMF/DMSO (1/1) gelöst. Hierzu werden 1.2 mg (5.6 μ mol, 2.5 eq) GlcNAc-NH₂ **11**, 2.9 mg (5.6 μ mol, 2.5 eq) PyBOP und 1.5 μ L (9.0 mmol, 4 eq) DIPEA gegeben. Das Reaktionsgemisch wird unter Argonatmosphäre 4 d gerührt. Es wird 1 h eine Entschützung mit 96 % TFA, 2 % TES und 2 % H₂O durchgeführt, die Lösung abfiltriert und das Glycopeptid **103** per LC-MS analysiert. Analytische Bedingungen für LC-MS: Säule Hydro C18 S-3 μ m (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 20 \rightarrow 80 % B in 30 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₁₂₉H₁₉₉N₃₃O₄₀S₃ (2948.35),

ESI-MS: M_{ber} = 2946.37; M_{gef} = 1474.76 (M + 2H)²⁺, 983.80 (M + 3H)³⁺.

Fmoc-Ala-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz 103a

510.5 mg (0.2 mmol, B_H = 0.5 mmol/g) Harz **40** werden in einem länglichen 40 mL Glaskolben unter Argonatmosphäre mit 10 mL 10 % AcBr/DCM versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 3 h inkubiert. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz **41** mit absolutem DCM (5 \times) gewaschen. 459.9 mg (1.2 mmol, 5 eq) Fmoc-Ala-OH werden in 3 mL absolutem DCM gelöst und mit 253.4 μ L (1.2 mmol, 5 eq) DIPEA versetzt. Die Lösung wird unter Argonatmosphäre zum Harz gegeben und 20 h inkubiert. Anschließend wird die Lösung in einen 10 mL Spritzenreaktor überführt und das Harz mit absolutem DCM (5 \times) gewaschen.

Fmoc-Ser(t-Bu)-Arg(Pbf)-Tyr(t-Bu)-Phe-Tyr(t-Bu)-Asp(OAll)-Dmb-Gly-Thr(t-Bu)-Ser(t-Bu)-Nle-Ala-Trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz 103b

(Bikunin 40-50, geschützt)

535.3 mg (0.2 mmol, B_H = 0.42 mmol/g) Harz werden in ein 45 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Aminosäuren (1 mmol, 5 eq) werden im Peptidsynthesizer unter Zugabe von 4.5 mL einer 0.4 M DIPEA in DMF Lösung mit 455.1 mg HCTU (1 mmol, 5 eq) aktiviert. Die Kupplungsdauer und Aktivierungsbedingungen der jeweiligen Aminosäuren sind aus Tabelle 15 zu entnehmen. Für die Fmoc-Entschützungen werden je 3 mL 20 % Piperidin/DMF

verwendet. Fmoc-Asp(OAll)-OH (1 mmol, 5 eq) wird mit 1.6 g PyBOP (1 mmol, 5 eq) aktiviert. Fmoc-Dmb-Gly-OH (0.6 mmol, 3 eq) wird mit 572.4 mg PyBOP (0.6 mmol, 3 eq) aktiviert.

Tabelle 15: Kupplungssequenz für die Synthese von Bikunin 40-49 **103b**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Kupplungs- dauer [min]	Aktivierungsmittel
Nle-49	Fmoc-Nle-OH	388.8	30	HCTU
Ser-48	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	421.8	30	HCTU
Thr-47	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH	437.2	30	HCTU
Gly-46	Fmoc-Dmb-Gly-OH	295.3	45	PyBOP
Asp-45	Fmoc-Asp(OAll)-OH	395.3	60	PyBOP
Tyr-44	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	505.5	30	HCTU
Phe-43	Fmoc-Phe-OH	426.1	30	HCTU
Tyr-42	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	505.5	30	HCTU
Arg-41	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	713.6	30	HCTU
Ser-40	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH	421.8	30	HCTU

Es wird nach Fmoc-Bestimmung von einer quantitativen Beladung des Harzes ausgegangen. Vom Harz wird eine analytische TFA-Abspaltung mit 96 % TFA, 2 % TES und 2 % H₂O durchgeführt und das erhaltene Peptid per LC-MS charakterisiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 20 → 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

Fmoc-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asp(OAll)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-OH 103c

(Bikunin 40-50 entschützt)

C₇₆H₉₈N₁₆O₂₀ (1541.66),

ESI-MS: M_{ber} = 1540.69; M_{gef} = 1542.41 76 (M + H)⁺, 771.76 (M + 2H)²⁺.

*Boc-Cys(St-Bu)-Gln(Trt)-Leu-Gly-Tyr(t-Bu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Ala-Dmb-Gly-Pro-Cys(St-Bu)-Nle-Gly-Thr(t-Bu)-Nle-Ser(t-Bu)-Arg(Pbf)-Tyr(t-Bu)-Phe-Tyr(t-Bu)-Asp(OAll)-Dmb-Gly-Thr(t-Bu)-Ser(t-Bu)-Nle-Ala-trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz **104***

(Bikunin 26-50, geschützt)

Es wird mit 300 mg (0.1 mmol, $B_H = 0.2$ mmol/g) Harz Bikunin 40-50 **103b** weitergearbeitet. Die Aminosäuren (0.5 mmol, 5 eq) werden mit 172.00 mg HCTU (0.5 mmol, 5 eq) aktiviert. Fmoc-Dmb-Gly-OH, Fmoc-Nle-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH und Fmoc-Tyr(t-Bu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH (0.3 mmol, 3 eq) werden mit 129.6 mg PyBOP (0.3 mmol, 3 eq) aktiviert. Im Peptidsynthesizer werden je 3 mL einer 0.4 M DIPEA/DMF-Lösung zugegeben. Für die Fmoc-Entschützungen werden je 3 mL 20 % Piperidin/DMF verwendet. Tabelle 16 gibt die jeweiligen Kupplungsbedingungen an. Cystein 35 wird als symmetrisches Anhydrid gekuppelt, unter Verwendung von 10 eq (1.0 mmol) Fmoc-Cys(St-Bu)-OH und 5 eq (0.5 mmol) DIC. Zunächst werden 358.2 mg Fmoc-Cys(St-Bu)-OH in 3 mL DCM_{abs} und 1 mL DMF gelöst und für 10 min bei 0 °C gerührt. Anschließend werden 83.4 μL DIC hinzugetropft und für weitere 20 min bei 0 °C gerührt. Die Lösung wird vom ausgefallenen *N,N,N',N'*-Tetramethylharnstoff abfiltriert, eingengt, in 3 mL DMF gelöst, zum Peptidylharz gegeben und für 3 h in einem Spritzenreaktor geschüttelt. Cystein 26 wird unter Verwendung von 10 eq (1.0 mmol) Boc-Cys(St-Bu)-OH und 5 eq (0.5 mmol) DIC aktiviert. Zunächst werden 256.8 mg Boc-Cys(St-Bu)-OH in 3 mL DCM_{abs} und 1 mL DMF gelöst und 10 min bei 0 °C gerührt. Anschließend werden 83.4 μL DIC hinzugetropft und für weitere 20 min bei 0 °C gerührt. Die Lösung wird filtriert, eingengt, in 3 mL DMF gelöst und 3 h in einem Spritzenreaktor mit Peptidylharz geschüttelt.

Tabelle 16: Kupplungssequenz für die Synthese von Bikunin 26-39.

Aminosäure- position	Aminosäure	m [mg]	Zeit [min]	Aktivierungs- mittel
Nle-39, Thr-38	Fmoc-Nle-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	123.4	60	PyBOP
Gly-37	Fmoc-Gly-OH	123.4	30	HCTU
Nle-36	Fmoc-Nle-OH	146.7	30	HCTU
Cys-35	Fmoc-Cys(St-Bu)-OH	358.2	180	DIC
Pro-34	Fmoc-Pro-OH	140.0	30	HCTU
Gly-33	Fmoc-Dmb-Gly-OH	111.4	60	PyBOP

Ala-32	Fmoc-Ala-OH	79.0	60	HCTU
Tyr-31, Ser-30	Fmoc-Tyr(t-Bu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH	146.1	60	PyBOP
Gly-29	Fmoc-Gly-OH	123.4	30	HCTU
Leu-28	Fmoc-Leu-OH	146.1	30	HCTU
Gln-27	Fmoc-Gln(Trt)-OH	305.4	30	HCTU
Cys-26	Boc-Cys(St-Bu)-OH	256.8	180	DIC

Das Harz wird mit einer Lösung aus je 3 mL 1.5 % TFA, 2 % TES in DCM versetzt und 10×2 min in dieser Lösung geschüttelt. In einem Kolben werden 2.7 mL DIPEA vorgelegt, worin die Filtrate gesammelt werden. Die gesammelten Filtrate werden eingengt. Es werden 157.6 mg Rohprodukt erhalten. Vom Harz wird eine analytische TFA-Abspaltung durchgeführt und das erhaltene Peptid **104e** per LC-MS charakterisiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50×2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 30 \rightarrow 90 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

H-Cys(St-Bu)-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys(St-Bu)-Nle-Gly-Thr-Nle-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asp(OAll)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-OH 104e

(Bikunin 26-50 entschützt)

$\text{C}_{128}\text{H}_{195}\text{N}_{29}\text{O}_{37}\text{S}_4$ (2860.35),

Ausbeute: 157.6 mg (37.8 μmol , 70 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 2858.32$; $M_{\text{gef}} = 1430.88$ ($M + 2\text{H}$)²⁺, 954.28 ($M + 3\text{H}$)³⁺.

Boc-Cys(St-Bu)-Gln(Trt)-Leu-Gly-Tyr(t-Bu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-Ala-Dmb-Gly-Pro-Cys(St-Bu)-Nle-Gly-Thr(t-Bu)-Nle-Ser(t-Bu)-Arg(Pbf)-Tyr(t-Bu)-Phe-Tyr(t-Bu)-Asp(OAll)-Dmb-Gly-Thr(t-Bu)-Ser(t-Bu)-Nle-Ala-NHNHBoc 105

(Bikunin 26-50 Hydrazid geschützt)

Es werden 157.6 mg Peptidylsäure **104** (37.8 μmol , 1 eq), 15.0 mg *tert*-Butylcarbazat (113.3 μmol , 3 eq), 12.8 mg Cl-HOBt (75.5 μmol , 2 eq) und 12.9 μL DIPEA (75.5 μmol , 2 eq) in 5 mL absolutem DCM gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt. Danach werden 12.8 μL DIC (75.5 μmol , 2 eq) zugegeben. Die Reaktion wird 18 h gerührt und die Temperatur wird langsam von 0 °C auf RT erhöht. Die Reaktion wird eingengt. Man erhält 160 mg

Rohsubstanz, welche durch Flash-Chromatographie (Reveleris® iES, Kartuschengröße 40 g, DCM/MeOH, 0 → 10 %, 40 min, 36 mL/min) gereinigt wird. Vom Peptid wird eine analytische TFA-Abspaltung durchgeführt und das erhaltene Peptid **105e** per LC-MS charakterisiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C8 S-3 µm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 → 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

Boc-Cys(St-Bu)-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys(St-Bu)-Nle-Gly-Thr-Nle-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asp(OAll)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-NHNHBoc 105e

(Bikunin 26-50 Hydrazid entschützt)

C₁₂₈H₁₉₇N₃₁O₃₆S₄ (2874.38)

Ausbeute: 148.7 mg (34.7 µmol, 92 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} = 2872.34; M_{gef} = 1438.82 (M + 2H)²⁺, 959.07 (M + 3H)³⁺.

Boc-Cys(St-Bu)-Gln(Trt)-Leu-Gly-Tyr(t-Bu)-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-Ala-Dmb-Gly-Pro-Cys(St-Bu)-Nle-Gly-Thr(t-Bu)-Nle-Ser(t-Bu)-Arg(Pbf)-Tyr(t-Bu)-Phe-Tyr(t-Bu)-Asp-Dmb-Gly-Thr(t-Bu)-Ser(t-Bu)-Nle-Ala-NHNHBoc 107

(Bikunin 26-50 Asp Hydrazid, desallyliert)

Es werden 148.7 mg des geschützten Peptidhydrazids **105** (34.7 µmol, 1 eq) in einen 10 mL Spitzkolben gegeben und in 650 µL absolutem DCM gelöst. Unter Schutzgasatmosphäre werden 26.2 mg Pd^{II}EnCat® 30 (0.04 mmol/g) (10.4 µmol, 0.3 eq) und 17.9 mg (26.0 µmol, 0.7 eq) (*R,R*)-DACH-phenyl-Trost Ligand **106** und 64.1 µL PhSiH₃ (0.5 mmol, 15 eq) zugegeben. Die Reaktion wird 2.5 h unter Argonatmosphäre im Dunkeln gerührt. Der immobilisierte Katalysator wird abfiltriert und es wird mit DCM nachgespült. Die organische Phase wird 3 × mit 50 mL einer gesättigten NaCl-Lösung extrahiert. und anschließend eingengt. Die Rohsubstanz wird durch Flash-Chromatographie (Reveleris® iES, Kartuschengröße 40 g, DCM/MeOH, 0 → 10 %, 25 min, 40 mL/min) gereinigt. Es wird eine analytische TFA-Abspaltung durchgeführt und das erhaltene Peptid **107e** per LC-MS charakterisiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C8 S-3 µm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 → 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

Boc-Cys(St-Bu)-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys(St-Bu)-Nle-Gly-Thr-Nle-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asp-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-NHNHBoc **108e**

(*Bikunin 26-50 Asp Hydrazid, entschützt*)

C₁₂₅H₁₉₃N₃₁O₃₆S₄ (2834.32),

Ausbeute: 103.8 mg (24.4 μmol, 71 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} = 2832.31; M_{gef} = 1418.26 (M + 2H)²⁺, 945.48 (M + 3H)³⁺.

NH₂-Cys(St-Bu)-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys(St-Bu)-Nle-Gly-Thr-Nle-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn(Nona)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-NHNH₂ **108**

(*Bikunin 26-50 Nona Hydrazid*)

Es werden 33.9 mg (8.0 μmol, 1 eq) des desallylierten Peptidhydrazids **107** in einen Langhalskolben mit Schraubseptum gegeben. Danach wird eine Lösung aus 4.6 mg HATU (12.0 μmol, 1.5 eq) und 2.7 μL DIPEA (16.0 μmol, 2 eq) in 300 μL DMSO/DMF (1:1) zugegeben und 20 min gerührt. Anschließend werden 19.7 mg HPLC gereinigtes und mit Ionenaustauscher behandeltes Glycosylamin **48** zugegeben. Der Kolben wird unter Argon gesetzt und der Reaktionsansatz 1 d bei RT gerührt. Nach 3 h wird mit 4.56 mg HATU (12.0 μmol, 1.5 eq) und 2.74 μL DIPEA (16.0 μmol, 2 eq) nachaktiviert. Nach 1 d wird mit 4.6 mg HATU (12.0 μmol, 1.5 eq) und 2.7 μL DIPEA (16.0 μmol, 2 eq) nachaktiviert. Die Reaktion wird per LC-MS kontrolliert. Die Reaktion wird im Hochvakuum eingengt. Der Rückstand wird in 1.5 mL 96 % TFA, 2 % TES und 2 % H₂O gelöst und 2 h geschüttelt. Das Glycopeptid **108** wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether ausgefällt (15 min bei –24 °C) und abzentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Präzipitat 2 × mit kaltem Diethylether gewaschen. Der Rückstand wird in 20 % Acetonitril/H₂O + 0.1 % HCOOH gelöst und gefriergetrocknet. Die Rohsubstanz wird durch RP-HPLC über eine YMC Hydro C18 Säule (150 × 10 mm) mit einem Gradienten von 20 bis 50 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 45 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C8 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 → 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₁₈₇H₂₉₆N₃₆O₈₀S₄ (4456.80),

Ausbeute: 10.0 mg (2.2 μmol, 28 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 4453.91$; $M_{\text{gef}} = 2229.91 (M + 2H)^{2+}$, $1486.52 (M + 3H)^{3+}$, $1115.33 (M + 4H)^{4+}$.

H-Cys(St-Bu)-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys(St-Bu)-Nle-Gly-Thr-Nle-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn(Undeca)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-NHNH₂ 110

(Bikunin 26-50 Undeca Hydrazid)

0.6 mg (0.1 μmol , 1 eq) Glycopeptid **108** und 0.6 mg (0.9 μmol , 8 eq) CMP-NeuAc (als Dinatriumsalz) werden in 280 μL Tris-Puffer (100 mM, pH 8) gelöst. Dann werden nacheinander 2.3 μL BSA (einer Stammlösung aus 10 mg/mL BSA), 3.0 μL alkalische Phosphatase (3 U) (E.C.3.1.3.1), und schließlich 50 mU α -2,6-Sialyltransferase (E.C.2.4.99.1) (*Photobacterium damsela*, Sigma Aldrich) zugegeben. Die Reaktion wird 18 h bei 27 °C inkubiert. Nach 1 d werden 100 μL Tris-Puffer (100 mM, pH 8), 1.0 μL alkalische Phosphatase (1 U), 0.6 mg (0.9 μmol , 8 eq) CMP-NeuAc und 30 mU α -2,6-Sialyltransferase (E.C.2.4.99.1) (*Photobacterium damsela*, Sigma Aldrich) zugegeben. Nach 2 d werden 38.0 μL (10 % v/v) DMF, 1.0 μL alkalische Phosphatase (1 U) (E.C.3.1.3.1), 0.6 mg (0.9 μmol , 8 eq) CMP-NeuAc und 30 mU α -2,6-Sialyltransferase (E.C.2.4.99.1) zugegeben. Das Rohprodukt wird per Gelpermeationschromatographie (Superdex Peptide[®] PE 30/100 Säule 300 x 10 mm) mit 30 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Anschließend wird durch RP-HPLC über eine YMC Hydro C18 Säule (150 × 10 mm) mit einem Gradienten von 10 bis 40 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % HCOOH in 50 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden mit 1 M NaHCO₃ auf pH 7 gebracht, gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 → 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{209}\text{H}_{330}\text{N}_{38}\text{O}_{96}\text{S}_4$ (5039.31),

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 5036.10$; $M_{\text{gef}} = 1680.67 (M + 3H)^{3+}$, $1260.96 (M + 4H)^{4+}$.

8.13 Versuche zu Kapitel 5.4

H-Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-Nle-Gly-Thr-Nle-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn(Nona)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-NH₂ 111

(Bikunin 1-50 Nona Hydrazid)

6.2 mg (1.9 μmol , 2 eq) des Thioesters **88** werden in 211.5 μL Ligationspuffer, bestehend aus 8 M Guanidiniumchlorid, 0.1 M Natriumdihydrogenphosphat, 0.1 M MPAA und 5 mM TCEP, pH 7 gelöst und zu 3.8 mg des Cysteinfragments **108** (1 eq, 0.853 μmol) gegeben. Die Reaktion wird 2 d in einer anaeroben Glovebox inkubiert. Anschließend werden 1.5 mg DTT zugegeben. Das Rohprodukt wird per Gelpermeationschromatographie (Superdex Peptide[®] PE 30/100 Säule 300 \times 10 mm) mit 50 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Anschließend wird das Rohprodukt durch RP-HPLC über eine Ascentis C18 Säule (250 \times 10 mm) mit einem Gradienten von 10 bis 50 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 55 min bei einer Flussrate von 4 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 20 \rightarrow 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₂₉₂H₄₆₅N₆₅O₁₂₇S₂ (6982.31),

Ausbeute: 2.66 mg (0.381 μmol , 39 %),

ESI-MS: M_{ber} = 6978.14; M_{gef} = 1747.29 (M + 4H)⁴⁺, 1397.79 (M + 5H)⁵⁺, 1165.05 (M + 6H)⁶⁺.

H-Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-Nle-Gly-Thr-Nle-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn(Undeca)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-NH₂ 113

(Bikunin 1-50 Undeca Hydrazid)

0.5 mg (72.0 nmol, 1 eq) Glycopeptid **111** und 1.1 mg (1.7 μmol , 24 eq) CMP-NeuAc (Dinatriumsalz) werden in 72.0 μL Tris-Puffer (100 mM, pH 8) gelöst. Dann werden nacheinander 2.0 μL BSA (Stammlösung mit 10 mg/mL BSA), 2.0 μL alkalische Phosphatase (2 U) (E.C.3.1.3.1), und schließlich 60 mU α -2,6-Sialyltransferase (E.C.2.4.99.1) zugegeben.

Die Reaktion wird 18 h bei 30 °C inkubiert. Das Rohprodukt wird per Gelpermeationschromatographie (Superdex Peptide® PE 30/100 Säule 300 × 10 mm) mit 50 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt.

C₃₁₄H₄₉₉N₆₇O₁₄₃S₂ (7564.81),

Ausbeute: 0.4 mg (53.0 nmol, 74 %),

ESI-MS: M_{ber} = 7560.33; M_{gef} = 1892.27 (M + 4H)⁴⁺, 1513.86 (M + 5H)⁵⁺, 1261.72 (M + 6H)⁶⁺.

H-Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-Xyl(Gal-Gal)-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-Nle-Gly-Thr-Nle-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn(Undeca)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-NHNH₂ 114

(Bikunin 1-50 Undeca Xyl Gal Gal Hydrazid)

0.4 mg (53.0 nmol, 1 eq) Glycopeptid **113** werden in 110 µL (6.6 mU β4GalT7 (E.C. 2.4.1.133), β3GalT6 (E.C.2.4.1.134)) Enzymlösung mit Bis-Tris Puffer, 1 M NaCl (pH 7) gelöst. Dann werden nacheinander 2.0 µL BSA (Stammlösung mit 10 mg/mL BSA), 2.0 µL alkalische Phosphatase (2 U) (E.C.3.1.3.1), 0.5 µL MnCl₂ (0.5 M Stammlösung) und schließlich 0.1 mg UDP-Galactose (Dinatriumsalz) zugegeben. Der Reaktionsansatz wird 18 h bei 30 °C inkubiert. Das Rohprodukt wird per Gelpermeationschromatographie über eine Superdex Peptide® PE 30/100 Säule (300 x 10 mm) mit 50 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 µm (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 → 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₃₂₆H₅₁₉N₆₇O₁₅₃S₂ (7889.10),

Ausbeute: 0.3 mg (38.0 µmol, 72 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} = 7884.43; M_{gef} = 1973.77 (M + 4H)⁴⁺, 1579.17 (M + 5H)⁵⁺, 1316.16 (M + 6H)⁶⁺.

NH₂-Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-Xyl(Gal-Gal-GlcA)-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-Nle-Gly-Thr-Nle-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn(Undeca)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-NHNH₂ 115

(Bikunin 1-50 Undeca Xyl Gal Gal GlcA Hydrazid)

0.3 mg (38.0 nmol, 1 eq) Glycopeptid **114** werden in 60 μ L (0.9 mg/mL GFP-B3GAT3 in 25 mM HEPES, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol, pH 7) Enzymlösung gelöst. Dann werden nacheinander 2.0 μ L BSA (Stammlösung mit 10 mg/mL BSA), 2.0 μ L alkalische Phosphatase (2 U) (E.C.3.1.3.1), 0.5 μ L MnCl₂ (0.5 M Stammlösung) und schließlich 0.1 mg UDP-GlcA (Trinatriumsalz) zugegeben. Der Reaktionsansatz wird 18 h bei 30 °C inkubiert. Das Rohprodukt wird per Gelpermeationschromatographie (Superdex Peptide® PE 30/100 Säule 300 \times 10 mm) mit 50 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Anschließend wird über eine YMC Ultra HT Hydro C18 Säule, 12 nm, S-2 μ m (30 \times 2 mm) mit einem Gradienten von 20 bis 50 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 30 min bei einer Flussrate von 0.2 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μ m (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 10 \rightarrow 50 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

C₃₃₂H₅₂₇N₆₇O₁₅₉S₂ (8065.22),

Ausbeute: 0.3 mg (37.0 nmol, 97 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: M_{ber} = 8060.47; M_{gef} = 2017.55 (M + 4H)⁴⁺, 1614.16 (M + 5H)⁵⁺, 1345.29 (M + 6H)⁶⁺.

*NH₂-Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Gly-Xyl-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-Nle-Gly-Thr-Nle-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn(Nona)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-MMBA **116***

(Bikunin 1-50 Nona Thioester)

Zu 1.1 mg des Hydrazids **111** (0.2 μ mol, 1 eq) werden 50.3 μ L eines Puffers, bestehend aus 6 M Guanidiniumchlorid, 0.2 M Natriumdihydrogenphosphat und 0.02 M Natriumnitrit bei pH 3.5 gegeben. Die Reaktion wird bei -24 °C für 50 min inkubiert. Anschließend wird mit 1 M NaOH die Reaktionslösung auf pH 6-7 eingestellt und 1.7 mg MMBA (10.0 μ mol, 65 eq) zugegeben. Bei RT wird die Reaktionslösung für 1 h inkubiert. Das Rohprodukt wird per Gelpermeationschromatographie (Superdex Peptide® PE Säule 300 \times 10 mm) mit 50 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μ m (50 \times 2.1 mm);

Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 20 → 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$C_{300}H_{469}N_{63}O_{129}S_3$ (7118.47)

Ausbeute: 0.9 mg (0.1 μ mol, 85 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 7114.12$; $M_{\text{gef}} = 2373.88 (M + 3H)^{3+}$, $1780.43 (M + 4H)^{4+}$, $1424.45 (M + 5H)^{5+}$, $1187.31 (M + 6H)^{6+}$.

8.14 Versuche zu Kapitel 5.5

(Bikunin 1-147 Nona) 121a

1.7 mg (1 eq, 0.2 μ mol) des Thioesters **116** werden in 100 μ L Ligationspuffer, bestehend aus 8 M Guanidiniumchlorid, 0.1 M Natriumdihydrogenphosphat, 0.1 M MPAA und 5 mM TCEP, pH 7 gelöst und zu 2.5 mg (0.2 μ mol, 1 eq) des Cysteinfragments **120** gegeben. Die Reaktion wird 2 d in einer anaeroben Glovebox inkubiert. Anschließend werden 1.5 mg DTT zugegeben. Dann wird die Reaktionslösung schnell auf 1 mL mit einem Puffer aus 8 M Guanidiniumchlorid und 0.5 M Arginin, pH 8 verdünnt. Anschließend wird auf 8.6 mL mit einem Puffer aus 0.5 M Guanidiniumchlorid, 0.5 M Arginin, 50 mM Tris und 157 mM NaCl pH 8, verdünnt. Diese Lösung wird gegen einen Puffer (400.0 mL) aus 1 M Guanidiniumchlorid, 50 mM Tris, 157 mM NaCl, 0.5 M Arginin und 10 mM DTT, pH 8 dialysiert. Die Proteinkonzentration beträgt 0.5 mg/mL. Die Dialyse erfolgt 20 h in einer anaeroben Glovebox. 2.0 mL der Proteinlösung werden entnommen und mit 1.2 mg Glutathion (2 mM) versetzt und unter Luftzufuhr für 2 d geschüttelt. Das Rohprodukt wird per Gelpermeationschromatographie (Superdex Peptide[®] PE Säule 300 × 10 mm) mit 50 % MeCN/H₂O (+ 0.1 % TFA) als Laufmittel bei einer Flussrate von 0.6 mL/min gereinigt. Anschließend wird das Rohprodukt über eine YMC Protein-RP C5 Säule (150 × 10 mm) mit einem Gradienten von 20 bis 50 % Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA in 8 Säulenvolumen bei einer Flussrate von 2 mL/min gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielprodukt werden gefriergetrocknet und per LC-MS analysiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C4 S-3 μ m (50 × 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 20 → 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$C_{758}H_{1167}N_{193}O_{268}S_{13}$ (17688.35),

Ausbeute: 0.7 mg (38.0 μmol , 68 %), weißer Feststoff,

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 17677.00$; $M_{\text{gef}} = 2209.17$ (M + 8H)⁸⁺, 1963.91 (M + 9H)⁹⁺, 1767.61 (M + 10H)¹⁰⁺, 1607.03 (M + 11H)¹¹⁺, 1473.23 (M + 12H)¹²⁺, 1359.98 (M + 13H)¹³⁺, 1262.92 (M + 14H)¹⁴⁺, 1107.33 (M + 15H)¹⁵⁺.

H-Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-(GlcA-Gal-Gal-Xyl)-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-Nle-Gly-Thr-Nle-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn(Undeca)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-MMBA 122
(Bikunin 1-50 Undeca Xyl Gal Gal GlcA Thioester)

Zu 0.3 mg des Hydrazids **115** (60.0 nmol, 1 eq) werden 20.7 μL eines Puffers bestehend aus 6 M Guanidiniumchlorid, 0.2 M Natriumdihydrogenphosphat und 0.02 M Natriumnitrit, pH 3.0 gegeben. Die Reaktion wird 50 min bei -24 °C inkubiert. Anschließend wird mit 1 M NaOH die Reaktionslösung auf pH 6-7 eingestellt und 0.7 mg MMBA (4.0 μmol , 65 eq) zugegeben. Bei RT wird die Reaktionslösung 1 h inkubiert.

Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C4 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 20 \rightarrow 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$\text{C}_{340}\text{H}_{531}\text{N}_{65}\text{O}_{161}\text{S}_3$ (8201.39),

ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 8196.45$; $M_{\text{gef}} = 1641.40$ (M + 5H)⁵⁺, 1368.07 (M + 6H)⁶⁺.

H-Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Glu-Gly-(GlcA-Gal-Gal-Xyl)-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-Cys-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-Cys-Nle-Gly-Thr-Nle-Ser-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn(Undeca)-Gly-Thr-Ser-Nle-Ala-MPAA 123
(Bikunin 1-50 Undeca Xyl Gal Gal GlcA Thioester)

Zu 0.3 mg des Hydrazids **115** (60.0 nmol, 1 eq) werden 20.7 μL eines Puffers bestehend aus 6 M Guanidiniumchlorid, 0.2 M Natriumdihydrogenphosphat und 0.02 M Natriumnitrit, pH 3.0 gegeben. Die Reaktion wird 50 min bei -24 °C inkubiert. Anschließend wird mit 1 M NaOH die Reaktionslösung auf pH 6-7 eingestellt und 0.68 mg MPAA (4.0 μmol , 65 eq) zugegeben. Bei RT wird die Reaktionslösung für 1 h inkubiert. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Hydro C18 S-3 μm (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 %

Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 20 → 80 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$C_{340}H_{531}N_{65}O_{161}S_3$ (8201.39),

ESI-MS: $M_{ber} = 8196.45$; $M_{gef} = 1641.72 (M + 5H)^{5+}$, $1368.36 (M + 6H)^{6+}$.

(Bikunin 1-147 Undeca Xyl Gal Gal GlcA) 126

Der Thioester **123** wird in einer *one pot* Reaktion mit 50 μ L eines Ligationspuffers bestehend aus 8 M Guanidiniumchlorid, 0.1 M Natriumdihydrogenphosphat, 0.1 M MPAA und 5 mM TCEP, pH 7 versetzt und zu 0.5 mg (47.0 nmol, 1 eq) des Cysteinfragments **125** gegeben. Die Reaktion wird 4 d in einer anaeroben Glovebox inkubiert. Anschließend werden 1.0 mg DTT zugegeben. Analytische HPLC-Bedingungen für LC-MS: Säule: Pro C4 S-3 μ m (50 \times 2.1 mm); Lösungsmittel: Eluens A: Wasser (0.1 % Ameisensäure); Eluens B: Acetonitril (0.1 % Ameisensäure), Gradient: Lineargradient 20 → 60 % B in 25 min, Flussrate: 0.2 mL/min.

$C_{798}H_{195}N_{193}O_{300}S_{13}$ (18773.28)

ESI-MS: $M_{ber} = 18761.34$; $M_{gef} = 2085.29 (M + 9H)^{9+}$, $1877.54 (M + 10H)^{10+}$, $1706.74 (M + 11H)^{11+}$, $1564.00 (M + 12H)^{12+}$, $1444.56 (M + 13H)^{13+}$, $1340.99 (M + 14H)^{14+}$, $1251.00 (M + 15H)^{15+}$, $1104.00 (M + 17H)^{17+}$.

8.15 Versuche zu Kapitel 5.6

Aktivitätstest von Bikunin 1-147 121a

1 mg Trypsin wird in 1 mL HCL-Lösung (1 mM) gelöst. mg BAPNA (*N*-Benzoyl-D,L-Arginin-*p*-nitroanilid) wird in 67 mM NaH_2PO_4 (0.25 mM), pH 7.6 gelöst. Als Referenz werden 1.5 mL der BAPNA Lösung und 0.1 mL 1 mM HCL Lösung in eine Quarzküvette gegeben und die Absorption bei 410 nm vermessen. Dieser Wert wird von den weiteren Messwerten abgezogen. Für die Positivkontrolle wird eine 1/1-Verdünnung aus der Trypsin-Lösung (1 mg/mL) und HPLC- H_2O hergestellt. Die Temperatur beträgt 25 °C. Davon werden 0.1 mL zu 1.5 mL BAPNA-Lösung in einer Quarz-Küvette gegeben. Dann wird jede Minute für 10 min die Absorption bei 410 nm gemessen. *Human Urinary Trypsin Inhibitor* (Biorbyt) (1000 IU/mg)

aus humanem Urin wird in HPLC-H₂O gelöst und entsprechendes Volumen entnommen, sodass je 0.25 IU, 0.5 IU, 1 IU, 2 IU, 8.5 IU eingesetzt werden. Es werden 50 µL (25 µg) Trypsin-Lösung, 10 µL der *Human Urinary Trypsin Inhibitor* (Biorbyt) Lösung mit entsprechender IU und 40 µL 1 mM HCL-Lösung bei 25 °C für 20 min inkubiert. Anschließend werden diese 100 µL zu 1.5 mL BAPNA Lösung in einer Quarzküvette gegeben und jede Minute für 10 min die Absorption bei 410 nm gemessen. Dies wird für je 0.25 IU, 0.5 IU, 1 IU, 2 IU, 8.5 IU durchgeführt. Die Messwerte sind in Tabelle 17 aufgeführt. Jede Messung wird dreimal wiederholt. Das synthetische Bikunin **121a** wird in HPLC-H₂O gelöst und entsprechendes Volumen entnommen, sodass je 1.0 µg, 2.0 µg und 5.0 µg eingesetzt werden. Es werden 50 µL Trypsin-Lösung, 10.0 µL der Lösung an Bikunin **121a** mit entsprechender Menge und 40 µL 1 mM HCL-Lösung bei 25 °C für 20 min inkubiert. Anschließend werden diese 100 µL zu 1.5 mL BAPNA Lösung in einer Quarzküvette gegeben und jede Minute für 10 min die Absorption bei 410 nm gemessen (Tabelle 18). Dies wird für je 1.0 µg, 2.0 µg und 5.0 µg durchgeführt. Jede Messung wird dreimal wiederholt.

Tabelle 17: Mittelwerte der Absorptionswerte bei 410 nm der Positivkontrolle und des Urinary Trypsin Inhibitors (Biorbyt)

Zeit [min]	Positivkontrolle	0.25 IU	0.5 IU	1.0 IU	2.0 IU	8.5 IU
1	0.0110	0.0074	0.0088	0.0025	0.0007	0.0000
2	0.0781	0.0720	0.0608	0.0401	0.0113	0.0001
3	0.1499	0.1265	0.1148	0.0741	0.0230	0.0050
4	0.2184	0.1863	0.1667	0.1099	0.0333	0.0091
5	0.2835	0.2428	0.2190	0.1443	0.0435	0.0117
6	0.3454	0.2971	0.2668	0.1788	0.0542	0.0142
7	0.4010	0.3490	0.3149	0.2103	0.0631	0.0151
8	0.4554	0.3984	0.3598	0.2428	0.0734	0.0171
9	0.5058	0.4457	0.4048	0.2744	0.0815	0.0194
10	0.5510	0.4912	0.4442	0.3051	0.0908	0.0210

Tabelle 18: Absorptionswerte bei 410 nm des synthetischen Bikunins 121a.

Zeit [min]	1 μg	2 μg	5 μg
1	0.0011	0.0294	0.0044
2	0.0475	0.0600	0.0205
3	0.0996	0.0957	0.0357
4	0.1507	0.1321	0.0509
5	0.1991	0.1654	0.0666
6	0.2445	0.1980	0.0798
7	0.2880	0.2294	0.0924
8	0.3325	0.2577	0.1047
9	0.3699	0.2845	0.1156
10	0.4017	0.3114	0.1253

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt *Prof. Dr. Carlo Unverzagt* für die Möglichkeit zur Anfertigung meiner Dissertation am Lehrstuhl BOC, die Stellung der sehr interessanten Themen, sowie die stete Diskussionsbereitschaft.

Dr. Vera Ullmann und *Dr. Marina Schmäzlein* danke ich für die Unterstützung zu Beginn meiner Promotion. Ich freue mich, dass uns seitdem eine Freundschaft verbindet.

Bei *Elisabeth Rozanski, Marie Lott, Sascher Weidler, Thomas Luber, Theodoros Karagiannis, Silvia Krapp, Angelina Gross, Christopher Graf, Lukas Perkams, Manuel Mönnich, Simone Seeleithner, Karen Gottwald, Irene Boos, Dr. Claudia Pöhner, David Rau* und *Volker Schubert* bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Bei *Karen Gottwald* bedanke ich mich für zahlreiche LC-MS-Messungen und die gute Zusammenarbeit bei der Betreuung des Massenspektrometers.

Bei *Lukas Perkams, Thomas Luber* und *Manuel Mönnich* möchte ich mich für die Messung von NMR-Proben und die Hilfe bei der Auswertung bedanken.

Irene Boos, Lukas Perkams und *Theodoros Karagiannis* danke ich für die Bereitstellung diverser *N-Glycane*.

Für die Bestellung von Chemikalien, das Destillieren von Lösungsmitteln und die Wartung und Reparatur der Laborgeräte danke ich *Volker Schubert* und *Silvia Krapp*.

Irtraud Herold und *Silvia Kastner* danke ich für die Erledigung aller Verwaltungsarbeiten.

Bei meinen Praktikanten *Milena Fischer, Vanessa Wicklein, Ilona Baumann, Dominik Stahnke, Alexander Albrecht, David Linder, Christopher Breunig, Christoph Klumpen, Kerstin Reichenberger, Sabine Reinhardt, Tobias Klein, Andreas Rösch, Franziska Strube, Patrick Probst, Yvonne Rückl, Linda Löffler, Tabea Loermann, Susanne Handke, Franziska Klein,*

Raisa Kociurzynski, Christoph Bernhardt, Katja Dankhoff, Susanne Dietzel, Fabian Kallmeier, Florian Wunderlich und Barbara Doleschal bedanke ich mich sehr für die Mithilfe an dieser Arbeit.

Ayad Dawood, David Rau und Christopher Graf danke ich besonders für den Beitrag zu meiner Arbeit durch deren Masterarbeiten.

Sehr großer Dank gilt meiner Familie. Ihr habt mir auf meinem Weg stets Rückhalt und Unterstützung gegeben.

10. Literaturverzeichnis

- ¹ L. Lehle, S. Strahl, W. Tanner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6956-6972.
- ² M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 58-68.
- ³ R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631-664.
- ⁴ R. G. Spiro, *Glycobiology*, **2002**, *12*, 43R-56R.
- ⁵ B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579-601.
- ⁶ R. Apweiler, H. Hermjakob, N. Sharon, *Biochem. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, **1999**, *1473*, 4-8.
- ⁷ O. Seitz, *ChemBioChem*, **2000**, *1*, 214-246.
- ⁸ U. Arnold, A. Schierhorn, R. Ulbrich-Hofmann, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *259*, 470.
- ⁹ A. Dove, *Bioech. Nature* **2001**, *19*, 913-917.
- ¹⁰ D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2005**, *4*, 477-488.
- ¹¹ T. Buskas, S. Ingale, G.-J. Boons, *Glycobiology*, **2006**, *16*, 113R-136R.
- ¹² L. Liu, C. S. Bennett, C.-H. Wong, *Chem. Commun.* **2006**, 21-33.
- ¹³ a) R. B. Trimble, A. L. Tarentino, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 1646-1651. b) P. W. Robbins, R. B. Trimble, D. F. Wirth, C. Hering, F. Maley, G. F. Maley, R. Das, B. W. Gibson, N. Royal, K. Biemann, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 7577-7583.
- ¹⁴ M. Fujita, S.-I. Shoda, K. Haneda, T. Inazu, K. Takegawa, K. Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1528*, 9-14.
- ¹⁵ a) L. Otvos Jr., K. Wroblewski, E. Kollat, A. Perczel, M. Hollosi, G. D. Fasman, H. C. J. Ertl, J. Thurin, *Peptide Res.* **1989**, *2*, 362-366. b) L. Otvos Jr., L. Urge, M. Hollosi, K. Wroblewski, G. Graczyk, G. D. Fasman, J. Thurin, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5889-5892.
- ¹⁶ M. Fujita, S.-I. Shoda, K. Haneda, T. Inazu, K. Takegawa, K. Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1528*, 9-14.
- ¹⁷ R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154
- ¹⁸ T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249-289.
- ¹⁹ a) T. W. Muir, *Structure* **1995**, *3*, 649-652. b) G. A. Lemieux, C. R. Bertozzi, *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 506-513.
- ²⁰ P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776.
- ²¹ E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640.

- ²² J. C. Scheuermann *et al.*, *Nature*, **2010**, 465, 243.
- ²³ F. Mende, M. Beisswenger, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 1266.
- ²⁴ G. Fang, Y. Li, F. Shen, Y. Huang, J. Li, Y. Liu, H. Cui, L. Liu, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 7787-7791.
- ²⁵ W. Chen, J. W. Yewdell, R. L. Levine, J. R. Bennink, *J. Exp. Med.* **1999**, 189, 1757-1764.
- ²⁶ R. J. Payne, C.-H. Wong, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 21–43.
- ²⁷ T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 10068-10073.
- ²⁸ Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 9408 – 9412; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 9248 – 9252.
- ²⁹ F. W. Hoffmann, R. J. Ess, T. C. Simmons, R. S. Hanzel, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 6414 – 6414.
- ³⁰ C. Walling, R. Rabinowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 5326 – 5326; C. Walling, O. H. Basedow, E. S. Savas, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 2181 – 2184.
- ³¹ M. Keller, C. Boissard, L. Patiny, N. N. Chung, C. Lemieux, M. Mutter und P. W. Schiller, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3896-3903.
- ³² S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 957-989.
- ³³ S. T. Anisfeld, P. T. Lansbury Jr., *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 5560-5562.
- ³⁴ H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4495– 44538.
- ³⁵ C. Heinlein, D. V. Silva, A. Tröster, J. Schmidt, A. Gross und C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 6406 –6410.
- ³⁶ R. Chen, J. Tolbert, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 3211–3216.
- ³⁷ a) H. Kunz, H. Waldmann, C. Unverzagt, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1985**, 26, 493. b) J. Y. Roberge, X. Beebe, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3915.
- ³⁸ T. Conroy, K. A. Jolliffe und R. J. Payne, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 3723–3733.
- ³⁹ J. Vagner, H. Qu, V. J. Hruby, *Curr. Op. in Chem. Biol.* **2008**, 12, 292–296.
- ⁴⁰ UNAIDS, World Health Organization **2003**.
- ⁴¹ a) D. Klatzmann, E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruet, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, L. Montagnier, *Nature* **1984**, 312, 767–768; b) A. G. Dalgleish, P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, R. A. Weiss, *Nature* **1984**, 312, 763–767.
- ⁴² a) C. E. Baldwin, R. W. Sanders, B. Berkhout, *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 1633–1642; b) P. F. Lin, W. Blair, T. Wang, T. Spicer, Q. Guo, N. Zhou, Y. F. Gong, H. G. Wang, R. Rose,

- G. Yamanaka, B. Robinson, C. B. Li, R. Fridell, C. Deminie, G. Demers, Z. Yang, L. Zadjura, N. Meanwell, R. Colonno, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 11013–11018.
- ⁴³ R. Wyatt, J. Sodroski, *Science* **1998**, *280*, 1884–1888.
- ⁴⁴ a) C. Bonomelli *et al.*, *PLoS ONE* **2006**, *6*, e23521. b) K. J. Doores *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010** *107*, 13800–13805. c) D. Eggink *et al.*, *Virology* **2010**, *401*, 236–247. d) E. P. Go *et al.*, *J. Virol.* **2011**, *85*, 8270–8284. e) M. Pabst, M. Chang, J. Stadlmann, F. Altmann, *Biol. Chem.* **2012** *393*, 719–730. f) T. Mizuochi *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1990** *265*, 8519–8524.
- ⁴⁵ R. W. Sanders, M. Venturi, L. Schiffner, R. Kalyanaraman, H. Katinger *et al.*, *J. Virol.* **2002**, *76*, 7293–7305.
- ⁴⁶ a) M. Ouellet *et al.* *J. Immunol.* **2005**, *174*, 4120–4126. b) C. St-Pierre, *et al.* *J. Virol.* **2011**, *85*, 11742–11751.
- ⁴⁷ T. van Montfort *et al.* *J. Immunol.* **2011**, *187*, 4676–4685.
- ⁴⁸ J. M. Binley *et al.* *J. Virol.* **2010**, *84*, 5637–5655.
- ⁴⁹ a) R. Wyatt *et al.*, *Nature* **1998**, *393*, 705–711. b) J. N. Reitter, R. E. Means, R. C. Desrosiers, *Nat. Med.* **1998**, *4*, 679–684. c) X. Wei *et al.* *Nature* **2003** *422*, 307–312.
- ⁵⁰ E. J. Toone, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 719.
- ⁵¹ L. M. Walker *et al.*, *Science*, **2009**, *326*, 285–289.
- ⁵² K. A. Hassapis, L. G. Kostrikis, *Current HIV Research* **2013**, *11*, 610–622.
- ⁵³ J. S. McLellan *et al.*, *Nature* **2011**, *480*, 336–343.
- ⁵⁴ R. Pejchal *et al.*, *Science* **2011**, *334*, 1097–1103.
- ⁵⁵ M. Pancera *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 804–813.
- ⁵⁶ B. Aussedat, Y. Vohra, P. K. Park, A. Fernández-Tejada, S. M. Alam, S. M. Dennison, F. H. Jaeger, K. Anasti, S. Stewart, J. H. Blinn, H-X. Liao, J. G. Sodroski, B. F. Haynes, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13113–13120.
- ⁵⁷ M. N. Amin, J. S. McLellan, W. Huang, J. Orwenyo1, D. R. Burton, W. C. Koff, P. D. Kwong, L-X. Wang, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 521–526.
- ⁵⁸ R. Huber, J. Deisenhofer, P. M. Colman *et al.*, *Nature* **1976** *264*, 415–420.
- ⁵⁹ a) F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, *Immunity* **2006**, *24*, 19–28. b) F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch. *Curr. Opin. Immunol.* **2007**, *19*, 239–245. c) F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 34–47. d) J. V. Ravetch, S. Bolland, *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 275–290. e) J. V. Ravetch, F. Nimmerjahn, *Fundamental Immunology*, **2007**, in W. E. Paul, Ed.: Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, 684–705.
- ⁶⁰ Y. Kaneko, F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, *Science*, **2006**, *313*, 670–673.
- ⁶¹ J. N. Arnold, M. R. Wormald, R. B. Sim *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* **2007**. *25*, 21–50.

- ⁶² M. J. Feige, S. Nath, S. R. Catharino *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2009**, *391*, 599–608.
- ⁶³ R. M. Anthony, F. Wermeling, J. V. Ravetch, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2012**, *1253*, 170–180
- ⁶⁴ C. Ferrara, S. Grau, C. Jager *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 12669–12674. C. Ferrara, F. Stuart, P. Sondermann *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 5032–5036. R. L. Shields, J. Lai, R. Keck *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26733–26740. T. Shinkawa, K. Nakamura, N. Yamane *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 3466–3473. E. Shoji-Hosaka, Y. Kobayashi, M. Wakitani *et al.*, *J. Biochem.* **2006**, *140*, 777–783. A. Natsume, M. Wakitani, N. Yamane-Ohnuki *et al.*, *J. Immunol. Methods* **2005**, *306*, 93–103.
- ⁶⁵ B. J. Scallon, S. H. Tam, S. G. McCarthy *et al.*, *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 1524–1534.
- ⁶⁶ J. Davies, L. Jiang, L. Z. Pan *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *74*, 288–294.
- ⁶⁷ A. Loos, H. Steinkellner, *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *526*, 167–73.
- ⁶⁸ M. Collin, A. Olsén, *EMBO J.* **2001**, *20*, 3046–3055.
- ⁶⁹ M. Kuroguchi, M. Mori, K. Osumi, M. Tojino, S. Sugawara, S. Takashima, Y. Hirose, W. Tsukimura, M. Mizuno, J. Amano, A. Matsuda, M. Tomita, A. Takayanagi, S-I. Shoda, Takashi Shirai, *PlosOne* **2015**, *10*, 1-24.
- ⁷⁰ W. Huang, J. Giddens, S.-Q. Fan, C. Toonstra, L-X. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12308–12318.
- ⁷¹ E. L. Smith, J. P. Giddens, A. T. Iavarone, K. Godula, L-X. Wang, C. R. Bertozzi, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 788–795.
- ⁷² R. G. Miller, F. Anderson, B. R. Brooks, H. Mitsumoto, W. G. Bradley, S. P. Ringel, *Ann. Neurol.* **2009**, *65* Suppl.1, 24-28.
- ⁷³ M. Edri-Brami, B. Rosental, D. Hayoun, M. Welt, H. Rosen, I. Wirguin, B. Nefussy, V. E. Drory, A. Porgador, R. G. Lichtenstein, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35772.
- ⁷⁴ N. R. Shulman, *J. Biol. Chem.* **1955**, *213*, 655-671.
- ⁷⁵ W. Gebhhard, K. Hochstrasser, H. Fritz, J. J. Enghild, S. V. Pizzo, G. Salvesen, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **1990**, *371*, 13-22.
- ⁷⁶ M. Balduyck, A. Hayem, J. P. Kerckaert, C. Mizon, J. Mizon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *109*, 1247-1255.
- ⁷⁷ E. Fries, A. M. Blom, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2000**, *32*, 125-137.
- ⁷⁸ H. Toyoda, T. Ikey, Y. Demachi, T. Toida, T. Imanari, *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 2882-2884.
- ⁷⁹ F. Chirat, M. Balduyck, C. Mizon, S. Laroui, P. Sautiere, J. Mizon, *Int. J. Biochem.* **1991**, *23*, 1201-1203.

- ⁸⁰ Y. Tanaka, S. Maehara, H. Sumi, N. Toki, S. Moriyama, K. Sasaki, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *705*, 192-199.
- ⁸¹ X.-H. Gou, Y.-Y. Liu, Q.-L. Chen, J.-J. Tang, D.-Y. Liu, L. Zou, X.-Y. Wu, W. Wang, *AMB Express* **2012**, *2*, 1-7.
- ⁸² L. Chi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2617–2625.
- ⁸³ M. Ly, F. E. L. III, T. N. Laremore, T. Toida, I J. Amster, R. J. Linhardt, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 327-833.
- ⁸⁴ K. Hochstrasser, G. Bretzel, H. Feuth, W. Hilla, K. Lempart, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1976**, *357*, 153-162.
- ⁸⁵ J. Potempa, K. Kwon, R. Chawla, J. Travis, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 15109–15114.
- ⁸⁶ E. Wiharm, M. A. A. Parry, R. Friebel, H. Tschesche, G. Matschiner, C. P. Sommerhoff, D. E. Jenne *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 27331–27337.
- ⁸⁷ F. Bost, M. Diarra-Mehrpour, J.-P. Martin, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *252*, 339–346.
- ⁸⁸ C. Michalski *et al.* *Vox Sang.* **1994**, *67*, 329–336.
- ⁸⁹ J. Bauer, Z. Reich, *Med. Klein.* **1909**, *5*, 1744–1747. H. J. Faarvang, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1965**, *120*, 1–83.
- ⁹⁰ a) M. J. Pugia, J. A. Lott, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2005**, *43*, 1–16. b) K. Kato, *Igaku Yakugaku* **1995**, *33*, 1089–1097.
- ⁹¹ C. Mizon, F. Piva, V. Queyrel, M. Balduyck, E. Hachulla, J. Mizon, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2002**, *40*, 579–586.
- ⁹² M. J. Pugia, R. G. Sommer, P. Volkir, S. A. Jortani, R. Valdes, J. A. Lott, *Siemens Medical Solution Internal Data Report* **2005**.
- ⁹³ K. A. Delaria, D. K. Muller, C. W. Marlor, J. E. Brown, R. C. Das, S. O. Rocznik, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12209–12214.
- ⁹⁴ Y. Kato, M. Kudo, T. Shinkawa, H. Mochizuki, M. Isaji, I. Shiromizu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *243*, 377–383.
- ⁹⁵ Y. Hirashima, H. Kobayashi, M. Suzuki, Y. Tanaka, N. Kanayama N, M. Fujie *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 13650–13656. N. Kanayama, K. Maehara, M. Suzuki, Y. Fujise, T. Terao, *Biochem. Biophys. Res Commun.* **1997**, *238*, 560–564. C. M. Milner, A. J. Day, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 1863–1873.
- ⁹⁶ M. J. Pugia, J. A. Lott, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2005**, *43*, 1–16.
- ⁹⁷ M. Ly, T. N. Laremore, R. J. Linhardt *Omics* **2010**, *14*, 389–399.

- ⁹⁸ C. Gotting, J. Kuhn, R. Zahn, T. Brinkmann, K. Kleesiek, *J. Mol. Biol.* **2000**, *304*, 517–528.
C. Ponighaus, M. Ambrosius, J. C. Casanova, C. Prante, J. Kuhn, J. D. Esko, K. Kleesiek, C. Gotting, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 5201–5206.
- ⁹⁹ H. Kitagawa, Y. Tone, J. Tamura, K. W. Neumann, T. Ogawa, S. Oka, T. Kawasaki, K. Sugahara, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 6615–6618. G. Wei, X. Bai, A. K. Sarkar, J. D. Esko, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 7857–7864.
- ¹⁰⁰ H. Habuchi, O. Habuchi, K. Kimata, *Glycoconj. J.* **2004**, *21*, 47–52.
- ¹⁰¹ M. Yamaguchi, K. Takagaki, K. Kojima, N. Hayashi, F. Chen, I. Kakizaki, A. Kon, M. Endo, *Glycoconj. J.* **2010**, *2*, 189–198.
- ¹⁰² a) J. Tamura, N. Tsutsumishita-Nakai, Y. Nakao, M. Kawano, S. Kato, N. Takeda, S. Nadanaka, H. Kitagawa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1371–1374. b) J. Tamura, T. Nakamura-Yamamoto, Y. Nishimura, S. Mizumoto, J. Takahashi, K. Sugahara, *Carbohydrate Research* **2010**, *345*, 2115–2123. c) J. Tamura, Y. Nakada, K. Taniguchi, M. Yamane, *Carbohydrate Research* **2008**, *343*, 39–47. d) S. Maza, M. M. Kayser, G. Macchione, J. López-Prados, J. Angulo, J. L. de Paz, P. M. Nieto, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *42*, 3510–3525. d) T-Y. Huang, M. M. L. Zulueta, S-C. Hung, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1506–1509.
- ¹⁰³ B. Yang, K. Yoshida, Z. Yin, H. Dai, H. Kavunja, M. H. El-Dakdouki, S. Sungsuwan, S. B. Dulaney, X. Huang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10185–10189.
- ¹⁰⁴ K. Yoshida, B. Yang, W. Yang, Z. Zhang, J. Zhang, X. Huang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9051–9058.
- ¹⁰⁵ M. Favre, K. Moehle, L. Jiang, B. Bfeiffer, J. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2679–2685.
- ¹⁰⁶ a) C. M. Nair, M. Vijayan, Y. V. Venkatachalapathi, P. Balaram, *J. Chem. Soc., Chem. Comm* **1979**, 1183–1184. b) J. W. Bean, K. D. Kopple, C. E. Peishoff, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5328–5334. c) D. K. Chalmers, G. R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**; *117*, 5927–5937.
- ¹⁰⁷ J. A. Robinson, *Accounts of chemical research* **2008**, *41*, 1278–1288.
- ¹⁰⁸ T. Riedel, A. Ghasparian, K. Moehle, P. Rusert, A. Trkola, J. A. Robinson, *ChemBioChem.* **2011**, *12*, 2829–2836. W. L. DeLano, M. H. Ultsch, A. M. de Vos, J. A. Wells, *Science* **2000**, *287*, 1279–1283. R. L. A. Dias, R. Fasan, K. Moehle, A. Renard, D. Obrecht, J. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2726–2732.
- ¹⁰⁹ M. El Haddadi, F. Cavelier, E. Vives, A. Azmani, J. Verducci, J. Martinez, *J. Peptide Sci.* **2000**, *6*, 560. D. Skropeta, K. A. Jolliffe, P. Turner, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8804–8809.
- ¹¹⁰ I. Boos, *Dissertation*, Universität Bayreuth **2015**.

- ¹¹¹ Prof. J. A. Robinson, Institute of Organic Chemistry, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Switzerland.
- ¹¹² H. N. Gopi, K. C. Tirupula, S. Baxter, S. Ajith, I. M. Chaiken, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 54-57
- ¹¹³ a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; b) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064; c) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004–2021; d) H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128.
- ¹¹⁴ a) Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193. b) A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, J. C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11782–11783; c) A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164–11165; d) A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535–546; e) F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397–14402; f) R. Manetsch, A. Krasinski, Z. Radic, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12809; g) B. Helms, J. L. Mynar, C. J. Hawker, J. M. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15020–15021.
- ¹¹⁵ T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
- ¹¹⁶ R. G. Lichtenstein, Ben-Gurion University of the Negev, Department of Biotechnology, Engineering, Beersheba, Israel.
- ¹¹⁷ T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705–6710.
- ¹¹⁸ D. Bang, S. B. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534 – 2538; *Angew. Chem.* **2004**, *161*, 2588 – 2592.
- ¹¹⁹ C. Piontek *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1936–1940. C. Piontek *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1941 –1945.
- ¹²⁰ B. F. Gisin, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 3102–3106.
- ¹²¹ M. Quibell, L. C. Packman, T. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11656–11668.
- ¹²² K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943–3946.
- ¹²³ S. N. McCurdy, *Peptide research* **1989**, *2*, 147–152.
- ¹²⁴ M. Góngora-Benítez, A. Basso, T. Bruckdorfer, M. Royo, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *Chemistry*, **2012**, *18*, 16166–16176.
- ¹²⁵ M. Royo, J. Alsina, E. Giralt, U. Slomczynska, F. Albericio, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1995**; 1095–1102.

- ¹²⁶ a) V. Ullmann, M. Rädisch, I. Boos, J. Freund, C. Pöhner, S. Schwarzinger, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11566-11570. b) P. Wang, B. Aussedat, Y. Vohra, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11571-11575.
- ¹²⁷ N. Yamamoto, T. Sakakibara, Y. Kajihara, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3287-3290.
- ¹²⁸ H. Kunz und H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1984**, *23*, 71-72.
- ¹²⁹ D. Lim, M. A. Brimble, R. Kowalczyk, A. J. Watson, A. J. Fairbanks, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11907-11911.
- ¹³⁰ H. Bayley, D. N. Standring, J. R. Knowles, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 3633-3634.
- ¹³¹ S. Mezzato, C. Unverzagt, *Carbohydrate Research* **2010**, *345*, 1306-1315.
- ¹³² T. Karagiannis, *Masterarbeit*, Universität Bayreuth **2015**.
- ¹³³ C. Unverzagt, H. Kunz, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9308-9309.
- ¹³⁴ D. G. Drueckhammer *et al.*, *Synthesis* **1991**, 499. C. H. Wong *et. al.*, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 569. C. H. Wong, K. Drauz, H. Waldmann, VCH, Weinheim, **1995**, 279. K. M. Koeller, C. H. Wong, *Chem.Rev.* **2000**, *100*, 4465.
- ¹³⁵ G. Baisch *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 749.
- ¹³⁶ S. André, C. Unverzagt, S. Kojima, X. Dong, C. Fink, K. Kayser, H.-J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 845-855. I. Prahl, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4259-4262. C. Unverzagt, S. Andre, J. Seifert, S. Kojima, C. Fink, G. Srikrishna, H. Freeze, K. Kayser, H-J. Gabius, *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 478-491.
- ¹³⁷ S. Mezzato, C. Unverzagt, *Carbohydrate Research* **2010**, *345*, 1306-1315.
- ¹³⁸ M. Villain, J. Vizzavona, K. Rose, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 673-679. D. Bang, S. B. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534 – 2538.
- ¹³⁹ B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 687 –690.
- ¹⁴⁰ F. Wunderlich, *Bachelorarbeit*, Universität Bayreuth **2014**.
- ¹⁴¹ a) G. Fang, Y. Li, F. Shen, Y. Huang, J. Li, Y. Lin, H. Cui, L Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7645 –7649. b) G. Fang, J. Wang, L. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10347 – 10350. c) J. X. Wang, G. M. Fang, Y. He, D. L. Qu, M. Yu, Z. Y. Hong, L. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2194-2198.
- ¹⁴² K. Gottwald, *Dissertation in Vorbereitung*, Universität Bayreuth.
- ¹⁴³ P. Siman, S. V. Karthikeyan, M. Nikolov, W. Fischle, A. Brik, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *31*, 8059-8063.
- ¹⁴⁴ M. Fischer, *Bachelorarbeit*, Universität Bayreuth **2013**.
- ¹⁴⁵ S. C. Hung, Genomics Research Center, Taiwan.

- ¹⁴⁶ C. Gildersleeve *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6316-6325. Y. Zhang, S. M. Muthana, J. J. Barchi, Jr., J. C. Gildersleeve, *Organic letters* **2012**, *14*, 3958-3961.
- ¹⁴⁷ M. Green, J. Berman, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5851-5852.
- ¹⁴⁸ H. Hagenmaier, H. Frank, Hoppe-Seylers, *Z. Physiol. Chem.* **1972**, *353*, 1973-1976.
- ¹⁴⁹ D. Harrison, A. C. E. Smith, *J. Chem. SOC.* **1960**, 2157.
- ¹⁵⁰ W. Koenig, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2034-2040.
- ¹⁵¹ Y. Kajihara, A. Yoshihara, K. Hirano, N. Yamamoto, *Carbohydr. Res.* **2006**, *10*, 1333-1340.
- ¹⁵² R. Almeida, S. B. Levery, U. Mandel, H. Kresse, T. Schwientek, E. P. Bennett, H. Clausen, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 26165–26171. T. Okajima, K. Yoshida, T. Kondo, K. Furukawa, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 22915–22918.
- ¹⁵³ N. Taniguchi *et al.*, *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*, DOI 10.1007/978-4-431-54240-7_31, Springer Japan **2014**, 63-72.
- ¹⁵⁴ R. Almeida, S. B. Levery, U. Mandel, H. Kresse, T. Schwientek, E. P. Bennett, H. Clausen, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 26165-26171.
- ¹⁵⁵ H. Clausen, Copenhagen Center for Glycomics, Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Copenhagen, Institute of Health Science, Copenhagen, Denmark.
- ¹⁵⁶ M. Iacomini, B. Casu, M. Guerrini, A. Naggi, A. Pirola, G. Torri, *Analytical Biochemistry* **1999**, *274*, 50–58.
- ¹⁵⁷ K. Moreman, 3055 Complex Carbohydrate Research Center, 315 Riverbend Rd, University of Georgia, Athens, Georgia 30602-4712.
- ¹⁵⁸ Y. Tone, H. Kitagawa, K. Imiya, S. Oka, T. Kawasaki, K. Sugahara, *FEBS Lett* **1999** *459*, 415–420.
- ¹⁵⁹ G. Stavropoulos, D. Gatos, V. Magafa, K. Barlos, *Lett. Pept. Sci.* **1995**, *2*, 315-318.
- ¹⁶⁰ C. Graf, *Masterarbeit*, Universität Bayreuth **2013**.
- ¹⁶¹ T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218–9227.
- ¹⁶² N. Yamamoto, T. Sakakibara, Y. Kajihara, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3287-3290. [
- ¹⁶³ A. M. Pérez-López *et. al.*, *Synlett* **2014**, *25*, 2319-2322.
- ¹⁶⁴ B. M. Trost, D. L. Van Vranken, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 395–422.
- ¹⁶⁵ L. Perkams, *Dissertation in Vorbereitung*, Universität Bayreuth.
- ¹⁶⁶ T. Yamamoto, M. Nakashizuka, H. Kodama, Y. Kajihara, I. Terada, *J. Biochem.*, **1996**, *120*, 104-110.
- ¹⁶⁷ Y. Kajihara, T. Yamamoto, H. Nagae, M. Nakashizuka, T. Sakakibara, I. Terada, *J.*

- Org. Chem.*, **1996**, *61*, 8632-8635. Y. Kajihara, T. Ebata, H. Kodama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3166-3169.
- ¹⁶⁸ A. Reif, S. Siebenhaar, A. Tröster, M. Schmälzlein, C. Lechner, P. Velisetty, K. Gottwald, C. Pöhner, I. Boos, V. Schubert, S. Rose-John, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12125–12131.
- ¹⁶⁹ A. Dawood, *Masterarbeit*, Universität Bayreuth **2014**.
- ¹⁷⁰ D. Rau, *Masterarbeit*, Universität Bayreuth **2015**.
- ¹⁷¹ R. Rudolph, G. Böhm, H. Lilie, R. Jaenicke, Protein Function (Ed.: T. E. Creighton), *Oxford University Press, Oxford*, **1997**, 57-99.
- ¹⁷² T. Y. Lin, S. N. Timasheff, *Protein Sci.* **1996**, *5*, 372-381.
- ¹⁷³ H. Lilie, E. Schwarz, R. Rudolph, *Current Opinion in Biotechnology* **1998**, *9*, 497–501.
- ¹⁷⁴ A. K. Ahmed, S. W. Schaffer, D. B. Wetlaufer, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 8477-8482. D. B. Wetlaufer, P. A. Branca, G. X. Chen, *Protein Eng.* **1987**, *2*, 141-146.
- ¹⁷⁵ M. B. Seefeldt *et al.*, *Protein Science* **2004**, *13*, 2639-2650.
- ¹⁷⁶ K. E. Lindström, A. Blom, E. Johnsson, B. Haraldsson, E. Fries, *Kidney Int.* **1997**, *51*, 1053-1058.
- ¹⁷⁷ A. Slota, M. Sjöquist, M. Wogast, J. Alston-Smith, E. Fries, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1994**, *375*, 127-133.
- ¹⁷⁸ D. Page, L. Quillen, G. Duc, *Crop Sci.* **2000**, *40*, 1482-1485.
- ¹⁷⁹ Z. Zhu, R. Valdes, C. Q. Simmons, M. W. Linder, M. J. Pugia, S. A. Jortani, *Clin. Chim. Acta.* **2006**, *371*, 71–78. M. J. Pugia, S. A. Jortani, M. Basu, R. Sommer, H. H. Kuo, S. Murphy *et al.*, *Glycoconj. J.* **2007**, *24*, 5–15.
- ¹⁸⁰ J. A. Robinson, *Accounts of chemical research* **2008**, *41*, 1278-1288.
- ¹⁸¹ C. Quentin, M. C. Thibaut, J. Horovitz, C. Bebear, *Lancet.* **1990**, *336*, 375. B. M. Zak, B. E. Crawford, J. D. Esko, *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, *1573*, 346-355.

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 5 Nr. 4 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach den gesetzlichen Bestimmungen über die Führung akademischer Grade zur Führung eines Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.

(§ 8 S. 2 Nr. 5 PromO)

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

(§ 8 S. 2 Nr. 7 PromO)

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

(§ 8 S. 2 Nr. 8 PromO)

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

(§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

.....
Ort, Datum, Unterschrift