

Kohlenhydrat-funktionalisierte Polypeptide: Synthese und molekulare Erkennung von Zellen

Dissertation

**zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes**

Von

Diplom-Chemiker

Thomas Stöhr

Saarbrücken

2010

Tag des Kolloquiums:	02.07.2010
Dekan:	Prof. Dr. Stefan Diebels
Berichterstatter:	Prof. Dr. Gerhard Wenz Prof. Dr. Claus-Michael Lehr
Vorsitz:	Prof. Dr. Wilhelm F. Maier
Akad. Mitarbeiter:	Dr. Christian Neis

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt die Synthese nicht-ionischer wasserlöslicher Glycopeptide für die polyvalente Präsentation von Kohlenhydraten.

Zunächst wurden Kohlenhydrate über Thioharnstoff-Gruppen an die ϵ -Aminogruppe von L-Lysin gebunden. Die erhaltenen Lysinderivate wurden anschließend in kohlenhydrat-funktionalisierte *N*-Carboxyanhydride überführt.

Durch Kombination dieser mannose-, glucose- und galactose-funktionalisierten *N*-Carboxyanhydride mit diethylenglycol-funktionalisiertem Lysin-*N*-carboxyanhydrid, gelang die direkte Synthese wasserlöslicher Glycopeptide, ohne auf ionische Aminosäuren zurückzugreifen. Sowohl die Nickel(0)- als auch die triethylamin-initiierte Polymerisation lieferte hochmolekulare Copolypeptide, deren Zusammensetzung sich durch die Zusammenstellung der eingesetzten NCA-Gemische gut kontrollieren lässt.

Durch die zusätzliche Verwendung des Cobausteins *N*_ε-Trifluoracetyl-L-lysin gelang darüber hinaus die polymeranaloge Fluoreszenzmarkierung der Glycopeptide.

Schließlich konnte in FACS- und Fluoreszenz-Analysen gezeigt werden, dass die synthetisierten Glycopeptide zu kohlenhydrat-spezifischen Bindungen mit T-Zellen und Erythrocyten fähig sind. Da eine cytotoxische Wirkung ausgeschlossen werden konnte, erfüllen die synthetisierten Glycopeptide damit die wichtigsten Voraussetzungen für eine spätere biotechnologische Anwendung.

Zuletzt konnten aus glycosylierten Triblockcopolypeptiden auch kohlenhydrat-modifizierte Nanopartikel hergestellt werden.

Summary

The present thesis discusses the synthesis of nonionic water-soluble glycopeptides for a polyvalent carbohydrate presentation.

Initially, carbohydrates were linked to the ϵ -amino group of L-lysine via thiocarbamide groups. The resulting lysine derivatives were converted into carbohydrate-functionalized *N*-carboxyanhydrides.

The combination of this mannose-, glucose- and galactose-functionalized *N*-carboxyanhydrides with diethyleneglycol functionalized lysine *N*-carboxyanhydride led directly to water-soluble glycopeptides without utilizing ionic amino acids. Nickel(0)- and triethylamine-initiated polymerization both resulted in high molecular weight copolypeptides. The polymer composition directly correlated with the NCA proportion.

Additionally, the utilization of *N*_ε-trifluoroacetyl-L-lysine as a third building block allowed the polymer analogous fluorescence labeling of glycopeptides.

Furthermore, FACS and fluorescence analysis revealed a carbohydrate specific binding of the synthesized glycopeptides to T cells and erythrocytes.

Due to their non-cytotoxic character the glycopeptides are potentially useful for biotechnical applications.

Finally, nanoparticles bearing carbohydrates were prepared from glycosylated triblock copolypeptides.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Polypeptide.....	1
1.1.1	Proteine.....	1
1.1.2	Proteinstruktur.....	2
1.2	Polypeptidsynthese	4
1.2.1	Gentechnische Peptidsynthese	4
1.2.2	Schrittweise Peptidsynthese	4
1.2.3	Polymerisation von α -Aminosäure- <i>N</i> -carboxyanhydriden	5
1.3	Molekulare Erkennung.....	15
1.4	Glycopeptide	18
2	ZIELSETZUNG	22
3	SYNTHESESTRATEGIEN.....	24
3.1	Polymeranaloge Glycosylierung	24
3.2	Polymerisation kohlenhydrat-funktionalisierter α -Aminosäuren	24
4	GLYCOPEPTIDSYNTHESE DURCH POLYMERANAOLGE GLYCOSYLIERUNG.....	26
4.1	Einleitung	26
4.2	Synthese der Monomere	29
4.2.1	Einleitung NCA-Synthese	29
4.2.2	Nomenklatur	31
4.2.3	Synthese von geschütztem Glutamin und Glutamat.....	31
4.2.4	NCA-Synthese	34
4.3	Polymerisation.....	36
4.3.1	bpyNi(COD)-initiierte Polymerisation	38
4.3.2	Amin-initiierte Polymerisation	44
4.3.3	Synthese von Diblockcopolymeren	45
4.4	Vergleich der Polymerisationsmethoden.....	47
4.4.1	Polypeptide zur Darstellung von Nanopartikeln	47
4.4.2	Copolypeptide auf der Basis von Gln(Trt).....	47
4.4.3	Copolypeptide auf der Basis von Glu(TCE)	49
4.5	Polymeranaloge Glycosylierung	54
4.6	Zusammenfassung.....	55

5	SYNTHESE VON GLYCOPEPTIDEN DURCH POLYMERISATION KOHLENHYDRAT-FUNKTIONALISIERTER NCAs.....	56
5.1	Einleitung	56
5.2	Synthese der Monomere	58
5.2.1	Synthese von diethylenglycol-funktionalisierten NCAs	60
5.2.2	Synthese von mannose-funktionalisierten NCAs	63
5.2.3	Synthese von kohlenhydrat-funktionalisierten NCAs.....	65
5.3	Kohlenhydrat-funktionalisierte Triblockcopolyptide	76
5.4	Statistische kohlenhydrat-funktionalisierte Copolyptide.....	78
5.4.1	Fluoreszenz-Markierung der Glycopeptide durch polymeranaloge Umsetzung	87
5.5	Zusammenfassung	94
6	NANOPARTIKEL	96
6.1	Einleitung	96
6.2	Synthesestrategie	97
6.3	Herstellung der Nanopartikel	100
6.3.1	Herstellung der Polypeptidlösungen	100
6.3.2	Emulsions-Diffusions-Verdampfungs-Verfahren	101
6.3.3	Abspaltung der Schutzgruppen	103
6.3.4	Nanopartikel auf Basis kohlenhydrat-funktionalisierter Polypeptide	105
6.4	Zusammenfassung und Ausblick	106
7	BINDUNGSSTUDIEN DER KOHLENHYDRAT-FUNKTIONALISIERTEN POLYPEPTIDE	107
7.1	Cytotoxizitätsanalysen	107
7.2	Bindungsstudien an aktivierten T-Zellen	109
7.3	Bindungsstudien an Erythrocyten	112
7.4	Zusammenfassung und Ausblick	115
8	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	116
9	EXPERIMENTELLER TEIL	119
9.1	Feinchemikalien und Lösemittel.....	119
9.2	Methoden und Geräte	119
9.3	Synthesen	123
9.3.1	Monomere	123

9.3.2	Polymerisation.....	172
9.3.3	Polymeranaloge Umsetzung.....	197
9.3.4	Herstellung der Nanopartikel.....	198
10	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	201
11	VERZEICHNIS DER VERBINDUNGEN.....	206
12	LITERATURVERZEICHNIS	211
	DANKSAGUNGEN.....	222

1 Einleitung

1.1 Polypeptide

1.1.1 Proteine

Proteine sind die vielseitigsten Makromoleküle lebender Systeme und spielen bei nahezu allen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Sie dienen unter anderem als Strukturbausteine, der Signalübertragung und dem Speichern und Transportieren anderer Moleküle. Außerdem wirken sie bei chemischen Umsetzungen als hoch spezifische Katalysatoren. Chemisch betrachtet sind Proteine lineare Polymere, bei denen die α -Carboxylgruppe einer Aminosäure über eine Amidbindung mit der α -Aminogruppe einer anderen Aminosäure verknüpft ist. Bemerkenswert ist, dass die Proteine sämtlicher Lebensformen – vom Bakterium bis zum Menschen – aus den gleichen 20 Aminosäuren aufgebaut sind. Die gewaltige Fülle der Funktionen der Proteine hat ihren Ursprung in der Verschiedenartigkeit und Vielseitigkeit dieser 20 natürlichen Aminosäuren. Erwähnenswert ist auch, dass in natürlichen Proteinen ausschließlich die L-Isomere der Aminosäuren vorkommen. Die funktionellen Eigenschaften der Proteine hängen, wie bei anderen biologischen Molekülen, von ihrer dreidimensionalen Struktur ab.

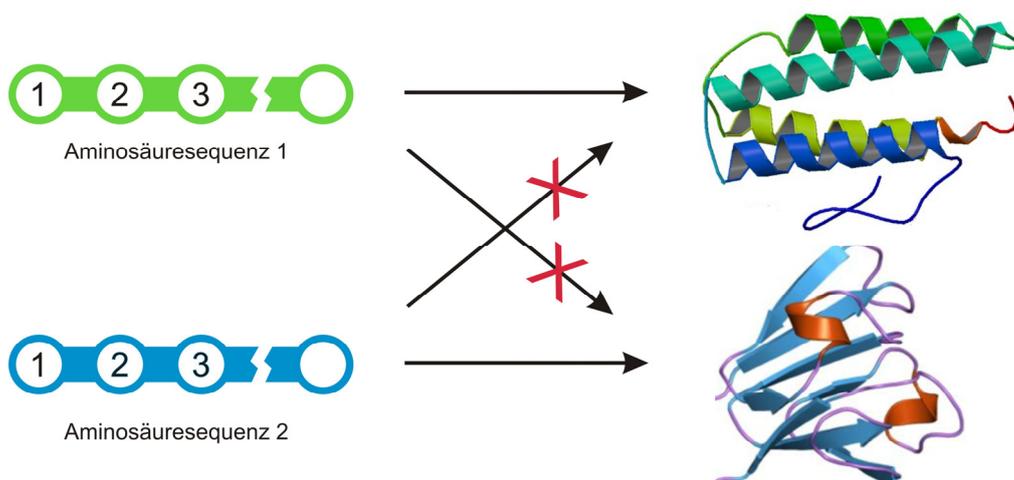


Abbildung 1.1: Faltung eines Proteins. Die Raumstruktur der Proteine ist durch ihre Aminosäuresequenz festgelegt.^[1, 2]

Ihre Polypeptidketten falten sich von selbst in eine genau definierte, vielgestaltige Raumstruktur, die durch die Sequenz ihrer Aminosäuren festgelegt wird (Abb. 1.1).^[3] Diese spontane Faltung, stellt den Übergang von der eindimensionalen Welt der Sequenzinformationen zur dreidimensionalen Welt biologischer Abläufe dar.

1.1.2 Proteinstruktur

Bei der Beschreibung der Architektur eines Proteins unterscheidet man zwischen vier Organisationsebenen. Als Primärstruktur bezeichnet man die Aminosäuresequenz eines Proteins. In ihr ist die genaue Reihenfolge der einzelnen, auch Reste genannten, Aminosäuren entlang einer Peptidkette festgelegt. Die räumliche Anordnung von Aminosäureresten, die in der linearen Sequenz nahe beieinander liegen wird auch Sekundärstruktur genannt. Dazu gehören periodische Polypeptidstrukturen wie α -Helices und β -Faltblätter (Abb. 1.2), definierte Strukturen wie β -Turns und Ω -Loops, sowie deren Verteilung entlang einer Peptidkette. α -Helices werden durch intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert, die sich jeweils zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff einer Aminosäure und dem Amid-Proton der Aminosäure der Hauptkette ausbilden, die in der linearen Sequenz vier Positionen weiter liegt (Abb. 1.2).

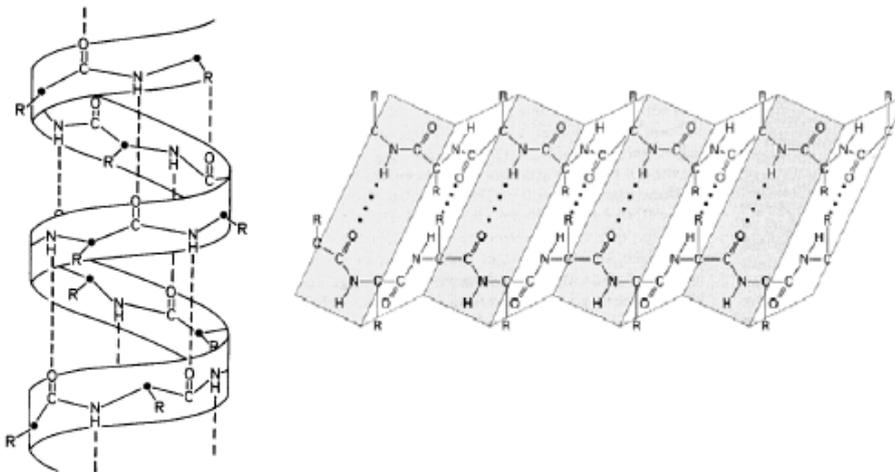


Abbildung 1.2: Wasserstoffbrückenbindungen in der Sekundärstruktur von Polypeptiden: intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen einer α -Helix (links) und Wasserstoffbrückenbindungen eines β -Faltblatts (rechts)^[4]

Durch diese Anordnung sind aufeinander folgenden Aminosäurereste jeweils um 100° gegeneinander verdreht, so dass eine volle Umdrehung der Helix 3.6 Aminosäuren entspricht.^[5] β -Faltblatt-Strukturen werden hingegen durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert.

Die Gesamtanordnung der Polypeptidkette eines Proteins wird als Tertiärstruktur bezeichnet. Sie beschreibt also die räumliche Beziehung von Aminosäureresten die innerhalb der Aminosäuresequenz weit auseinander liegen. Proteine die aus mehr als einer Polypeptidkette bestehen weisen eine vierte Organisationsebene auf. Die Quartärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung der einzelnen Peptidketten, sowie die Art ihrer Wechselwirkungen untereinander. Die vier Hierarchieebenen der Proteinstruktur sind in Abb. 1.3 dargestellt.

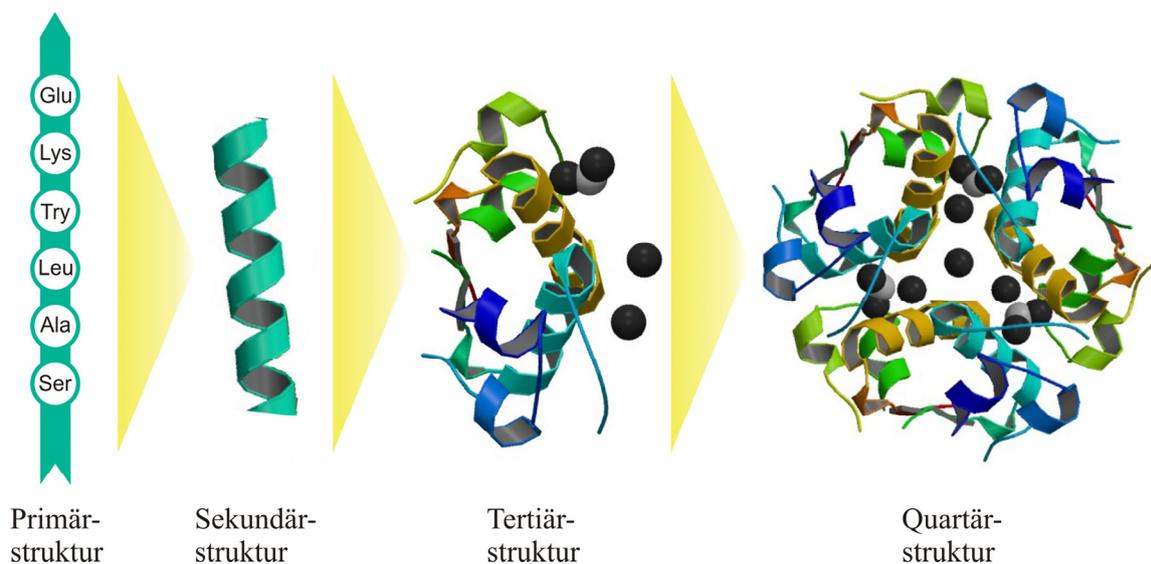


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der vier Hierarchieebenen einer Proteinstruktur.^[2, 6]

Die erstaunliche Eigenschaft der Proteine, sich selbständig zu komplexen dreidimensionalen Strukturen zusammenzulagern, ist der Grund für ihre beherrschende Rolle in der Biochemie.^[7] Es ist daher nicht verwunderlich, dass große Anstrengungen unternommen werden, um Syntheserouten zur Herstellung gleichwertiger künstlicher Polypeptide für biotechnologische Anwendungen zu entwickeln.^[8-13] Bei der chemischen Synthese von Polypeptiden treten jedoch immer einige Neben- und Abbruchreaktionen auf.^[14] Die daraus resultierenden Synthesefehler sind ein großes Problem, da schon

kleinste Fehler in der Aminosäuresequenz zu umfassenden strukturellen und funktionellen Unterschieden führen können. Das Hauptaugenmerk der Forschung im Bereich der Peptidsynthese liegt daher auf der Eliminierung unerwünschter Nebenreaktionen, um der Perfektion der natürlichen Proteinsynthese näher zu kommen.

1.2 Polypeptidsynthese

1.2.1 Gentechnische Peptidsynthese

Zur Synthese von Polypeptiden gibt es zwei grundsätzlich verschiedene Ansätze. Bei der biotechnischen bzw. gentechnischen Peptidsynthese macht man sich die Perfektion der Natur zu Nutze. Durch den konservierten genetischen Code und die komplexe Transkriptions- und Translationsmaschinerie, werden Synthesefehler in der Regel vermieden. Durch das gezielte Einbringen von genetischer Information in einem Expressionsvektor, können Zellen derart in ihrem Genom verändert werden, dass diese anschließend das Zielpeptid exprimieren. Auf diese Weise können auch Polypeptide mit komplizierter Aminosäuresequenz dargestellt werden. Großtechnische Anwendung findet dieses Verfahren beispielsweise bei der gentechnischen Produktion von Humaninsulin in *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevisiae*.^[15] Die biotechnologische Polypeptidsynthese hat jedoch den Nachteil, dass für jedes neue Polypeptid ein entsprechendes Gen verwendet werden muss, das für die gewünschte Peptidsequenz codiert. Außerdem ist für den Aufbau der Polypeptide, neben den natürlichen Aminosäuren, nur eine begrenzte Anzahl unnatürlicher Aminosäuren geeignet.^[7]

1.2.2 Schrittweise Peptidsynthese

Die Alternative ist die Herstellung von Polypeptiden durch chemische Synthese. Die bekannteste Methode hierfür ist die so genannte schrittweise Synthese. Der Aufbau der Polypeptidkette erfolgt hierbei sequenzspezifisch, durch sukzessive Kondensation der einzelnen Aminosäuren unter Bildung von Peptidbindungen. Zur Vermeidung unerwünschter Nebenreaktionen müssen C- und N-terminale Schutzgruppen verwendet werden. Daher ist nach jedem Kettenwachstumsschritt ein zweiter Reaktionsschritt erforderlich, um durch Abspaltung einer Schutzgruppe ein Kettenende von seiner

Schutzgruppe zu befreien und die Anknüpfung einer weiteren Aminosäure zu ermöglichen. Die Anzahl der Syntheseschritte und damit die Kettenlänge werden jedoch durch die unvollständige Umsetzung bei jedem Syntheseschritt limitiert. Neuere Fortschritte auf diesem Gebiet sind in einem Übersichtsartikel von SO-YEOP HAN ausführlich erläutert.^[16]

Eine Weiterentwicklung der schrittweisen Synthese ist die 1963 von BRUCE MERRIFIELD entwickelte Festphasenpeptidsynthese,^[17] für deren Entdeckung MERRIFIELD 1984 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Bei diesem Verfahren ist das *C*-terminale Ende der wachsenden Polypeptidkette reversibel an einen unlöslichen Träger gebunden. Die Verwendung eines Trägermaterials, meist vernetztes Polystyrol, erleichtert die Aufreinigung zwischen den einzelnen Syntheseschritten und ermöglicht neben dem Einsatz großer Reagenzüberschüsse, zur Gewährleistung einer quantitativen Umsetzung, auch die Automatisierung des Syntheseverfahrens. Wegen der beschränkten Beladungskapazität der Trägermaterialien eignet sich die Festphasensynthese jedoch nicht zur Herstellung großer Substanzmengen. So gibt es bei der Herstellung von Polypeptiden bis heute keine großtechnische Anwendung der Festphasensynthese.

Eine weitere Synthesemethode, die sich besonders zur Darstellung langkettiger Polypeptide eignet, ist die Polymerisation von α -Aminosäure-*N*-carboxyanhydriden (NCAs). Diese ringöffnende Polymerisation gestattet zwar nicht den Aufbau komplizierter Aminosäuresequenzen, im Gegenzug lässt sich aber der Polymerisationsgrad (P_n), und damit die Molmasse, einfach durch Variation des Monomer/Initiator-Verhältnisses kontrollieren. Seit Ende der Vierziger Jahre ist die Polymerisation von NCAs daher die meistverwendete Herstellungsmethode zur Darstellung von hochmolekularen Polypeptiden im großen Maßstab.^[18] Bis heute wurden bereits über 200 verschiedene NCAs synthetisiert. Diese beachtliche Vielfalt an Monomeren ermöglicht die Darstellung eines breiten Spektrums an Polypeptiden. Die Entwicklung dieser Synthesemethode ist in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst.^[14, 19, 20]

1.2.3 Polymerisation von α -Aminosäure-*N*-carboxyanhydriden

Die Synthese und Polymerisation von α -Aminosäure-*N*-carboxyanhydriden (NCAs) wurden zu Beginn des letzten Jahrhunderts erstmals von HERRMANN LEUCHS be-

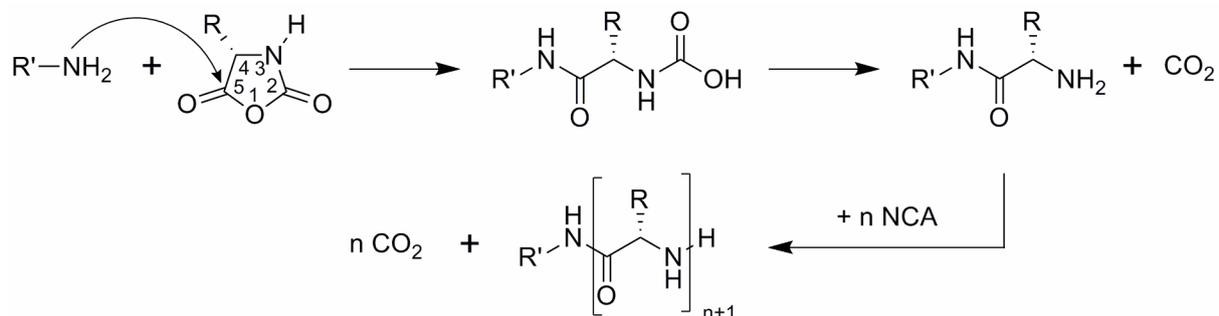
schrieben.^[20] In den Jahren 1906 bis 1908 beschrieb er in drei Arbeiten Herstellung, Eigenschaften und Polymerisation der nach ihm benannten Leuchs Anhydride.^[21-23] Der Einsatz dieser cyclischen, hoch reaktiven α -Aminosäurederivate als Monomer für die Herstellung von Polypeptiden durch ringöffnende Polymerisation, setzte sich erst 1921 mit den Arbeiten von THEODOR CURTIUS^[24-26] und FRITZ WESSELY^[27-34] fort. Neben ihrer Verwendung bei der ringöffnenden Polymerisation, untersuchte man auch ihre Eignung zur schrittweisen Synthese von Oligo- und Polypeptiden. Hier bieten die NCAs den Vorteil, dass durch ihre Ringstruktur die Aktivierung der Carbonylgruppe mit dem Schutz der α -Aminogruppe kombiniert ist. Beispielsweise gelang es einer von ROBERT G. DENKEWALTER und RALPH HIRSCHMANN geführten Forschungsgruppe der Merck Company, das Enzym Ribonuclease-S ausschließlich durch schrittweise Synthese mit NCAs herzustellen.^[35-41] Ein großer Nachteil ist ihre hohe Empfindlichkeit gegen Feuchtigkeit und ihre geringe Lagerbeständigkeit, weswegen NCAs auch nicht im Chemikalienhandel erhältlich sind. Da der Einsatz von NCAs für die schrittweise Synthese von Polypeptiden außerdem zur Entstehung unerwünschter Oligomerisationsprodukte führen kann, werden NCAs bis heute kaum für den schrittweisen Aufbau von Polypeptiden verwendet.

Dies und die Entstehung unerwünschter Oligomerisationsprodukte bei der schrittweisen Synthese von Polypeptiden, sind der Grund warum NCAs bei diesem Syntheseweg auch heute noch kaum eingesetzt werden. Ihr Hauptanwendungsgebiet ist nach wie vor die Synthese von Homopolypeptiden durch ringöffnende Polymerisation.

Die Polymerisation von NCAs kann je nach verwendetem Monomer und Initiator nach verschiedenen Mechanismen ablaufen. Bei der traditionellen Methode der NCA-Polymerisation kommen als Initiator eine Reihe von Nucleophilen und Basen zum Einsatz.^[42] Am häufigsten werden primäre Amine und Alkoxidanionen verwendet. Der genaue Verlauf der Polymerisation hängt maßgeblich vom Nucleophilie/Basizitäts-Verhältnis des Initiators und dem zu polymerisierenden NCA ab.

Bei der Verwendung primärer aliphatischer Amine,^[43-48] die stärker nucleophil als basisch wirken, verläuft die Polymerisation idealerweise über eine nucleophilen ringöffnenden Reaktion, bei der die Länge der Polymerkette linear mit der Umsetzung des Monomers steigt (Schema 1.1). In reiner Form handelt es sich bei diesem als Amin-Mechanismus bezeichneten Prozess um eine lebende Polymerisation,^[20, 49, 50] die zu

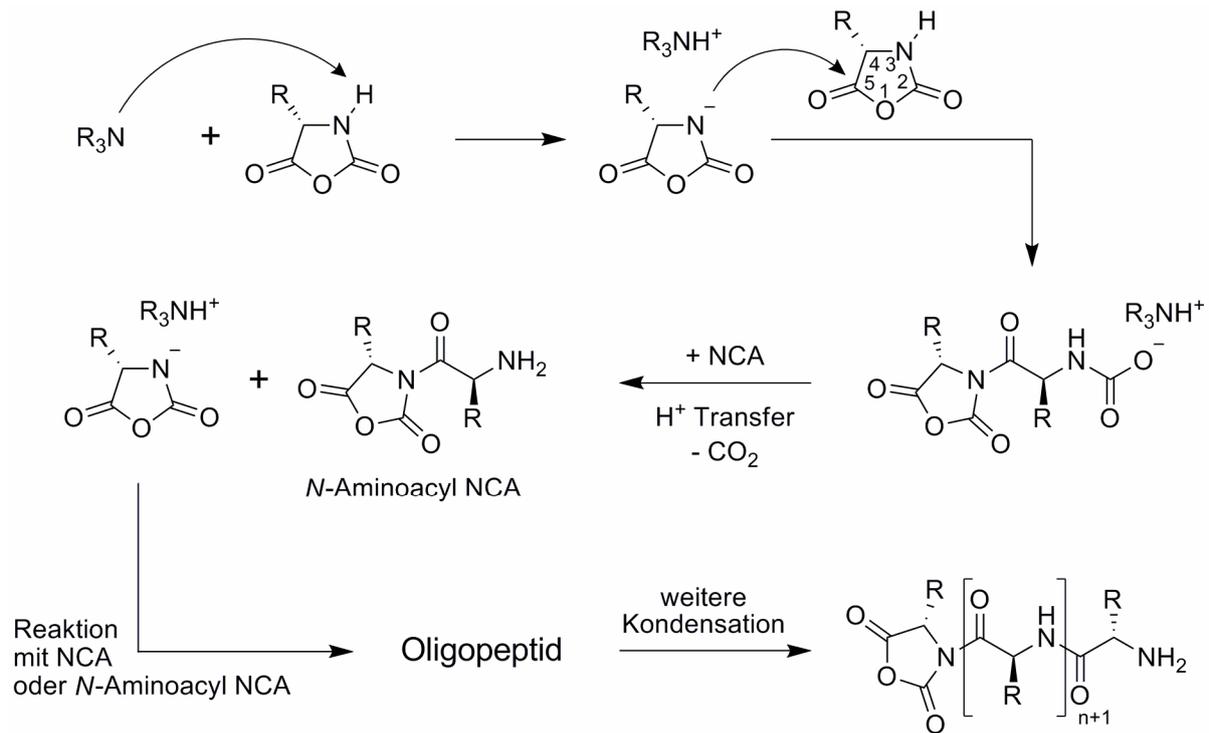
definierten Polypeptiden mit niedrigen Polydispersitäten (PDs) führt und die gezielte Synthese von Blockcopolymeren, dendritischen Copolymeren und sternförmigen Polymeren ermöglicht.



Schema 1.1: Amin-Mechanismus der NCA-Polymerisation.

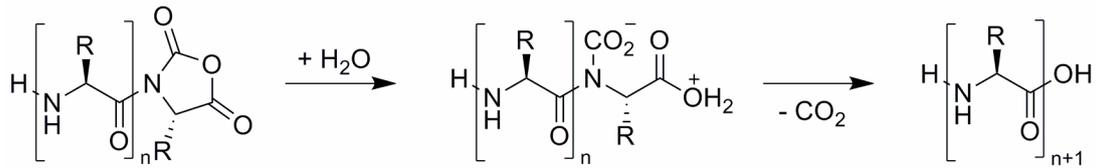
Die Initiierung der Polymerisation erfolgt durch den nucleophilen Angriff des Amins am C-5 Carbonylkohlenstoffs des NCAs, der unter Ringöffnung zur Bildung einer Carbaminsäure führt. Durch Decarboxylierung der Carbaminsäure entsteht eine primäre Aminogruppe die wiederum ein weiteres NCA-Monomer angreifen kann. Das durch Kettenwachstum gebildete Polypeptid enthält als Endgruppe das ursprüngliche Startmolekül. Der Amin-Mechanismus ermöglicht also die gezielte Einführung funktioneller Endgruppen.^[51-54]

Überwiegt der basische Charakter des Initiators, wie bei tertiären Aminen und Alkoxiden, so verläuft die Polymerisation über einen anionischen Prozess, der als Aktivierter Monomer Mechanismus (AM-Mechanismus) bekannt ist (Schema 1.2). Obwohl der Einsatz dieser Initiatoren zu wenig definierten Polypeptiden führt,^[14, 55] werden sie in einigen Fällen zur Herstellung von Polypeptiden mit sehr hohen Molekulargewichten verwendet, bei denen der Einsatz primärer Amine als Initiator keinen Erfolg bringt.^[56]



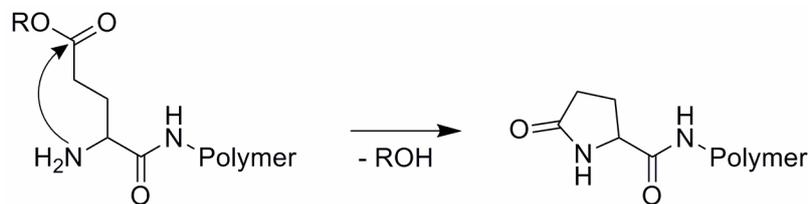
Schema 1.2: Mechanismus der NCA-Polymerisation über aktivierte Monomere (AM-Mechanismus)

Im ersten Schritt dieses Mechanismus erfolgt die Deprotonierung eines NCA-Stickstoffs durch den eingesetzten Starter. Das entstehende NCA-Anion greift als so genanntes aktiviertes Monomer unter Bildung eines Dimers nucleophil am C-5 Carboxylkohlenstoff eines weiteren NCAs an.^[43] Durch Decarboxylierung und anschließenden Protonentransfer bildete sich ein *N*-Aminoacyl-NCA, welches sowohl über eine nucleophile Aminofunktion als auch über eine elektrophile *N*-Acyl-NCA-Gruppe verfügt. Das weitere Kettenwachstum kann daher entweder über den Amin-Mechanismus oder durch den Angriff eines weiteren NCA-Anions auf die *N*-Acyl-NCA-Gruppe des *N*-Aminoacyl-NCA (AM-Mechanismus) erfolgen. Die gebildeten Oligopeptide können im weiteren Reaktionsverlauf zu hochmolekularen Polypeptidketten kondensieren. Durch die in Schema 1.3 dargestellte Hydrolyse der *N*-Acyl-NCA-Gruppe erhält man schließlich ein Polypeptid mit einer Aminogruppe auf der einen und einer Carboxylgruppe auf der anderen Seite. Der Initiator wird also nicht in das Polypeptid eingebaut.



Schema 1.3: Hydrolyse des Kettenendes beim AM-Mechanismus

Nach der Initiierung des Kettenwachstums kann ein System im Verlauf der Polymerisation mehrfach zwischen dem Amin- und dem AM-Mechanismus hin- und herwechseln. Das Kettenwachstum über den Amin-Mechanismus ist sozusagen eine Nebenreaktion des AM-Mechanismus, und umgekehrt. Das grundlegende Problem der konventionellen NCA-Polymerisation ist die fehlende Kontrolle über das wachsende Kettenende. Nachdem der Initiator mit einem NCA-Monomer reagiert hat, nimmt er nicht mehr aktiv an der weiteren Reaktion teil. Die gebildeten Amin-, Carbamat- oder NCA-Anion-Endgruppen sind in der Lage eine Fülle unerwünschter Nebenreaktionen einzugehen.^[19, 47] Ein Beispiel für eine solche Nebenreaktion ist der in Schema 1.4 dargestellte Kettenabbruch bei der Synthese Alkyl-geschützter Polyglutamate.^[20]



Schema 1.4: Für Poly(γ -O-alkyl-L-glutamat) typischer Kettenabbruch durch intramolekulare nucleophile Substitution.

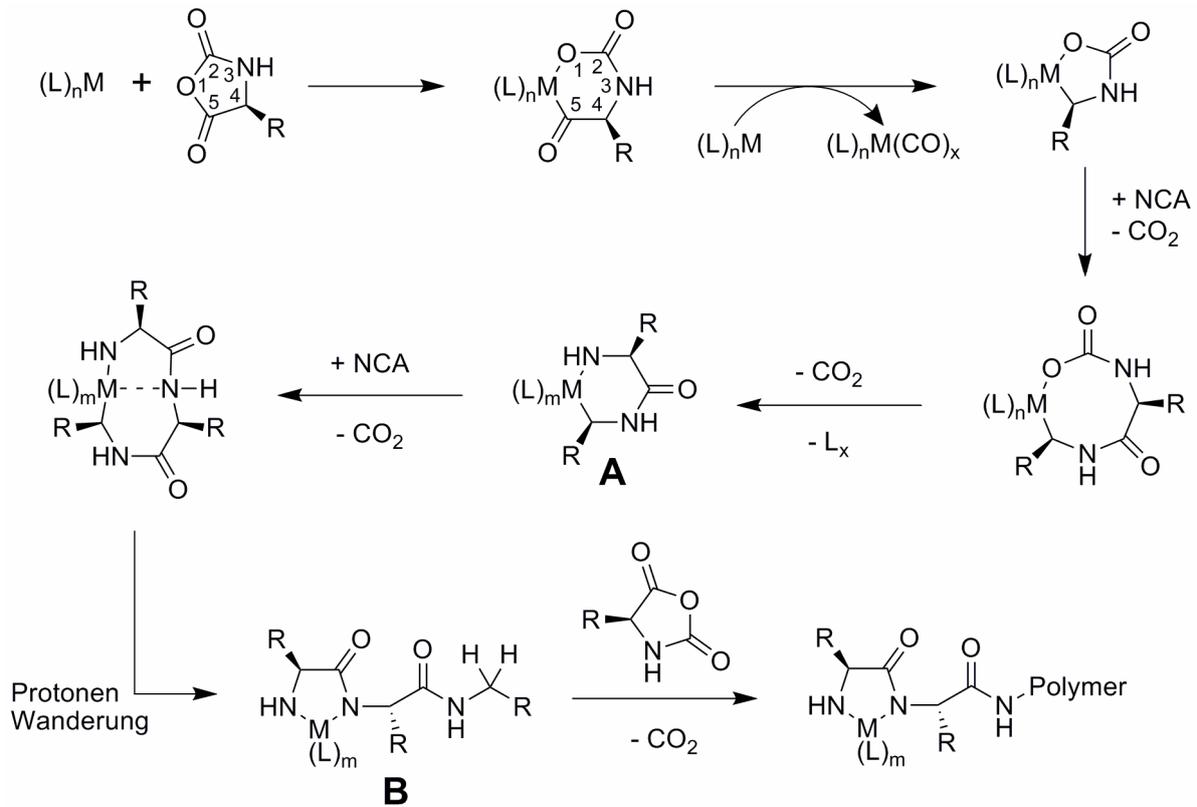
Aufgrund dieser Nebenreaktionen geht der lebende Charakter der durch primäre Amine initiierten NCA-Polymerisation verloren. Die Struktur der nach dieser Methode synthetisierten Blockcopolymeren stimmt daher häufig nicht mit der, durch die Reihenfolge der Monomerzugabe, beabsichtigten Struktur überein. Außerdem sind die Blockcopolymeren oft mit erheblichen Mengen an Homopolymeren verunreinigt.^[14] In den letzten Jahren wurden verschiedene Möglichkeiten untersucht, um störende Nebenreaktionen bei der NCA-Polymerisation zu unterdrücken und dadurch eine bessere Kontrolle des Molekulargewichts und der Polydispersität zu ermöglichen. Eine von THRA-

SYVOULOS ALIFERIS *et al.* veröffentlichte Methode kombiniert den Einsatz von sehr stark nucleophilen Initiatoren mit einer Hochvakuum-Technik.^[45] IVAYLO DIMITROV *et al.* synthetisierten definierte Diblockcopolymere aus Polystyrol und einem Polypeptidblock, indem sie das Hydrochlorid eines mit einer primären Aminogruppe funktionalisierten Polystyrols als Makroinitiator einsetzten.^[57] Die Dissoziation des Hydrochlorids setzt neben dem als eigentlicher Initiator fungierenden Amin auch ein Proton frei, welches das Kettenwachstum über den AM-Mechanismus unterdrückt. Diese Methode ermöglicht die Synthese von Blockcopolymeren mit einer Polydispersität unter 1.03. Wie die Arbeiten von ALIFERIS und DIMITROV beschäftigen sich die meisten Publikationen mit der Optimierung der bekannten amin-initiierten NCA-Polymerisation.

Eine gänzlich neue Polymerisationsmethode wurde von TIMOTHY J. DEMING *et al.* etabliert. Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass niedervalente Übergangsmetall-Komplexe in cyclische Anhydride insertieren und unter Eliminierung von Kohlenstoffmonoxid weiterreagieren.^[20] Bei der Untersuchung zahlreicher Metallkomplexe hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit als Initiatoren bei der Polymerisation von NCAs,^[10, 58-83] erwiesen sich besonders Ni(0)- und Co(0)-Komplexe als geeignet. Die Entwicklung hocheffizienter Nickel- und Kobalt-Initiatoren, wie (2,2'-Bipyridin)(1,5-Cyclooctadien)Nickel(0) (bpyNi(COD)) oder Tetrakis(trimethylphosphan)Kobalt(0) ((PMe₃)₄Co), ermöglicht heute die lebende Polymerisation von NCAs zu hochmolekularen Polypeptiden. Die Arbeitsgruppe von TIMOTHY DEMING untersuchte jedoch nicht nur die Anwendungsmöglichkeiten dieser Deming Initiatoren. Es gelang ihnen auch den Reaktionsmechanismus dieser Polymerisation aufzuklären, indem sie ¹³C-markierte NCAs mit Triphenylphosphin-Nickel(0)- und Triphenylphosphin-Kobalt(0)-Komplexen umsetzten.^[73, 76, 79, 81] Aufgrund ihrer geringen Reaktivität können diese Komplexe zwar mit NCAs reagieren, sind danach jedoch nicht mehr in der Lage durch die Reaktion mit weiteren NCA-Monomeren Polypeptide aufzubauen.

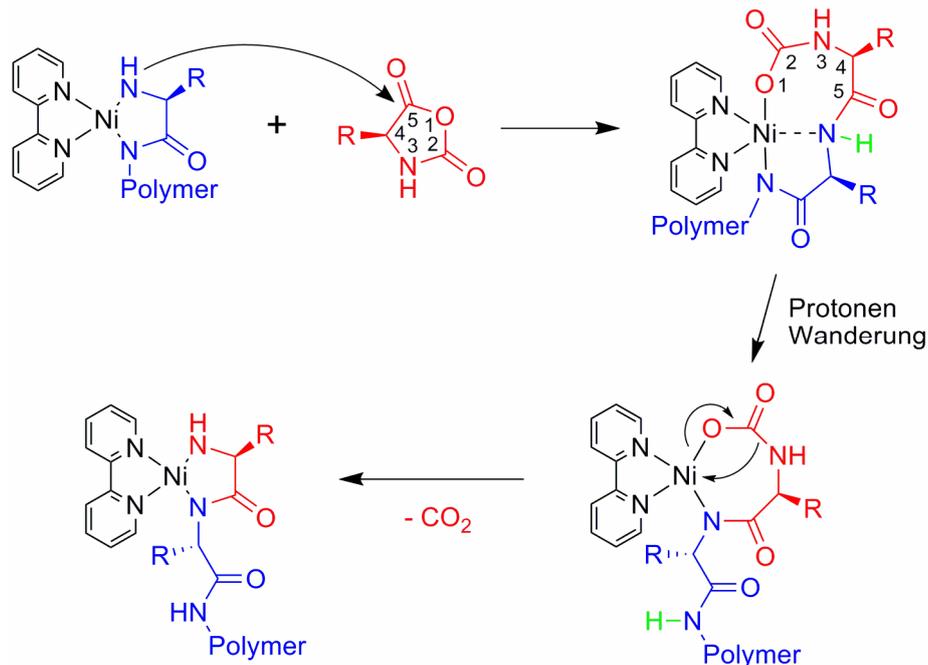
Der Reaktionsmechanismus der Übergangsmetall-Komplex initiierten NCA-Polymerisation ist in Schema 1.5 dargestellt. Im ersten Schritt erfolgt die regiospezifische Insertion des Metallkomplexes in die O-C₅ Bindung eines NCA-Rings. Dieser oxidativen Addition folgt die Abspaltung von Kohlenstoffmonoxid. Durch die Additi-

on eines weiteren NCA-Moleküls und die anschließende Kohlenstoffdioxid-Elimination bildet sich ein Amido-alkyl-Metallacyclus (**A**).



Schema 1.5: Mechanismus der Übergangsmetall-Komplex initiierten NCA-Polymerisation.

Nach der Reaktion mit einem weiteren NCA kontrahiert sich dieser intermediär gebildete Sechsring unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid, zu einem Amido-Amidat-Metallacyclus (**B**). Die Bildung dieses Fünfrings erfolgt vermutlich über den Transfer eines Amid-Protons auf den am Metallzentrum gebundenen Kohlenstoff, welcher zur Abspaltung des Kettenendes vom Metallzentrum führt. Wie man Schema 1.6 entnehmen kann stellt der gebildete Amido-Amidat-Komplex das aktive Kettenende dar, über welches das eigentliche Kettenwachstum erfolgt. Das Kettenwachstum beginnt mit dem nucleophilen Angriff der Amido-Gruppe auf den C-5 Carbonylkohlenstoff eines NCA-Monomers. Der gebildete große Metallacyclus, kontrahiert anschließend unter Protonentransfer und CO_2 -Abspaltung wieder zu einem Amido-Amidat-Metallacyclus. Dabei wird die Polypeptidkette um eine Monomereinheit verlängert.



Schema 1.6: Kettenwachstum bei der bpyNi(COD)-initiierten NCA-Polymerisation.

Die Metall-Komplex initiierte NCA-Polymerisation hat den Vorteil viele Nebenreaktionen zu vermeiden und ermöglicht damit die Kontrolle des Polymerisationsgrades bei gleichzeitig sehr geringer Polydispersität.^[14] TIMOTHY DEMING *et al.* konnten über diese Methode Polypeptide mit Molekulargewichten zwischen 500 Da und 500 kDa und einer Molekulargewichtsverteilung von weniger als 1.20 synthetisieren.^[19] Da es sich um eine lebende Polymerisation handelt, gestattet diese Methode auch die Herstellung von Blockcopolymeren und die Einführung funktioneller Endgruppen. Sogar die enantioselektive Umsetzung eines racemischen NCA-Gemischs ist durch den Einsatz chiraler Liganden möglich.^[78]

Unabhängig vom verwendeten Initiator erfolgt die Polymerisation der NCAs ohne detektierbare Racemisierung am chiralen Zentrum.^[14] Ob hierbei hohe Polymerisationsgrade und niedrige Polydispersitäten erreicht werden können, hängt jedoch nicht nur vom verwendeten Initiator ab. Eine entscheidende Rolle spielen auch die Löslichkeit und Sekundärstruktur der wachsenden Peptidkette. Niedrige PDs lassen sich nur bei Homopolypeptiden erreichen, die während des gesamten Polymerisationsverlaufs im Reaktionsmedium löslich sind. Bei den meisten Homopolypeptiden fallen jedoch bereits die Oligomere während der Polymerisation aus dem Reaktionsmedium aus, dies führt zu hohen Polydispersitäten. HANS R. KRICHELDORF *et al.* untersuchten dieses

Phänomen, indem sie die Zusammensetzung der Produkte einer amin-initiierten Polymerisation der NCAs von Sarkosin (*N*-Methylglycin) und L-Alanin mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie untersuchten.^[46] Obwohl die Polymerisationen unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden und die erhaltenen Polymere ähnliche Polymerisationsgrade aufwiesen, unterschieden sich die Polydispersitäten deutlich. Im Gegensatz zu Polysarkosin, für das eine PD ≈ 1.15 ermittelt wurde, wies das erhaltene Polyalanin eine sehr breite Molekulargewichtsverteilung auf, wie sie für Polykondensationen typisch wäre. Der charakteristische Unterschied zwischen beiden Polypeptiden ist, dass nur die Peptidgruppen in Poly(L-Alanin) als Wasserstoffbrücken-Donoren zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen fungieren können, um stabile Sekundärstrukturen zu bilden. Der Verlauf der Polymerisation von L-Alanin, bei der schon die wachsenden Oligomere im Reaktionsmedium unlöslich sind, ist in Abb. 1.4 dargestellt. Der Großteil der Oligopeptide fällt in Form von β -Faltblatt-Lamellen aus.^[84, 85] Einige bleiben jedoch in Lösung, setzen das Kettenwachstum fort und bilden ab einem Polymerisationsgrad $P_n > 11$ lösliche α -Helices.

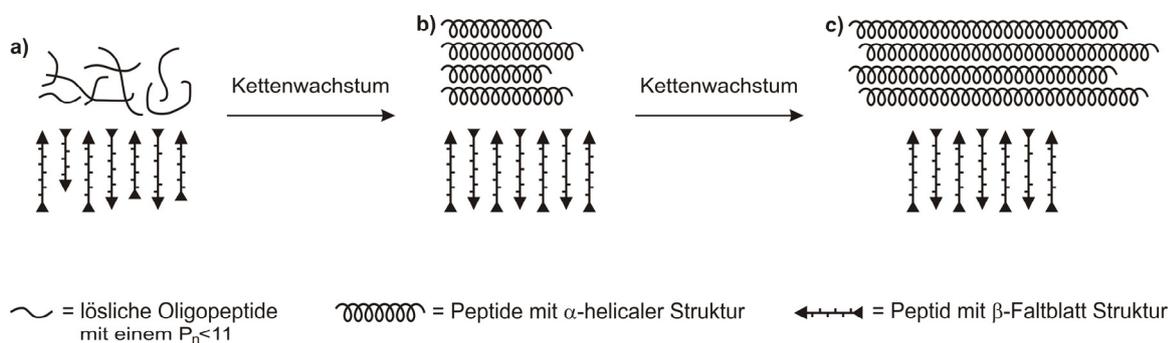


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der bei einer amin-initiierten Polymerisation von L-Alanin auftretenden Sekundärstrukturen:^[46] a) niedriger Umsatz, b) mittlere Umsatz, c) hoher Umsatz.^[46]

Die wachsenden Polypeptidketten liegen also in unterschiedlichen Sekundärstrukturen vor, deren jeweilige Endgruppen unterschiedliche Reaktivitäten aufweisen. Auch die Reaktivitäten der Kettenenden auf der Oberfläche der β -Faltblatt-Lamellen können, wegen unterschiedlicher sterischer Abschirmung und Rückfaltung einzelner Kettenenden, stark variieren.^[42] Diese breite Streuung der Endgruppenreaktivitäten führt zu unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der einzelnen Peptidketten und

somit zu einer breiten Molekulargewichtsverteilung. Die Rückfaltung von Peptidketten auf der Oberfläche ist auch bei der Synthese hochmolekularer Polypeptide ein erhebliches Problem, da aufgrund der sterischen Hinderung das Kettenwachstum vollständig abbrechen kann. Daher konnten noch nie hochmolekulare Polypeptide mit Molmassen größer 20 kDa von ausschließlich β -Faltblatt bildenden Aminosäuren hergestellt werden.^[20]

Um diesen Erkenntnissen Rechnung zu tragen, wurde der Zusammenhang zwischen Primär- und Sekundärstruktur durch eine Kombination von IR-Spektroskopie mit Weitwinkelröntgenstreuung und Kleinwinkelröntgenstreuung untersucht.^[86, 87] Danach lassen sich die verschiedenen Homopolypeptide anhand ihrer Sekundärstrukturen in drei Klassen einteilen:

1. Ausschließlich β -Faltblattstrukturen bildende Polyaminosäuren: Glycin, Valin, Isoleucin, Serin, Threonin und Cystein.
2. Polyaminosäuren, die bei ausreichender Kettenlänge zur Ausbildung von α -Helices fähig sind: Norleucin, Leucin, Histidin, Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin, β -Ester der Asparaginsäure, γ -Ester der Glutaminsäure, *N*-substituierte Lysine.
3. Polymere *N*-substituierter Aminosäuren, die wie Polysarkosin statistische Knäule oder auch spezielle Helices bilden können, z. B. Prolin und 4-Hydroxyprolin.

Wichtig zum Verständnis des Verlaufs von NCA-Polymerisationen ist die Tatsache, dass alle α -Helix-bildenden Homopolypeptide bis zu einem Polymerisationsgrad von 10 ± 1 als β -Faltblatt vorliegen.^[88-91]

Lange Ketten mit niedrigen Polydispersitäten können nur von wenigen löslichen, und meist α -Helix-bildenden, Polypeptiden erhalten werden. Daher befassen sich mehr als 90% aller neueren Publikationen zum Thema NCA-Polymerisation mit Poly(γ -alkylglutamaten) und Poly(*N*_ε-benzyloxycarbonyl-lysin).^[20]

Die von TIMOTHY J. DEMING *et al.* entwickelten Übergangsmetall-Initiatoren ermöglichen zwar eine bessere Kontrolle bei einer Vielzahl von NCA-Polymerisationen, für

die Synthese hochmolekularer Polypeptide gibt es jedoch bis heute weder einen universell einsetzbaren Initiator noch ein universelles Lösemittel. Daher wurden die in der Literatur beschriebenen optimalen Polymerisationsbedingungen meist für jede Polymerisation einzeln empirisch ermittelt.

1.3 Molekulare Erkennung

Die gegenseitige Erkennung von Molekülen steht am Anfang fast aller Prozesse in biologischen Systemen.^[92] Meist werden hierbei niedermolekulare Liganden über nichtkovalente schwache Wechselwirkungen reversibel an biologische makromolekulare Zielstrukturen, wie Proteine, gebunden. Eine lange Zeit wenig beachtete Substanzklasse, deren Vertreter auf den meisten Zelloberflächen zu finden sind und deren biologische Bedeutung zunehmend in den Mittelpunkt wissenschaftlicher Forschung rückt, sind die Kohlenhydrate.^[93] Sie spielen eine wichtige Rolle beim Zellwachstum, bei der interzellulären Kommunikation, der Immunabwehr, der Signaltransduktion und auch der Tumorpheriferation.^[94-96] Da die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor auf Kräften kurzer Reichweite beruhen, muss ein Ligand eine geeignete Gestalt besitzen, um in die Bindungstasche des Rezeptormoleküls zu passen. Erkannt wurde dieses, der molekularen Erkennung zu Grunde liegende, Schlüssel-Schloss-Prinzip (Abb. 1.5) erstmals 1894 durch EMIL FISCHER.^[97] FISCHER ging bei der Entwicklung seiner Theorie von starren Liganden und Bindungsstellen aus.

Da Proteine jedoch flexibel sind und sich die Konformation ihrer Bindungsstelle durch die Bindung eines Liganden deutlich verändern kann, beschreibt das Schlüssel-Schloss-Prinzip die Protein-Ligand-Wechselwirkung nur unzureichend.^[98] Eine Weiterentwicklung stellt die Induced-fit-Theorie (Hand-im-Handschuh-Prinzip) dar (Abb. 1.6).^[99] Sie beschreibt die

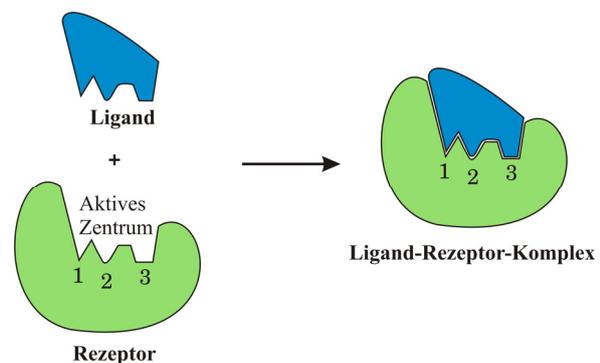


Abbildung 1.5: Bildung eines Ligand-Rezeptor-Komplexes nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip

Ligand-Rezeptor-Bindung als dynamischen Prozess, bei dem die Bindungsstelle des Rezeptors erst nach der Anlagerung eines Liganden eine zu diesem komplementäre Form besitzt.

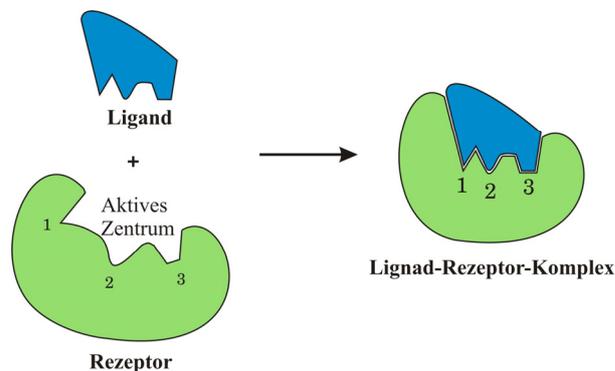


Abbildung 1.6: Bildung eines Ligand-Rezeptor-Komplexes nach dem Induced-fit-Prinzip

Form besitzt.

In der Natur bewirkt diese geometrisch und chemisch komplementäre Anlagerung kleiner Ligand-Moleküle an biologische Rezeptoren einen Eingriff in die Abfolge von Stoffwechsel- und Signaltransduktionsprozessen und löst somit einen physiologischen Effekt aus.

Ein Beispiel für eine solche Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung ist die spezifische Erkennung von Kohlenhydratstrukturen durch Lectine. Diese Proteine sind an verschiedenen zellulären Prozessen, wie Proteinfaltung, Zelladhäsion und Apoptoseinduktion beteiligt.^[100] Ein funktionell wichtiges tierisches Lectin ist Galectin-3, ein Mitglied der ubiquitären β -Galactosid-bindenden Protein-Familie.^[101] Galectin-3 reguliert die Zellproliferation, indem es für das Spleißen der prä-mRNA verantwortlich ist.^[102] Darüber hinaus spielt die Interaktion von Galectin-3 mit den Kohlenhydratgruppen membranständiger Mucine eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung mukosaler Schutzfunktionen.^[103]

Die wichtigste Funktion der Lectine ist jedoch der Förderung des Zell-Zell-Kontaktes. Hierbei interagieren Lectine an der Oberfläche einer Zelle mit membranständigen Kohlenhydraten einer anderen Zelle. Ein Beispiel für eine solche Kohlenhydrat-Protein-Erkennung ist die spezifische gegenseitige Erkennung von Endothelzellen und Leukozyten bei Entzündungen. Diese Erkennung beruht auf der Wechselwirkung zwischen membranständigen Glycoproteinen der Endothelzellen, den Selektinen, und der Tetrasaccharid-Gruppe Sialyl-Lewis^X (SLe^X).^[104-107] SLe^X ist als Bestandteil von Glycopeptiden und Glycolipiden auf der Leukozytenmembran lokalisiert.

Die einzelnen Bindungen zwischen Kohlenhydrat-Liganden und Rezeptor-Proteinen sind im Vergleich zu anderen biologischen Wechselwirkungen jedoch relativ

schwach.^[108] Ihre Dissoziationskonstanten liegen gewöhnlich zwischen 10^{-3} M und $5 \cdot 10^{-5}$ M. Dies sichert die Spezifität der Kohlenhydrat-Lectin-Bindung und ermöglicht außerdem bei Bedarf eine Trennung.^[3] An der gegenseitigen molekularen Erkennung biologischer Einheiten (Moleküle, Viren, Zellen usw.) sind jedoch meist mehrere Kohlenhydrat-Rezeptor-Wechselwirkungen beteiligt. Durch den Chelateffekt bei der gleichzeitigen Bildung mehrerer Ligand-Rezeptor-Bindungen wird die Bindungsstärke erheblich gesteigert.^[109] So binden trivalente, natürlich vorkommende Oligosaccharide polyvalent mit ihren drei *N*-Acetyl-galactose-Gruppen an den C-Lectin-Asialoglycoprotein-Rezeptor auf der Oberfläche von Leberzellen mit einer Dissoziationskonstanten von 10^{-8} M, während die Dissoziationskonstante der entsprechenden einfachen Galactose nur 10^{-3} M beträgt.^[110]

Diese polyvalenten Wechselwirkungen können durch die gleichzeitige Bindung mehrerer Liganden einer biologischen Einheit an mehrere Bindungsstellen eines Rezeptor-Proteins (Abb. 1.7 A) einer anderen biologischen Einheit oder an mehrere verschiedene Rezeptoren einer anderen biologischen Einheit (Abb. 1.7 B) zustande kommen. In einigen Fällen ist für die polyvalente Bindung eine Reorganisation der Rezeptorproteine auf der Zellmembran notwendig (Abb. 1.7 C). Diese Anpassung der Abstände der einzelnen Rezeptoren an einen multivalenten Liganden wird als ligand-induziertes Rezeptorclustering bezeichnet.^[111]

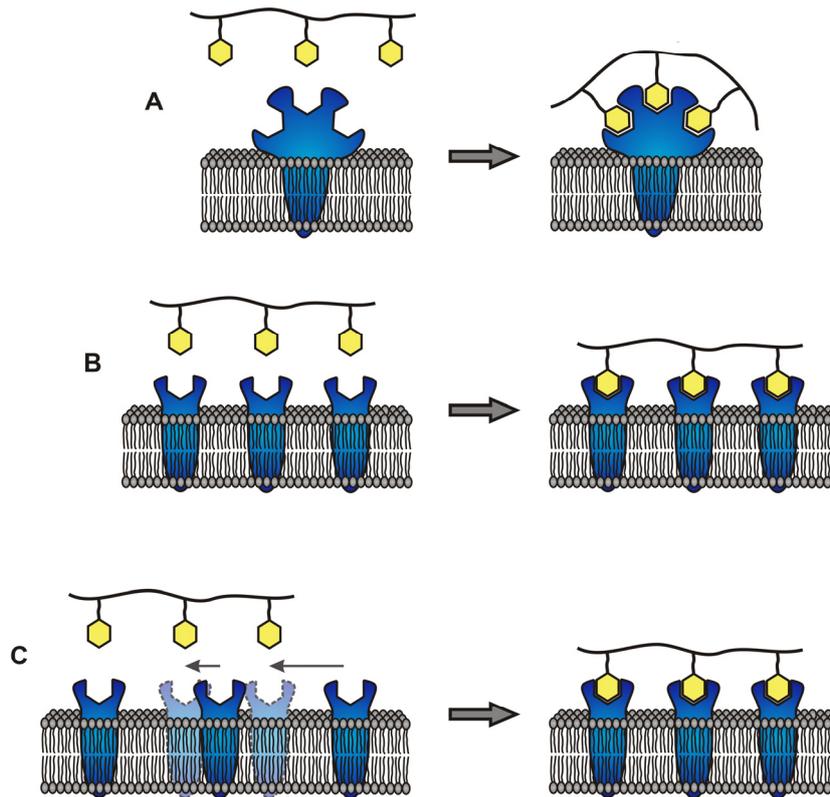


Abbildung 1.7: Polyvalente Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung: A) Bindung eines polyvalenten Liganden an mehrere Bindungsstellen eines membranständigen Rezeptors, B) Gleichzeitige Bindung eines polyvalenten Liganden an mehrere membranständige Rezeptoren, C) Bindung eines polyvalenten Liganden unter Rezeptorclustering

Das Prinzip der polyvalenten Bindung macht man sich auch in biochemischen Nachweißreaktionen und biologischen Bindungsstudien zu Nutze.^[112, 113] So verwendeten KEUN-HONG PARK *et al.* Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierte kohlenhydratfunktionalisierte Polystyrole, um spezifische Wechselwirkung zwischen Glycopolymeren und blutbildenden Zellen mittels konfokaler Laser-Mikroskopie zu untersuchen.^[114]

1.4 Glycopeptide

Glycopeptide bzw. Glycoproteine entstehen durch kovalente Bindung von Kohlenhydraten an Peptide bzw. Proteine. Durch diese posttranslationale Modifikation wird die ohnehin eindrucksvolle strukturelle Vielseitigkeit der Proteine noch einmal enorm gesteigert.^[115]

Glycoproteine sind häufig Bestandteil von Zellmembranen, wo sie bei Prozessen wie der Zelladhäsion, der Infektion durch Viren oder der Bindung von Spermien an Eizellen eine wichtige Rolle spielen.^[3]

Ein wichtiges Beispiel für eine spezifische Kohlenhydrat-Rezeptor-Bindung ist die Erkennung von an den Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC) gebundenen Glycoproteinen durch Rezeptoren der T-Zellen.^[116] Diese Erkennung ist ein wichtiger Schritt bei der T-Zell vermittelten Immunabwehr.

Neben ihrer Funktion als Erkennungsmerkmal für einen bestimmten Rezeptor, sind diese Kohlenhydrate auch maßgeblich für die Struktur und Funktion des Glycoproteins verantwortlich. So zeigten PAULINE M. RUDD *et al.* am Beispiel der Ribonuclease A eindrucksvoll den Einfluss eines einzelnen Kohlenhydrats auf die Struktur und Funktion eines Enzyms.^[117]

Mit zunehmendem Verständnis der bedeutenden Rolle, die Glycoproteine in biologischen Prozessen spielen, steigt auch das wissenschaftliche Interesse an dieser Verbindungsklasse. Die Isolierung einzelner Glycoproteine aus natürlichen Quellen ist jedoch äußerst schwierig, da die meisten Glycoproteine in mehreren unterschiedlichen Glycosylierungsmustern existieren können.^[118] Wegen dem steigenden Bedarf an Glycopeptiden für medizinische, biologische und pharmakologische Studien gewinnt, neben der schon hoch entwickelten Peptidsynthese, die chemische Glycopeptidsynthese daher zunehmend an Bedeutung. Die Fortschritte bei der Synthese und biotechnologischen Anwendung von Glycopeptiden sind in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst.^[107, 118-121]

In der Natur findet die Glycosylierung von Proteinen im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Komplex statt. Die Anknüpfung der Kohlenhydrate erfolgt hierbei entweder über die Amid-Gruppe eines Asparaginrests (*N*-glycosidische Bindung), oder die Alkoholfunktion eines Serin- oder Threoninrestes (*O*-glycosidische Bindung). Auch bei der Herstellung synthetischer Glycopeptide werden die Kohlenhydratmoleküle meist an diese drei Aminosäuren gebunden.^[107, 118, 122, 123] Die *O*- und *N*-glycosidischen Bindungen sind jedoch weder besonders säure- noch basenstabil. Bereits ab einem pH > 9 können Zuckermoleküle von einem Serinrest abgespalten werden (Abb. 1.8).^[107]

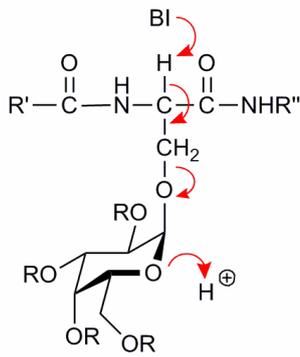


Abbildung 1.8: Struktur und Labilität einer *O*-glycosidischen Galactose-Serin-Bindungen

abspaltbarer Schutzgruppen benötigt. Das Spektrum konventioneller Schutzgruppen reicht daher für die Synthese komplexer Glycopeptide oft nicht aus. Ein Lösungsansatz ist die Verwendung enzymlabiler Schutzgruppen. Die Verwendung von Enzymen ermöglicht hierbei eine regio- und chemoselektive Abspaltung einzelner Schutzgruppen unter sehr milden Bedingungen.^[124, 125]

Bei der Glycosylierung synthetischer Polypeptide ist man jedoch nicht auf die drei oben genannten Aminosäuren beschränkt. Vielmehr kann der synthetische Chemiker, für die Anknüpfung von Kohlenhydraten, auf ein breites Spektrum an Aminosäureresten zurückgreifen. Dies ermöglicht eine wesentlich stabilere Glycosyl-Peptidverknüpfung als bei natürlichen Glycopeptiden. BERNHARD WESTERMANN *et al.* berichten beispielsweise über die Synthese gemäß Abb. 1.9 aufgebauter *C*-glycosylierter α -Aminosäuren als Bausteine für die Peptidsynthese.^[126]

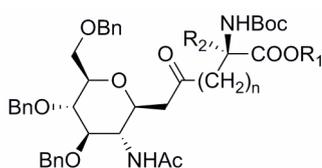


Abbildung 1.9: Struktur einer *C*-glycosylierten α -Aminosäuren

Obwohl kohlenhydrat-funktionalisierte α -Aminosäuren überwiegend für die schrittweise Synthese von Glycopeptiden verwendet werden, eignen sie sich grundsätzlich auch für die NCA-Polymerisation. Die Herstellung kohlenhydrat-funktionalisierter NCAs gelang erstmals 1966 ERWIN RÜDE *et al.* durch die direkte Phosgenierung von *O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-L-serin Hydrobromid.^[127]

KEIGO AOI *et al.* berichteten 1994 erstmals über die Synthese von Glycopeptiden durch die ringöffnende Polymerisation kohlenhydrat-funktionalisierter NCAs.^[128]

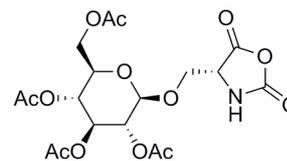
Durch amin-initiierte Polymerisation des in Abb.

1.10 dargestellten *O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-L-Serin-*N*-carboxyanhydrids

Ser(Ac₄Glc)-NCA sowie die Copolymerisation desselben mit L-Alanin-*N*-carboxyanhydrid (Ala-NCA)

gelang ihnen die Synthese von Homopolypeptiden und Blockcopolypeptiden mit Molmassen zwischen 4 und 20 kDa in Ausbeuten zwischen 50% und 92%. Bei der anschließenden

Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppen stellten sie weder eine Isomerisierung der β -glycosidischen Bindung, noch eine Racemisierung des Polypeptids fest. In den folgenden Jahren veröffentlichten KEIGO AOI *et al.* weitere Arbeiten, in denen sie Ser(Ac₄Glc)-NCA zur Herstellung von neuartigen Blockcopolymeren, Pfropf-Copolymere, sowie zur Glycosylierung von Polyamidoamin-Dendrimeren einsetzen.^[129-131] Für all diese Anwendungen wurden aber ausschließlich das bereits von ERWIN RÜDE synthetisierte Ser(Ac₄Glc)-NCA und das synthetisch sehr ähnliche *O*-(2-*N*-acetyl-3,4,6-Tri-*O*-acetyl- β -D-glucosaminyl)-L-Serin-*N*-carboxyanhydrid verwendet. Dieser Mangel an Diversität ist auch der Grund, warum die Polymerisation kohlenhydrat-funktionalisierter NCAs für die Synthese von Glycopeptiden nie den gleichen Stellenwert erreichte, den die NCA-Polymerisation bei der Polypeptidsynthese einnimmt. Meistens erfolgt die Synthese von Glycopeptiden daher nicht direkt durch Polymerisation kohlenhydrat-funktionalisierter NCAs, sondern durch die Glycosylierung mittels NCA-Polymerisation synthetisierter Polypeptide.^[132]



31

Abbildung 1.10: Struktur des von ERWIN RÜDE synthetisierten Ser(Ac₄Glc)-NCA.

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen auf der Basis von Polypeptiden wasserlösliche, polyvalente Liganden für polyvalente Kohlenhydrat-Rezeptor-Wechselwirkungen synthetisiert werden. Für eine polyvalente Bindung müssen mehrere Kohlenhydrat-Moleküle an einem wasserlöslichen Träger gebunden sein. Die für biologische Anwendungen essentielle Wasserlöslichkeit soll auf zwei Arten erreicht werden: einerseits sollen wasserlösliche Glycopeptide synthetisiert werden, andererseits sollen wasserunlösliche Glycopeptide in Form von Nanopartikeln kolloidal solubilisiert werden. Wie in Abb. 2.1 dargestellt ist, erfolgt die polyvalente Präsentation der Kohlenhydrate im zweiten Fall an der Oberfläche der Nanopartikel.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll daher eine Syntheseroute für die Darstellung wasserlöslicher Glycopeptide entwickelt werden. Die gute Wasserlöslichkeit soll erreicht werden ohne auf ionische Aminosäurereste zurückzugreifen.

Da bei der Synthese dieser Glycopeptide keine genaue Aminosäuresequenz eingehalten werden muss, ist die NCA-Polymerisation die am besten geeignete Darstellungsmethode. Es soll sowohl die Möglichkeit einer nachträglichen Kohlenhydrat-Funktionalisierung von fertigen Polypeptidketten, als auch die direkte Synthese von nicht-ionischen wasserlöslichen Glycopeptide durch Copolymerisation von kohlenhydrat-funktionalisierten NCAs untersucht werden. Hierfür sollen zunächst geeignete NCAs identifiziert und synthetisiert werden. Anschließend muss ein Initiator gefunden werden, der eine kontrollierte Polymerisation dieser Monomere ermöglicht.

Im zweiten Teil soll die Eignung synthetischer Polypeptide für die Herstellung von Nanopartikeln mit kohlenhydrat-modifizierten Oberflächen nach der Emulsions-Diffusions-Verdampfungs-Methode untersucht werden. Hierzu sollen mittels NCA-Polymerisation geeignete Polypeptide synthetisiert werden. Die Polypeptide sollen

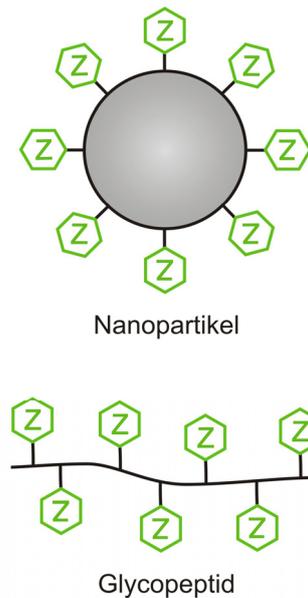


Abbildung 2.1: Polyvalente Präsentation von Kohlenhydraten

entweder direkt über Kohlenhydrat-Funktionen verfügen oder im Anschluss an die Herstellung der Nanopartikel mit diesen modifiziert werden.

Um biologische Bindungsstudien zu ermöglichen, müssen die synthetisierten Glycopeptide darüber hinaus durch polymeranaloge Umsetzung mit Fluoreszenzlabeln versehen werden.

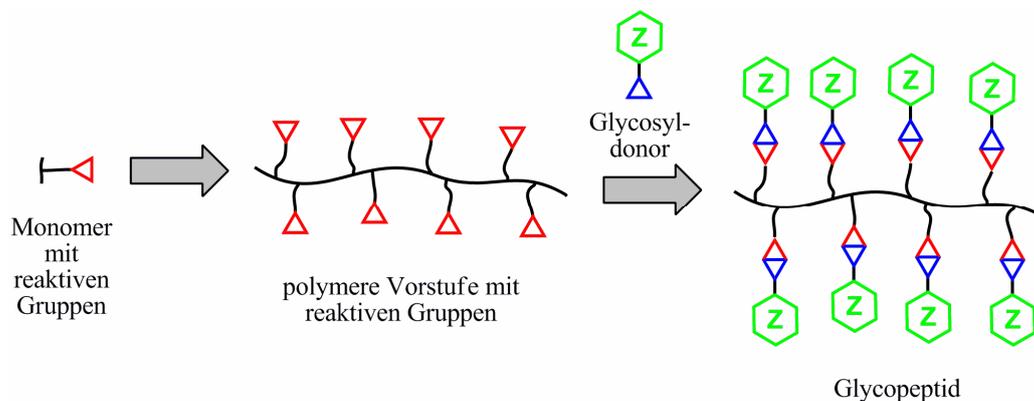
Zuletzt soll die Eignung der synthetisierten Glycopeptide für eine zukünftige Anwendung im Bereich der gezielten Anfärbung von Zellen und des gerichteten Transports pharmakologischer Wirkstoffe untersucht werden. Dazu soll eine cytotoxische Wirkung der synthetischen Glycopeptide ausgeschlossen und ihre spezifische Bindungsfähigkeit an T-Zellen und Erythrocyten untersucht werden.

3 Synthesestrategien

Zur Synthese von Glycopeptiden gibt es grundsätzlich zwei unterschiedliche Synthesestrategien.

3.1 Polymeranaloge Glycosylierung

Bei der ersten Strategie werden in einem ersten Schritt zuckerfreie Polypeptide synthetisiert. Die Glycosylierung der fertigen Peptidketten erfolgt anschließend in einer polymeranalogen Umsetzung.^[133] Diese zweistufige Syntheseroute wird auch in der natürlichen Synthese von Glycopeptiden verfolgt.

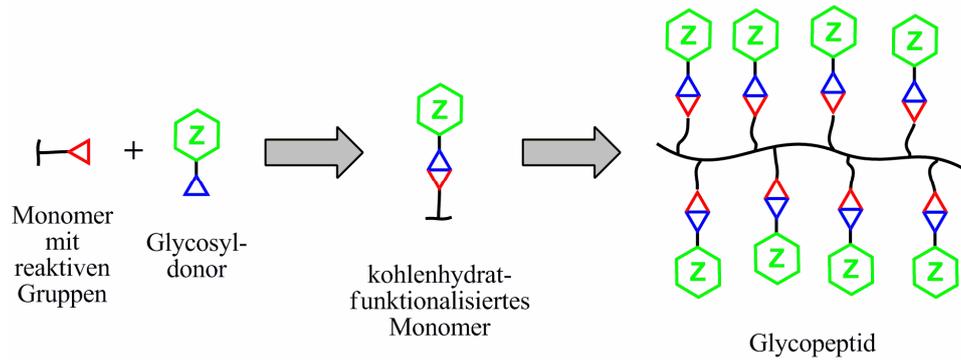


Schema 3.1: Schematische Darstellung der Synthese von Glycopeptiden durch polymeranaloge Umsetzung von reaktiven Polypeptidketten mit Glycosyldonoren

Für die Anknüpfung der Zuckermoleküle werden Aminosäurereste mit reaktiven Gruppen, wie etwa Amino-, Alkohol- oder Säuregruppen, benötigt. Das Hauptproblem der ersten Synthesestrategie ist die unvollständige Umsetzung dieser reaktiven Seitenketten. Die nicht umgesetzten Gruppen können ungewollte, unspezifische Wechselwirkungen mit verschiedenen biologischen Makromolekülen eingehen.

3.2 Polymerisation kohlenhydrat-funktionalisierter α -Aminosäuren

Bei der zweiten Strategie erfolgt die Anknüpfung der Zuckermoleküle an die Aminosäuren bereits vor der Polymerisation.^[128] Die Synthese der Glycopeptide erfolgt anschließend direkt aus diesen kohlenhydrat-modifizierten α -Aminosäuren.



Schema 3.2: Schematische Darstellung der direkten Synthese von Glycopeptiden aus kohlenhydrat-funktionalisierten Monomeren

Die zweite Synthesestrategie ist jedoch mit einem hohen synthetischen Aufwand verbunden, da für die Synthese jedes einzelnen Glycopeptids die komplette Syntheseroute durchlaufen werden muss.

4 Glycopeptidsynthese durch polymeranaloge Glycosylierung

4.1 Einleitung

Der einfachste und kostengünstigste Weg zur Herstellung hochmolekularer Polypeptide ist die Polymerisation von NCAs. Nach dieser Methode lassen sich, mit Hilfe recht simpler Reagenzien, Polypeptide in großen Mengen bei gleichzeitig guten Ausbeuten synthetisieren. Insbesondere zur Darstellung von Homopolypeptiden, statistischen Copolypeptiden und Blockcopolypeptiden, ist die NCA-Polymerisation das Mittel der Wahl. Daher wurde diese Methode auch in der vorliegenden Arbeit zur Peptidsynthese verwendet.

Im ersten Schritt erfolgt die Synthese von Copolypeptiden durch Copolymerisation verschiedener NCAs. Eine Aminosäure soll im zweiten Schritt zur Anbindung der Kohlenhydrate verwendet werden, eine andere Aminosäure soll als Abstandshalter zwischen den Kohlenhydraten dienen. Wegen der mangelnden Toleranz der NCA-Polymerisation gegenüber nucleophilen und basischen Gruppen müssen die Reste aller trifunktionellen Aminosäuren während der Polymerisation mit geeigneten Schutzgruppen versehen sein. Bei statistischen Copolypeptiden lässt sich der Anteil dieser glycosylierbaren Aminosäurereste und damit auch der mittlere Abstand zweier benachbarter Kohlenhydrate in der Peptidkette des Glycopeptide, durch das Mischungsverhältnis der beiden NCAs kontrollieren. Copolypeptide können entweder durch die Kombination der NCAs zweier verschiedener α -Aminosäuren oder durch Copolymerisation derselben trifunktionellen α -Aminosäure, mit zwei unterschiedlichen Schutzgruppen für die dritte Funktion, dargestellt werden. CÉLINE GUILLERMAIN *et al.* synthetisierten beispielsweise mehrere Diblockcopolypeptide durch sequenzielle Copolymerisation von L-Lysin-NCAs mit verschiedener N_ϵ -Schutzgruppen.^[134, 135] Die Verwendung zweier verschiedener NCAs der gleichen Aminosäure hat den Vorteil, dass die Reaktivitäten der beiden NCAs weniger stark differieren. Der Einsatz verschiedener Aminosäuren erhöht hingegen die Diversität der Polypeptide. Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Synthesestrategien verfolgt.

Bei der Auswahl der NCAs müssen verschiedene Kriterien beachtet werden. Die für die Blockierung der funktionellen Gruppen der verschiedenen NCAs notwendigen Schutzgruppen müssen eine selektive Entschützung des gewünschten Aminosäurerests ermöglichen. Außerdem sollte die Abspaltung der Schutzgruppen unter milden Bedingungen erfolgen, um einen Abbau der Polypeptidkette zu vermeiden. Die Löslichkeit muss zudem auf den Verwendungszweck zugeschnitten sein.

Polypeptide, die zur Herstellung von Nanopartikeln verwendet werden, müssen in einem nur partiell mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel löslich sein. Sie dürfen aber weder vor noch nach der Glycosylierung gut in Wasser löslich sein, da sich die Nanopartikel sonst auflösen. Zur Synthese dieser Polypeptide können daher die gebräuchlichen, gut polymerisierbaren NCAs γ -Benzyl-L-glutamat Glu(Bzl), γ -*tert.*-Butyl-L-glutamat Glu(*t*-Bu), N_ϵ -Trifluoracetyl-L-lysin Lys(TFA), N_ϵ -*tert.*-Butyloxycarbonyl-L-lysin Lys(Boc) und N_ϵ -Benzyloxycarbonyl-L-lysin Lys(Z) verwendet werden.^[20, 134, 135]

Das wichtigste Kriterium bei der Synthese löslicher Glycopeptide ist die Wasserlöslichkeit der fertigen Glycopeptide. Eine gute Löslichkeit ist die Grundvoraussetzung für den pharmakologischen oder medizinischen Einsatz der betreffenden Glycopeptiden. Bei den heute gebräuchlichen wasserlöslichen Polypeptiden (z.B. Poly-L-lysin und Poly-L-asparaginsäure) handelt es sich jedoch um Polyelektrolyte. Ihre Wasserlöslichkeit ist, wie bei allen Polyelektrolyten, stark pH-abhängig. Ein großes Problem ist außerdem, dass die für die Wasserlöslichkeit verantwortlichen ionischen Aminosäurereste unspezifische Wechselwirkungen mit anderen geladenen Biopolymeren eingehen können. Dies kann letztlich zu einer Agglomeration der Makromoleküle führen.

Alle nichtionischen Homopolypeptide der natürlichen Aminosäuren sind hingegen unlöslich in Wasser, wenn die Anzahl der verknüpften Aminosäuren 25 übersteigt.^[74]

SONGMING CHEN und RONALD WETZEL beschreiben aber ein Verfahren, um synthetische Polypeptide mit langen Polyglutaminketten unter Verwendung von Trifluoressigsäure und Hexafluorisopropanol zu desaggregieren, und dadurch in eine wasserlösliche Form zu überführen.^[136] Auch konnten ERIC LEWIN ALTSCHULER *et al.* bereits 1997 zeigen, dass der Einbau weniger abweichender Aminosäuren in Polyglutaminket-

ten ausreicht, um deren Sekundär- und Tertiärstruktur so zu verändern, das wasserlösliche Polypeptide erhalten werden.^[137]

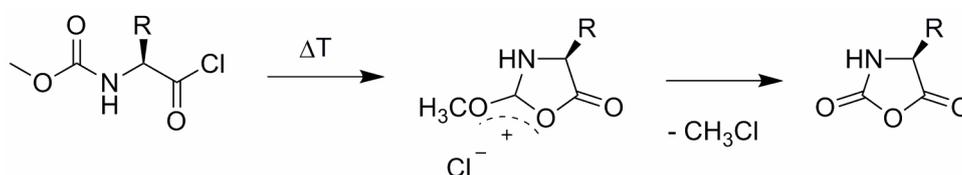
Die Polypeptidketten der dargestellten Glycopeptide werden daher ebenfalls überwiegend aus Glutamin aufgebaut. Um Angriffspunkte für die anschließende Glycosylierung in die Polypeptide einzubauen, wird N_ϵ -Trifluoracetyl-L-lysin als Cobaustein verwendet. Die Wahl fiel auf N_ϵ -Trifluoracetyl-L-lysin, da sich das entsprechende NCA Lys(TFA)-NCA **6** hervorragend für die NCA-Polymerisation eignet und gut lösliche Polypeptide bildet.^[135] Die Glycosylierung der synthetisierten Polypeptide soll nach der Abspaltung der TFA-Schutzgruppen durch die Umsetzung der N_ϵ -Aminogruppe des Lysins mit Isothiocyanato-Zuckern (z.B. 1-Isothiocyanato-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannose **25**) erfolgen. Die nucleophile Addition von Aminen an Isothiocyanate verläuft unter sehr milden Bedingungen mit exzellenten Ausbeuten. Außerdem sind die gebildeten Thioharnstoffe sowohl gegen Säuren als auch gegen Basen beständig und gewährleisten damit eine stabile Anbindung der Kohlenhydrate.

Der hohe Glutaminanteil soll nicht nur die Wasserlöslichkeit der Glycopeptide gewährleisten, sondern auch für einen ausreichenden Abstand zwischen den zur Anknüpfung der Kohlenhydratmolekülen vorgesehenen Lysinbausteinen sorgen. Ein ausreichender Abstand zwischen den Lysinresten ist notwendig, um die Anknüpfung der Kohlenhydrate nicht durch sterische Wechselwirkungen zu behindern.

4.2 Synthese der Monomere

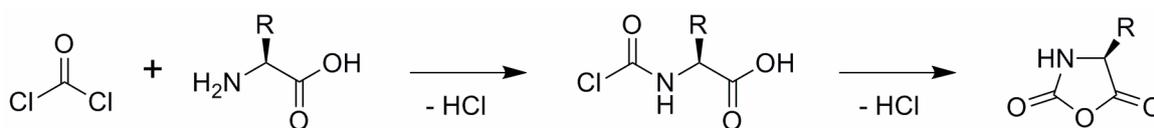
4.2.1 Einleitung NCA-Synthese

Die erste Syntheseroute zur Darstellung von α -Aminosäure-*N*-carboxyanhydriden wurde bereits 1906 von HERMANN LEUCHS entdeckt, als er versuchte *N*-Methoxycarbonylamino-säurechloride zu destillieren.^[21] Wie in Schema 4.1 gezeigt ist, cyclisierten diese beim Erhitzen auf 70°C unter der Abspaltung von Chlormethan zu den entsprechenden NCAs.



Schema 4.1: NCA Synthese nach der Leuchs-Methode

Eine weitere Möglichkeit NCAs zu synthetisieren ist die von FRIEDRICH FUCHS und A. C. FARTHING entwickelte direkte Phosgenierung der entsprechenden α -Aminosäurederivate (Schema 4.2).^[138, 139] Diese als Fuchs-Farthing-Methode^[57] bekannte Variante ist die am häufigsten eingesetzte Methode zur Darstellung von NCAs.

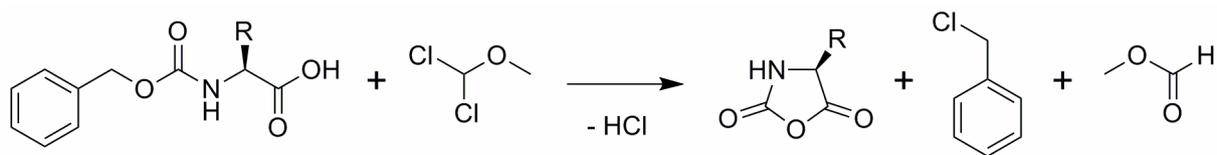


Schema 4.2: NCA Synthese nach der Fuchs-Farthing-Methode

Da sich jedoch nicht alle α -Aminosäuren durch direkte Phosgenierung zu NCAs umsetzen lassen, findet auch die Leuchs-Methode heute noch Anwendung.^[42] Um den Umgang mit gasförmigem Phosgen zu vermeiden, kommen meist leichter handhabbare Phosgenersatzstoffe, wie das feste Bis(trichlormethyl)carbonat (Triphosgen), zum Einsatz. Diese setzen Phosgen erst während der Reaktion bei höheren Temperaturen frei.^[140] Allerdings entstehen bei dieser Methode Nebenprodukte wie Chlorwasser-

stoff, *N*-Chloroformyl-Aminosäurechloride und α -Isothiocyanato-Säurechloride,^[141] die sich störend auf die Polymerisation auswirken können und daher ein mehrfaches Umkristallisieren der erhaltenen NCAs erfordern. Obwohl NCAs gegen Wasser empfindlich sind und in wasserhaltigen organischen Lösungsmitteln oberhalb von 20°C rasch oligomerisieren, beschrieben DREW S. POCHÉ, MICHAEL J. MOORE und JENNIFER L. BOWLES, dass auch das Waschen der NCA-Lösung bei 0°C mit Wasser und Hydrogencarbonatlösung eine effektive Reinigungsmethode sein kann.^[142] Um die Zerstörung der NCAs zu vermeiden, muss auf das Waschen aber sofort eine intensive Trocknung der organischen Lösung folgen.

Eine dritte Methode zur Darstellung von NCAs ist die in Schema 4.3 gezeigte direkte Umsetzung der am α -Stickstoff Z- oder Boc-geschützten Aminosäurederivate mit Dichlormethylmethylether.^[143]



Schema 4.3: Direkte Umsetzung einer Z-geschützten α -Aminosäure mit Dichlormethylmethylether.

Der Vorteil dieser Methode ist, dass der verwendete flüssige Dichlormethylmethylether leicht handhabbar und zugleich wesentlich weniger giftig ist, als die gewöhnlich eingesetzten Phosgenderivate. Dichlormethylmethylether kann außerdem in großem Überschuss eingesetzt werden, da sich der nicht umgesetzte Ether, wegen seiner niedrigen Siedetemperatur (85°C), nach der Reaktion einfach destillativ aus dem Reaktionsgemisch entfernen lässt.

4.2.2 Nomenklatur

Um die oft langen Namen der in dieser Arbeit verwendeten Aminosäurederivate abzukürzen, wird im Folgenden die in Abb. 4.1 erläuterte Kurzschreibweise verwendet.

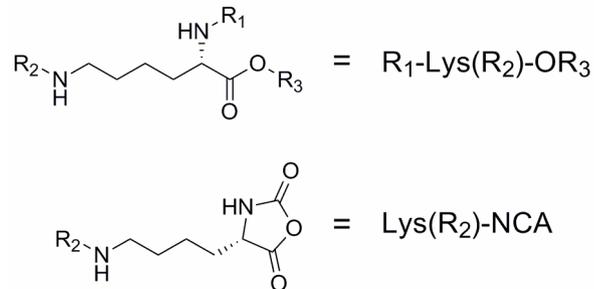
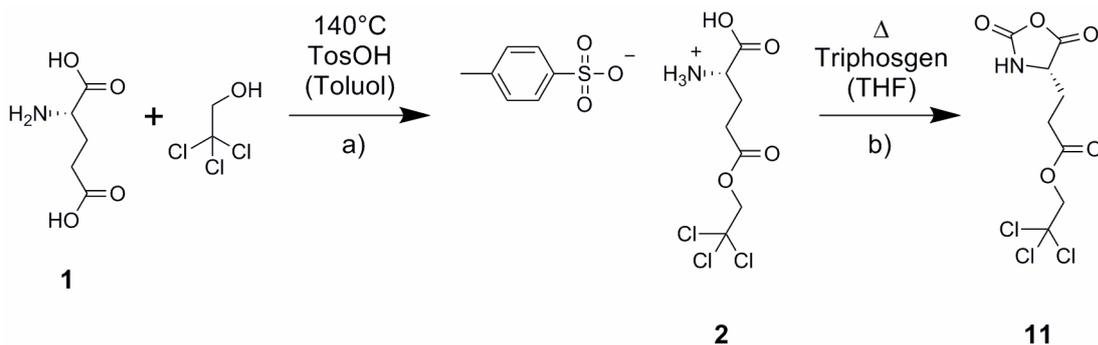


Abbildung 4.1: Erläuterung der verwendeten Kurzschreibweise

4.2.3 Synthese von geschütztem Glutamin und Glutamat

Die Darstellung von γ -(2,2,2-Trichlorethyl)-L-glutamat-*N*-carboxyanhydrid **11** erfolgte nach der in Schema 4.4 abgebildeten zweistufigen Synthese aus L-Glutaminsäure **1** in einer Gesamtausbeute von 35%.



Schema 4.4: Syntheseroute zur Darstellung von γ -(2,2,2-Trichlorethyl)-L-glutamat-*N*-carboxyanhydrid **11**. a) Regiospezifische, säurekatalysierte Veresterung der γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure **1**, b) Phosgenierung des Glutaminsäureesters **2** mit Triphosgen.

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die von KAZUNORI ISHIKAWA und TAKESHI ENDO veröffentlichte Vorschrift.^[144]

Die Veresterung der L-Glutaminsäure **1** mit 2,2,2-Trichlorethanol wurde mit *p*-Toluolsulfonsäure als Katalysator in Toluol bei 140°C durchgeführt. Auf das in der Literatur durchgeführte mehrfache Umkristallisieren aus einem Ethanol/Diethylether-Gemisch sollte unbedingt verzichtet werden. In dieser Arbeit hat sich

nämlich herausgestellt, dass es hierbei zu einer Umesterung unter Bildung von γ -Ethyl-L-glutamat **2e** (Abb. 4.3) kommt. Im ¹H-NMR-Spektrum erkennt man dies an den zusätzliche auftretenden Signale bei einer chemischen Verschiebung von 4.15 ppm und 1.24 ppm, die den Protonen der CH₂- und CH₃-Gruppe des Ethylrestes zugeordnet werden können. Auch das in Abb. 4.4 dargestellte Massenspektrum enthält ein

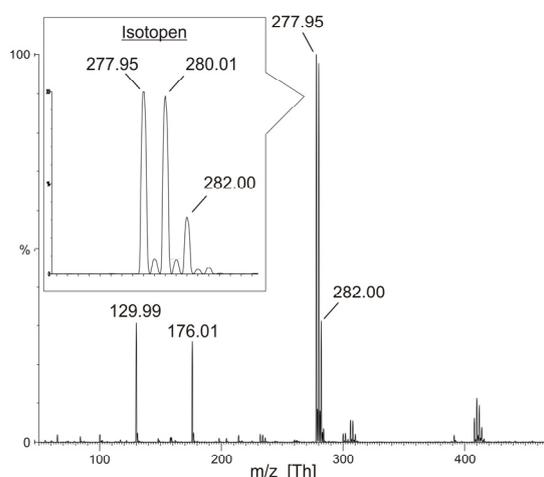


Abbildung 4.4: Massenspektrum (ESI+) von γ -(2,2,2-Trichlorethyl)-L-glutaminsäure Hydrotosylat **2** nach der Umkristallisation aus einem Ethanol/Diethylether-Gemisch.

Die beschriebene Synthese liefert jedoch nicht das gewünschte γ -(2,2,2-Trichlorethyl)-L-glutamat, sondern das entsprechende Hydrotosylat **2**. Obwohl sich das Tosylat-

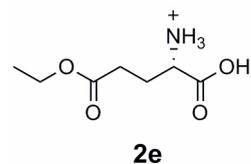


Abbildung 4.2: Struktur des bei der Umkristallisation von Glu(TCE) **2** als Nebenprodukt gebildeten γ -Ethyl-L-glutamats **2e**.

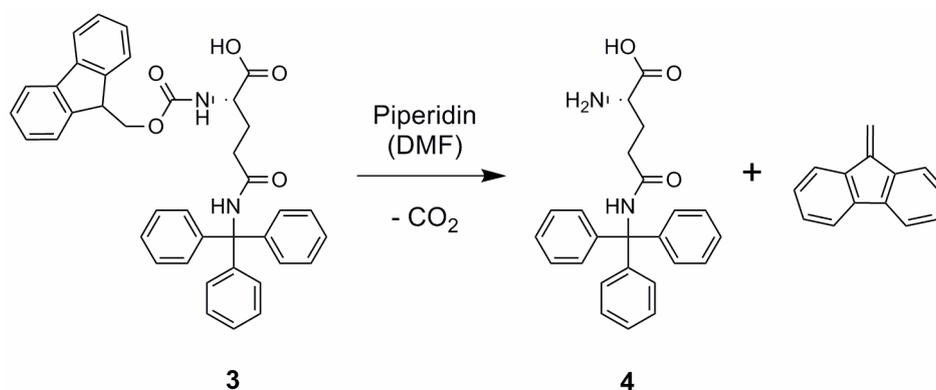
zusätzliches Signal bei 176.01 Th. Dieses m/z-Verhältnis entspricht der Masse des einfach protonierten Aminosäureesters **2e**.

Zur Überprüfung dieses Befundes wurde die Umkristallisation unter Verwendung eines Gemischs aus Isopropanol und Diethylether wiederholt. Auch hier trat eine entsprechende Umesterung auf. Der zusätzliche Peak im Massenspektrum bei 190.27 Th, entspricht dem gebildeten einfach protonierten Glutaminsäure- γ -Isopropylester.

Anion nicht störend auf die folgende NCA-Synthese auswirkt, wurde es von ISHIKAWA und ENDO vor der Phosgenierung des Aminosäureesters mittels Ionenaustauschchromatographie durch ein Chlorid-Anion substituiert. Dies war notwendig, da eine ausreichende Reinigung des NCAs durch Umkristallisation sonst nicht möglich ist. Auf diesen Ionenaustausch konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings verzichtet werden, da das Tosylat-Anion bei der wässrigen Aufarbeitung nach der NCA-Synthese problemlos abgetrennt wird.

Die Überführung von γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutaminsäure Hydrotosylats **2** in das entsprechende Glu(TCE)-NCA **11** erfolgte anschließend nach der allgemeinen Synthesvorschrift auf Seite 34.

Das ebenfalls kommerziell nicht erhältliche N_{δ} -Triphenylmethyl-L-glutamin (Gln(Trt)-OH) **4** wurde gemäß Schema 4.5 aus dem verfügbaren N_{α} -Fluorenylmethoxycarbonyl- N_{δ} -triphenylmethyl-L-glutamin (Fmoc-Gln(Trt)-OH) **3** hergestellt.

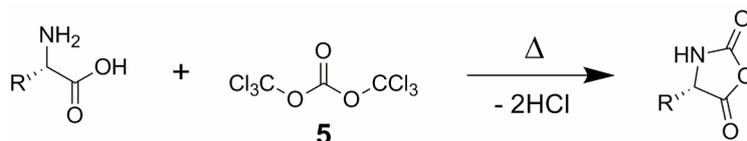


Schema 4.5: Synthese von N_{δ} -Triphenylmethyl-L-glutamin **4**^[145]

Die selektive Abspaltung der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe erfolgte nach einer literaturbekannten Methode in quantitativer Ausbeute.^[145, 146]

4.2.4 NCA-Synthese

Die Synthese der NCAs **6-13** erfolgte nach der Fuchs-Farthing-Methode durch die direkte Phosgenierung der jeweiligen geschützten L-Aminosäuren mit Triphosgen **5** (Schema 4.6).



Schema 4.6: NCA-Synthese durch direkte Phosgenierung von α -Aminosäuren mit Triphosgen **5**.

Für diese Synthesen wurde, in Anlehnung an Publikationen von CÉLINE GUILLERMAIN^[134, 135] und DREW S. POCHER,^[142] folgende allgemeine Synthesevorschrift erarbeitet:

Die geschützten α -Aminosäure werden unter Schutzgasatmosphäre in wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF) gelöst bzw. suspendiert und auf 65°C erwärmt. Die warmen Lösungen werden mit festem Triphosgen versetzt, welches *in situ* die dreifache Menge Phosgen freisetzt. Zur Entfernung des entstehenden Chlorwasserstoffs wird ein kontinuierlicher Schutzgasstrom durch das Reaktionsgefäß geleitet. Nach 3 h wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer abdestilliert und der erhaltene Rückstand in Ethylacetat aufgenommen.

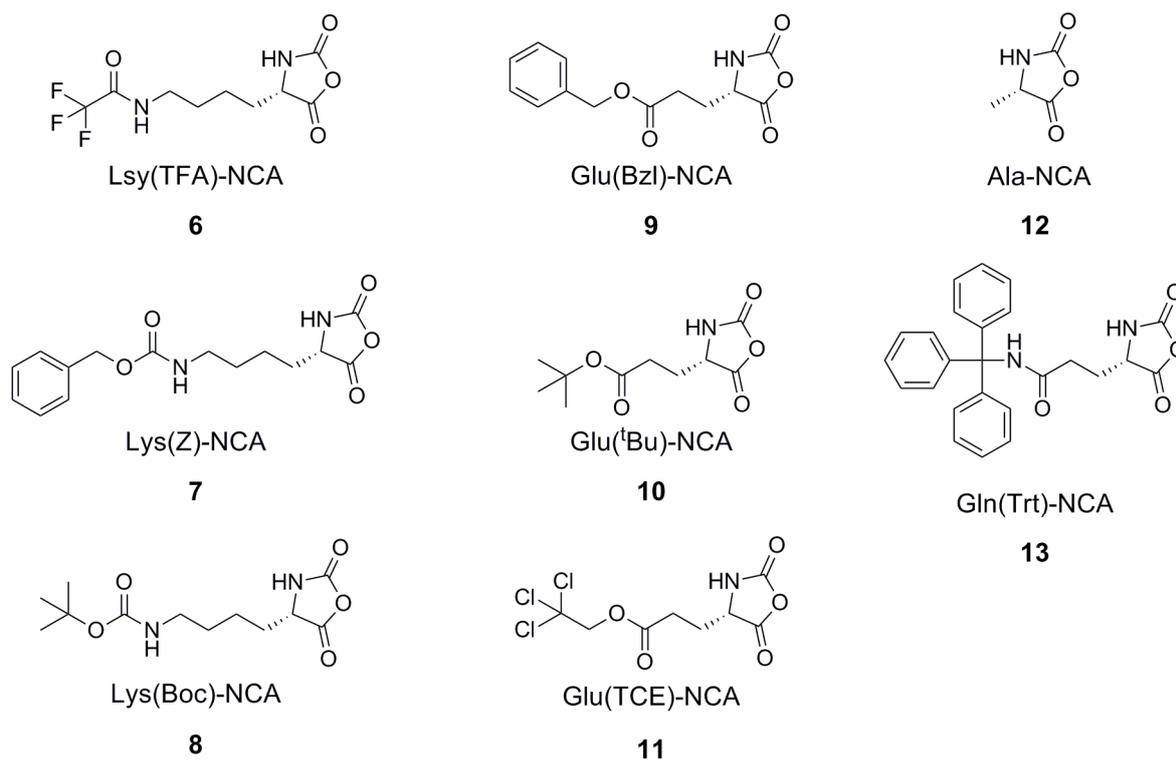


Abbildung 4.3: Strukturen und Benennung der synthetisierten NCAs

Die Reinigung der erhaltenen NCAs erfolgt durch mehrmaliges Waschen der organischen Phase mit Wasser und wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung.

Hierbei muss unbedingt zügig gearbeitet werden, um eine Oligomerisierung der NCAs zu vermeiden. Abb. 4.3 zeigt die nach dieser Vorgehensweise erhaltenen NCAs. Die isolierten Ausbeuten sind in Tab. 4.1 aufgelistet.

Das als Lösungsmittel verwendete THF muss, aufgrund seiner Mischbarkeit mit Wasser, vor der wässrigen Aufarbeitung abdestilliert und durch Ethylacetat ersetzt werden. Dennoch ist Verwendung von THF während der Reaktion dem direkten Einsatz von Ethylacetat als Lö-

Tabelle 4.1: Ausbeuten, der durch direkte Phosgenierung mit Triphosgen synthetisierten NCAs

NCA	Kurzschreibweise	Ausbeute
6	Lys(TFA)-NCA	80 %
7	Lys(Z)-NCA	85 %
8	Lys(Boc)-NCA	56 %
9	Glu(Bzl)-NCA	78 %
10	Glu(<i>t</i> -Bu)-NCA	71 %
11	Glu(TCE)-NCA	51%
12	L-Alanin-NCA	70 %
13	Gln(Trt)-NCA	70%

sungsmittel vorzuziehen, da die als Edukte eingesetzten Aminosäurederivate eine hohe Löslichkeit in THF aufweisen und THF ohne großen Aufwand stets frisch an einer Umlaufdestille über Natrium absolutieren werden kann.

Auf die in der Literatur oft empfohlene Zugabe von Aktivkohle, zur Beschleunigung des Zerfalls von Triphosgen in reaktives Phosgen, wurde nach einigen Versuchen verzichtet, da die aufwendige Abtrennung der Aktivkohle zu einer Verschlechterung der Produktqualität führte.

Die erfolgreiche Umsetzung der α -Aminosäuren zu den entsprechenden NCAs zeigt sich im ^1H -NMR-Spektrum an den, im Vergleich zu den Signalen der Aminosäuren, tieffeldverschobenen Signalen der α -H-Atome zwischen 4.38 ppm und 4.46 ppm. Im ^{13}C -NMR-Spektrum werden die Signale der α -C-Atome ebenfalls tieffeldverschoben und liegen nun zwischen 56,62 ppm und 57.09 ppm. Auch die neu dazugekommenen Signale der unter Ringschluss eingebauten Carbonylkohlenstoffe zwischen 151.92 ppm und 152.04 ppm bestätigen die Bildung der NCA-Ringe.

Mit 51-85% liegen die erzielten Ausbeuten im Rahmen der in der Literatur angegebenen Werte, oder übertreffen diese sogar.^[135, 146]

4.3 Polymerisation

Auf Grund der in der Literatur beschriebenen Vorteile,^[14, 19, 80] wurden für die Polymerisation der synthetisierten NCAs Übergangsmetall-Initiatoren eingesetzt. Bei der Suche nach einem geeigneten Initiator fiel die Wahl auf bpyNi(COD). bpyNi(COD) ist aufgrund seiner höheren Oxidationsbeständigkeit leichter zugänglich und handhabbar als $(\text{PMe}_3)_4\text{Co}$ und liefert hochmolekulare Polypeptide mit niedrigen PDs in exzellenten Ausbeuten.^[73]

Da die bpyNi(COD)-initiierte NCA-Polymerisation wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Initiators mit einem hohen synthetischen Aufwand verbunden ist, wird im Rahmen dieser Arbeit auch die Synthese von Copolypeptiden mit Hilfe der weniger aufwendigen amin-initiierten NCA-Polymerisation untersucht.

Die Molmassen der erhaltenen Polypeptide wurden mittels Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) bestimmt. Als Eluent wurde in Abhängigkeit von der Löslichkeit des untersuchten Polypeptids THF oder *N,N*-Dimethylacetamid DMAc verwendet. Die in THF durchgeführten GPC-Messungen werden im Folgenden mit dem Index ¹ und die in DMAc durchgeführten Messungen mit dem Index ² gekennzeichnet. Die Bestimmung der Molmassen, insbesondere sehr langer Polypeptidketten, erwies sich jedoch als schwierig. In einigen Fällen lieferten die GPC-Messungen Molmassen von lediglich einigen Hundert oder aber mehreren Millionen Dalton (Da). Die Probleme bei der Größenausschluss-Chromatographie sind möglicherweise auf Wechselwirkungen der Polypeptide mit der stationären Phase der GPC-Säulen zurückzuführen, welche dem Trennprinzip der GPC widersprechen. Vermutlich bilden sich auch Aggregate aus, die wegen ihrer Größe außerhalb des Messbereichs der GPC liegen. Polypeptide deren Molmassen nicht bestimmt werden konnten, werden im Folgenden mit der Abkürzung n.a. für nicht analysierbar gekennzeichnet.

Um die Molekulargewichtsverteilungen der einzelnen Polypeptide miteinander vergleichen zu können, wurden aus den Ergebnissen der GPC-Analysen auch die jeweiligen Polydispersitäten (PDs) berechnet. Diese sind definiert als der Quotient aus dem Gewichtsmittel (M_w) und dem Zahlenmittel (M_n) der Molmasse (Gl. 4-1).

$$PD = \frac{M_w}{M_n} \quad (4-1)$$

Um die Länge einer gebildeten Peptidkette mit dem eingesetzten I/M-Verhältnis vergleichen zu können, muss die Anzahl der Aminosäuren berechnet werden, aus denen die entsprechende Peptidkette aufgebaut ist. Da die Peptidketten aus mehreren Bausteinen aufgebaut sind, muss für die Berechnung des durchschnittlichen Polymerisationsgrades (P_n) zunächst die durchschnittliche Molmasse einer imaginären Monomereinheit (\bar{M}_{mono}) berechnet werden. Dies gelingt durch das Aufsummieren der gemäß ihrer relativen Häufigkeit (h_{NCA}), mit der sie in den Polypeptidketten vertreten sind, gewichteten Molmassen (M_{NCA}) der einzelnen Aminosäurebausteine (Gl. 4-2)

$$\bar{M}_{mono} = \sum_{NCA} h_{NCA} \cdot M_{NCA} \quad (4-2)$$

Dividiert man anschließend die mittels GPC bestimmte mittlere Molmasse (M_w) durch \bar{M}_{mono} so erhält man gemäß Gl. 4-3 den durchschnittlichen Polymerisationsgrad des entsprechenden Copolypeptids.

$$P_n = \frac{M_w}{\bar{M}_{mono}} \quad (4-3)$$

4.3.1 bpyNi(COD)-initiierte Polymerisation

Der Verlauf der Nickel(0)-initiierten Polymerisation von NCAs wird stark von dem verwendeten Lösungsmittel beeinflusst. Wird DMF als Lösemittel verwendet, so stimmen die Molekulargewichte der erhaltenen Polypeptide mit dem verwendeten Monomer/Initiator-Verhältnissen überein. Die Verwendung von THF führt hingegen zu Polypeptiden deren Kettenlängen die erwarteten Werte weit übertreffen.

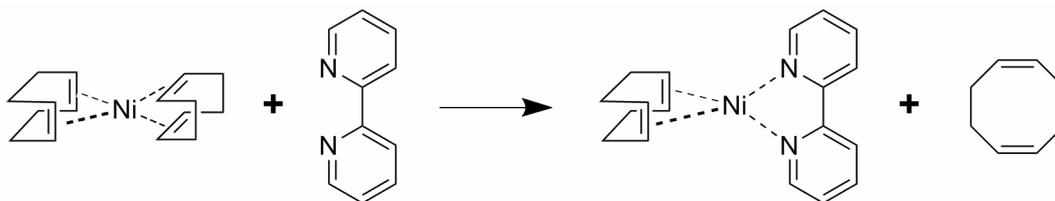
Die erhaltenen hohen Molekulargewichte sind jedoch nicht auf eine verringerte Kontrolle des Kettenwachstums zurückzuführen, vielmehr beruhen sie auf einer verminderten Bildung der für das Kettenwachstum verantwortlichen aktiven Kettenenden. Die Herabsetzung der Anzahl aktiver Kettenenden resultiert aus der Inaktivierung eines Teils der Nickel(0)-Komplexe durch den Einfang von CO, einer unvollständigen Kontraktion der intermediär gebildeten Amido-Alkyl-Ringe und der Aggregation der wachsenden Polymerketten in wenig polaren Lösemitteln.^[73]

Dieser Lösemittelleffekt wurde in der vorliegenden Arbeit zur Synthese sehr langkettiger Polypeptide ausgenutzt, da er den Einsatz größerer Initiator Mengen ermöglicht. Sehr geringen Initiator Mengen sind in zweierlei Hinsicht problematisch. Zum einen lassen sich geringe Initiator Mengen nur schwer handhaben, zum anderen werden dadurch die Auswirkungen einer möglichen geringen Kontamination mit Sauerstoff verstärkt.

Um durch Feuchtigkeit ausgelöste Nebenreaktionen zu vermeiden, wurden die verwendeten Lösemittel kurz vor der Polymerisation nach gängigen Vorschriften getrocknet und destilliert. Außerdem wurden alle hier besprochenen Polymerisationen unter Schutzgasatmosphäre in silanisierten Glaskolben durchgeführt. Im Falle der

triethylamin-initiierten Polymerisationen reichte Stickstoff als Schutzgas aus. Für die Herstellung des (2,2'-Bipyridin)(1,5-Cyclooctadien)Ni(0)-Komplexes (bpyNi(COD)) und der damit initiierten Polymerisationen wurde, wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Ni(0)-Zentrums, Argon als Schutzgas verwendet. Außerdem wurden die Lösemittel und auch die NCA-Lösungen durch das Anlegen eines Vakuums und anschließender Belüftung mit Argon jeweils mindestens dreimal entgast.

Um eine Oxidation des Nickel(0)-Zentrums zu vermeiden, wurde die verwendete Initiatorlösung jeweils kurz vor der Polymerisation frisch hergestellt. Hierzu wurde 1 eq. Bis(1,5-Cyclooctadien)Nickel(0) in THF gelöst und tropfenweise mit 1 eq. einer 2,2'-Bipyridin-Lösung in THF versetzt.^[147] Die zunächst orangene Reaktionslösung verfärbt sich durch die Bildung von bpyNi(COD) tief violett. Um einen vollständigen Ligandenaustausch (Schema 4.7) zu gewährleisten wird die Lösung noch 3 h bei Raumtemperatur gerührt.



Schema 4.7: Bildung des (2,2'-Bipyridin)(1,5-Cyclooctadien)Nickel(0)-Komplexes unter Ligandenaustausch.

Zur Abtrennung des freien 1,5-Cyclooctadiens wurde der erhaltene bpyNi(COD)-Komplex anfangs auskristallisiert, abfiltriert und getrocknet. Die in die Polymerisationen eingesetzten Initiatorlösungen wurden jeweils kurz vor der Polymerisation durch Lösen der entsprechenden Menge des isolierten Komplexes im verwendeten Lösungsmittel hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass das beim Ligandenaustausch freiwerdende 1,5-Cyclooctadien die Polymerisation nicht stören. Die nach dem Ligandenaustausch erhaltenen bpyNi(COD)-Lösungen konnten daher ohne vorherige Abtrennung des 1,5-Cyclooctadiens direkt als Initiatorlösung eingesetzt werden. Durch dieses Vorgehen konnte der synthetische Aufwand zur Herstellung der bpyNi(COD)-Initiator-Lösungen erheblich verringert werden.

Die Synthese der Homopolymere Poly(N_ϵ -trifluoracetyl-L-lysin) **14**, Poly(N_ϵ -*tert.*-butyloxycarbonyl-L-lysin) **15** und Poly[γ -(2,2,2-trichlorethyl)-L-glutamat] **16,17** erfolgte durch die Polymerisation der entsprechenden NCAs **6**, **8** und **11** mit bpyNi(COD) in THF bei Raumtemperatur. Die nach der Zugabe der bpyNi(COD)-Lösung tiefviolette Reaktionslösung färbt sich rasch rot. Dieser Farbumschlag ist auf den Austausch des 1,5-Cyclooctadien-Liganden am Nickel(0)-Zentrum unter Bildung des Amido-Amidat-Metallacyclus zurückzuführen.

Nach zwei Tagen wurden die Polypeptide durch Eintropfen der jeweiligen Reaktionslösung in ein Gemisch aus Methanol und Wasser gefällt. Die Initiator/Monomer-Verhältnisse (I/M), die erzielten Ausbeuten sowie die analytischen Daten der erhaltenen Polypeptide **14-17** sind in Tab. 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Ausbeuten und Molmassen M_w der mittels bpyNi(COD)-initiiertes NCA-Polymerisation dargestellte Homopolypeptide. (I/M: Initiator/Monomer-Verhältnisse, PD: Polydispersität, P_n : durchschnittlicher Polymerisationsgrad, ¹: GPC-Messung erfolgte in THF, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc)

Polymer	Monomer	Initiator	I/M	Lösemittel	M_w [g/mol]	P_n	PD	Ausbeute
14	Lys(TFA)-NCA	bpyNi(COD)	1/80	THF	172200 ¹	768	1.19	81 %
15	Lys(Boc)-NCA	bpyNi(COD)	1/70	THF	559200 ²	3019	1.78	86 %
16	Glu(TCE)-NCA	bpyNi(COD)	1/80	THF	31300 ²	120	n. a.	27 %
17	Glu(TCE)-NCA	bpyNi(COD)	1/50	THF	22300 ²	86	1.10	15 %

Die geringen Ausbeuten der Polymere **16** und **17** beruhen nicht auf einer unvollständigen Umsetzung der NCAs, vielmehr sind sie auf die schlechte Abtrennbarkeit der nach der Polymerisation ausgefällten Polypeptide zurückzuführen.

Die Fällung der Poly[γ -(2,2,2-trichlorethyl)-L-glutamat] **16** und **17** erwies sich nämlich als schwierig. Weder schwach polare organische Lösemittel wie Diethylether oder *n*-Hexan, noch Alkohol/Wasser-Gemische eigneten sich als Fällungsmittel, da stets schlecht filtrierbare Niederschläge erhalten wurden. Die Fällung erfolgte schließlich in einem Gemisch aus Methanol und 1 mM Salzsäure im Verhältnis 1 zu 2. Doch auch

dieses Fällungsmittel lieferte einen sehr feinen, pulverartigen Niederschlag, der weder durch Filtration noch durch Abzentrifugieren vollständig extrahiert werden konnte.

Die Darstellung der statistischen Copolypeptide **18-23** erfolgte analog zur Synthese der Homopolypeptide **14-17** durch Polymerisation der entsprechenden NCA-Gemische. Die Zusammensetzung der eingesetzten NCA-Gemische, die eingesetzten I/M-Verhältnisse sowie die die Charakterisierungen der daraus erhaltenen Copolypeptide sind in Tab. 4.3 zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Zusammensetzungen und Molmassen M_w der mittels bpyNi(COD) -initiiertes NCA-Polymerisation dargestellten statistischen Copolypeptide. (I/M: Initiator/Monomergesamtmenge-Verhältnis, Ratio Poly: Zusammensetzung der synthetisierten Copolypeptide, P_n : durchschnittlicher Polymerisationsgrad, PD: Polydispersität, ¹: GPC-Messung erfolgte in THF, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc)

Polymer	NCA ₁	NCA ₂	I/M	Ratio Poly	M_w [g/mol]	P_n	PD	Ausbeute
18	1.0 Lys(TFA)	5.0 Gln(Trt)	1/40	n. a.	39400 ²	114	1.18	70 %
19	1.0 Lys(TFA)	4.0 Glu(<i>t</i> -Bu)	1/70	1.0 : 3.5	44700 ²	218	1.66	72 %
20	1.0 Lys(TFA)	5.0 Glu(Bzl)	1/70	1.0 : 4.6	26300 ²	119	1.08	87 %
21	1.0 Lys(TFA)	5.0 Glu(TCE)	1/50	1.0 : 5.7	19100 ¹	75	1.94	39 %
22	1.0 Lys(TFA)	8.0 Glu(TCE)	1/50	1.0 : 8.0	10300 ¹	608	1.62	26 %
23	8.0 Lys(TFA)	1.0 Glu(TCE)	1/50	7.1 : 1.0	32100 ¹	140	2.04	24 %

Wie bei den Polyglutamaten **16** und **17** sind auch die bei der Synthese der Copolypeptide **21-23** erzielten, geringen Ausbeuten überwiegend auf die schlechte Abtrennbarkeit der ausgefällten Polymere zurückzuführen.

Die Zusammensetzung eines synthetisierten Copolypeptids lässt sich allgemein über die Integrationsverhältnisse geeigneter eindeutig zugeordneter und aufgelöster Signalflächen im ^1H -NMR-Spektrum bestimmen. Bei den Polypeptiden **21-23** wurden gemäß Abb. 4.4 die basisliniengetrenten Signalflächen der Methylen-Protonen des Trichlorethylesters bei 4.86 ppm und der ϵ -Methylen-Protonen der Lysinreste bei 3.14 ppm miteinander verglichen.

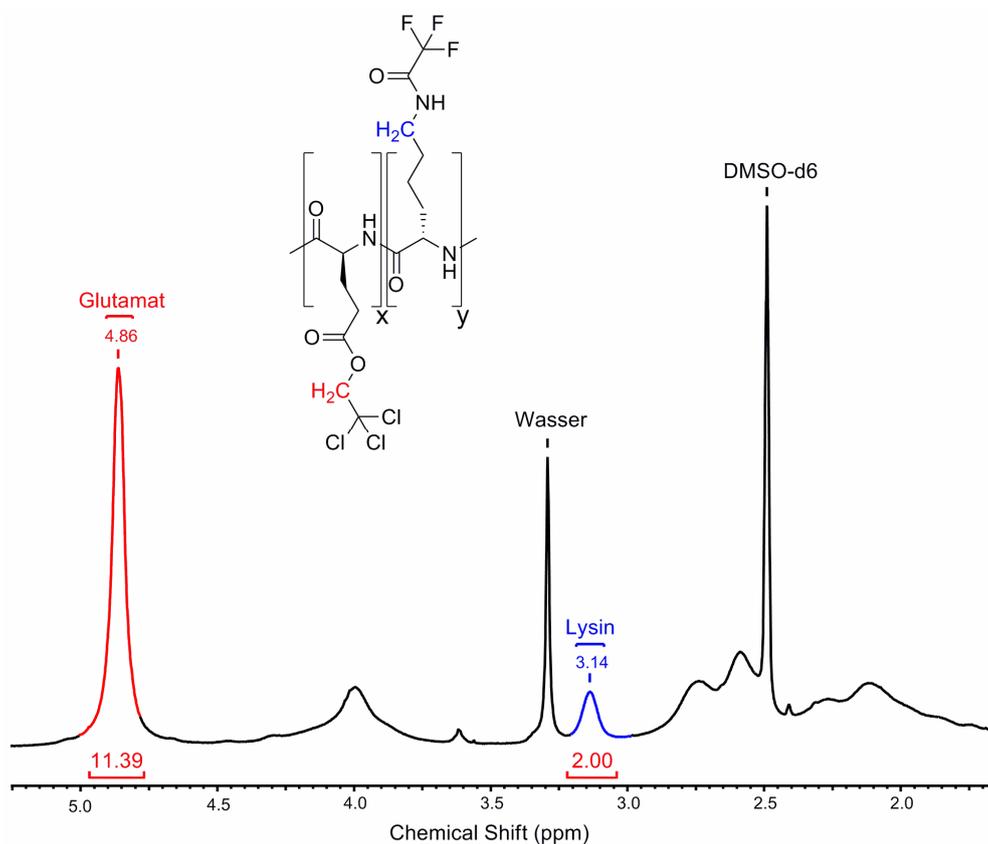


Abbildung 4.4: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Poly[Glu(TCE)-*co*-Lys(TFA)] **21**, aufgenommen in DMSO- d_6 . Die Zahlen unter den Peaks stellen die Integrationen der entsprechenden Signalflächen dar.

Analog hierzu wurde die tatsächliche Zusammensetzung von Poly[Glu(Bzl)-*co*-Lys(TFA)] **20** aus den vollständig aufgelösten Signalflächen der beiden ϵ -Methylen-Protonen der Lys(TFA)-Reste bei 3.09 ppm und der beiden Benzyl-Protonen der Glu(Bzl)-Reste bei 5.03 ppm abgeleitet.

Wie man Abb. 4.5 entnehmen kann, sind im Fall von Poly[Glu(*t*-Bu)-*co*-Lys(TFA)] **15** die Signale der Glu(*t*-Bu)-Bausteine, wegen der für Polymere typischen Signalverbreiterung, jedoch nicht vollständig von den Signalen der Lys(TFA)-Bausteine aufgelöst.

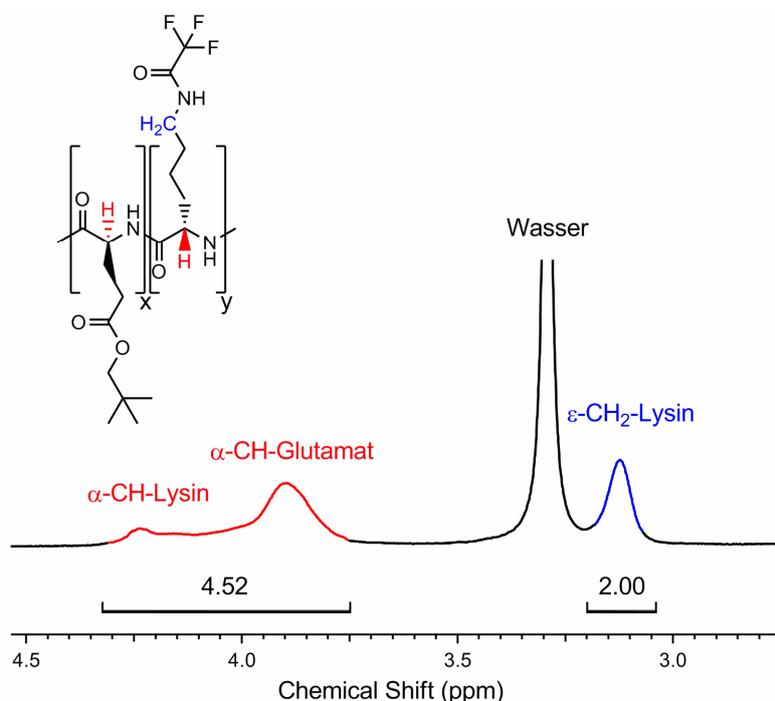


Abbildung 4.5: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Copolypeptid **19**, aufgenommen in $\text{DMSO-}d_6$.

Daher wurde die Signalflächen der beiden ϵ -Methylen-Protonen der Lys(TFA)-Reste I_{Lys} (blau) mit den vereinigten Signalflächen der α -Methylen-Protonen von Glu(*t*-Bu) und Lys(TFA) $I_{Glu+Lys}$ (rot) verglichen. Unter Berücksichtigung der Anzahl der Protonen errechnet sich das tatsächliche Verhältnis der Aminosäuren in dem Copolypeptid **19** nach Gl. 4-4.

$$\frac{n[\text{Lys}(\text{TFA})]}{n[\text{Glu}(t-\text{Bu})]} = \frac{\frac{1}{2}I_{Lys}}{I_{Glu+Lys} - \frac{1}{2}I_{Lys}} \quad (4-4)$$

Wie man in Tab. 4.3 erkennt korrelieren die aus den NMR-Spektren berechneten Zusammensetzungen der synthetisierten Copolypeptide **19-23** gut mit den eingesetzten NCA-Verhältnissen.

4.3.2 Amin-initiierte Polymerisation

Zur Darstellung der Homopolypeptide **24** und **25** wurden 3 Gew.% Lösungen der entsprechenden NCAs in DMF unter Schutzgasatmosphäre bei Raumtemperatur polymerisiert. Als Initiator kam Triethylamin zum Einsatz. Die durchgeführten Ansätze und die Charakterisierung der daraus erhaltenen Polypeptide sind in Tab. 4.4 zusammengefasst.

Tabelle 4.4: Ausbeuten und Molmassen M_w der synthetisierten Homopolypeptide. (I/M: Initiator/Monomer-Verhältnisse, PD: Polydispersität, P_n : durchschnittlicher Polymerisationsgrad, ¹: GPC-Messung erfolgte in THF, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc)

Polymer	Monomer	Initiator	I/M	Lösemittel	M_w [g/mol]	P_n	PD	Ausbeute
24	Lys(TFA)-NCA	NEt ₃	1/30	DMF	86900 ¹	383	1.69	71 %
25	Glu(TCE)-NCA	NEt ₃	1/30	DMF	1600 - 4.4 Mio ²	n. b.	3.16	49 %

Die Darstellung der statistischen Copolypeptide **26-31** erfolgte analog zur Synthese der Homopolypeptide **24** und **25** durch Polymerisation der entsprechenden NCA-Gemische. Die Zusammensetzung der polymerisierten NCA-Gemische, der jeweils verwendete Initiator sowie das eingesetzte I/M-Verhältnis sind in Tab. 4.5 aufgelistet.

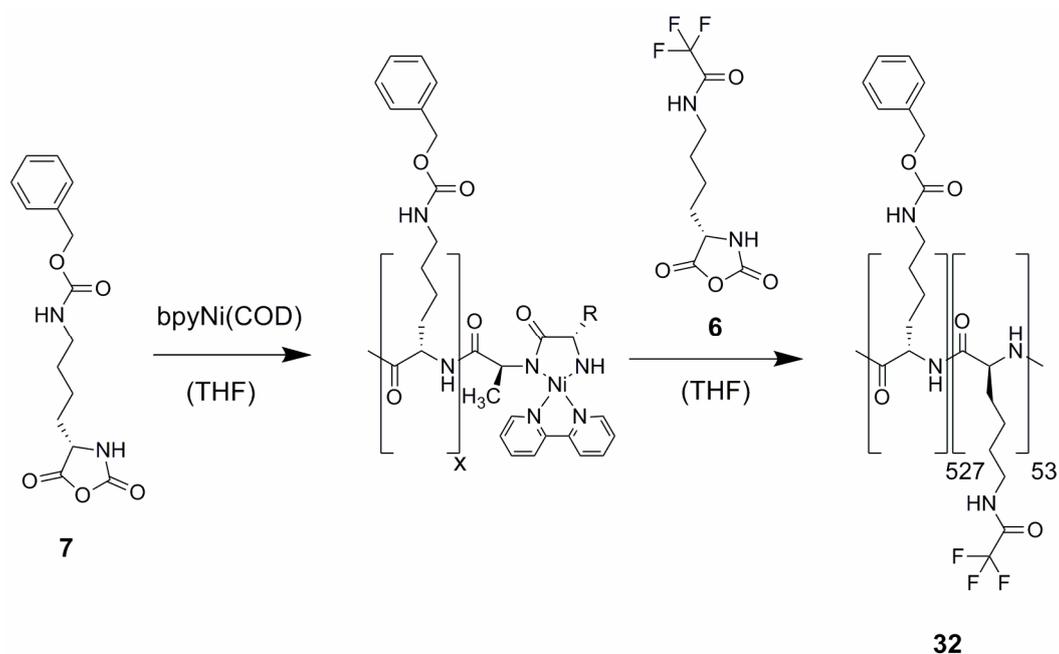
Tabelle 4.5: Zusammensetzungen und Molmassen M_w der synthetisierten statistischen Copolypeptide. (I/M: Initiator/Monomergesamtmenge-Verhältnis, Ratio: Zusammensetzung der synthetisierten Polypeptide, P_n : durchschnittlicher Polymerisationsgrad, PD: Polydispersität, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc)

Polymer	NCA ₁	NCA ₂	Initiator	I/M	LM	Ratio	M_w [g/mol]	P_n	PD	Ausbeute
26	1.0 Lys(TFA)	2.0 Glu(<i>t</i> -Bu)	NEt ₃	1/50	DMF	1.0 : 2.0	186500 ²	899	1.25	78 %
27	1.0 Lys(TFA)	5.0 Gln(Trt)	NEt ₃	1/50	DMF	n. a.	7200 ²	21	1.28	56%
28	1.0 Lys(TFA)	1.0 Glu(TCE)	NEt ₃	1/30	DMF	2.0 : 1	1400 ²	6	1.38	53 %
29	1.0 Lys(TFA)	1.0 Glu(TCE)	NEt ₃	1/30	THF	---	---	---	---	---
30	1.0 Lys(TFA)	5.0 Glu(TCE)	<i>n</i> -Hexylamin	1/50	DMF	---	---	---	---	---
31	1.0 Lys(TFA)	5.0 Glu(TCE)	<i>n</i> -Hexylamin	1/50	THF	1 : 15.6	2929 ²	11	1.64	38 %

Tab. 4.5 zeigt, dass die Verwendung von *n*-Hexylamin und Triethylamin als Initiator für die Umsetzung von Glu(TCE)-NCA zu wenig definierten Produkten führt. Eine genauere Analyse dieses Befunds folgt in Abschnitt 4.4.

4.3.3 Synthese von Diblockcopolymeren

Die Synthese der Diblockcopolypeptide **32-35** (Tab. 4.6) erfolgte unter den gleichen Synthesebedingungen wie die Herstellung der statistischen Copolypeptide. Die beiden NCAs (NCA_1 und NCA_2) wurden jedoch nicht gleichzeitig, sondern sukzessive mit einem Zeitabstand von sechs Stunden zugegeben.



Schema 4.8: Synthese von Poly{[Lys(TFA)]₅₃-*block*-[Lys(Z)]₅₂₇} durch sukzessive Copolymerisation von Lys(Z)-NCA **7** und Lys(TFA)-NCA **6**.

Da die durch Triethylamin initiierte NCA-Polymerisation über den AM-Mechanismus verläuft, ist sie nicht für die Synthese von Blockcopolymeren geeignet (siehe Einleitung). Für die Darstellung der Diblockcopolypeptide **32-35** kam daher ausschließlich $bpyNi(COD)$ als Initiator zum Einsatz. Die Verwendung von $bpyNi(COD)$ ermöglicht es außerdem den Fortbestand des aktiven Kettenendes der lebenden Polymerisation zu überprüfen. Es ist darauf zu achten, dass die durch den Amido-Amidat-Metallacyclus

hervorgerufene Rotfärbung der Reaktionslösung auch nach der Zugabe des zweiten NCAs bestehen bleibt. Ein weiterer Farbumschlag würde die Oxidation des Nickel-Zentrums und damit den Abbruch der Polymerisation anzeigen.

Tabelle 4.6: Ausbeuten, Zusammensetzungen und Molmassen M_w der verschiedenen Diblock-copolyptide. (I/M_{ges} : $n_{Initiator}/(n_{NCA1} + n_{NCA2})$, Ratio Poly: Zusammensetzung der synthetisierten Diblockcopolyptide, P_n : durchschnittlicher Polymerisationsgrad, PD: Polydispersität, ¹: GPC-Messung erfolgte in THF, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc)

Polymer	NCA ₁	NCA ₂	I/M_{ges}	Ratio Poly	M_w [g/mol]	P_n	PD	Ausbeute
32	10 Lys(Z)	1 Lys(TFA)	1/70	9.9 : 1	150100 ²	580	1.49	70 %
33	10 Glu(Bzl)	1 Lys(TFA)	1/70	9.77 : 1	119800 ¹	545	5.14	76 %
34	10 Lys(TFA)	1 Lys(Boc)	1/70	9.49 : 1	196400 ¹	875	1.59	100 %
35	10 Lys(Boc)	1 Lys(TFA)	1/70	10.0 : 1	369500 ¹	1621	4.78	86 %

Auch hier wurde die tatsächliche Zusammensetzung der Blockcopolyptide **32-35** über die Integrationsverhältnisse geeigneter eindeutig zugeordneter und aufgelöster Signalflächen im ¹H-NMR-Spektrum bestimmt. Wie man Tab. 4.6 entnehmen kann, stimmt die Zusammensetzungen der polymerisierten NCA-Gemische weitgehend mit den Zusammensetzungen der jeweiligen Blockcopolyptide überein.

4.4 Vergleich der Polymerisationsmethoden

Um den Nutzen der synthetisch sehr anspruchsvollen bpyNi(COD)-Initiatoren zu überprüfen, werden im Folgenden die Ergebnisse der bpyNi(COD)-initiierten Polymerisation denen der amin-initiierten Polymerisation gegenübergestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit, werden die Polypeptide hinsichtlich ihres Anwendungszwecks und der enthaltenen Aminosäuren in drei Gruppen unterteilt.

4.4.1 Polypeptide zur Darstellung von Nanopartikeln

Da die zur Darstellung von Nanopartikel vorgesehenen Polypeptide **14**, **15**, **19**, **20**, **24**, **26** und **32-35** nicht in wasserlösliche Derivate überführt werden müssen, konnten sie vollständig aus den gut polymerisierbaren Bausteinen Lysin und Glutamat aufgebaut werden. Bei der Polymerisation der entsprechenden NCAs bzw. NCA-Gemische traten daher erwartungsgemäß keine Probleme auf. Sowohl die Homopolypeptide als auch die statistischen Copolypeptide und die Diblockcopolypeptide konnten in guten Ausbeuten (70-100%) erhalten werden. Wie für die verwendeten Initiatoren Triethylamin und bpyNi(COD) erwartet übertreffen die Polymerisationsgrade das I/M-Verhältnis um ein Vielfaches.

Auch die Zusammensetzungen der statistischen Copolypeptide **19**, **20** und **26** sowie der Diblockcopolypeptide **32-35** stimmen gut mit den Zusammensetzungen der eingesetzten NCA-Gemische überein.

Sowohl die bpyNi(COD)-initiierte als auch die triethylamin-initiierten Polymerisation führen also zu definierten Polypeptiden.

4.4.2 Copolypeptide auf der Basis von Gln(Trt)

Die Synthese der überwiegend aus Glutamin aufgebauten Polypeptidketten erfolgte zunächst durch die Polymerisation eines Gemisches von *N*₈-Triphenylmethyl-L-glutamin-*N*-carboxyanhydrid (Gln(Trt)-NCA) **13** und Lys(TFA)-NCA **6**. Die Trityl-Schutzgruppe ist eine zur basenlabilen TFA-Schutzgruppe orthogonale Schutzgruppe und lässt sich selektiv mit Trifluoressigsäure abspalten. Außerdem begünstigt die Tri-

tyl-Schutzgruppe wegen ihres hohen sterischen Anspruchs die Ausbildung einer α -Helix, da diese Sekundärstruktur den größten Abstand zwischen den einzelnen Aminosäureresten aufweist. Wie in der Einleitung bereits erklärt wurde, ist das Vorliegen einer α -helicalen Struktur für einen reibungslosen Polymerisationsverlauf unabdingbar.

Wie bereits beschrieben, wurden zur Darstellung der entsprechenden Copolypeptide die beiden NCAs Gln(Trt)-NCA **13** und Lys(TFA)-NCA **6** in einem Verhältnis von 5:1 gemischt und mit Triethylamin und bpyNi(COD) polymerisiert. Hierbei traten jedoch sowohl in DMF als auch in THF Löslichkeitsprobleme auf. Bereits kurz nach der Zugabe des Initiators konnte das Ausfallen eines weißen Niederschlags beobachtet werden. Bei diesem Niederschlag handelt es sich um die wachsenden Polypeptidketten, die mit wachsender Kettenlänge zunehmend unlöslich werden. Zur Begründung dieses Sachverhalts sei auf Abb. 1.4 verwiesen. Trotz der Löslichkeitsprobleme wurde die Polymerisation zwei Tage fortgeführt. Aus dem Überstand konnten keine Polypeptide gewonnen werden, und die aus dem Reaktionsmedium ausgefallenen Polypeptide waren auch in der Hitze in keinem gängigen Lösungsmittel löslich. Die für die GPC-Messungen benötigten Lösungen der Polypeptide **18** und **27** konnten nur unter großem Aufwand hergestellt werden. Hierzu wurden in der Hitze stark verdünnte Lösungen der Polypeptide hergestellt, die anschließend im Vakuum aufkonzentriert wurden.

Da die Bestimmung der Zusammensetzung der Polypeptide normalerweise mittels ^1H -NMR-Spektroskopie erfolgt, konnte sie wegen der Unlöslichkeit der Proben im dafür benötigten Konzentrationsbereich, nicht durchgeführt werden. Daher wurde für die Berechnung von \bar{M}_{mono} nach Gl. 4-2 das eingesetzte Verhältnis der NCAs (Gln(Trt)-NCA)/Lys(TFA)-NCA 5:1) verwendet.

$$\bar{M}_{mono} = \frac{5}{6} \cdot M_{\text{Gln(Trt)}} + \frac{1}{6} \cdot M_{\text{Lys(TFA)}} = \frac{5}{6} \cdot 370.44 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + \frac{1}{6} \cdot 224.18 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 346.06 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \quad (4-5)$$

Wegen der schlechten Löslichkeit der wachsenden Peptidketten führte die triethylamin-initiierte Polymerisation zu Peptiden, deren tatsächlicher Polymerisationsgrad ($P_n = 21$) weit unterhalb des eingesetzten Monomer/Initiator-Verhältnisses von 50/1 liegt.

Die unvollständige Umsetzung der NCAs schlägt sich auch in der mit 56% sehr geringen Ausbeute nieder.

Die bpyNi(COD)-initiierte Polymerisation lieferte hingegen langkettige Polypeptide ($P_n = 114$) in annehmbaren Ausbeuten. Aufgrund ihrer Unlöslichkeit konnten diese Polypeptide aber nicht entschützt werden und waren daher nicht für eine Glycosylierung geeignet.

4.4.3 Copolypeptide auf der Basis von Glu(TCE)

Die Tatsache, dass die direkte Synthese von hochmolekularem Polyglutamin, aufgrund der schlechten Polymerisierbarkeit von Glutamin-NCAs und der geringen Löslichkeit der wachsenden Polypeptidketten, schwierig ist, ist ein bekanntes Problem.^[148] Eine elegante Methode um diese Schwierigkeiten zu umgehen wurde von KAZUNORI ISHIKAWA und TAKESHI ENDO beschrieben.^[144, 148] Anstelle eines Glutamin-*N*-carboxyanhydrids verwendeten sie das gut polymerisierbare γ -(2,2,2-Trichlorethy)-L-glutaminsäure-*N*-carboxyanhydrid (Glu(TCE)-NCA) **11**. Das gewünschte Polyglutamin erhält man anschließend durch Ammonolyse der Aktivestergruppen des erhaltenen Polyglutamats in organischen Lösemitteln. γ -(2,2,2-Trichlorethy)-L-glutamat lässt sich, mit geeigneten Nucleophilen, aber auch zu anderen wasserlöslichen Glutamat- und Glutaminderivaten umsetzen.

Um die mit den unterschiedlichen Initiatoren erzielten Ergebnisse dieser Syntheseroute miteinander vergleichen zu können, fasst Tab. 4.7 die aus den Tabellen 4.2 - 4.5 bekannten Polypeptide auf Basis von Glu(TCE) noch einmal zusammen.

Tabelle 4.7: Vergleich der Zusammensetzungen und polymerisationsgrade P_n der synthetisierten Poly[Lys(TFA)-*co*-Glu(TCE)]e. (LM: verwendetes Lösungsmittel, I/M: Initiator/Monomergesamtmenge-Verhältnis, 6 : 11: Stoffmengenverhältnis der Bausteine Lys(TFA) und Glu(TCE) im Polypeptid, P_n : durchschnittlicher Polymerisationsgrad, PD: Polydispersität)

Polymer	NCA ₁	NCA ₂	Initiator	I/M	LM	6 : 11	P_n	PD	Ausbeute
16	Glu(TCE)	---	bpyNi(COD)	1/80	THF	---	120	n. a.	27 %
17	Glu(TCE)	---	bpyNi(COD)	1/50	THF	---	86	1.10	15 %
21	1.0 Lys(TFA)	5.0 Glu(TCE)	bpy(Ni(COD))	1/50	THF	1.0 : 5.7	75	1.94	39 %
22	1.0 Lys(TFA)	8.0 Glu(TCE)	bpy(Ni(COD))	1/50	THF	1.0 : 8.0	608	1.62	26 %
23	8.0 Lys(TFA)	1.0 Glu(TCE)	bpy(Ni(COD))	1/50	THF	7.1 : 1.0	140	2.04	24 %
25	Glu(TCE)		NEt ₃	1/30	DMF	---	---	---	49 %
28	1.0 Lys(TFA)	1.0 Glu(TCE)	NEt ₃	1/30	DMF	2.0 : 1	6	1.38	53 %
29	1.0 Lys(TFA)	1.0 Glu(TCE)	NEt ₃	1/30	THF	---	---	---	---
30	1.0 Lys(TFA)	5.0 Glu(TCE)	<i>n</i> -Hexylamin	1/50	DMF	---	---	---	---
31	1.0 Lys(TFA)	5.0 Glu(TCE)	<i>n</i> -Hexylamin	1/50	THF	1 : 15.6	11	1.64	38 %

Tab. 4.7 kann man entnehmen, dass die amin-initiierte Polymerisation nur Oligopeptide mit Molmassen bis maximal 3 kDa in Ausbeuten von maximal 53% liefert. Auch die Verwendung anderer Lösungsmittel (DMAc, Dioxan und Dichlormethan), die Verlängerung der Reaktionslaufzeit von drei auf zehn Tage und die Herabsetzung der Reaktionstemperatur von Raumtemperatur auf 5°C brachte keinen Erfolg. Ein weiteres Problem ist, dass die Zusammensetzung dieser Peptide nicht mit der Zusammensetzung der eingesetzten NCA-Gemische übereinstimmt. Die Kontrolle der Zusammensetzung der Peptidketten ist aber notwendig, da durch den Anteil des N_ϵ -Trifluoracetyl-L-lysins letztlich die Anzahl der im fertigen Glycopeptid gebundenen Kohlenhydrate festgelegt wird.

Die mangelnde Reaktionskontrolle bei der Polymerisation des Glu(TCE)-NCAs **11** zeigt sich auch bei der mit Triethylamin initiierten Synthese des Homopoly[γ -(2,2,2-trichlorethyl)-L-glutamat]s **25**. Das in Abb. 4.6 gezeigte GPC-Elugramm des Polypeptids zeigt, dass es sich bei dem erhaltenen Produkt nicht um ein einheitliches Polypeptid, sondern um ein Gemisch von Polypeptiden unterschiedlicher Molmassen handelt. Die aus der GPC-Messung errechneten Polymerisationsgrade schwanken zwischen 6 und 17000.

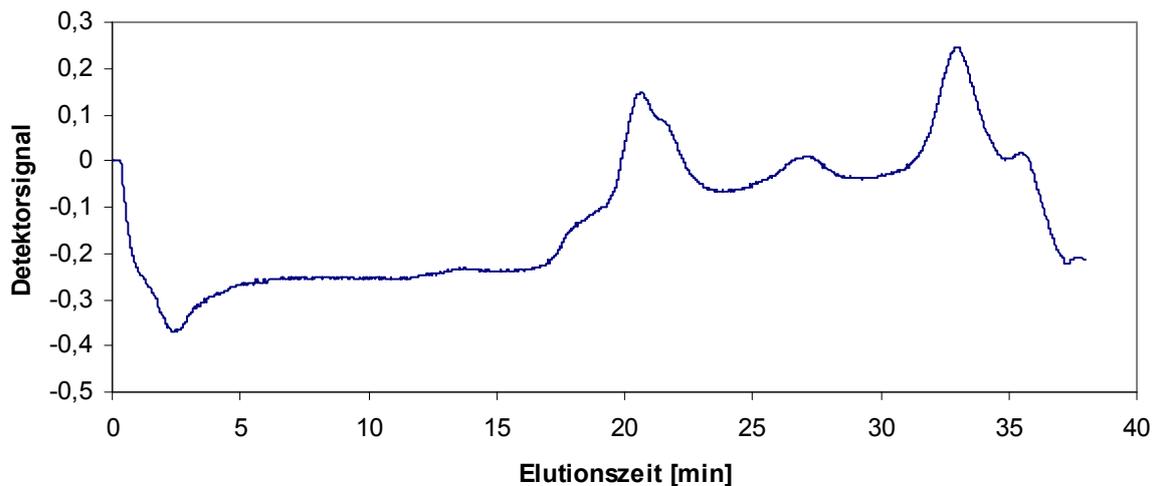
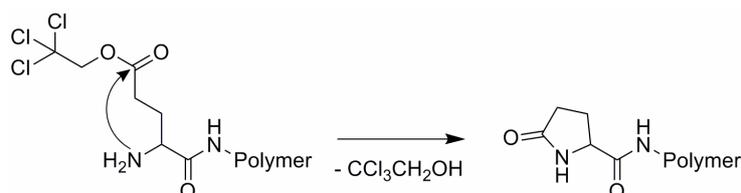


Abbildung 4.6: GPC-Elugramm des Homopoly[γ -(2,2,2-trichlorethyl)-L-glutamat]s **25**. Die Probe wurde in einer Konzentration von 3 mg/ml in DMAc aufgegeben und mit einem RI-Detektor detektiert.

Die Probleme bei der amin-initiierten Polymerisation von Glu(TCE)-NCA **11** beruhen wahrscheinlich auf der in Schema 4.9 dargestellten Nebenreaktion. Im Vergleich zu gebräuchlichen stabilen Schutzgruppen begünstigt die hohe Reaktivität des 2,2,2-Trichlorethylesters die nucleophile Substitution von Trichlorethanol, welche den Abbruch des Kettenwachstums zur Folge hat.



Schema 4.9: Kettenabbruch durch intramolekulare nucleophile Substitution

Dies zeigte sich bereits bei der Synthese von Glu(TCE)-NCA, bei der das Problem auftrat, dass die Trichlorethyl-Reste leicht durch andere Alkohole substituiert wurden. Amine sind daher keine geeigneten Initiatoren für die Synthese hochmolekularer Polypeptide auf Basis von Glu(TCE)-NCA **11**.

Durch den Einsatz von Nickel(0)-Initiatoren kann diese Nebenreaktion vermieden werden. Unter Verwendung von bpyNi(COD) als Initiator gelang daher die Synthese von langkettigem Poly[γ -(2,2,2-trichlorethyl)-L-glutamat].

Die Polymerisationsgrade der erhaltenen Homopoly[γ -(2,2,2-trichlorethyl)-L-glutamat]e entsprechen dem 1.5- (**16**) bzw. 1.7-fachen (**17**) I/M-Verhältnis. Die Verwendung von THF als Lösungsmittel führte also, wie erwartet, zur Bildung von Polypeptidketten, deren Länge die nach dem I/M-Verhältnis zu erwartende Kettenlänge übertrifft. Die Kettenlänge der Polyglutamate **16** und **17** beträgt dennoch nur einen Bruchteil der Kettenlänge des auf gleichem Weg synthetisierten Polylysins **14**, dessen Polymerisationsgrad annähernd dem 10-fachen I/M-Verhältnis entspricht.

Auch die im GPC-Elugramm von **16** ersichtliche Uneinheitlichkeit der Polyglutamatketten (Abb. 4.7), deutet bei der bpyNi(COD)-initiierten Polymerisation des Glu(TCE)-NCA **11** auf eine geringe Reaktionskontrolle hin.

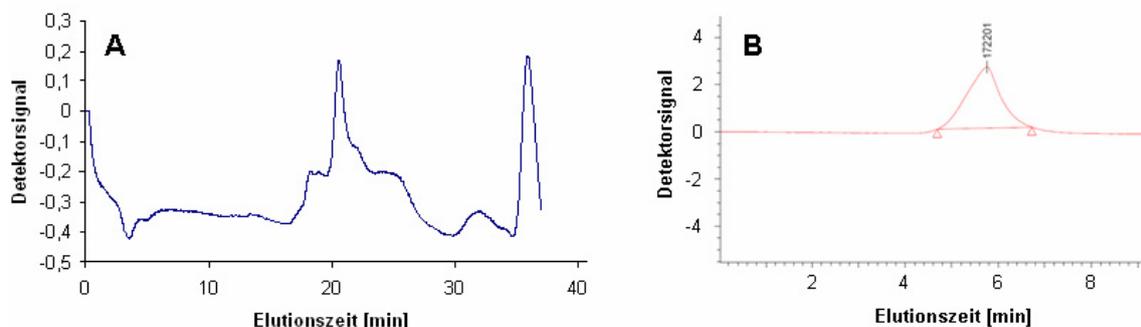


Abbildung 4.7: **A)** GPC-Elugramm von Homopoly[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat] **16**. Die Probe wurde in einer Konzentration von 3 mg/ml in DMAc aufgegeben und mit einem RI-Detektor detektiert. **B)** GPC-Elugramm von Homopoly(N_ϵ -trifluoracetyl-L-lysin) **14**. Die Probe wurde in einer Konzentration von 3 mg/ml in THF aufgegeben und mit einem RI-Detektor detektiert.

Um zwei geeignete Copolypeptide für die Glycosylierung zu erhalten, wurden die NCAs **11** und **6** im Verhältnis von 5:1 und 8:1 gemischt und mit bpyNi(COD) in THF polymerisiert. Problematisch ist hierbei der bei der Synthese der Homopolypeptide **14**, **16** und **17** offenbarte Unterschied im Polymerisationsverhalten der NCAs **6** und **11**. Dieser Unterschied der Polymerisierbarkeit der beiden NCAs könnte dazu führen, dass die tatsächliche Zusammensetzung des synthetisierten Polypeptids von der beabsichtigten abweicht. Um die Korrelation zwischen der Zusammensetzung der in die Polymerisation eingesetzten NCA-Gemische und der Zusammensetzung der erhaltenen Polypeptide zu untersuchen, wurde zusätzlich das überwiegend aus N_ϵ -Trifluoracetyl-L-lysin aufgebaute Copolypeptid **23** synthetisiert. Hierzu wurde ein Gemisch der NCAs **39** und **6** im Verhältnis 1:8 unter den gleichen Reaktionsbedingungen polymerisiert, die auch zur Synthese der Copolypeptide **21** und **22** verwendet wurden.

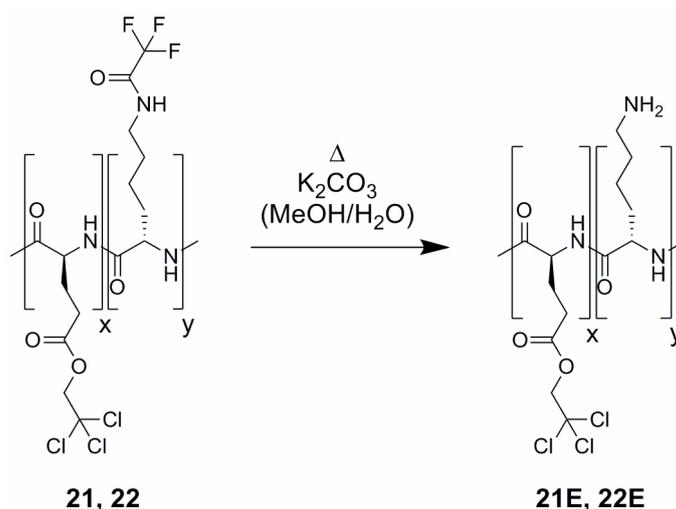
Die in Tab. 4.7 zusammengefassten Ergebnisse der durchgeführten Polymerisationen zeigen, dass die aus den NMR-Spektren berechnete Zusammensetzung der syntheti-

sierten Polypeptide **21-23** gut mit dem eingesetzten Verhältnis der NCAs **6** und **11** korreliert.

Der Einsatz von $\text{bpyNi}(\text{COD})$ führt also im Gegensatz zu *n*-Hexylamin und Triethylamin zu definierten Polypeptiden mit gut kontrollierbarer Zusammensetzung.

4.5 Polymeranaloge Glycosylierung

Um die Glycosylierung der synthetisierten Polypeptide zu ermöglichen, müssen zuerst die für die Anknüpfung der Kohlenhydratmoleküle vorgesehenen Aminogruppen entschützt werden. Die selektive Abspaltung der TFA-Schutzgruppen erfolgte mit Kaliumcarbonat bei 80°C (Schema 4.10).^[146, 149]



Schema 4.10: Abspaltung der TFA-Schutzgruppen von Poly[Glu(TCE)-*co*-Lys(TFA)] mit Kaliumcarbonat bei 80°C

Die erhaltenen teilentschützten Polypeptide **21E** und **22E** waren jedoch in allen gebräuchlichen Lösungsmitteln vollkommen unlöslich. Auch die Verwendung stärkerer nicht nucleophiler Basen, wie DIPEA oder Triethylamin, welche die Abspaltung der TFA-Schutzgruppe bereits bei Raumtemperatur ermöglichen, führte zu unlöslichen Polypeptiden. Die schlechte Löslichkeit erklärt sich durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den freien Aminogruppen des Lysins und den Carbonylgruppen der Glutamatreste. Wegen der Unlöslichkeit der Produkte konnte der

Erfolg der Reaktion nicht mittels NMR-Spektroskopie überprüft werden. Die erfolgreiche Abspaltung der TFA-Schutzgruppe zeigte sich lediglich im IR-Spektrum. Hier fehlte die für die Carbonylgruppe des Trifluoracetylamids charakteristische Bande bei 1725 cm^{-1} .

4.6 Zusammenfassung

Zur Synthese der NCAs wurden verschiedene geschützte Aminosäuren mit Triphosgen umgesetzt. Die Fuchs-Farthing-Methode lieferte die literaturbekannten NCAs **6-10** und **12** in Ausbeuten zwischen 56% und 85%. Glu(TCE)-NCA **11** und Gln(Trt)-NCA **13** konnten über zweistufige Synthesen in Overall-Ausbeuten von 35% und 70% synthetisiert werden.

Die bpyNi(COD)-initiierte Polymerisation dieser NCAs lieferte Homo- und Copolypeptide mit Molmassen zwischen 10 kDa und 560 kDa. Auch die Zusammensetzungen der statistischen Copolypeptide **19-23** sowie der Diblockcopolypeptide **32-35** stimmen gut mit den Zusammensetzungen der eingesetzten NCA-Gemische überein.

Die für die polymeranaloge Glycosylierung vorgesehenen Copolypeptide waren jedoch nach der partiellen Abspaltung ihrer Schutzgruppen vollständig unlöslich in allen gebräuchlichen Lösungsmitteln und konnten daher nicht mit Kohlenhydraten funktionalisiert werden.

Die Synthesestrategie wasserlösliche Glycopeptide durch Glycosylierung von Polypeptiden auf Glutaminbasis darzustellen, war also wegen der fehlenden Kontrolle des Polymerisationsgrades, der geringen Ausbeute sowie der anhaltenden Probleme bei der Löslichkeit der Polypeptide nicht erfolgreich.

5 Synthese von Glycopeptiden durch Polymerisation kohlenhydrat-funktionalisierter NCAs

5.1 Einleitung

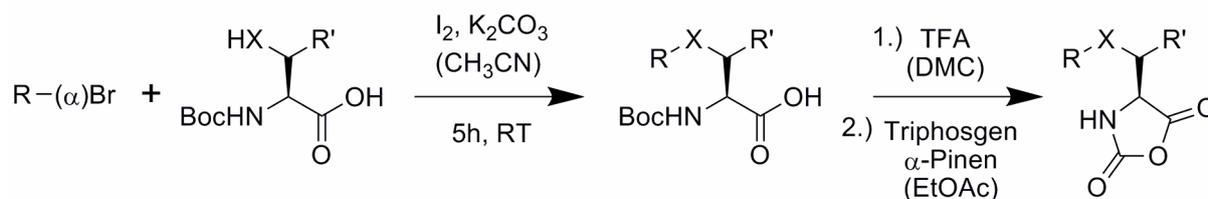
Eine in Chemie und Biowissenschaften weit verbreitete Methode um die Wasserlöslichkeit synthetischer Polymere zu erhöhen, ist die Anknüpfung von Polyethylenglycol (PEG) an ein Ende der Polymerkette.^[150-154] Der Einsatz von PEG-haltigen Blockcopolymeren hat sich besonders bei der Herstellung von Wirkstofftransportsystemen bewährt,^[154-156] da PEG biologisch verträglich ist, lange Zeit ohne Degradation im Blutstrom zirkulieren kann und nicht immunogen ist.^[74, 154]

Die Herstellung solcher Blockcopolymerer erfolgt gewöhnlich durch Anpfropfen langer linearer PEG-Ketten an fertige Polypeptide bzw. Proteine.^[157, 158] Der Peptidblock kann aber auch ausgehend vom Ende des PEGs sukzessive aufgebaut werden. Hierzu werden α -Amino-Polyethylenglycol- ω -Methylether als Makroinitiatoren für die ringöffnende Polymerisation von NCAs eingesetzt.^[159, 160] Die erstaunliche Eigenschaft des PEGs sowohl in Wasser, als auch in den meisten organischen Lösungsmitteln hervorragend löslich zu sein, wirkt sich auch positiv auf den Polymerisationsverlauf aus. Während der Polymerisation hält der PEG-Block die wachsende Peptidkette in Lösung, wodurch eine vollständige Umsetzung der NCAs und niedrige PDs erreicht werden. Ein Problem bei der Anknüpfung langer PEG-Ketten an hydrophobe Peptidblöcke ist aber, dass dadurch die Sekundärstruktur der Peptide verändert^[161] und die Peptide gegen die Erkennung durch biologische Rezeptoren abgeschirmt werden. Außerdem neigen die gebildeten amphiphilen Copolymerer zur Micellenbildung.^[159]

Ein anderer Weg um die erstaunliche Solubilität von PEG auf Polypeptide zu übertragen wurde von MIAOER YU *et al.* beschrieben.^[74] Anstatt eine lange PEG-Kette an das Ende der Polypeptidkette zu binden, versahen sie jedes Aminosäure-Monomer mit einer kurzen Ethylenglycol-Einheit. Die erhaltenen mono- und diethylenglycolmonomethylether-funktionalisierten Lysin-NCAs wurden mit Übergangsmetall-Initiatoren polymerisiert. Auf diese Weise erhielten sie nicht nur wasserlösliche Polypeptide, sondern umgingen auch den Einsatz sehr teurer monofunktionalisierter Poly-

thylenglycole. Die vielen kurzen Diethylenglycol-Reste erzeugen eine hohe Ethylenglycoldichte rings um die Polypeptidkette, die das Polypeptid vor dem Abbau durch Proteasen schützt, ohne seine Sekundärstruktur zu verändern.^[74, 162] Analysen mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie zeigten, dass die Polypeptide in einem pH-Bereich von 2-12 eine vollständig α -helicale Sekundärstruktur aufweisen.^[74]

Der Einbau der Kohlenhydrate soll durch die Verwendung geeigneter kohlenhydrat-funktionalisierter NCAs als Cobausteine erfolgen. Wie bereits erwähnt wurde, ist die Auswahl an literaturbekannten kohlenhydrat-tragenden NCAs sehr begrenzt. Neben der bereits 1966 von ERWIN RÜDE *et al.* beschriebenen Synthese von *O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-L-serin-*N*-carboxyanhydrid gibt es nur eine weitere publizierte Syntheseroute zur Darstellung kohlenhydrat-funktionalisierter NCAs. In dieser von MATTHEW I. GIBSON *et al.* publizierten Methode erfolgte die Glycosylierung der Aminosäuren durch die Umsetzung von N_{α} -Boc-geschützten Aminosäuren mit peracetylierten 1-Brom- α -Pyranosen (R-(α)Br) in Gegenwart von Iod.^[122, 163] Hierdurch konnten sie auf den nicht mehr zeitgemäßen Einsatz des giftigen Quecksilbercyanids verzichten, der für die von RÜDE durchgeführte Koenigs-Knorr Reaktion erforderlich ist.



Schema 5.1: Synthese von kohlenhydrat-funktionalisierten Aminosäure-*N*-carboxyanhydriden nach MATTHEW I. GIBSON *et al.* (R: verschiedene peracetylierte Zucker, R': H oder CH₃, X: O oder S).^[122]

Nach der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurden die erhaltenen *O*- und *S*-glycosylierten Aminosäuren, durch Umsetzung mit Triphosgen, in die entsprechenden NCAs überführt. Die Overall-Ausbeute der in Schema 5.1 dargestellten dreistufigen Synthese lag je nach Zucker zwischen 12% und 30%. Die Homopolypeptide der von

MATTHEW I. GIBSON *et al.* zur Synthese der kohlenhydrat-funktionalisierten NCAs verwendeten α -Aminosäuren Serin, Threonin und Cystein gehören jedoch alle zur Gruppe ausschließlich β -Faltblattstrukturen bildender Polyaminosäuren.^[20] Folglich sind die von GIBSON *et al.* dargestellten NCAs für die Synthese langkettiger Glycopeptide durch NCA-Polymerisation nicht geeignet.

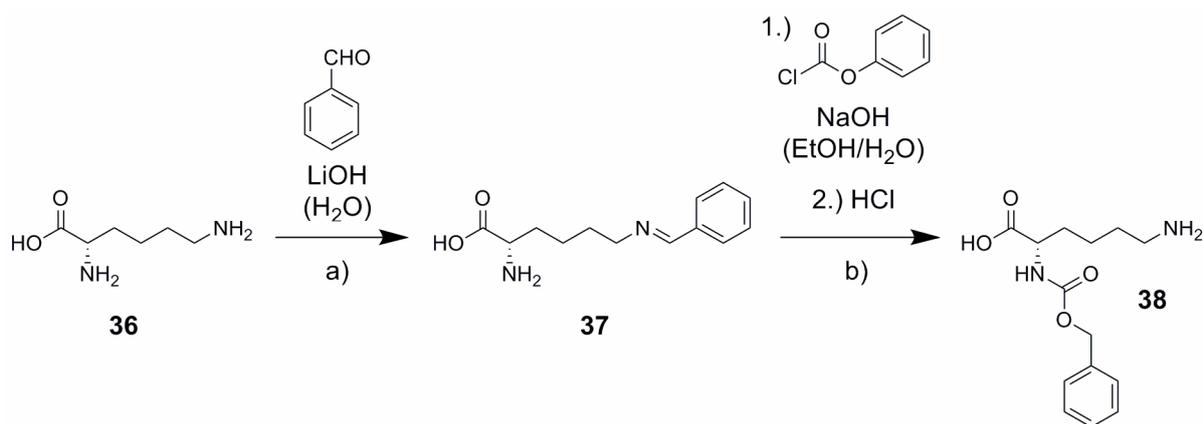
Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zwei Syntheserouten entwickelt, welche die Darstellung von kohlenhydrat-funktionalisierten NCAs auf Basis der gut polymerisierbaren Aminosäure L-Lysin ermöglichen. Um einen gleichmäßigen Einbau der kohlenhydrat-funktionalisierten Aminosäuren in die Polylysin-Kette zu gewährleisten, muss die Reaktivität dieser kohlenhydrat-funktionalisierten NCAs mit der Reaktivität des als Coabaustein verwendeten N_ϵ -(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysin-NCA (Lys(DEG)-NCA) **43** übereinstimmen. Stark differierende Reaktivitäten haben unterschiedliche Einbaugeschwindigkeiten zur Folge, so dass anstelle von statistischen Copolymeren Multiblockcopolymeren erhalten werden und die Zusammensetzungen der Polypeptide von den Zusammensetzungen der eingesetzten NCA-Gemische abweichen können.^[20] Letzteres Problem wurde bereits bei der Synthese von Poly{[γ -(2,2,2-trichlorethyl)-L-glutamat]-*co*-[N_ϵ -trifluoracetyl-L-lysin]} **28** und **31** beschrieben.

Daher wurde für die Synthese der kohlenhydrat-funktionalisierten NCAs **56a-c** ebenfalls Lysin verwendet, welches von Yu *et al.* auch bei der Synthese von Lys(DEG)-NCA **43** verwendet wurde. Die Verwendung von Lysin hat außerdem den Vorteil, dass es die α -helicale Struktur des restlichen Polypeptids nicht stört.

5.2 Synthese der Monomere

Für die Herstellung kohlenhydrat-funktionalisierter Lysin-NCAs müssen die Kohlenhydratmoleküle regioselektiv an die ϵ -Aminogruppe des Lysins gebunden werden. Hierzu benötigt man Lysinderivate mit freien ϵ - und geschützten α -Aminogruppe. Als Schutzgruppen bieten sich vor allen Boc und Z an, da sich die entsprechend geschützten Aminosäuren mit Dichlormethylmethylether direkt in ihre NCAs überführen lassen.

Obwohl N_{α} -*tert.*-Butyloxycarbonyl-L-Lysin (Boc-Lys-OH) **39** und N_{α} -Benzyloxycarbonyl-L-Lysin (Z-Lys-OH) **38** kommerziell erhältlich sind, wurde auch ein Syntheseweg (Schema 5.2) erprobt, um Z-Lys-OH **38**, in Anlehnung an eine von AIMEE BENCE und PETER CROOKS veröffentlichte Vorschrift zur regioselektiven Schützung von Lysin,^[164] kostengünstig im großen Maßstab zu synthetisieren.

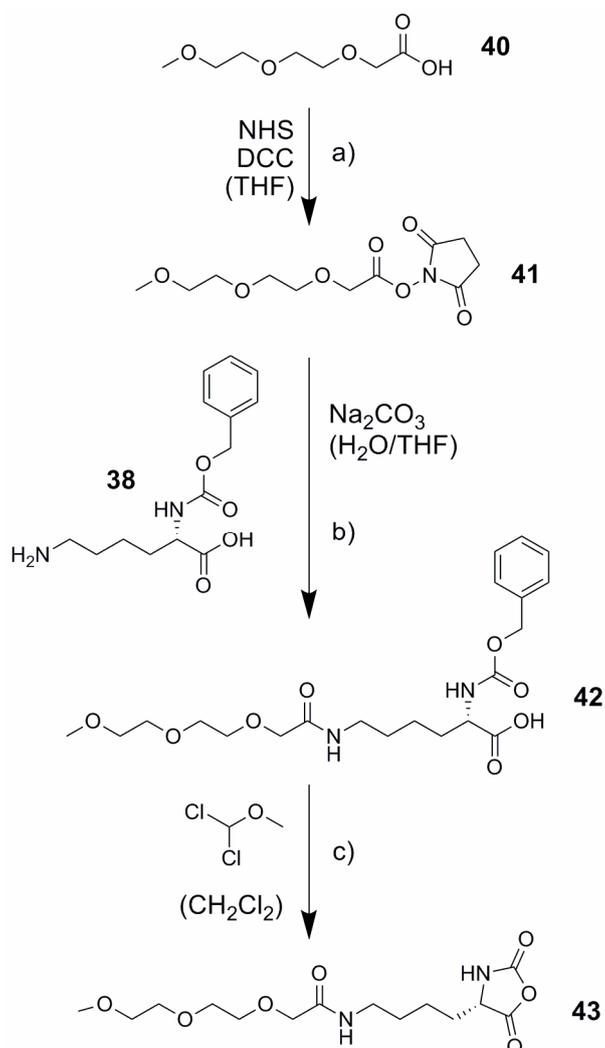


Schema 5.2: Synthese von N_{α} -Benzyloxycarbonyl-L-Lysin **38**. a) regioselektive basenkatalysierte Iminbildung,^[165] b) Z-Schützung mit anschließender saure Hydrolyse des ϵ -Imins.^[164]

Da die selektive Z-Schützung der α -Aminogruppe des L-Lysins **36** nicht möglich ist, musste zunächst die ϵ -Aminogruppe blockiert werden. Hierfür wurde die ϵ -Aminofunktion in wässriger Lithiumhydroxid-Lösung regioselektiv mit Benzaldehyd umgesetzt. Hierbei wurde eine Ausbeute von 42% erzielt. Das erhaltene N_{ϵ} -Benzyliden-L-Lysin **37** kann im ¹H-NMR-Spektrum einfach anhand der charakteristischen Signale der Aromaten-Protonen zwischen 7.09 ppm und 7.51 ppm identifiziert werden. Die freie α -Aminogruppe wird anschließend mit Chlorameisensäurebenzylester umgesetzt. Nach der sauren Hydrolyse des ϵ -Imins erhält man das Z-Lys-OH **38** in einer Ausbeute von 45%. Die erfolgreiche Umsetzung kann man an der Tieffeldverschiebung des Signals des α -Wasserstoffatoms von 3.35 ppm auf 4.01 ppm erkennen. Obwohl wegen der geringen Overall-Ausbeute von 19% noch Optimierungsbedarf besteht, bietet die beschriebene Syntheseroute die Möglichkeit Z-Lys-OH **38** im großen Maßstab darzustellen.

5.2.1 Synthese von diethylenglycol-funktionalisierten NCAs

Die Synthese des N_ϵ -(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysin-NCA (**43**) erfolgte nach der von MIAOER YU *et al.* veröffentlichten dreistufigen Synthesevorschrift (Schema 5.3) ausgehend von 2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]essigsäure **40**.^[74]



Schema 5.3: Darstellung von N_ϵ -(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysin-NCA **43** nach YU *et al.*^[74] a) Aktivierung der Säurefunktion, b) nucleophile Substitution mit Z -Lys-OH **38**, c) NCA-Ringschluss

Zur Aktivierung der Carbonsäurefunktion wurde die 2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]essigsäure **40** mit N -Hydroxysuccinimid (NHS) und N,N' -Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kupplungsreagenz zum N -{2-[2-(2-Methoxy-

ethoxy)ethoxy]acetyl}-oxysuccinimid **41** umgesetzt. Die Reaktion erfolgte bei 0°C in THF und lieferte den Aktivester **41** in annähernd quantitativer Ausbeute. Die Bildung des *N*-Hydroxysuccinimidesters **41** konnte mittels NMR-Spektroskopie durch das Auftreten des charakteristischen breiten Singulets der Succinimid-Protonen bei 12.53 ppm bestätigt werden. Der Aktivester **41** wurde anschließend mit *N*_α-Benzyloxycarbonyl-L-lysin (*Z*-Lys-OH) **38** in Gegenwart von Natriumcarbonat bei 20°C zum *N*_α-Benzyloxycarbonyl-*N*_ε-(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysin (*Z*-Lys(DEG)-OH) **42** umgesetzt. Als Reaktionsmedium wurde ein 1:1 Gemisch aus THF und Wasser verwendet. Die durch das Wasser bedingte teilweise Hydrolyse des Aktivesters wurde zu Gunsten der vollständigen Löslichkeit des *Z*-Lys-OH **38** als Nebenreaktion in Kauf genommen. Obwohl die DC-Analyse die vollständige Umsetzung der Edukte zeigte, konnte nach der von MIAOER YU *et al.* beschriebenen Aufarbeitung nur sehr geringe Mengen des Produkts isoliert werden. Die Extraktion des Lysinderivats **42** mit Ethylacetat gelang erst nachdem der pH-Wert des vom THF befreiten Reaktionsgemischs mit Essigsäure auf pH = 4 angesäuert wurde. Die Herabsetzung des pH-Wertes hat eine Protonierung der Carboxylatgruppe des Lysins **42** zur Folge, wodurch die Löslichkeit von **42** in Ethylacetat verbessert und gleichzeitig die Löslichkeit in Wasser verringert wird. Durch diese Vorgehensweise konnte die Ausbeute auf 74% gesteigert werden. Die Identität und hohe Reinheit des Produktes **42** konnte im Massenspektrum anhand des Molekülpeak $[M+Na]^+$ bei einem *m/z*-Verhältnis von 463.2 Th bestätigt werden. Auch die ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung zeigte die für die Bildung von *Z*-Lys(DEG)-OH **42** erwartete Verschiebung der Signale der α-CH₂-Gruppe des Aktivesters von 4.48 ppm auf 3.97 ppm.

Die Überführung des Lysins **42** in das *N*_ε-(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysin-NCA **43** erfolgte unter Rückfluss mit Dichlormethylmethylether in wasserfreiem Dichlormethan. Die Verwendung von Dichlormethylmethylether ermöglichte die direkte Umsetzung des Lysins **42** ohne vorherige Abspaltung der *Z*-Schutzgruppe. Da der flüssige Dichlormethylmethylether nach der Reaktion leicht abgetrennt werden kann, wurde er im Überschuss (1.5 eq.) eingesetzt. Um die vollständige Umsetzung von **42** zu garantieren, wurden nach ¾ der Reaktionszeit zudem weitere 0.25 eq. Dichlormethylmethylether zugegeben. Eine wässrige Aufarbeitung des NCAs **43** war wegen dessen guter Wasserlöslichkeit nicht möglich. Zur Reinigung wurde das ölige Rohprodukt daher in

wasserfreiem THF gelöst und portionsweise mit *n*-Hexan versetzt, bis sich gerade so eine zweite Phase bildete. Die untere gelbe Phase wurde verworfen. Die obere farblose Phase wurde mit *n*-Hexan verdünnt und zur Auskristallisation des Produktes auf -20°C gekühlt. Hierbei wurde das hochreine Produkt **43** in Form farbloser Nadeln in einer zufrieden stellenden Ausbeute von 74% erhalten.

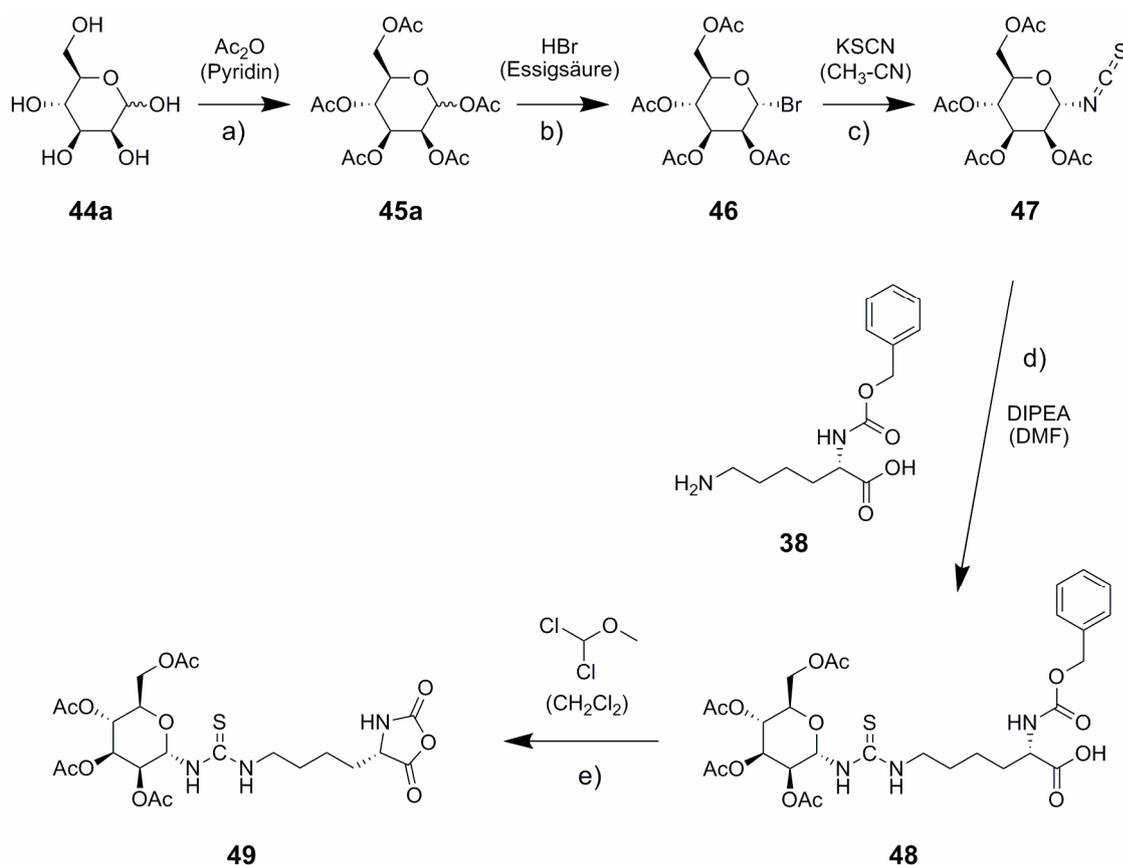
Die schrittweise Zugabe des Dichlormethylmethylethers war für die vollständige Umsetzung des *Z*-Lys(DEG)-OH **42** erforderlich. Wenn die gesamte Menge an Dichlormethylmethylether zu Beginn der Reaktion zugegeben wurde, waren die erhaltenen NCAs stets mit geringen Mengen des Edukts **42** verunreinigt. Die Abtrennung des nicht umgesetzten *Z*-Lys(DEG)-OH **42** war mit einem erheblichen Ausbeuteverlust verbunden und führte in einigen Fällen zur Oligomerisierung der NCAs.

Die Bildung des NCA-Rings spiegelte sich im ¹H-NMR-Spektrum durch die Tieffeldverschiebung des Signals des α -Amino-Protons von 5.71 ppm auf 7.77 ppm wider.

Mit einer Overall-Ausbeute der dreistufigen Synthese von 55% konnte die von MIA-OER YU *et al.* erzielte Gesamtausbeute von 26% mehr als verdoppelt werden.

5.2.2 Synthese von mannose-funktionalisierten NCAs

Die für die Darstellung von N_ϵ -[2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)(1-thio-2-aza-ethyl)]-L-lysin-NCA (Lys(Man-NCS)-NCA) **49** entwickelte Syntheseroute ist in Schema 5.4 skizziert.



Schema 5.4: Syntheseroute zur Darstellung von Lys(Man-NCS)-NCA **49**. a) Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin,^[166] b) nucleophile Substitution mit Bromwasserstoffsäure,^[166] c) nucleophile Substitution mit Kaliumrhodanid,^[167] d) nucleophile Addition von Z-Lys-OH, e) Umsetzung des Z-geschützten Lysins **48** mit Dichlormethylmethylether^[74]

Im ersten Schritt wurden die Hydroxy-Gruppen der Mannose **44a** mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert.^[166] Die Zusammensetzung des erhaltenen Anomerengemischs von α -Anomer/ β -Anomer = 2.1:1 konnte aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum abgeleitet werden. Das Dublett bei 6.05 ppm kann hierbei mit Hilfe der Karplus-Gleichung, anhand seiner größeren ^3J -Kopplungskonstanten, dem Anomeren-Proton des α -Anomers zugeordnet werden.

Die Umsetzung von **45a** mit Bromwasserstoffsäure in Essigsäure bei 0°C liefert die 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-Brom- α -D-mannose **46** in einer Ausbeute von 93%.^[166, 168] Wegen der Nachbargruppenbeteiligung der Acetyl-Gruppe in Position 2 wird hierbei ausschließlich das α -Anomer gebildet.^[169, 170] Im ¹H-NMR-Spektrum zeigt sich die Umsetzung an der Tieffeldverschiebung des Signals des Anomeren-Protons auf 6.29 ppm.

Die nucleophile Substitution des Broms mit Kaliumrhodanid lieferte schließlich den fertigen Glycosyldonor **47** in einer Ausbeute von 79%.^[167] Die Bildung der 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-isothiocyanato- α -D-mannose **47** kann anhand der Verschiebung des Signals des Anomeren-Protons auf 5.54 ppm im ¹H-NMR-Spektrum und der charakteristischen Bande der Isothiocyanat Valenzschwingung bei 2068 cm⁻¹ im IR-Spektrum bestätigt werden.

*N*_ε-(2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-ethyl))-*N*_α-(benzyloxycarbonyl)-L-lysin (Z-Lys(Man-NCS)-OH) **48** lässt sich durch Umsetzung von **47** mit *N*_α-Benzyloxycarbonyl-L-lysin (Z-Lys-OH) **38** in Gegenwart von *N,N*-Diisopropyl-Ethylamin (DIPEA) in einer Ausbeute von 32% gewinnen. Der durch den nucleophilen Angriff der *N*_ε-Aminogruppe des Lysins auf den Kohlenstoff des Isothiocyanats gebildete Thioharnstoff verbindet hierbei die Lysinseitenkette mit dem anomeren Kohlenstoff der 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-mannose. Diese Bindung hat gegenüber den natürlichen *O*- und *N*-glycosidischen Bindungen den Vorteil, dass sie weder säure- noch basenlabil ist. Die Bildung von **48** zeigt sich im ¹³C-NMR-Spektrum am Auftreten des für Thioharnstoffgruppe typischen Kohlenstoffsignals bei 211.63 ppm.

In ihrer Arbeit über die Darstellung *O*- und *S*-glycosylierter NCAs berichten MATTHEW I. GIBSON *et al.*, dass die Phosgenierung der von ihnen synthetisierten kohlenhydrat-funktionalisierten Aminosäuren mit Triphosgen nicht ohne vorherige Entschützung der α -Aminogruppe möglich war.^[122] Auch die erzielten Ausbeuten von 26 % bis maximal 51 % sind nicht zufriedenstellend. Wie bei der Synthese von Lys(DEG)-NCA **43** gezeigt werden konnte, ermöglicht die Verwendung von Dichlormethylmethylester jedoch die direkte Umsetzung von *N*_α-geschützten Lysinderivaten zu den entsprechenden NCAs in guten Ausbeuten, ohne vorherige Abspaltung der Boc- bzw. Z-

Schutzgruppen. Bei der analogen Umsetzung der kohlenhydrat-funktionalisierten Aminosäure **48** wird der Dichlormethylmethylester im 2.5-fachen Überschuss eingesetzt. Da das gebildete Lys(Man-NCS)-NCA **49** nicht in Wasser löslich ist, kann hier anstelle der Umkristallisation wieder auf die, aus der allgemeinen Synthesevorschrift auf Seite 34 bekannte, wässrige Aufarbeitung mit Natriumhydrogencarbonat zurückgegriffen werden. Ein solcher Reinigungsschritt wird auch von MATTHEW I. GIBSON *et al.* empfohlen, wurde aber in der von ihnen veröffentlichten Arbeit nicht unternommen.^[122]

Auf diese Weise erhält man das pulverförmige NCA **49** in einer Ausbeute von 35%. Die Bildung des NCA-Rings konnte anhand des dafür charakteristischen Signals des Urethan-Kohlenstoffs bei 151.89 ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum bestätigt werden.

Für die in Schema 5.4 skizzierte fünfstufige Syntheseroute konnte somit eine Overall-Ausbeute von 7.5% erzielt werden.

5.2.3 Synthese von kohlenhydrat-funktionalisierten NCAs

Bei der Synthese von statistischen Copolypeptiden mit hohem Lys(DEG)-Gehalt muss beachtet werden, dass die 3,6,9-Trioxa-decanoyl-Reste dieses Bausteins rings um das Rückgrat der Polypeptidkette eine Hülle bilden (Abb. 5.1).

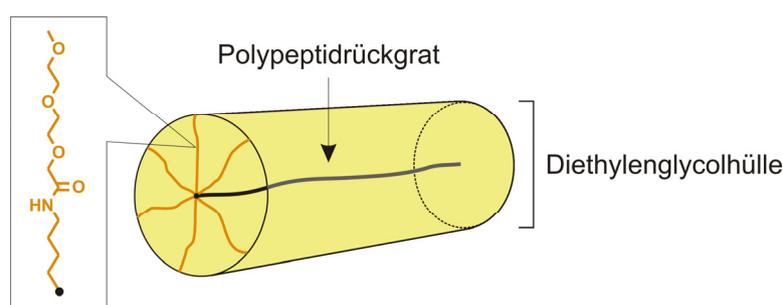


Abbildung 5.1: Abschirmung des Polypeptids durch die gebildete Diethylenglycolhülle

Hierdurch werden alle Liganden, die einen zu geringen Abstand zum Polypeptidrückgrat haben, vor einer Erkennung durch biologische Rezeptoren abgeschirmt. Daher wurde der Abstand zwischen dem gebundenen Zucker und der Peptidkette gemäß Abb. 5.2 im Vergleich zu Lys(Man-NCS)-NCA **49** um eine Diethylenglycoleinheit verlängert.

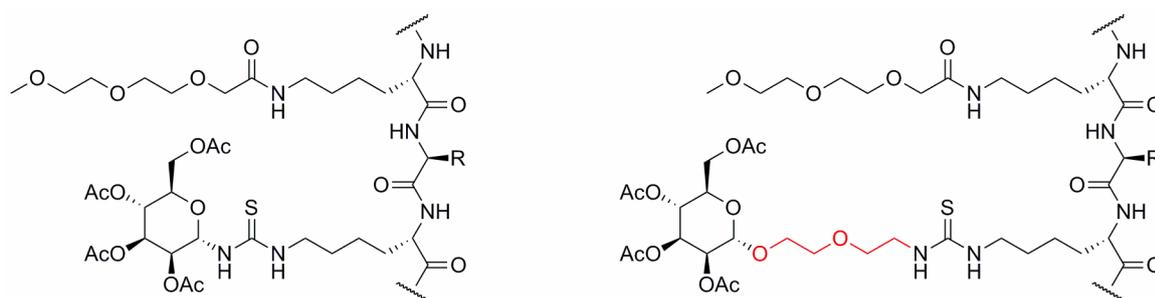


Abbildung 5.2: Vergrößerung des Abstandes zwischen Peptidrückgrat und Kohlenhydrat

Die für die Synthese der entsprechenden kohlenhydrat-funktionalisierten Lysin-NCAs erarbeitete sechsstufige Syntheseroute ist in Schema 5.5 exemplarisch für N_ϵ -(8-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl))-L-lysin-NCA (Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-NCA) **56a** skizziert. Zur Optimierung der NCA-Bildung wurden zwei verschiedene Syntheserouten mit unterschiedlichen Lysinderivaten getestet. Hierbei wurde neben dem bereits zur Synthese von Lys(Man-NCS)-NCA **49** und Lys(DEG)-NCA **43** eingesetzten *Z*-geschützten *Z*-Lys-OH **38** (Syntheschema rechts) auch das Boc-geschützte Pendant (Boc-Lys-OH) **39** (Syntheschema links) glycosyliert.

Um die Zuckerspezifität biologischer Rezeptoren untersuchen zu können, wurden neben Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)NCA **56a** auch die entsprechenden 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-Glucose und 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-Galactose tragenden NCAs **56b** (Glucose) und **56c** (Galactose) synthetisiert (Abb.5.3).

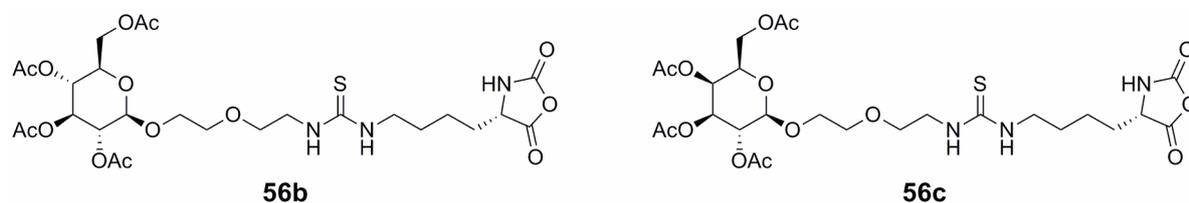
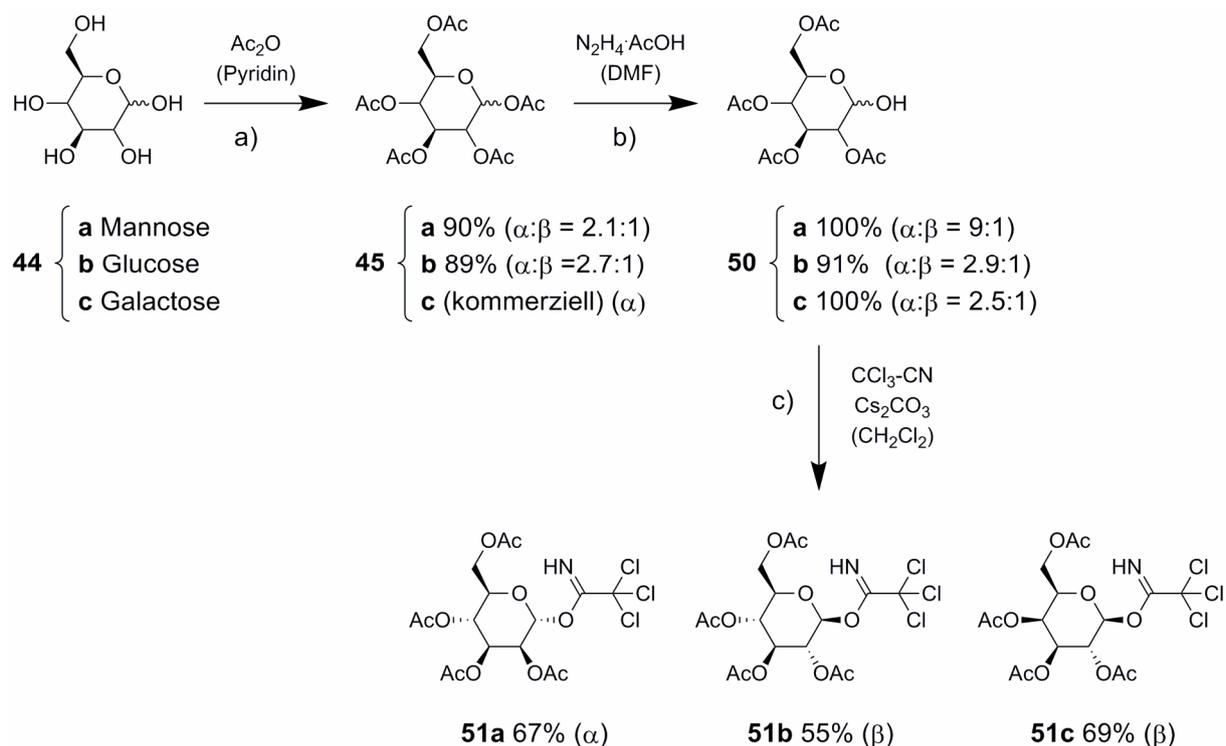


Abbildung 5.3: Strukturen von Lys(Ac₄Glc(EO)₂NCS)-NCA) **56b** und Lys(Ac₄Gal(EO)₂NCS)-NCA) **56c**

Zuerst wurden die Kohlenhydrate über die in Schema 5.6 dargestellte, literaturbekannte dreistufige Synthese in die jeweiligen Trichloracetimidate **51a-c** überführt.^[171]



Schema 5.6: Synthese der 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-trichloracetimidato- α -D-pyranosen **51a-c**.^[171] a) Acetylierung der Hydroxy-gruppen, b) regioselektive Deacetylierung der anomeren Hydroxy-Gruppe, c) basenkatalysierte nucleophile Addition von **50a-c**

Im ersten Schritt wurden alle Hydroxy-Gruppen der Zucker mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert. Bei Galactose entfiel dieser Schritt, da die kommerziell erhältliche 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- α -D-Galactose **45c** als Ausgangsstoff für die Synthese von **56c** diente. Die anomere Hydroxy-Gruppe wurde anschließend mit Hydrazinacetat in DMF bei 50°C regioselektiv deacetyliert.^[171]

Zur Aktivierung der anomeren Hydroxy-Gruppe wurde diese schließlich in Gegenwart von Cäsiumcarbonat in wasserfreiem Dichlormethan mit Trichloracetonitril zum Trichloracetimidat umgesetzt. In den ^{13}C -NMR-Spektren der Produkte **51a-c** zeigen die einzelnen Signale der anomeren Kohlenstoffatome bei 94.46 ppm (**51a**), 92.89 ppm (**51b**) und 93.51 ppm (**51c**), dass jeweils ausschließlich ein Anomer gebildet wurde. Die Bildung der anomerenreinen Trichloracetimide **51a-c** lässt sich anhand des Reaktionsmechanismus erklären. Sie beruht auf der Nachbargruppenbeteiligung der Acetyl-Gruppe in Position 2.^[169]

Die Zusammensetzungen der Anomerengemische wurden aus den ^1H -NMR-Spektren abgeleitet. Mit Hilfe der Karplus-Gleichung können die Dubletts der Protonen der Position 1, anhand ihrer ^3J -Kopplungskonstanten, den jeweiligen Anomeren zugeordnet werden.^[172] Hierbei zeichnen sich bei Mannose die α -Anomere, bei Glucose (Abb. 5.4) und Galactose hingegen die β -Anomere durch eine größere ^3J -Kopplungskonstante aus.

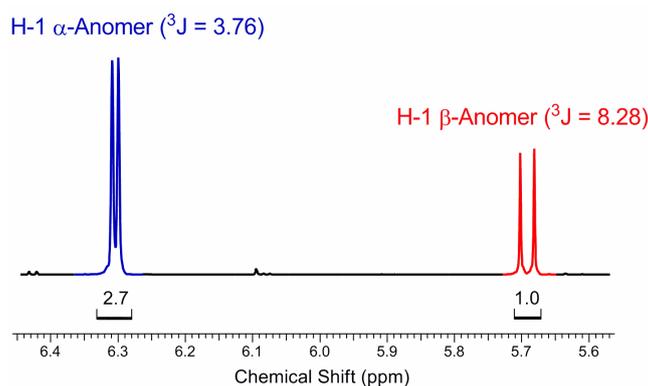
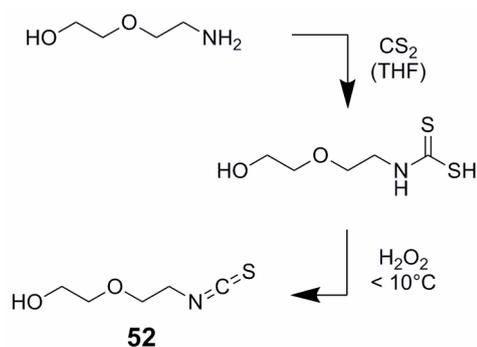


Abbildung 5.4: ^3J -Kopplungskonstanten der Anomerensignale von 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-glucopyranose **45b** im ^1H -NMR-Spektrum, aufgenommen in CDCl_3 . Die Zahlen unter den Anomerensignalen stellen die Integrationen der entsprechenden Signalflächen dar.

Die Darstellung von 2-(2-Isothiocyanatoethoxy)ethanol ((EO)₂NCS) **52** sollte nach einer von H. TAJIMA und G. LI veröffentlichten Synthesevorschrift erfolgen.^[173] Zunächst wurde 2-(2-Hydroxyethoxy)ethylamin gemäß Abb. 5.7 in Gegenwart von Triethylamin mit Schwefelkohlenstoff zum 2-(2-hydroxyethoxy)ethyldithiocarbamat umgesetzt.

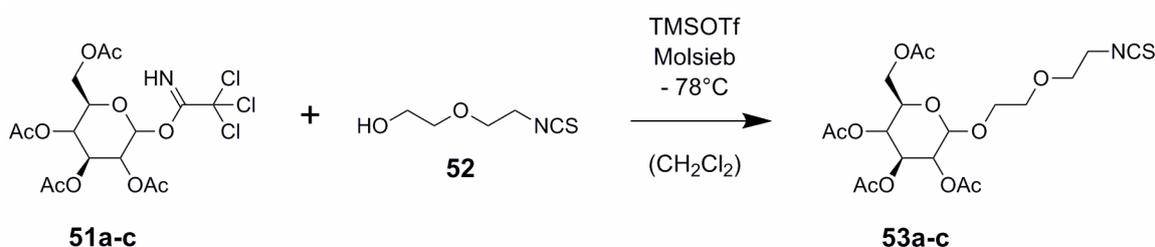
Die Dehydrosulfurierung des Dithiocarbamats erfolgte anschließend mit Wasserstoffperoxid unter ständiger Kühlung. Bei der anschließenden Aufkonzentrierung zersetzte sich das Produkt allerdings schlagartig in einer stark exothermen Reaktion unter Bildung von Schwefel. Um dies zu vermeiden, musste das angesäuerte Reaktionsgemisch, entgegen der publizierten Synthesanleitung,^[173] vor dem Abdestillieren des organischen



Schema 5.7: Synthesen von 2-(2-Isothiocyanatoethoxy)ethanol **52**

Lösungsmittels mit Wasser verdünnt werden. Nach der säulenchromatographischen Reinigung wurde das 2-(2-Isothiocyanatoethoxy)ethanol **52** in einer Ausbeute von 79% erhalten. Im IR-Spektrum beweist das Vorhandensein der charakteristischen NCS-Valenzschwingungsbande bei 2084 cm^{-1} , dass die Umsetzung zum 2-(2-Isothiocyanatoethoxy)ethanol **52** erfolgreiche war.

Im nächsten Schritt wurden die Trichloracetimidate **51a-c** in wasserfreiem Dichlormethan mit **52** zu den entsprechenden 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-*O*-(5-isothiocyanato-3-oxapentyl)-pyranosen **53a-c** umgesetzt. Diese in Schema 5.8 dargestellte Acetalbildung erfordert aber zusätzlich den Einsatz einer Lewissäure.



Schema 5.8: TMSOTf-katalysierte Acetalbildung.

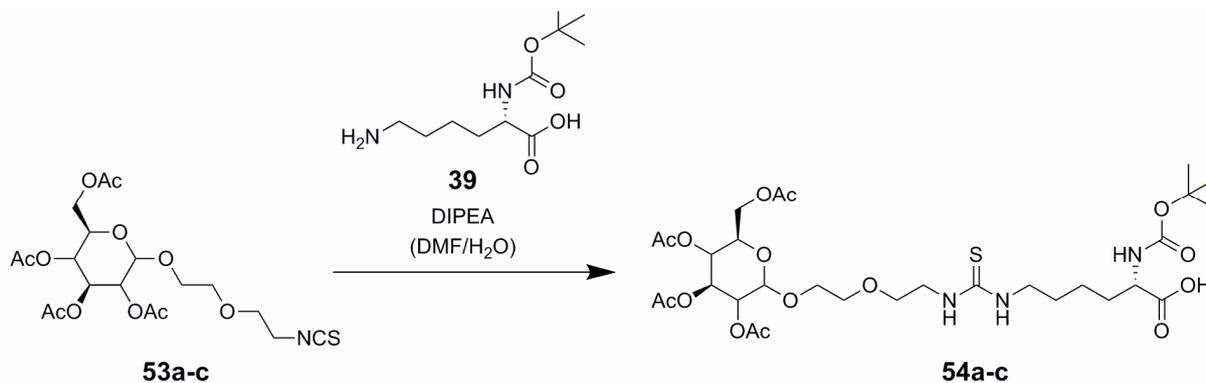
In der Literatur wird hierfür entweder Bortrifluorid-ethyletherat ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$)^[174] oder Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf)^[175] verwendet. Die durch $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ katalysierte Reaktion kann bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Der Einsatz von TMSOTf erfordert hingegen, dass das Reaktionsgemisch, vor der Zugabe der Lewis-säure auf -78°C gekühlt wird. Die Verbindungen **53a-c** wurden analog zu beiden Literaturvorschriften synthetisiert. Dabei hat sich herausgestellt, dass unter Verwendung von TMSOTf doppelt so hohe Ausbeuten erzielt werden können wie unter Verwendung von $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Die Erklärung hierfür lieferte eine dünnschichtchromatographische Untersuchung der erhaltenen Produkte, die zeigte, dass bei der $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ -katalysierten Umsetzung etliche Nebenprodukte gebildet wurden. Die Ausbeuten der, wegen der Nachbargruppenbeteiligung der Acetylgruppe in Position 2, anomereren säulenchromatographisch gereinigten Acetale sind in Tab. 5.1 zusammengefasst. Die Anknüpfung von **52** konnte anhand der, im Vergleich zu den jeweiligen Trichloracetimidaten, hochfeldverschobenen Anomerensignale nachgewiesen und durch Massenspektrometrie bestätigt werden. Die Identifizierung der erhaltenen Anomere erfolgte abermals anhand der großen ^3J -Kopplungskonstanten der Anomerensignale in den ^1H -NMR-Spektren.

Tabelle 5.1: Ausbeuten der $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ - und TMSOTf -katalysierten Synthese der 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-*O*-(5-isothiocyanato-3-oxapentyl)-pyranosen **53a-c** im Vergleich.

Zucker	Lewisäure	Anomer	Ausbeute
$\text{Ac}_4\text{Man}(\text{EO})_2\text{NCS}$ 53a	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	α	30 %
$\text{Ac}_4\text{Glc}(\text{EO})_2\text{NCS}$ 53b	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	β	51 %
$\text{Ac}_4\text{Gal}(\text{EO})_2\text{NCS}$ 53c	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	β	23 %
$\text{Ac}_4\text{Man}(\text{EO})_2\text{NCS}$ 53a	TMSOTf	α	70 %
$\text{Ac}_4\text{Glc}(\text{EO})_2\text{NCS}$ 53b	TMSOTf	β	67 %
$\text{Ac}_4\text{Gal}(\text{EO})_2\text{NCS}$ 53c	TMSOTf	β	74 %

Die Glycosylierung der Lysinbausteine erfolgt durch Umsetzung der Glycosyldonoren **53a-c** mit N_α -(Benzyloxycarbonyl)-L-lysin (Boc-Lys-OH) **39** in Gegenwart von DI-

PEA in DMF (Schema 5.9). Wegen der Unlöslichkeit der Aminosäure **39** in organischen Lösungsmitteln war die Zugabe von Wasser erforderlich. Die daraus resultierende teilweise Hydrolyse der Isothiocyanat-Gruppen der Pyranosen **53a-c** wurde zu Gunsten eines homogenen Reaktionsgemisches in Kauf genommen.



Schema 5.9: Basenkatalysierte Glycosylierung von Boc-Lys-OH **39**.

Um die bei der Extraktion von Z-Lys(DEG)-OH **42** aufgetretenen Löslichkeitsprobleme zu vermeiden, wurden auch die erhaltenen wässrigen Lösungen von Boc-Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-OH **54a**, Boc-Lys(Ac₄Glc(EO)₂NCS)-OH **54b** und Boc-Lys(Ac₄Gal(EO)₂NCS)-OH **54c** vor dem Extraktionsschritt mit Essigsäure auf pH = 5 angesäuert. Zur Abtrennung des eingesetzten Überschusses an Boc-Lys-OH **39**, sowie etwaige Hydrolyseprodukte wurden die erhaltenen kohlenhydrat-funktionalisierten Aminosäuren säulenchromatographisch gereinigt. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Ethylacetat, Ethanol und Essigsäure verwendet. Obwohl die Säulenchromatographie, aufgrund einer starken Bandenverbreiterung, mit erheblichen Ausbeuteverlusten verbunden war, war sie für die anschließende Synthese der entsprechenden NCAs unverzichtbar. Um die Produkte von der im Laufmittel enthaltene Essigsäure zu befreien, mussten diese im Anschluss an die Säulenchromatographie erneut in Ethylacetat gelöst und solange mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen werden, bis der Essigsäuregeruch verschwunden war. Die vollständige Umsetzung der Isothiocyanate zeigt sich in den IR-Spektren am Fehlen ihrer charakteristischen Banden zwischen 2100 cm⁻¹ und 2200 cm⁻¹. Die Anknüpfung der Glycosyldonoren **53a-c** an die Aminosäure **39** konnte mittels IR-Spektroskopie anhand der charakteristischen Bande

der N-H Deformationsschwingung der gebildeten Thioharnstoff-Gruppe bei 1600 cm^{-1} bestätigt werden. Aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ist außerdem ersichtlich, dass die Umsetzung weder eine Isomerisierung der anomerenreinen Zucker, noch eine Racemisierung des L-Lysins zur Folge hat.

Die analoge Glycosylierung wurde auch mit Z-Lys-OH **38** anstelle von Boc-Lys-OH **39** durchgeführt. Die Bildung der entsprechenden Produkte Z-Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-OH **55a**, Z-Lys(Ac₄Glc(EO)₂NCS)-OH **55b** und Z-Lys(Ac₄Gal(EO)₂NCS)-OH **55c** konnte mittels Massenspektrometrie anhand der Molekülpeaks $[\text{M}+\text{H}]^+$ bei einem m/z-Verhältnis von 758.31 bestätigt werden. Wie man Tab. 5.2 entnehmen kann, wurden bei der Umsetzung der Isothiocyanante **53a-c** mit Z-Lys-OH **38** in etwa die gleichen Ausbeuten erzielt wie bei der Verwendung von Boc-Lys-OH **39**.

Tabelle 5.2: Bei der Umsetzung der Glycosyldonoren **53a-c** mit Boc-Lys-OH und Z-Lys-OH erzielten Ausbeuten.

Produkt	Edukt	Ausbeute
Boc-Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)-OH 54a	Boc-Lys-OH	45 %
Boc-Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)-OH 54b	Boc-Lys-OH	17 %
Boc-Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)-OH 54c	Boc-Lys-OH	20 %
Z-Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)-OH 55a	Z-Lys-OH	43 %
Z-Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)-OH 55b	Z-Lys-OH	36 %
Z-Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)-OH 55c	Z-Lys-OH	20 %

Das Vorschreiten der ausgehend von 2-(2-Hydroxyethoxy)ethylamin dreistufigen Synthesen der kohlenhydrat-funktionalisierten Lysine **54a-c** und **55a-c** kann gemäß Abb. 5.5 anhand der Veränderung der charakteristischen Banden der Amino-, Isothiocyanat- und Thioharnstoff-Gruppen leicht mittels IR-Spektroskopie verfolgt werden.

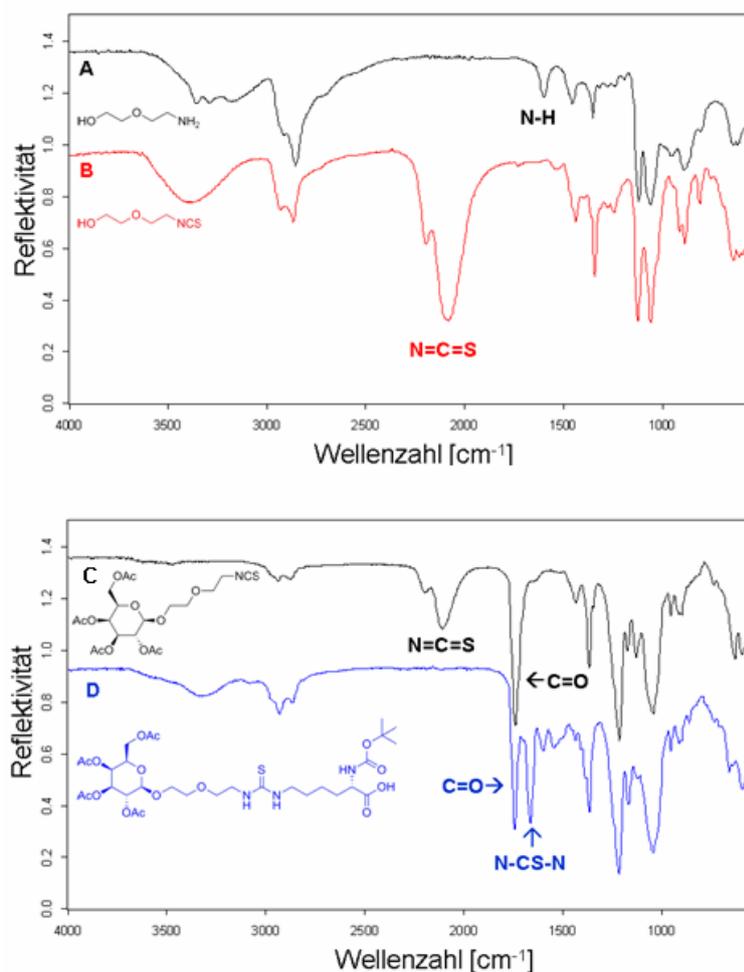
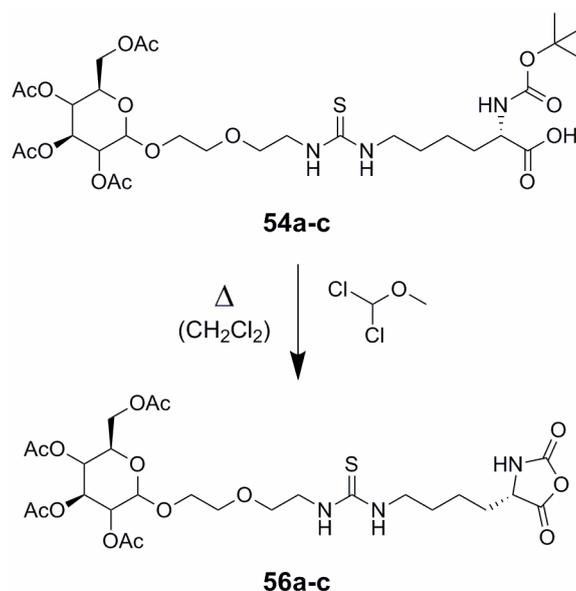


Abbildung 5.5: IR(ATR)-Spektren von A) 2-(2-Hydroxyethoxy)ethylamin (schwarz), B) 2-(2-Isothiocyanatoethoxy)ethanol **52** (rot), C) 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-O-(5-isothiocyanato-3-oxapentyl)-β-D-galactopyranose (Ac₄Gal(EO)₂NCS) **53c** (schwarz), D) N_ε-[8-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)(1-thio-2-aza-5,8-dioxa-octyl)]-N_α-(tert.-butyloxycarbonyl)-L-lysin (Boc-Lys(Ac₄Gal(EO)₂NCS)-OH) **54c** (blau)

Die Umsetzung der glycosylierten Lysinderivate **54a-c** und **55 a-c** zu den entsprechenden NCAs erfolgte schließlich gemäß Schema 5.10 mit Dichlormethylmethylether in wasserfreiem Dichlormethan in der Siedehitze. Wie bei der Darstellung von Lys(Man-NCS)-NCA **49** konnte, wegen der Wasserunlöslichkeit der erhaltenen NCAs, auch hier eine wässrige Aufarbeitung erfolgen.



Schema 5.10: NCA-Cyclisierung mit Dichlormethylmethylether.

Die bei der Synthese von Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-NCA **56a**, Lys(Ac₄Glc(EO)₂NCS)-NCA **56b** und Lys(Ac₄Gal(EO)₂NCS)-NCA **56c** erzielten Ausbeuten sind in Tab. 5.3 zusammengefasst. Die Bildung der NCA-Ringe kann mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie anhand der Verschiebung der Signale des α -Kohlenstoffs von über 50 ppm auf etwa 38 ppm bestätigt werden.

Tabelle 5.3: Bei der Umsetzung der Boc- und Z-geschützten kohlenhydrat-funktionalisierten Aminosäuren **54a-c** und **55a-c** zu den entsprechenden NCAs erzielte Ausbeuten.

Lysin	Edukt	Ausbeute
Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)-NCA 56a	Boc-Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)-OH 54a	55 %
Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)-NCA 56b	Boc-Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)-OH 54b	71 %
Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)-NCA 56c	Boc-Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)-OH 54c	55 %
Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)-NCA 56a	Z-Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)-OH 55a	76 %
Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)-NCA 56b	Z-Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)-OH 55b	80 %
Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)-NCA 56c	Z-Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)-OH 55c	82 %

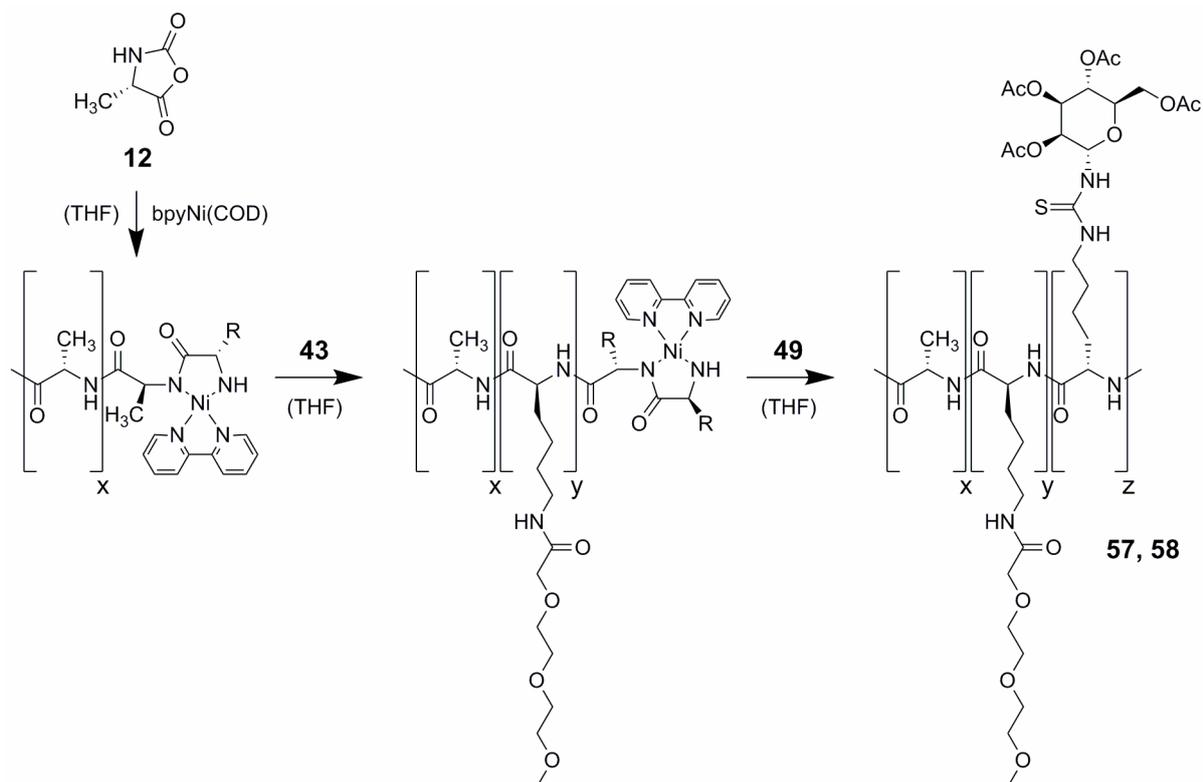
Die Umsetzung der Z-geschützten Lysinderivate brachte durchweg höhere Ausbeuten als die Umsetzung der entsprechenden Boc-geschützten Aminosäuren. Daher ist die von Z-Lys-OH **38** ausgehende Syntheseroute (Schema 5.5 rechts) der von Boc-Lys-OH **39** ausgehenden (Schema 5.5 links) vorzuziehen.

Für die ausgehend von Mannose **44a**, Glucose **44b** und 1,2,3,4,6-Pentaacetyl-galactopyranose **45c** sechs- bzw. fünfstufige Syntheseroute konnten somit Overall-Ausbeuten von 14% (Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-NCA **56a**), 9% (Lys(Ac₄Glc(EO)₂NCS)-NCA **56b**) und 8% (Lys(Ac₄Gal(EO)₂NCS)-NCA **56c**) erzielt werden.

5.3 Kohlenhydrat-funktionalisierte Triblockcopolypeptide

Für die direkte Herstellung von kohlenhydrat-tragenden Nanopartikeln aus kohlenhydrat-funktionalisierten Polypeptiden wurden zwei Triblockcopolypeptide synthetisiert. Neben dem mannose-funktionalisierten NCA **49** kamen hierfür die Cobausteine Lys(DEG)-NCA **43** und L-Alanin-NCA (Ala-NCA) **12** zum Einsatz. Lys(DEG)-NCA **43** wurde eingesetzt, um die Löslichkeit der Polypeptide zu erhöhen, Ala-NCA **12** soll als lipophiler Bestandteil hingegen der Stabilisierung der Partikel dienen.

Die Darstellung der Triblockcopolypeptide **57** und **58** erfolgte gemäß Schema 5.11 durch sukzessive Copolymerisation von Ala-NCA **12**, Lys(DEG)-NCA **43** und Lys(Man-NCS)-NCA **49** mit bpyNi(COD) in THF.



Schema 5.11: Reaktionsverlauf der Synthese der mannose-tragenden Triblockcopolypeptide **57** und **58**.

Die Zusammensetzungen der Triblockcopolypeptide **57** und **58**, die neben dem kohlenhydrat-tragenden Peptidblock aus hydrophoben Alanin- und hydrophilen Lys(DEG)-Blöcken unterschiedlicher Länge aufgebaut sind, sind in Tab. 5.4 zusammengefasst.

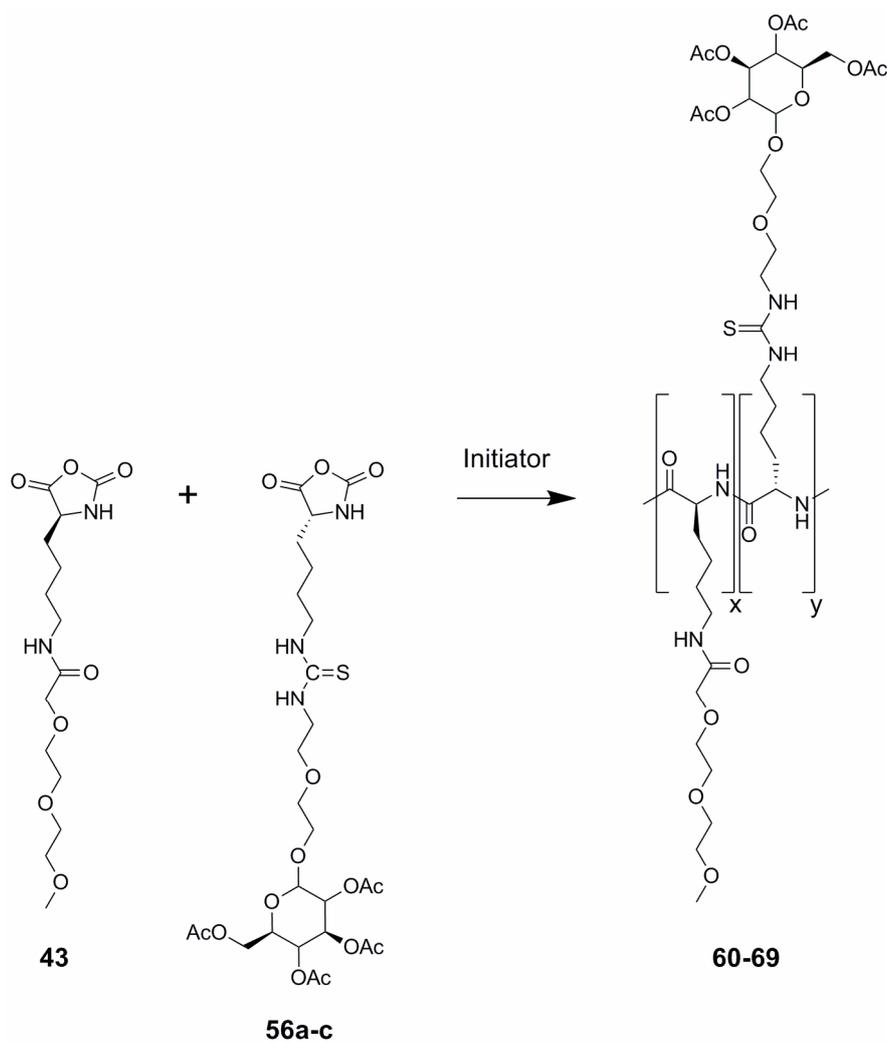
Tabelle 5.4: Ausbeuten der Synthesen der kohlenhydrat-tragenden Triblockcopolypeptide **57** und **58**. (Ratio Poly: Mengenverhältnis der Aminosäuren im Polypeptid, I/Alanin: Verhältnis Initiator/**12**, M_w : Molmasse, PD: Polydispersität)

Polymer	NCA ₁	NCA ₂	NCA ₃	Ratio Poly	I/Alanin	M_w	Ausbeute
57	10 Ala	10 Lys(DEG)	1 Lys(Man-NCS)	9.9 : 10 : 1	1:40	n. a.	92%
58	2 Ala	10 Lys(DEG)	1 Lys(Man-NCS)	2.2 : 10.1 : 1	1:8	n. a.	88%

5.4 Statistische kohlenhydrat-funktionalisierte Copolypeptide

Um das Polypeptid nicht mit Kohlenhydraten zu überladen, soll durchschnittlich nur etwa jede zehnte Aminosäure der Sequenz ein Kohlenhydratmolekül tragen. Berücksichtigt man, dass Poly[Lys(DEG)] in einer vollständig α -helicalen Struktur vorliegt,^[19, 176, 177] entspricht dies etwa einem Zuckermolekül je 2.5 Windungen der α -Helix. Bei einer Ganghöhe von 0.54 nm je Windung entspricht dies einem durchschnittlichen Abstand von etwa 1.35 nm entlang der Polypeptidkette. Da die einzelnen Aminosäurereste zudem gegeneinander verdreht sind, verfügen die Kohlenhydratmoleküle über ausreichend Platz um die fortschreitende Polymerisation nicht durch sterische Wechselwirkungen zu behindern.

Um das Polymerisationsverhalten der synthetisierten kohlenhydrat-funktionalisierten NCAs **56a-c** zu untersuchen, wurden Gemische aus diesen NCAs und Lys(DEG)-NCA **43** in unterschiedlichen Zusammensetzungen mit verschiedenen Initiatoren polymerisiert. Da sich zudem die von YU *et al.* veröffentlichte Arbeit ausschließlich mit der Übergangsmetall-katalysierten ((PMe₃)₄Co) Polymerisation von Lys(DEG)-NCA **43** beschäftigt, musste auch die Eignung dieses NCAs für die amin-initiierte NCA-Polymerisation überprüft werden. In diesem Zusammenhang berichteten LEO VAN KRALINGEN *et al.* über erhebliche Probleme bei der hexylamin-initiierten Polymerisation von *N*_ε-(12-Benzyl-1,11-dioxo-3,6,9,12-tetraoxa-dodecyl)-L-lysin-NCA berichteten, das Lys(DEG)-NCA **43** sehr ähnlichen ist.^[178] Zur Synthese der Lys(DEG)-haltigen Polypeptide **59-63** wurde daher Triethylamin verwendet, welches sich bereits bei anderen Polymerisationen bewährt hat.



Schema 5.12: Synthese kohlenhydrat-funktionalisierter Copolypeptide

Alle Polymerisationen erfolgten aus 5 Gew.-%-igen Lösungen der NCA-Gemische, unter striktem Luft- und Feuchtigkeitsausschluss. Die gemäß Schema 5.12 erhaltenen statistischen Copolypeptide wurden nach zwei Tagen in Diethylether gefällt, in Methanol gelöst und durch Ultrafiltration gereinigt. Tab. 5.5 enthält eine Zusammenstellung der durchgeführten Polymerisationen. Die teilweise geringen Ausbeuten sind größtenteils auf Verluste bei der Aufreinigung der zähen, klebrigen Polypeptid-Niederschläge zurückzuführen.

Tab. 5.5: Molmassen M_w und Ausbeuten der isolierten statistischen Copolypeptide. (I/M: Initiator/Monomeresamtmenge-Verhältnis, Ratio Poly: aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren berechnetes Stoffmengenverhältnis der Bausteine $\text{NCA}_1/\text{NCA}_2$ im Polypeptid, P_n : durchschnittlicher Polymerisationsgrad, PD: Polydispersität, 2 : GPC-Messung erfolgte in DMAc, n. a.: nicht analysierbar)

Polymer	NCA_1	NCA_2	Initiator	I/M	Lösemittel	Ratio Poly	M_w [g/mol]	P_n	PD	Ausbeute
59	Lys(DEG)	---	NEt_3	1/50	DMF	---	93600^2	324	1.43	91 %
60	8 Lys(DEG)	1 Lys(Ac4Man(EO)2NCS)	NEt_3	1/50	DMF	8 : 1	56800^2	176	2.18	55 %
61	8 Lys(DEG)	1 Lys(Ac4Man(EO)2NCS)	NEt_3	1/30	DMF	8.2 : 1	40000^2	124	1.66	74 %
62	8 Lys(DEG)	1 Lys(Ac4Glc(EO)2NCS)	NEt_3	1/30	DMF	7.9 : 1	44000^2	136	2.00	70 %
63	8 Lys(DEG)	1 Lys(Ac4Gal(EO)2NCS)	NEt_3	1/30	DMF	8.1 : 1	37400^2	116	1.27	91 %
64	4 Lys(DEG)	1 Lys(Ac4Man(EO)2NCS)	bpyNi(COD)	1/50	DMF	n. a.	n. a.	n. a.	1.17	88%
65	4 Lys(DEG)	1 Lys(Ac4Glc(EO)2NCS)	bpyNi(COD)	1/50	DMF	8.4 : 1	29400^2	91	1.39	91%
66	8 Lys(DEG)	Lys(Ac4Gal(EO)2NCS)	bpyNi(COD)	1/80	DMF	7.7 : 1	38100^2	117	1.39	89 %
67	9 Lys(DEG)	1 Lys(Ac4Man(EO)2NCS)	bpyNi(COD)	1/40	THF	10 : 1	130000^2	410	1.22	95 %
68	9 Lys(DEG)	1 Lys(Ac4Glc(EO)2NCS)	bpyNi(COD)	1/40	THF	9 : 1	n. a.	n. a.	n. a.	58 %
69	9 Lys(DEG)	1 Lys(Ac4Gal(EO)2NCS)	bpyNi(COD)	1/40	THF	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	10%

Poly[Lys(PEG)] und die synthetischen Glycopeptide **60-69** sind mäßig in Wasser und gut in polaren und mäßig polaren Lösungsmitteln wie THF, DMF, Dimethylsulfoxid (DMSO), Alkoholen und Chloroform löslich. Ihre Wasserlöslichkeit erhöhte sich nach der Abspaltung der Acetylschutzgruppen jedoch deutlich.

Die Zusammensetzungen der synthetisierten Glycopeptide **60-69** wurden gemäß Abb. 5.6 aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren über die Integrationsverhältnisse der eindeutig zugeordneten und voneinander aufgelösten Signale der ϵ -Methylen-Protonen der Lys(PEG)-Reste (blau) und der Protonen der Positionen 2, 3 und 4 der Pyranoseringe (grün) bestimmt.

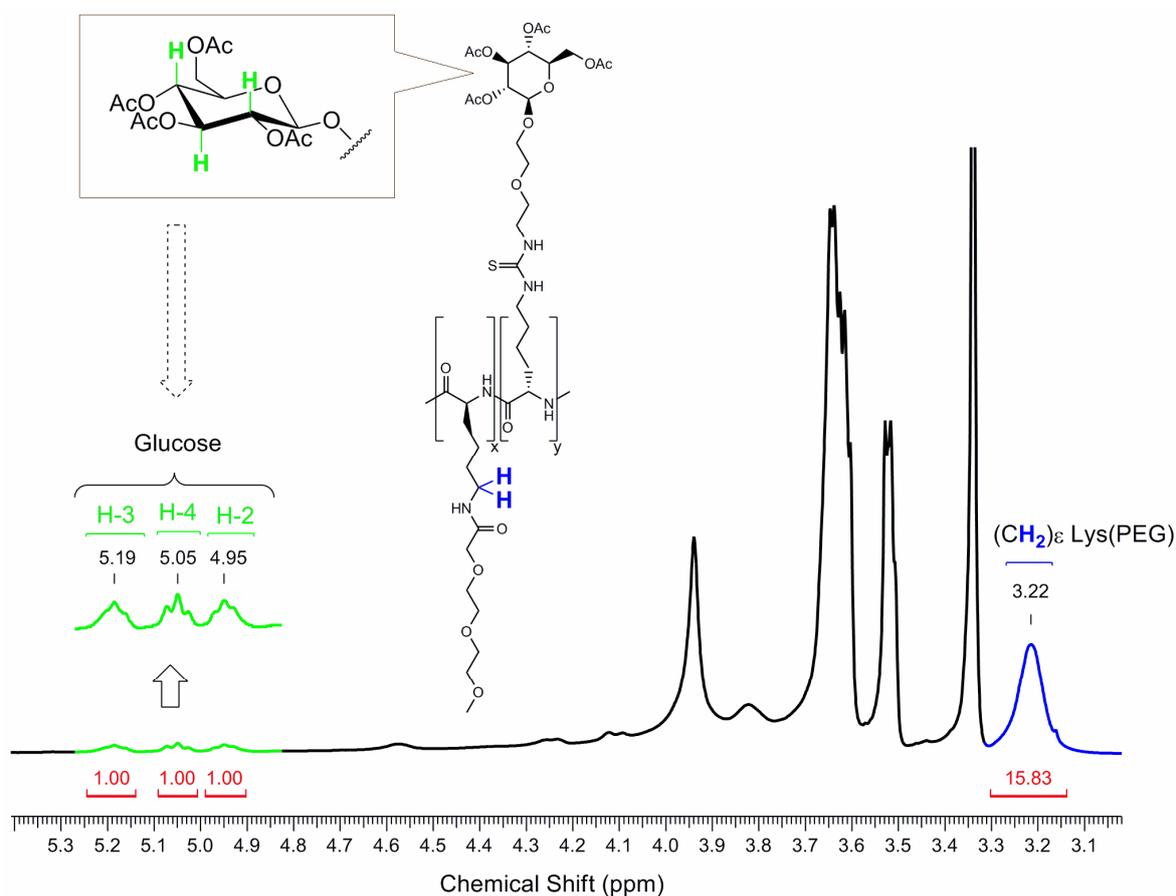


Abbildung 5.6: NMR-Spektrum des Glucose tragenden Polypeptids **62**, aufgenommen in CDCl_3 . Die Zahlen (rot) unterhalb der Basislinie spiegeln das Integrationsverhältnis der Signalfächen der ϵ -Methylen-Protonen der Lys(PEG)-Bausteine (blau) und der Glucose-Protonen (grün) wider.

Um ein möglichst genaues Ergebnis zu erzielen werden hierbei die Signalflächen der drei Pyranose-Protonen I_{H-2} , I_{H-3} und I_{H-4} aufsummiert und der Signalfläche der beiden ϵ -Methylen-Protonen der Lys(DEG)-Reste I_{Lys} gegenübergestellt. Berücksichtigt man die Anzahl der Protonen, so errechnet sich das tatsächliche Verhältnis der Aminosäuren in den Glycopeptide (Lys(DEG)/Lys(Ac₄Pyranose(EO)₂NCS)) wie folgt:

$$\frac{Lys(DEG)}{Lys(EO_2 - Pyranose)} = \frac{3}{2} \cdot \frac{I_{Lys}}{I_{H-2} + I_{H-3} + I_{H-4}} \quad (5-1)$$

Die über diese Methode bestimmten Zusammensetzungen der Polypeptide **60-69** sind in Tab. 5.5 aufgelistet. Man erkennt, dass die Zusammensetzungen der erhaltenen Glycopeptide gut mit den Zusammensetzungen der eingesetzten NCA-Gemische übereinstimmen. Sowohl die bpyNi(COD)-initiierten als auch die triethylamin-initiierten Polymerisationen führen also zu definierten Glycopeptiden.

Wie bei der triethylamin-initiierten Polymerisation zu erwarten war,^[20] weisen die erhaltenen Polypeptide Molmassen auf, die einem Mehrfachen der eingesetzten I/M-Verhältnisse entsprechen. Bemerkenswert ist außerdem, dass die triethylamin-initiierte Polymerisation der bpyNi(COD)-initiierten Polymerisation bezüglich der Molekulargewichte und Zusammensetzungen der erhaltenen Polypeptide beinahe ebenbürtig ist. Einzig die niedrigeren Polydispersitäten rechtfertigen den höheren synthetischen Aufwand, der mit der Verwendung des synthetisch anspruchsvollen Übergangsmetall-Initiators verbunden ist.

Um die Wechselwirkung der synthetisierten Glycopeptide mit Zelloberflächen (Erythrocyten und T-Zellen) mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusscytometrie untersuchen zu können, mussten diese zusätzlich mit Fluoreszenzlabeln versehen werden. Die Auswahl eines geeigneten Fluoreszenzlabels erfolgte unter Berücksichtigung der zur Verfügung stehenden apparativen Gegebenheiten. Wegen seines breiten Anwendungsspektrums in den Biowissenschaften und seiner hohen Fluoreszenzquantenausbeute fiel die Wahl hierbei auf Fluoresceinisothiocyanat (FITC).

Problematisch ist, dass FITC, wie alle gebräuchlichen Fluorophore, neben der zur Anknüpfung an die Glycopeptide vorgesehenen Isothiocyanat-Funktion über weitere, für

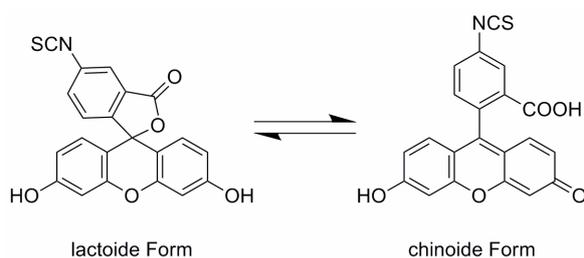
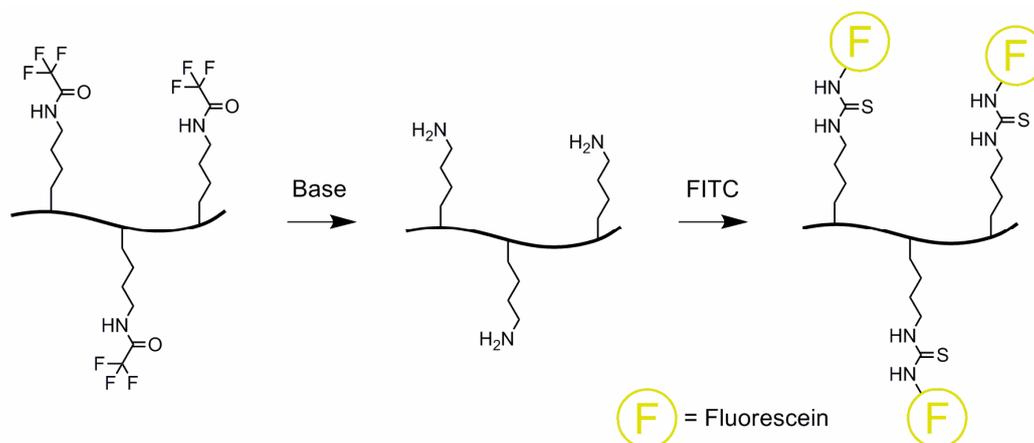


Abbildung 5.7: pH-abhängige Struktur von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

ihre Fluoreszenz und Löslichkeit unabdingbare, funktionelle Gruppen verfügt (Abb. 5.7). Wegen der geringen Toleranz der NCA-Polymerisation gegenüber nucleophilen und basischen Gruppen, kann die Synthese fluoreszenzmarkierter Glycopeptide daher nicht über die Polymerisation

fluoreszenzmarkierter NCAs erfolgen. Dies bedeutet, dass die Anknüpfung der Fluorophore nach der Polymerisation erfolgen muss. Hierzu wird neben Lys(DEG)-NCA **43** und den kohlenhydrat-tragenden NCAs **56a-c** zusätzlich Lys(TFA)-NCA **6** mit in die Glycopeptidketten einpolymerisiert. Nach der Abspaltung der TFA-Schutzgruppen werden die entschützten ϵ -Aminogruppen gemäß Schema 5.13 mit der Isothiocyanat-Gruppe des Fluoresceins zu den entsprechenden Thioharnstoffen umgesetzt.



Schema 5.13: Fluoreszenzmarkierung der Glycopeptide

Um die Folgen einer unvollständigen Umsetzung dieser Aminogruppen und die Anzahl der, für unspezifischen Wechselwirkungen mit Biomolekülen bereitstehenden, Carbonsäure- und Alkoholfunktionen des Fluoresceins zu begrenzen, soll der Anteil von Lys(TFA) an der Polypeptidkette so gering wie möglich gehalten werden. Andererseits soll der TFA-Lysin-Anteil im zu polymerisierenden NCA-Gemisch hoch ge-

nug sein, damit jede Polypeptidkette über mindestens ein Fluorophor verfügt. Außerdem muss die Fluoreszenz stark genug sein, um mit gängigen Verfahren detektiert zu werden. Für die Synthese der Glycopeptide **70-77** wurde daher ein Lys(TFA)-Anteil von etwa 5% und für die Synthese der voraussichtlich sehr langen Glycopeptide **78-80** ein Lys(TFA)-Anteil von etwa 2.5% verwendet. Die auf dieser Grundlage durchgeführten Polymerisationen sind in Tab. 5.6 aufgelistet.

Die Bestimmung der Zusammensetzungen der synthetisierten Glycopeptide **71-80** erfolgte wie gewohnt über die Integrationsverhältnisse geeigneter eindeutig zugeordneter und aufgelöster Signalflächen in den ^1H -NMR-Spektren. Zur Berechnung der Anteile der ethylenglycol- und kohlenhydrat-funktionalisierten Aminosäuren wurden auch hier die Signale der ϵ -Methylen-Protonen der Lys(DEG)-Reste und der Protonen der Positionen 2, 3 und 4 der Pyranoseringe verwendet. Da sämtliche Signale der Methylen-Protonen des trifluoracetyl-geschützten Lysins mit anderen Signalen überlagert sind, wurde zur Berechnung des Anteils an Lys(TFA) auf das Signal des ϵ -Amid-Protons des Lys(TFA)-Restes bei einer chemischen Verschiebung von 8.8 ppm zurückgegriffen. Die auf diese Weise berechneten Zusammensetzungen sind in Tab. 5.6 zusammengefasst.

Tab. 5.6: Molmassen M_w und Ausbeuten der isolierten statistischen Copolypeptide. (I/M: Initiator/Monomeresamtmenge-Verhältnis, Ratio Poly: aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren berechnetes Stoffmengenverhältnis der Bausteine $\text{NCA}_1/\text{NCA}_2/\text{NCA}_3$ im Polypeptid, P_n : durchschnittlicher Polymerisationsgrad, PD: Polydispersität, 2 : GPC-Messung erfolgte in DMAc, n. a.: nicht analysierbar)

Polymer	NCA_1	NCA_2	NCA_3	Initiator	I/M	Lösemittel	Ratio Poly	M_w [g/mol]	P_n	PD	Ausbeute
70	18 Lys(DEG)	---	1 Lys(TFA)	NEt_3	1/50	DMF	18.5 : 1	44500 ²	156	1.25	67 %
71	16 Lys(DEG)	2 Lys(Ac4Man(EO)2NCS)	1 Lys(TFA)	NEt_3	1/50	DMF	15.8 : 2 : 1	79900 ²	251	1.40	76 %
72	16 Lys(DEG)	2 Lys(Ac4Man(EO)2NCS)	1 Lys(TFA)	NEt_3	1/30	DMF	16 : 2 : 1	40800 ²	128	1.49	59 %
73	16 Lys(DEG)	2 Lys(Ac4Glc(EO)2NCS)	1 Lys(TFA)	NEt_3	1/30	DMF	16.2 : 2 : 1	41700 ²	131	1.94	82%
74	16 Lys(DEG)	2 Lys(Ac4Gal(EO)2NCS)	1 Lys(TFA)	NEt_3	1/30	DMF	16.2 : 2 : 0.82	33300 ²	104	1.66	85 %
75	16 Lys(DEG)	2 Lys(Ac4Man(EO)2NCS)	1 Lys(TFA)	bpyNi(COD)	1/80	DMF	16.4 : 2 : 1	38400 ²	121	1.71	89 %
76	16 Lys(DEG)	2 Lys(Ac4Glc(EO)2NCS)	1 Lys(TFA)	bpyNi(COD)	1/80	DMF	16.3 : 2 : 1	37600 ²	118	1.69	90 %
77	16 Lys(DEG)	2 Lys(Ac4Gal(EO)2NCS)	1 Lys(TFA)	bpyNi(COD)	1/80	DMF	16.3 : 2 : 1.04	38600 ²	121	1.81	66 %
78	36 Lys(DEG)	4 Lys(Ac4Man(EO)2NCS)	1 Lys(TFA)	bpyNi(COD)	1/40	THF	37 : 4 : 0.96	n. a.	n. a.	n. a.	99%
79	36 Lys(DEG)	4 Lys(Ac4Glc(EO)2NCS)	1.48 Lys(TFA)	bpyNi(COD)	1/80	THF	37.3 : 4 : 1.44	45000 ²	142	1.37	60 %
80	36 Lys(DEG)	4 Lys(Ac4Gal(EO)2NCS)	1 Lys(TFA)	bpyNi(COD)	1/80	THF	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	26 %

Die Sekundärstruktur der geschützten Polypeptide wurde mittels IR-Spektroskopie untersucht. In Abb. 5.8 sind exemplarisch die Spektren der Polypeptide **59** und **76** abgebildet.

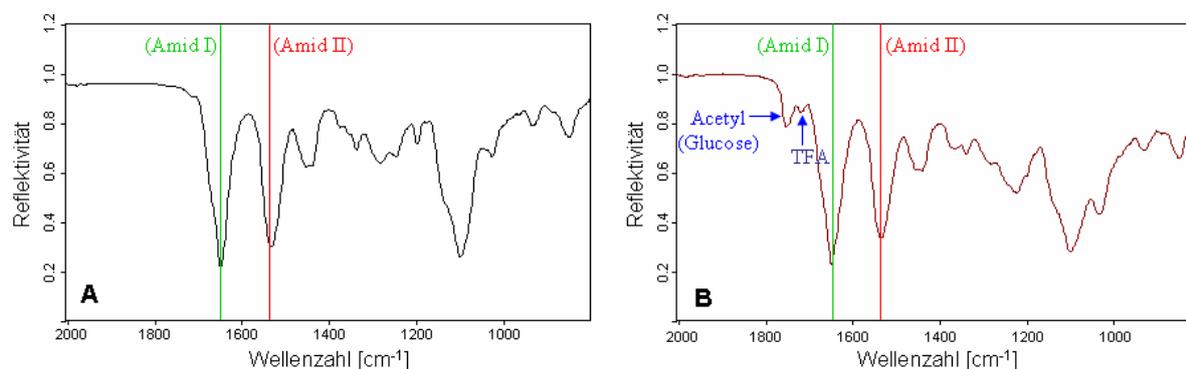


Abbildung 5.8: IR(ATR)-Spektren von A) Poly[Lys(DEG)] **59** und B) Poly{[Lys(DEG)]-co-[Lys(Ac₄Glc(EO)₂NCS)]-co-[Lys(TFA)]} **76**

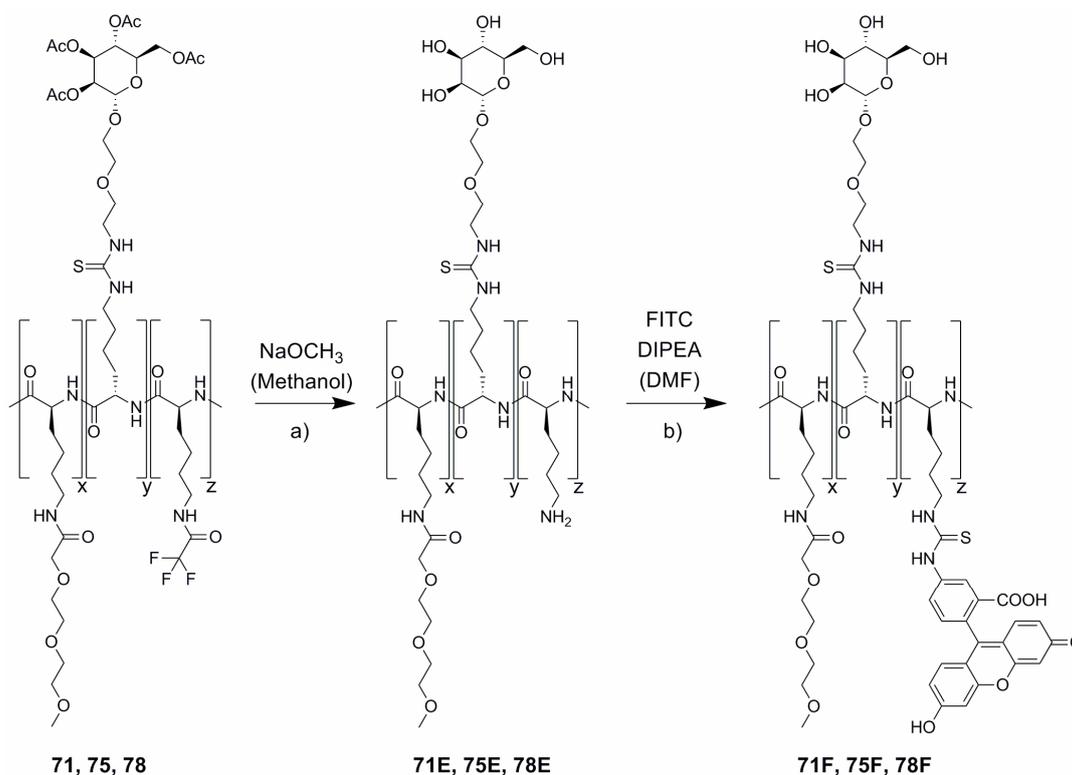
Die Lage der Amid I –Bande (C=O-Valenzschwingung) bei 1650 cm^{-1} und der Amid II –Bande (N-H-Deformationsschwingung) bei 1535 cm^{-1} entsprechen einer vollständig α -helicalen Sekundärstruktur.^[74, 179] Weder die TFA-Schutzgruppen noch die sperrigen Kohlenhydrate stören also die von YU *et al.* mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie bereits bestätigte α -helicale Struktur des Homopoly[Lys(DEG)]. Die entsprechenden Amid-Banden einer β -Faltblatt-Konformation würden hingegen bei 1630 cm^{-1} (Amid I) und 1520 cm^{-1} (Amid II) liegen.^[180] Im Gegensatz zu dem Spektrum des Homopolypeptids Poly[Lys(DEG)] **59** enthalten die Spektren der Glycopeptide **60-69** und **71-80** zusätzlich die C=O-Valenzschwingungs-Banden der Acetyl-Gruppen bei 1750 cm^{-1} . Darüber hinaus kann man in den IR-Spektren der Polypeptide **70-80** die C=O-Valenzschwingungs-Banden der TFA-Schutzgruppen bei 1720 cm^{-1} erkennen.

5.4.1 Fluoreszenz-Markierung der Glycopeptide durch polymeranaloge

Umsetzung

Damit man das Fortschreiten dieser polymeranalogen Umsetzung verfolgen kann, werden die Bezeichnungen der Polypeptide (**70-80**) beibehalten. Sie werden nach der Abspaltung der Schutzgruppen lediglich um ein **E** und nach der Fluoreszenzmarkierung um ein **F** erweitert.

Bei der zur Entfernung der Schutzgruppen in Methanol durchgeführten Zemplén-Reaktion, erfolgt gemäß Schema 5.14 eine simultane Abspaltung der Acetyl- und Trifluoracetyl-Schutzgruppen.^[181] Die entstehenden niedermolekularen Verbindungen werden durch Ultrafiltration entfernt. Nach Gefriertrocknung erhält man die entschützten Polypeptide **70E**, **71E** und **73E-79E** in quantitativen Ausbeuten. Zusätzlich zu den kohlenhydrat- und TFA-funktionalisierten Polypeptiden wurde probeweise auch jeweils ein Mannose (**67**), ein Glucose (**65**) und ein Galactose (**63**) tragendes Glycopeptide entschützt welches keine Lys(TFA)-Bausteine beinhaltet (Tab. 5.7).



Schema 5.14: Fluoreszenzmarkierung eines mannose-tragenden synthetischen Glycopeptids. a) Abspaltung der Schutzgruppen (Zemplén-Reaktion)^[181] und b) nucleophile Addition von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

Die vollständige Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppen zeigt sich in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der entschützten Glycopeptide am Verschwinden der Signale der Acetyl-Protonen zwischen 1.9 ppm und 2.2 ppm und in den IR-Spektren am Verschwinden der C=O-Valenzschwingungs-Bande bei 1750 cm^{-1} .^[128] Die simultane Abspaltung der TFA-Schutzgruppen konnte anhand des fehlenden ϵ -Amid-Protonen-Signals des Lys(TFA)-Rests bei 8.8 ppm in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren und der, für TFA charakteristischen C=O-Valenzschwingungs-Bande bei 1720 cm^{-1} ebenfalls bestätigt werden (Abb.5.9).

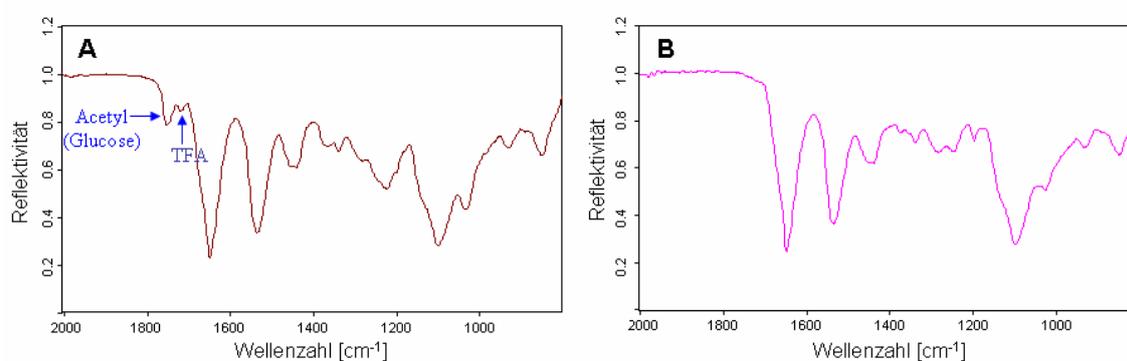


Abbildung 5.9: 10 IR(ATR)-Spektren von A) Poly{[Lys(DEG)]-*co*-[Lys(Ac₄Glc(EO)₂NCS)]-*co*-[Lys(TFA)]} **76** und B) Poly{[Lys(DEG)]-*co*-[Lys(Glc(EO)₂NCS)]-*co*-[L-Lysin]} **76E**

Die Molmassen der erhaltenen schutzgruppenfreien Glycopeptide wurden mittels GPC bestimmt. Um zu überprüfen, ob es im Verlauf der Reaktion zu einer Degradierung der Polypeptidketten kommt, werden die nach Gl. 4-2 und 4-3 berechneten Polymerisationsgrade mit den Polymerisationsgraden der entsprechenden geschützten Polypeptide verglichen. Auf gleiche Weise wird auch bei den fluoreszenzmarkierten Polypeptiden verfahren. Bei der Berechnung der Polymerisationsgrade der fluoreszenzmarkierten Polypeptide wird von einer vollständigen Umsetzung der freien Aminogruppen ausgegangen.

Tabelle 5.7: Molmassen M_w der Polypeptide vor und nach der Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppen. (Zucker: in den Polypeptiden enthaltene Zucker, P_n : durchschnittlicher Polymerisationsgrad, PD: Polydispersität, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc)

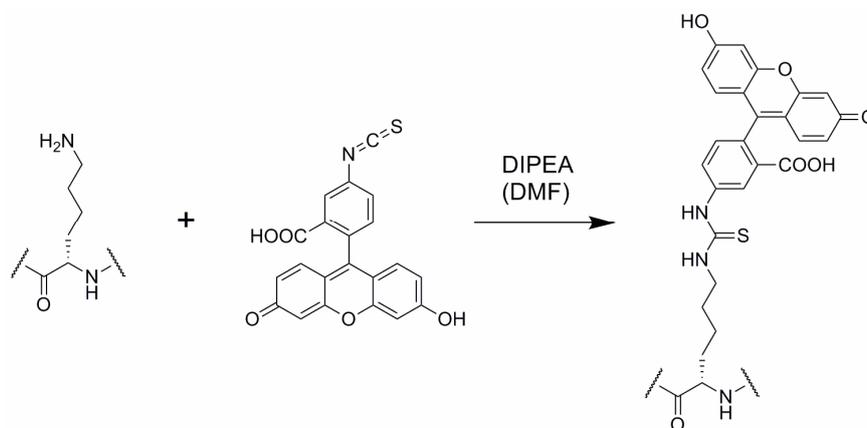
Polymer	Zucker	M_w [g/mol]	P_n	entschütztes			
				Polymer	Zucker	M_w [g/mol]	P_n
63	Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS	37400 ²	116	63E	Gal(EO) ₂ NCS	34500	113
65	Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS	29400 ²	91	65E	Glc(EO) ₂ NCS	23753	78
67	Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS	130000 ²	410	67E	Man(EO) ₂ NCS	125000	414

In den Tab. 5.7 und 5.8 kann man erkennen, dass die mittels GPC bestimmten Polymerisationsgrade und die theoretisch zu erwartenden Polymerisationsgrade häufig differieren. Da diese Abweichung jedoch sowohl zu höheren als auch geringeren Molmassen führt, ist sie wohl nicht das Resultat eines Abbaus der Peptidketten, sondern erklärt sich aus den bereits beschriebenen Problemen bei der GPC. Hiernach beruhen die Probleme bei der Bestimmung des Polymerisationsgrades möglicherweise auf Wechselwirkungen zwischen den Polypeptiden und der stationären Phase der GPC-Säulen, die dem Trennprinzip der GPC widersprechen. Diese Vermutung wird durch die Tatsache untermauert, dass die aus den GPC-Messungen berechneten Polymerisationsgrade bei der Entschützung, bei der potentiell zu Wechselwirkungen befähigte funktionelle Gruppen generiert werden, sinken und bei der anschließenden Umsetzung der gebildeten freien Amine wieder ansteigen. Dieser Trend zeigt sich besonders deutlich am Beispiel der Umsetzung des kohlenhydratfreien Polypeptids **70** ($P_n(\mathbf{70}) = 156 \rightarrow P_n(\mathbf{70E}) = 107 \rightarrow P_n(\mathbf{70F}) = 155$). Die Umsetzung der bei der Entschützung entstehenden freien Aminogruppen mit FITC führt dazu, dass der mittels GPC bestimmte Polymerisationsgrad des fluoreszenzmarkierten Polypeptids **70F** mit dem des zugrunde liegenden geschützten Glycopeptids **70** nahezu übereinstimmt.

Tabelle 5.8: Vergleich der Polymerisationsgrade P_n der geschützten, entschützten und fluoreszenzmarkierten Polypeptide. (Fluoro-Polymer: fluoreszenzmarkiertes Polypeptid, n. a.: nicht analysierbar, n. b.: nicht berechenbar, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc)

Polymer	P_n	PD	entschütztes Polymer			Fluoro-Polymer		
			P_n	PD		P_n	PD	
70	156	1.25	70E	107	1.60	70F	155	1.26
71	251	1.40	71E	196	1.22	71F	379	1.34
73	131	1.94	73E	139	1.16	---	---	---
74	104	1.66	74E	83	1.81	74F	83	3.13
75	121	1.71	75E	108	1.69	75F	n. a.	n. a.
76	118	1.69	76E	97	1.67	76F	91	2.90
77	121	1.81	77E	124	1.41	77F	146	1.28
78	n. a.	n. a.	78E	n. a.	n. a.	78F	n. a.	n. a.
79	144	1.37	79E	n. a.	n. a.	79F	147	1.37

Die Fluoreszenzmarkierung der entschützten Glycopeptide **70E**, **71E** und **74E-79E** erfolgt schließlich durch die in Schema 5.15 gezeigte Umsetzung der, mit DIPEA deprotonierten, freien Aminogruppen mit FITC in wasserfreiem DMF. Die destillative Entfernung des DMFs wird im Hochvakuum bei einer Wasserbadtemperatur von weniger als 40°C durchgeführt, um eine Denaturierung der Glycopeptide zu vermeiden.



Schema 5.15: nucleophile Addition von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

Da verbleibende freie Aminogruppen zu unspezifischen Wechselwirkungen mit Biomolekülen befähigt sind, müssen sie vollständig zu den entsprechenden Thioharnstoff-Gruppen umgesetzt werden. Daher wird das FITC in mindestens fünffachem Überschuss eingesetzt. Darüber hinaus wird nach einem Tag noch eine weitere Spatelspitze FITC zugegeben, um auch die letzten freien Aminogruppen mit frischem FITC umzusetzen. Das überschüssige niedermolekulare Fluorescein wird durch kontinuierliche Ultrafiltration gegen eine 5 kDa Cellulose-Membran abgetrennt. Zunächst wird mit dem dreifachen Volumen einer 0.25 M Kochsalz-Lösung ultrafiltriert, um möglicherweise elektrostatisch an die Glycopeptide gebundene Fluorescein-Moleküle zu entfernen. Anschließend wird das eingeschleppte Salz durch Ultrafiltration mit einem Methanol/Wasser-Gemisch und schließlich reinem Methanol wieder entfernt. Die Ultrafiltration wird mindestens solange durchgeführt, bis das anfangs leuchtend gelbe Filtrat vollkommen farblos ist und unter UV-Licht nicht mehr fluoresziert. Nachdem das Methanol abdestilliert und durch Wasser ersetzt wurde liefert die Lyophilisation der erhaltenen, leuchtend gelben Lösung schließlich das fertige fluoreszenzmarkierte Glycopeptid **70F**, **71F** und **74F-79F** in Form eines orangenen, watteartigen Feststoffs (Tab. 5.8)

Wegen der geringen Menge des gebundenen Fluoresceins und der Überlagerung der Fluorescein-Signale durch die übrigen Signale der Glycopeptide, konnte der Erfolg der Umsetzung weder durch NMR- noch durch IR-Spektroskopie bestätigt werden.

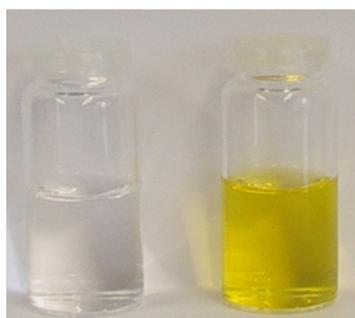


Abbildung 5.11: 0.1 Gew.%
Lösungen von **74E** (links)
und **74F** (rechts) in Methanol

Die in Abb. 5.11 dargestellte starke Färbung und Fluoreszenz der nach der Ultrafiltration erhaltenen Glycopeptidlösungen bestätigen jedoch ohne jeden Zweifel die Anknüpfung der Fluorophore.

Um die Kupplungsausbeute der Anbindung des FITC zu bestimmen, wurden die Anregungsspektren der fluoreszenzmarkierten Glycopeptide mittels UV/Vis-Spektroskopie aufgenommen. Wegen der pH-abhängigen Fluoreszenzstärke des Fluoresceins erfolgten die Messungen in PBS-Pufferlösung bei pH = 7.4. Die erhaltenen Kurven sind in Abb. 5.12 dargestellt.

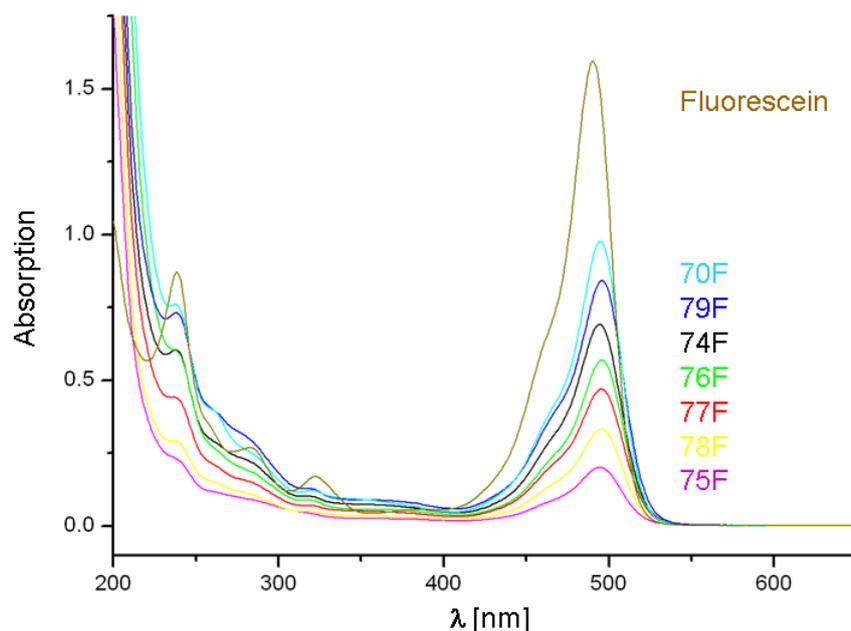


Abbildung 5.12: Absorptionsspektren der fluoreszenzmarkierten Glycopeptide und von reinem Fluorescein

Um den Anteil der FITC-markierten Lysinbausteine zu berechnen, wurden die Integrationsflächen der zwischen 400 nm und 550 nm liegenden Absorptionspeaks der fluoreszenzmarkierten Glycopeptide I_{Poly} mit der Integrationsfläche des Absorptionspeaks von reinem Fluorescein $I_{\text{Fluorescein}}$ verglichen. Der Anteil der FITC-markierten Lysinbausteine am Gesamtpolypeptid lässt sich anschließend aus den Glycopeptideinwägen m_{Poly} nach Gl. 5-2 berechnen.

$$\text{Anteil (FITC)} = P_n / ([I_{\text{Poly}} / I_{\text{Fluorescein}} \cdot n_{\text{Fluorescein}}] / [m_{\text{Poly}} / M_{\text{Poly}}]) \quad (5-2)$$

Vergleicht man den Anteil der FITC-markierten Lysinbausteine (Anteil FITC) mit dem Anteil der in die jeweiligen Ursprungspeptide **70**, **74-79** einpolymerisierten Lys(TFA)-Bausteine (Anteil TFA), so erhält man schließlich die in Tabelle 5.9 zusammengefassten Kupplungsausbeuten.

Tabelle 5.9: Kupplungsausbeute der FITC-Anbindung. (Anteil FITC: Anteil der FITC-markierten Lysinreste an den fluoreszenzmarkierten Glycopeptiden, Anteil Lys(TFA): Aus den ¹H-NMR-Spektren abgeleiteter Anteil von Lys(TFA) an den Ursprungspolypeptiden **70**, **74-79**)

Polypeptid	Anteil FITC	Anteil TFA	Kupplungsausbeute
70F	1/24.7	1/19.5	79%
74F	1/15.2	1/23.2	153%
75F	1/46.6	1/19.4	42%
76F	1/51.3	1/19.3	38%
77F	1/21.1	1/14.1	67%
78F	1/39.0	1/43.7	112%
79F	1/16.2	1/29.7	183%

Die geringen Kupplungsausbeuten bei der Fluoreszenzmarkierung der Glycopeptide **70E** und **75E-77E** deuten auf eine unvollständige Abspaltung der TFA-Schutzgruppen oder auf eine unvollständige Umsetzung der freien Aminogruppen hin. Der Grund für diese Schwierigkeiten ist vermutlich, dass die betroffenen Gruppen durch die langen 3,6,9-Trioxa-decanoyl-Reste des Cobausteins Lys(DEG) abgeschirmt werden. Das geringe Absorptionsvermögen der Glycopeptide **70F** und **75F-77F** ist möglicherweise aber auch auf das Ausbleichen der Proben zurückzuführen, die unter Lichtausschluss gelagert werden müssen, um das Ausbleichen des Fluoresceins zu vermeiden.^[182, 183]

Der Befund, dass die für die Synthese der Glycopeptide **74F**, **78F** und **79F** berechneten Kupplungsausbeuten über 100% liegen, kann hingegen auf eine elektrostatische Anlagerung von FITC an die entsprechenden Glycopeptide zurückzuführen sein. Eine solche Verunreinigung sollte jedoch eigentlich nach der durchgeführten Ultrafiltration mit Natriumchlorid-haltiger Waschlösung beseitigt sein. Die abweichenden Werte sind daher eventuell auch durch eine unzureichende Genauigkeit der zur Bestimmung der Kupplungsausbeuten angewendeten Methode zu erklären.

Sowohl die IR-Spektren der entschützten Glycopeptide, als auch die IR-Spektren der fluoreszenzmarkierten Glycopeptide enthalten ausschließlich die für eine α -Helix typischen Amid I-Bande bei 1650 cm^{-1} und Amid II-Bande bei 1535 cm^{-1} . Die vollständig α -helicale Struktur der synthetischen Glycopeptide wird also weder durch die Abspaltung der Schutzgruppen noch durch die Anknüpfung der Fluorophore verändert.

Die fertigen fluoreszenzmarkierten Glycopeptide **70F**, **71F** und **74F-79F** sind über einen breiten pH-Bereich gut in Wasser und vielen organischen Lösungsmittel wie DMSO, THF, DMAc, Chloroform und Methanol löslich.

5.5 Zusammenfassung

Die Darstellung von Glycopeptiden erfolgte durch Polymerisation kohlenhydrat-funktionalisierter NCAs.

Die Synthese von Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-NCA **56a**, Lys(Ac₄Glc(EO)₂NCS)-NCA **56b** und Lys(Ac₄Gal(EO)₂NCS)-NCA **56c** erfolgte über eine sechsstufige Syntheseroute ausgehend von den jeweiligen Zucker. Die Anknüpfung der Kohlenhydratmoleküle erfolgte hierbei über Thioharnstoff-Gruppen, die Überführung der erhaltenen Lysinderivate in die entsprechenden NCAs mit Dichlormethylmethylether.

Durch Kombination dieser mannose-, glucose- und galactose-funktionalisierten NCAs mit *N*_ε-(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysin-*N*-carboxyanhydrid **43**, bei dessen Synthese die Ausbeute, gegenüber der literaturbekannten Vorschrift, von 26% auf 55% gesteigert werden konnte, gelang die direkte Synthese der Glycopeptide **59-69**. Sowohl die (2,2'-Bipyridin)(1,5-Cyclooctadien)Nickel(0)- als auch die triethylamin-initiierte Polymerisation lieferte hierbei hochmolekulare ($M = 30\text{-}130\text{ kDa}$) statistische Polypeptide, deren Zusammensetzung sich durch das Mengenverhältnis der polymerisierten NCAs gut kontrollieren lässt. Die zur Abspaltung der Schutzgruppen durchgeführte Zemplén-Reaktion lieferte schließlich die nicht-ionischen wasserlöslichen Glycopeptide **63E**, **65E** und **67E** in quantitativer Ausbeute.

Durch die zusätzliche Verwendung des Cobausteins *N*_ε-Trifluoracetyl-L-lysin gelang darüber hinaus auch die für biologische Bindungsstudien erforderliche, polymeranalo-

ge Fluoreszenz-Markierung der entsprechenden mannose-, glucose- und galactose-tragenden Glycopeptide.

Die dargestellten Glycopeptide weisen eine α -helicale Struktur auf und sind in Wasser über einen breiten pH-Bereich löslich, womit sie eine grundlegende Voraussetzung für eine biotechnologische Anwendung erfüllen.

Die für Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-NCA **56a**, beschriebene Syntheseroute ist grundsätzlich auch für die Synthese von Lysin-NACs geeignet, die anstelle von Einfachzuckern mit komplexeren Kohlenhydraten oder anderen biologischen Liganden funktionalisierter sind. Es muss lediglich darauf geachtet werden, dass alle die NCA-Polymerisation störenden funktionellen Gruppen mit geeigneten Schutzgruppen blockiert sind. In Kombination mit dem biologisch kompatiblen und gegenüber biologischen Rezeptormolekülen inerten Baustein Lys(DEG)-NCA **43** eröffnet die vorgestellte Synthesestrategie damit den Zugang zu einem breiten Spektrum hoch interessanter funktionalisierter Polypeptide. In Analogie zu der erfolgreich durchgeführten kovalenten Fluoreszenzmarkierung ist zudem die zusätzliche kovalente Bindung pharmakologischer Wirkstoffe denkbar, welche einen gerichteten Wirkstofftransport ermöglichen könnte.

6 Nanopartikel

6.1 Einleitung

Im Laufe der letzten Jahre hat die Nanotechnologie zu großen Durchbrüchen in Wissenschaft und Technik geführt. Insbesondere im Bereich der Biowissenschaften macht man sich die bemerkenswerten, aus ihrer geringen Größe ($< 1\mu\text{m}$)^[159] resultierenden, Eigenschaften von Nanopartikeln zu Nutze. So hat sich gezeigt, dass Nanopartikel neben einer kontrollierten Abgabe, auch den gezielten Transport von Wirkstoffen ermöglichen, wobei sie die Fähigkeit besitzen verschiedene biologische Barrieren zu überwinden.^[184, 185] In der Pharmakologie werden meistens auf Polymeren basierende Nanopartikel eingesetzt.

Allgemein lassen sich solche Nanopartikel in Kern und Hülle unterteilen. Der oft lipophile Kern bleibt nach der Herstellung meist unverändert. Er dient zur Solubilisierung und Stabilisierung des eingekapselten Arzneistoffs. Die Hülle hingegen ist für spätere Modifizierungen zugänglich. Das Anknüpfen von Liganden kann beispielsweise einen gezielten Wirkstofftransport ermöglichen. Die am häufigsten verwendeten Polymere sind aliphatische Polyester, wie Polymilchsäure (PLA), Polyglycolsäure (PLG) und Poly(milchsäure-*co*-glycolsäure) (PLGA).^[186-191] Diese Polyester werden bereits seit den 70er Jahren für biomedizinische Anwendungen eingesetzt und sind daher weitgehend erforscht.^[190] Die Synthese neuer biologisch kompatibler und abbaubarer Polymere zur Herstellung maßgeschneiderter Nanopartikel ist daher von großem Interesse. Meist handelt es sich hierbei um Diblockcopolymere, deren einzelne Blöcke sich durch unterschiedliche Hydrophilien auszeichnen. In diesem Zusammenhang konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass sich Polypeptide und Blockcopolymere mit Polypeptidblöcken hervorragend zur Herstellung und Stabilisierung von Nanopartikeln eignen.^[63, 66, 67, 192-202] CHONG-SU CHO *et al.* veröffentlichten bereits 1999 eine Arbeit, in der sie die Synthese amphiphiler Diblockcopolymere aus Poly(γ -benzyl-L-glutamat) und Polyethylenglycol (PEG) zur Darstellung von Nanopartikeln über eine Diafiltrations-Methode beschreiben.^[159] Eine Verlängerung des Peptidblocks führt hierbei zu einer Zunahme der Nanopartikelgröße. In einer späteren Arbeit gelang ihnen, durch den Einsatz von mit Galactose funktionalisiertem PEG,

auch die Herstellung von Nanopartikeln die Galactose-Liganden auf ihrer Oberfläche tragen.^[202] ROBERT L. CLARK *et al.* zeigten 2009, dass neben den gewöhnlich verwendeten amphiphilen Blockcopolyptiden auch andere Polypeptide zur Darstellung von Nanopartikeln geeignet sind.^[192] Sie verwendeten ein Elektrospray-Verfahren um Nanopartikel aus gentechnisch erzeugten elastinähnlichen Polypeptiden herzustellen. Auch hier hatte die Länge der Polypeptide einen starken Einfluss auf die Morphologie der erhaltenen Nanopartikel.

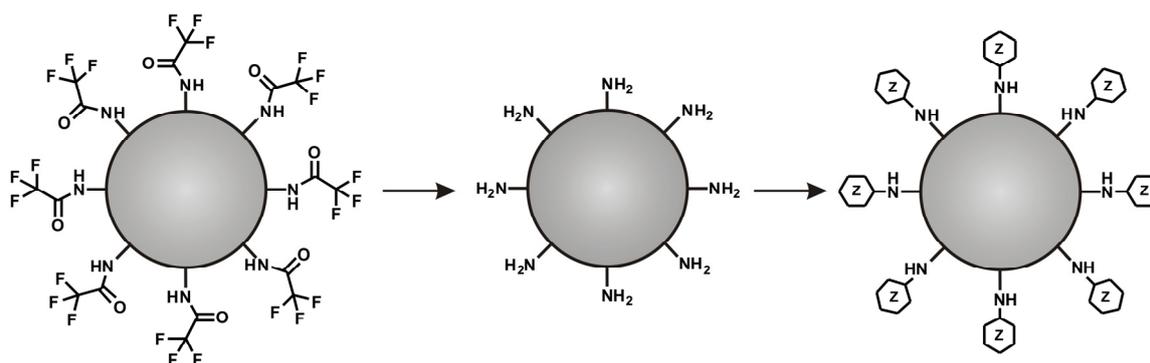
6.2 Synthesestrategie

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Darstellung und Oberflächenmodifizierung von Nanopartikeln auf Polypeptidbasis untersucht werden. Die Darstellung der Nanopartikel sollte nach der Emulsions-Diffusions-Verdampfungs-Methode erfolgen.^[203] Bei diesem Verfahren wird das Polymer zunächst in einem nur partiell mit Wasser mischbarem organischen Lösungsmittel gelöst. Die Wahl fiel hierbei auf Ethylacetat, da es eine geringe Mischbarkeit mit Wasser aufweist und leicht destillativ abgetrennt werden kann. Die Lösung wird mit einem Überschuss an Wasser versetzt und mit Hilfe eines Homogenisators mechanisch emulgiert. Anschließend wird das organische Lösungsmittel durch Anlegen eines Vakuums verdampft. Hierbei diffundiert das organische Lösemittel langsam aus den polymerhaltigen Tröpfchen in die wässrige Phase und hinterlässt das zuvor gelöste Polymer in Form kolloidaler Nanopartikel.

Die Modifizierung von Nanopartikeln erfolgt in der Literatur meist durch die Aktivierung von Säurefunktionen an der Oberfläche der Partikel. Diese Vorgehensweise bietet sich besonders zur Oberflächenmodifizierung von PLGA-Nanopartikeln an, da diese ohnehin über freie Säuregruppen verfügen.^[184]

Für die Glycosylierung von Polypeptiden steht wegen der Vielfalt der Aminosäuren prinzipiell eine große Fülle unterschiedlicher Funktionalitäten zur Auswahl. Die Bindung eines Zuckers kann beispielsweise über die Säurefunktion einer Glutaminsäure-Seitenkette, der Alkoholfunktion einer Serin-Seitenkette, der Thioalkoholgruppe einer Cystein-Seitenkette oder der Amin-Gruppe einer Lysin-Seitenkette erfolgen. Von diesen Aminosäuren eignen sich in der Praxis jedoch nur Lysin und Glutamat für die NCA-Polymerisation.^[20] Alle anderen natürlichen Aminosäuren mit reaktiven Seiten-

ketten scheiden wegen der schlechten Polymerisierbarkeit ihrer NCAs aus. Die Verwendung von Lysin bietet gegenüber der Verwendung von Glutaminsäure mehrere Vorteile. Zum einen ist es für die Umsetzung von Aminogruppen nicht notwendig diese vorher zu aktivieren, zum anderen kann die Abspaltung der Schutzgruppe leicht überprüft werden, da die Protonierung der Amine mit einem deutlichen Anstieg des ζ -Potentials einhergeht. Für die Kohlenhydrat-Modifizierung der Nanopartikeloberflächen fiel die Wahl daher auf Lysin.



Schema 6.1: Synthesestrategie für die Kohlenhydrat-Modifizierung von Nanopartikeloberflächen am Beispiel eines Partikels auf Basis von Lys(TFA).

Die Anknüpfung von Zuckermolekülen an die Aminofunktionen der Lysinreste kann beispielsweise über Amid- oder Thioharnstoffgruppen erfolgen. Die Arbeitsgruppe von MARY J. CLONINGER verwendete beispielsweise Isothiocyanato-Zucker um die Oberflächen von Polyamidoamin-Dendrimeren zu glycosylieren.^[174, 175, 204] Um die ϵ -Aminogruppe des Lysins während der NCA-Synthese und der anschließenden Polymerisation zu maskieren, muss diese mit einer Schutzgruppe blockiert sein. Nach der Herstellung der Nanopartikel werden gemäß Schema 6.1 einige der an der Oberfläche der Nanopartikel lokalisierten Schutzgruppen abgespalten, um freien Aminosäurereste als Reaktionsstellen zur Verfügung zu stellen. Hierfür sollen sowohl säure- als auch basenlabile Schutzgruppen verwendet werden.

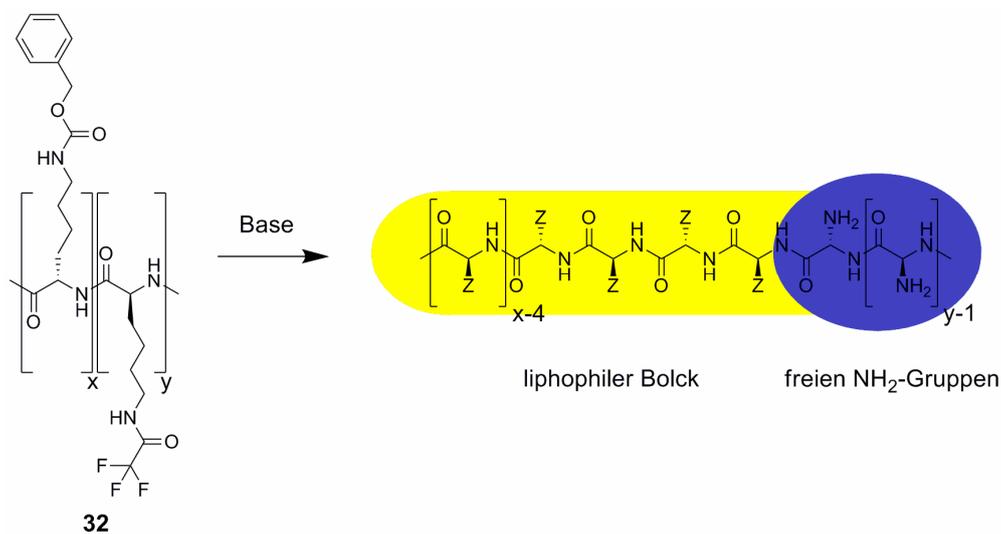
Die Entschützung sollte unter möglichst milden Bedingungen durchgeführt werden, um die Nanopartikel nicht zu zerstören.

In der vorliegenden Arbeit kamen daher Trifluoracetyler (TFA) als basenlabile und *tert.*-Butylcarbamate (Boc) als säurelabile Schutzgruppe zum Einsatz. Trifluoracetyl-

Schutzgruppen lassen sich unter sehr milden Bedingungen bereits mit Kaliumcarbonat abspalten.^[146] Die Verwendung der säurelabilen Boc-Schutzgruppe hat hingegen den Vorteil, dass die entschützten Aminogruppen während der Reaktion automatisch protoniert werden. Der Verlauf der Abspaltungsreaktion kann daher *in situ* verfolgt werden, ohne die Reaktion zu unterbrechen.

Die Abspaltung zu vieler Schutzgruppen kann jedoch, aufgrund der elektrostatischen Abstoßung protonierter Aminogruppen, die Stabilität der Nanopartikel beeinträchtigen. Um diesem Effekt zu begegnen wurden neben Homopolypeptiden auch statistische Copolypeptide synthetisiert. Durch die Verwendung orthogonaler Schutzgruppen lässt sich so die Anzahl der entschützten Aminogruppen begrenzen.

Um ein Zerplatzen der Nanopartikel während der Abspaltung der Schutzgruppen zu verhindern, wurden zudem Diblockcopolypeptide synthetisiert, bei denen ein Block gemäß Abb. 6.2 selektiv entschützt werden kann, während der andere Block unverändert bleibt.



Schema 6.2: Partielle entschützung von Poly{[N_ϵ -*tert.*-butyloxy-carbonyl-L-lysin]₉-*block*-[N_ϵ -trifluoroacetyl-L-lysin]₁} **32**.

Nach der partiellen Abspaltung der Schutzgruppen soll der unverändert lipophile Block die Nanopartikel stabilisieren. Um eine ausreichende Stabilisierung zu erreichen, beträgt die Länge des zur Entschützung vorgesehenen Teils daher auch nur 1/10

der Länge der unveränderten lipophilen Peptidkette. Zur Abspaltung waren wiederum die basenlabile TFA- und die säurelabile Boc-Schutzgruppe vorgesehen.

6.3 Herstellung der Nanopartikel

Die Herstellung der Nanopartikel erfolgte in Kooperation mit MANUEL J. SANTANDER ORTEGA aus dem Arbeitskreis für Biopharmazie und Pharmazeutische Biotechnologie von Prof. Dr. CLAUD-MICHAEL LEHR.

6.3.1 Herstellung der Polypeptidlösungen

Die für die Herstellung der Nanopartikel verwendete Emulsions-Diffusions-Verdampfungs-Methode beruht auf der Emulgierung eines Zwei-Phasen-Gemisches.^[203] Als wässrige Phase wurde eine 1 Gew.% Lösung von Polyvinylalkohol (PVA) in MilliQ Wasser verwendet. Der PVA dient dazu die Nanopartikel zu stabilisieren. Als organische Phase dienen Lösungen der synthetisierten Polypeptide in Ethylacetat, mit einer Massenkonzentration (β) von 1 mg/ml.

Da es keine verlässlichen Literaturdaten zur Löslichkeit geschützter Polypeptide in Ethylacetat gibt, wurden verschiedene Homopolypeptide, statistische Copolypeptide und Diblockcopolypeptide synthetisiert.

Bei der Überprüfung der Löslichkeit stellte sich jedoch heraus, dass bis auf die beiden Homopolypeptide **24** und **14** (Poly(N_ϵ -trifluoracetyl-L-lysin)) und das statistische Copolypeptid **26** (Poly $\{[N_\epsilon$ -trifluoracetyl-L-lysin]-co-[γ -*tert.*-butyl-L-glutamat] $\}$) alle synthetisierten Polypeptide bestenfalls mäßig in Ethylacetat löslich sind. Auch nachdem die Polypeptide mehrere Tagen lang unter Hitzezufuhr in Ethylacetat gerührt wurden, konnten keine Lösungen erhalten werden, deren Konzentration die für die Nanopartikelherstellung erforderliche Konzentration von 1 mg/ml auch nur annähernd erreichten.

Um dennoch Lösungen dieser Polypeptide in Ethylacetat in ausreichender Konzentration zu erhalten, wurden die Polypeptide zunächst in THF gelöst. Diese Lösungen wurden dann mit Ethylacetat verdünnt und am Rotationsverdampfer (Wasserbadtemperatur $< 40^{\circ}\text{C}$) auf etwa ein Viertel eingeeengt. Wegen der tieferen Siedetemperatur wurde hierbei ein Großteil des THFs abgetrennt. Die so erhaltenen klaren Lösungen wurden, durch Zugabe der entsprechenden Menge Ethylacetat, auf eine Konzentration von 1mg/ml eingestellt.

Von den vier Diblockcopolypeptiden wurden anhand ihrer vergleichsweise guten Löslichkeit das basisch entschützbare Polymer **32** und das sauer entschützbare Polymer **34** zur Herstellung von Nanopartikel ausgewählt. Zusammen mit dem statistischen Copolymer **26** und den drei Homopolypeptiden **14**, **15** und **24** standen damit für die Nanopartikelherstellung sechs unterschiedliche Polypeptid-Lösungen ($\beta = 1 \text{ mg/ml}$) zur Verfügung.

6.3.2 Emulsions-Diffusions-Verdampfungs-Verfahren

Zur Herstellung der Nanopartikel wurden je 0.5 ml der organischen Polypeptidlösungen mit 2.0 ml wässriger PVA-Lösung gemischt. Diese Zwei-Phasen-Gemische wurden emulgiert, mit 2.5 ml MilliQ Wasser verdünnt und erneut homogenisiert. Anschließend wurde die erhaltene Emulsion am Rotationsverdampfer vom Ethylacetat befreit. Auf diese Weise wurden kolloidale wässrige Lösungen der Nanopartikel mit einer Konzentration von ca. 0.1 mg/ml erhalten.

Die Größen und die Größenverteilung der gelösten Nanopartikel wurden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie ermittelt. Von allen Polypeptiden konnten monodisperse Nanopartikel mit Polydispersitätsindices (PDIs) zwischen 0.052 und 0.117 gewonnen werden.

Tabelle 6.1: Größe und Polydispersität der Nanopartikel in Abhängigkeit von der Molmasse und Zusammensetzung der zugrunde liegenden Polypeptide ($M_w(\text{Poly})$): mittlere Molmasse des verwendeten Polymers, PDI: Polydispersitätsindex, ¹: GPC-Messung erfolgte in THF, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc).

Nanopartikel	Polypeptid	$M_w(\text{Poly})$ [g/mol]	Durchmesser [nm]	PDI
Nano 1	Poly[Lys(TFA)] 24	86900 ¹	171.5 ± 1.8	0.095
Nano 2	Poly[Lys(TFA)] 14	172200 ¹	178.4 ± 3.2	0.098
Nano 3	Poly[Lys(Boc)] 15	559200 ²	182.1 ± 4.5	0.117
Nano 4	Poly{[Glu(<i>t</i> -Bu)] ₅₉₉ - <i>co</i> -[Lys(TFA)] ₃₀₀ } 26	186500 ²	189.3 ± 1.9	0.103
Nano 5	Poly{[Lys(Z)] ₅₃ - <i>block</i> -[Lys(TFA)] ₅₂₇ } 32	150100 ²	176.6 ± 0.2	0.052
Nano 6	Poly{[Lys(TFA)] ₈₃ - <i>block</i> -[Lys(Boc)] ₇₉₂ } 34	196400 ¹	166.7 ± 5.5	0.098

Aus Tab. 6.1 ist ersichtlich, dass weder die Molmassen der Polypeptide noch deren Zusammensetzung einen signifikanten Einfluss auf die Größe der gebildeten Nanopartikel haben. So besitzen die aus Poly[Lys(TFA)] **14** und **24** aufgebauten Partikel einem in etwa den gleichen Durchmesser, obwohl **14** eine doppelt so hohe Molmasse wie **24** besitzt. Dieses auf den ersten Blick überraschende Ergebnis resultiert aus der Herstellungsmethode. Bei der Verwendung der Emulsions-Diffusions-Verdampfungs-Methode hängt die Größe der Nanopartikel überwiegend von der in jedem einzelnen Tröpfchen der organischen Phase gelösten Polypeptidmenge und der Dichte der fertigen Nanopartikel ab. Bei einer konstanten Tröpfchengröße hat die Molmasse der Polypeptide aber keinen Einfluss auf die Masse des in den einzelnen Tröpfchen gelösten Polymers. Ein möglicher Einfluss der Polymere beschränkt sich also auf die Dichte der fertigen Nanopartikel und Größe der organischen Tröpfchen der Emulsion. Die erhaltenen Daten weisen also darauf hin, dass die Länge der Polymerketten und deren Hydrophilie weder die Tröpfchengröße noch die Dichte der Nanopartikel signifikant beeinflusst. Die Erhöhung der Polypeptidkonzentration würde hingegen zu einem Anstieg der Nanopartikelgröße führen.^[205, 206]

Um Aussagen über die Morphologie der Nanopartikeln treffen zu können, wurden diese mittels Rasterkraftmikroskopie (engl.: Atomic Force Microscopy AFM) untersucht. Die in Abb. 6.1 abgebildeten AFM-Aufnahmen zeigen, dass die erhaltenen Nanopartikel eine sphärische Gestalt aufweisen.

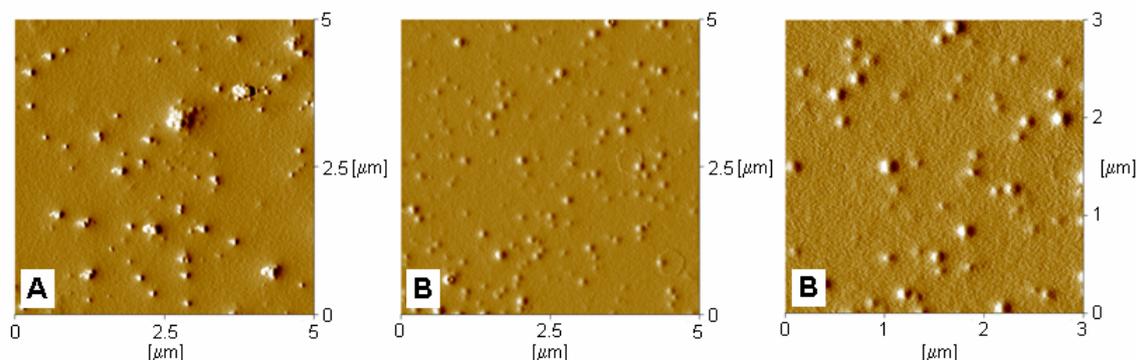


Abbildung 6.1: AFM-Aufnahmen der Nanopartikel auf Basis von A) Poly(N_ϵ -trifluoracetyl-L-lysin) **24** und B) **32** Poly[(N_ϵ -benzyloxycarbonyl-L-lysin)-*block*-(N_ϵ -trifluoracetyl-L-lysin)] auf Glimmer.

6.3.3 Abspaltung der Schutzgruppen

Um die Anknüpfung von Kohlenhydratmolekülen zu ermöglichen werden die Oberflächen der Nanopartikel **Nano 1**, **Nano 2**, **Nano 4** und **Nano 5** von den dort ansässigen TFA-Schutzgruppen (basenlabil) und die Oberflächen der Nanopartikel **Nano 3** und **Nano 6** von den dort ansässigen Boc-Schutzgruppen (säurelabil) befreit. Das Fortschreiten der Reaktionen kann anhand der Änderung des ζ -Potentials verfolgt werden. Durch die Protonierung der erhaltenen freien Amino-Funktionen verschiebt sich das ζ -Potential von anfangs negativen Werten (-1 mV bis -4 mV) ins Positive. Um die vollständige Protonierung der entschützten Aminogruppen zu gewährleisten, wurden die ζ -Potentiale sämtlicher Nanopartikel in salzsauren Lösungen (pH = 2.5) gemessen.

Der Versuch die TFA-Schutzgruppen mit Natriumhydroxid zu entfernen, hatte jedoch keine Änderung des ζ -Potentials zur Folge und auch die Größe der Nanopartikel blieb unverändert. Dieser Befund ist vermutlich auf die Abschirmung der Nanopartikel durch den sie umhüllenden amphiphilen PVA zurückzuführen, welcher die Wanderung der lipophoben Hydroxid-Ionen an die Nanopartikeloberflächen verhindert.

Unter Verwendung der lipophileren Base Triethylamin konnte hingegen, ebenso wie bei der Abspaltung der Boc-Schutzgruppen mit Salzsäure, eine Erhöhung des ζ -Potentials festgestellt werden. Wie man Abb. 6.2 entnehmen kann, hatte die Abspaltung der Schutzgruppen jedoch einen starken Anstieg der Polydispersität zur Folge. Dies ist vermutlich auf die Zerstörung der Nanopartikel zurückzuführen, die sich in der elektrostatischen Abstoßung der entschützten Aminogruppen begründet.

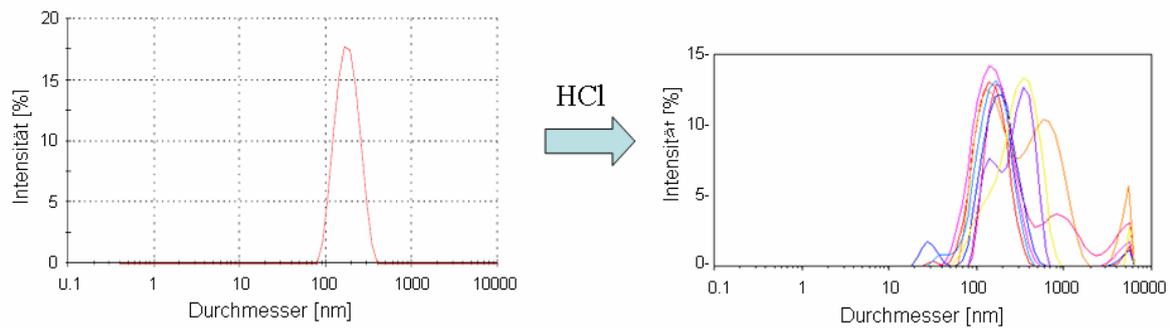


Abbildung 6.2: Größenverteilung der aus Poly(N_ϵ -trifluoracetyl-L-lysin) **24** hergestellten Nanopartikel vor (links) und nach (rechts) der Abspaltung der Boc-Schutzgruppen. Die unterschiedlich gefärbten Kurven im rechten Graph zeigen die Größenverteilungen nach verschiedenen Entschützungsversuchen.

Dieses Problem konnte auch durch die Verwendung anderer Entschützungsreagenzien wie Trifluoressigsäure, Ammoniak oder Kaliumcarbonat nicht behoben werden. Und auch die langen lipophilen Blöcke der Diblockcopolypeptide vermochten die Nanopartikel nicht zu stabilisieren.

6.3.4 Nanopartikel auf Basis kohlenhydrat-funktionalisierter Polypeptide

Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, ist die Darstellung von Nanopartikeln aus bereits fertigen kohlenhydrat-funktionalisierten Polypeptiden, da hierdurch die problematische Anknüpfung der Kohlenhydratmoleküle an die fertigen Nanopartikel entfällt. Erste Experimente erbrachten bereits viel versprechende Ergebnisse. So gelang es Nanopartikel aus kohlenhydrat-funktionalisierten Triblockcopolyeptiden herzustellen (Tab. 6.2).

Tabelle 6.2: Größe und Polydispersität der Nanopartikel auf Basis kohlenhydrat-funktionalisierter Triblockcopolyeptide (PDI: Polydispersitätsindex).

Nanopartikel	Triblockcopolyeptid	Durchmesser [nm]	PDI
Nano 7	Poly{Ala- <i>block</i> -[Lys(DEG)]- <i>block</i> -[Lys(Man-NCS)]} 57	150.8 ± 5.0	0.44
Nano 8	Poly{Ala- <i>block</i> -[Lys(DEG)]- <i>block</i> -[Lys(Man-NCS)]} 58	165.4 ± 4.3	0.42

Die großen PDIs hängen damit zusammen, dass neben den Nanopartikeln (Durchmesser < 170 nm) eine zweite Überstruktur mit einem Durchmesser von mehreren Tausend Nanometern gebildet wird. Ein Beispiel für eine solche Größenverteilung ist in Abb. 6.3 dargestellt.

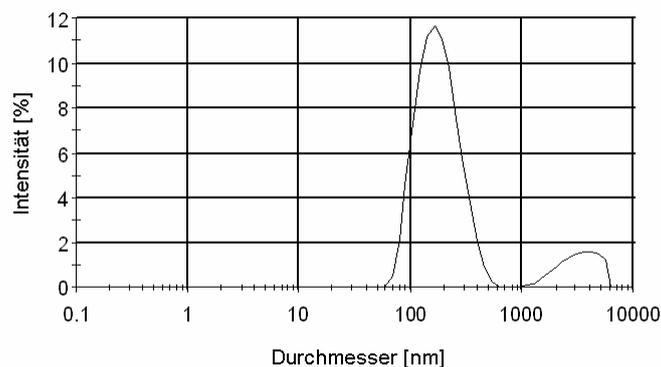


Abbildung 6.3: Größenverteilung der aus Poly{[L-Ala]-*block*-[Lys(DEG)]-*block*-[Lys(Man-NCS)]} **58** hergestellten Nanopartikel.

Vermutlich handelt es sich hierbei um Mizellen, deren Bildung durch den amphiphilen Charakter der Polypeptide **57** und **58** begünstigt wird.^[19, 63, 200] Unter Berücksichti-

gung dieser Ergebnisse wäre daher der Einsatz hydrophoberer, ethylenglycol-freier, kohlenhydrat-funktionalisierter Polypeptide erfolgversprechend.

6.4 Zusammenfassung und Ausblick

Für die Darstellung kohlenhydrat-modifizierter Nanopartikel wurden, durch Polymerisation unterschiedlicher geschützter NCAs, zunächst verschiedene Homopolypeptide, statistische Copolypeptide und Diblockcopolypeptide mit basenlabilen TFA- oder säurelabilen Boc-Schutzgruppen synthetisiert.

Mit Hilfe der Emulsions-Diffusions-Verdampfungs-Technik gelang daraus die Darstellung von sphärischen Nanopartikeln mit einem mittleren Durchmesser von 167-189 nm und einem Polydispersitätsindex von 0.05-0.12.

Die anschließende Abspaltung der Schutzgruppen hatte jedoch stets die Zerstörung der Nanopartikel zur Folge. Die Anknüpfung von Kohlenhydraten an die Nanopartikeloberfläche war daher nicht möglich.

Ein Weg dieses Problem zu umgehen, ist die Darstellung von Nanopartikeln aus bereits fertigen kohlenhydrat-funktionalisierten Polypeptiden. Erste Experimente in dieser Richtung erbrachten bereits viel versprechende Ergebnisse. So gelang die Darstellung von Nanopartikeln aus den mannose-funktionalisierten Triblockcopolypeptiden **57** und **58**. Angesichts der hohen Polydispersitätsindices der erhaltenen Nanopartikel (**Nano 7** und **Nano 8**) besteht bei der Auswahl geeigneter Glycopeptide jedoch noch Optimierungsbedarf. Erfolgversprechend wäre möglicherweise die Verwendung von hydrophoben statistischen Glycopeptide oder Blockcopolypeptiden mit hydrophoben Phenylalanin-Blöcken.

7 Bindungsstudien der kohlenhydrat-funktionalisierten Polypeptide

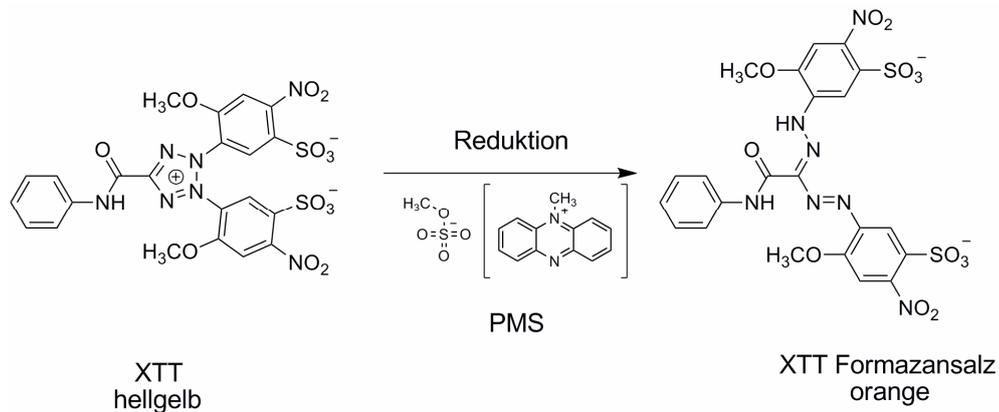
Die synthetisierten fluorescein-markierten Glycopeptide wurden in verschiedenen Fluoreszenzanalysen auf ihre Biokompatibilität und Bindungseigenschaften hin untersucht. Um die synthetisierten Glycoproteine auf ihre grundsätzliche Eignung für eine spätere Anwendung im Bereich des gerichteten Wirkstofftransports oder der spezifische Zellmarkierung zu untersuchen, muss zunächst eine cytotoxische Wirkung der kohlenhydrat-funktionalisierten Polypeptide ausgeschlossen werden. Um die Spezifität der Bindung dieser Glycopeptide an Kohlenhydrat-Rezeptoren zu überprüfen, wurden darüber hinaus Bindungsstudien an verschiedenen Blutzellen, die sich in ihrem Repertoire an Oberflächenrezeptoren unterscheiden, durchgeführt.

7.1 Cytotoxizitätsanalysen

Zunächst wurden die kohlenhydrat-funktionalisierten Polypeptide am KIST Europe hinsichtlich ihrer Cytotoxizität untersucht. Hierzu wurden humane T-Zellen mit Hilfe des Human T Cell Enrichment Cocktail der Firma Rosette Sep aus Vollblut isoliert. Diese Zellfraktion wurde in komplettiertem phenolrot-freiem RPMI 1640 Medium kultiviert. Nach Expansion der Zellen erfolgte die Aktivierung der T-Zellen mit Hilfe des T Cell Activation/ Expansion Kits der Firma Miltenyi Biotech.

Die aktivierten T-Zellen wurden mit den statistischen Glycopeptide **74F-76F** inkubiert und anschließend einem XTT Assay unterzogen. Bei diesem colorimetrischen Test werden die Zellen für vier Stunden mit dem blassgelben Tetrazoliumsalz XTT (Natrium 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfonatophenyl)-tetrazolium-5-carboxanilid) inkubiert. Durch die metabolische Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen wird das Tetrazoliumsalz in Anwesenheit von 0,2 Gew.% Phenazin Methosulfat (PMS) zu einem orangefarbenen Formazansalz reduziert (Schema 7.1). Bei diesem Nachweisverfahren besteht eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl lebender Zellen bzw. der Gesamtmenge mitochondrialer Dehydrogenasen und der Entstehung des orangefarbe-

nen Formazansalz. Die daraus resultierende Änderung der Absorption kann photometrisch bei 450 nm nachgewiesen werden.



Schema 7.1: Colorimetrischer Assay zur Bestimmung der Cytotoxizität

Zur Bestimmung der Cytotoxizität der kohlenhydrat-funktionalisierten Polypeptide wurden $2,5 \cdot 10^5$ T-Zellen in 100 μl phenolrot-freiem RPMI 1640 Medium ausgesät, mit einer Reihe von Konzentrationen (0,02 μM – 2 μM) der zu untersuchenden Polypeptide **74F-76F** versetzt und für 24 h bzw. 48 h bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die T-Zellen mit der entsprechenden Menge Idarubicin versetzt. Dieses cytotoxische Anthracyclin-Antibiotikum aus der Gruppe der Cytostatika, welches durch Interkalation in die DNA die Topoisomerase II und damit die Nukleinsäure- und Proteinsynthese inhibiert, wird zur Therapie von Leukämien eingesetzt. Die Inkubation der T-Zellen mit Idarubicin führt im Vergleich mit unbehandelten Zellen zu einer deutlichen Abnahme der optischen Dichte (OD) bei 450 nm, die mit einer Abnahme der Zellviabilität gleichzusetzen ist. Die Inkubation mit den kohlenhydrat-funktionalisierten Polypeptiden **74F-76F** führt unabhängig von Konzentration und Inkubationsdauer nicht zu einer verringerten Absorption bei 450 nm und somit nicht zu einer verminderten Zellviabilität (Abb. 7.1). Demnach kann eine cytotoxische Wirkung der synthetischen Glycopeptide ausgeschlossen werden. Auch bei einer Ausdehnung der Inkubationszeit auf 72 h konnten keine cytotoxischen Effekte durch die synthetisierten Polypeptide nachgewiesen werden.

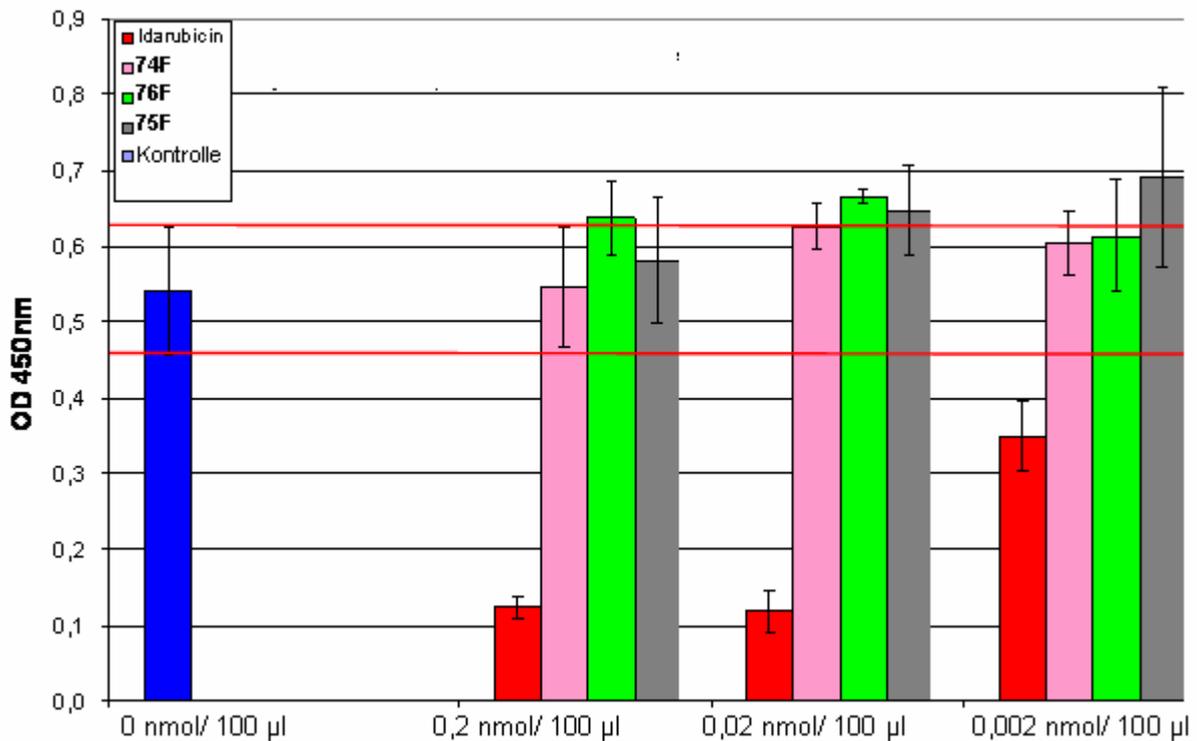


Abbildung 7.1: XTT Assay zur Untersuchung der kohlenhydratfunktionalisierten Polypeptide **74F-76F** auf Cytotoxizität in T-Zellen. $2,5 \cdot 10^5$ T-Zellen wurden in 100 µl phenolrot-freiem RPMI 1640 Medium ausgesät, mit entsprechenden Mengen Polypeptid bzw. Idarubicin versetzt und 48 h inkubiert.

7.2 Bindungsstudien an aktivierten T-Zellen

Um die Bindungseigenschaften der kohlenhydrat-funktionalisierten Polypeptiden an aktivierten T-Zellen zu untersuchen, wurden am KIST Europe Durchflusszytometrie-Analysen mit den fluoreszenzmarkierten Glycopeptiden **74F**, **75F** und **76F** sowie mit dem kohlenhydrat-freien Polypeptid **70F** durchgeführt.

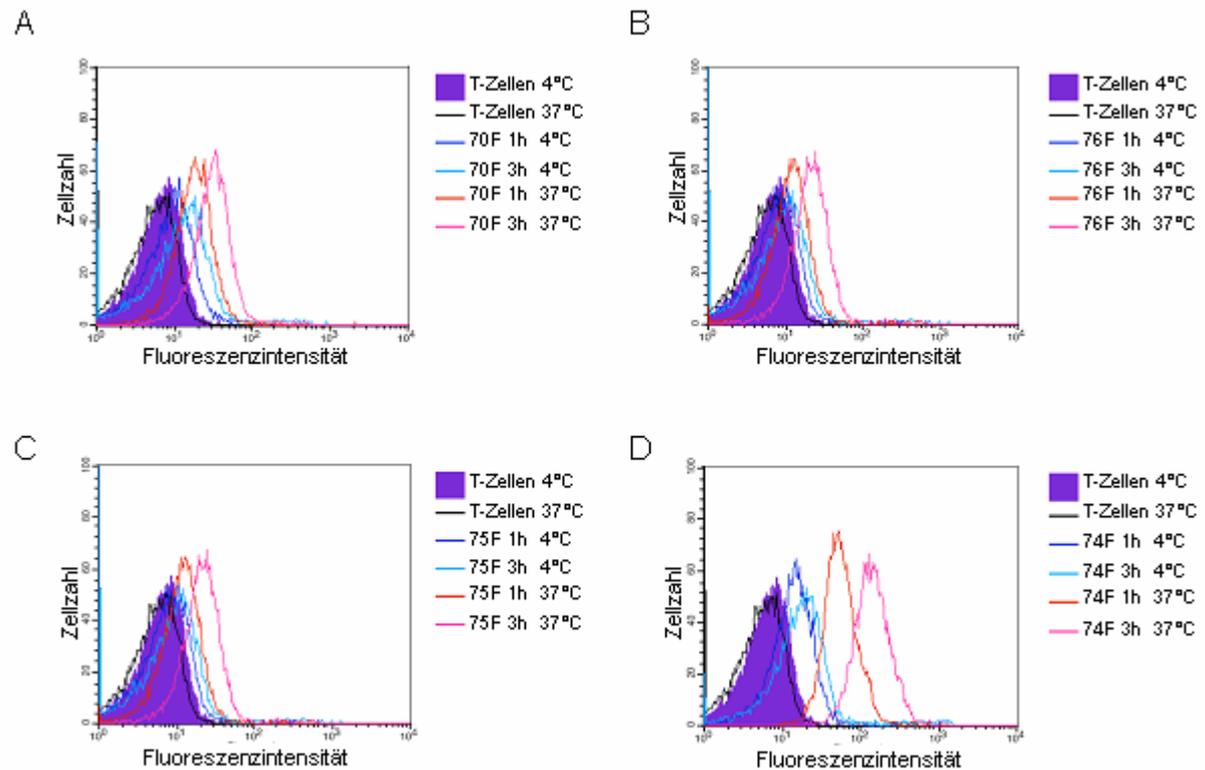


Abbildung 7.2: Durchflusszytometrie polypeptid-behandelter T-Zellen. In RPMI 1640 kultivierte T-Zellen wurden mit 0,2 mg/ml des Polypeptids (A) **70F** (kohlenhydrat-frei), (B) **76F** (glucose-funktionalisiert), (C) **75F** (mannose-funktionalisiert) bzw. (D) **74F** (galactose-funktionalisiert) inkubiert.

Beim kohlenhydrat-freien Polypeptid **70F** und beim glucose-funktionalisierten Polypeptid **76F** konnte bei einer Inkubationstemperatur von 37°C nur eine leichte Anbindung der FITC-markierten Polypeptide an die T-Zellen beobachtet werden. Auch beim mannose-funktionalisierten Polypeptid **75F** führte die Inkubation bei 37°C lediglich zu einer schwachen Fluoreszenz der T-Zellen. In Abb. 7.2 erkennt man, dass die Kurven der polypeptid-behandelten Zellen gegenüber den unbehandelten T-Zellen nur leicht verschoben sind.

Die Inkubation mit dem galactose-funktionalisiertem Polypeptid **74F** führte dagegen zu einer deutlichen Fluoreszenzfärbung der T-Zellen (Abb. 7.3). Die Kurve der behandelten T-Zellen wird durch Inkubation mit dem galactose-funktionalisierten Polypeptid deutlich nach rechts verschoben. Dies bedeutet eine deutliche Zunahme der grünen Fluoreszenz (Abb. 7.2 D).

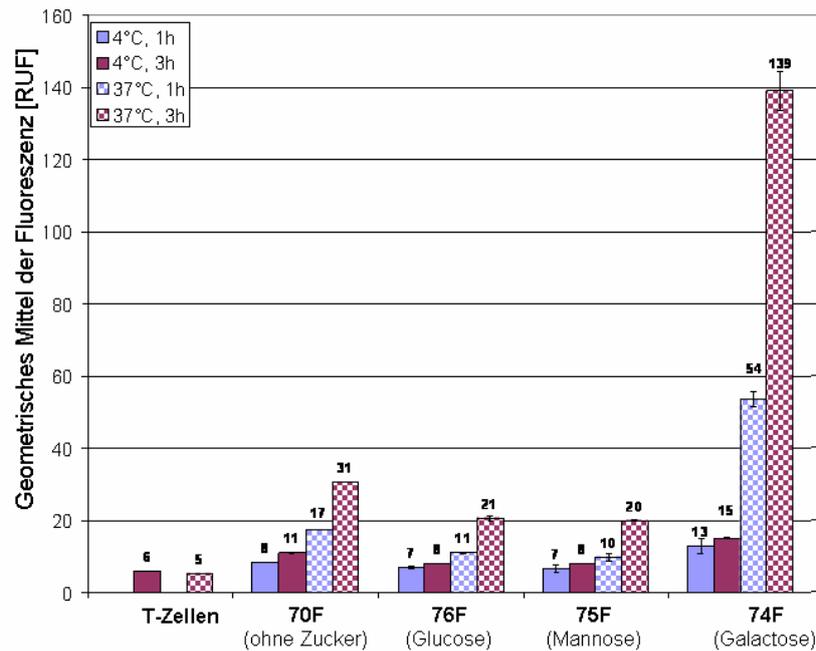
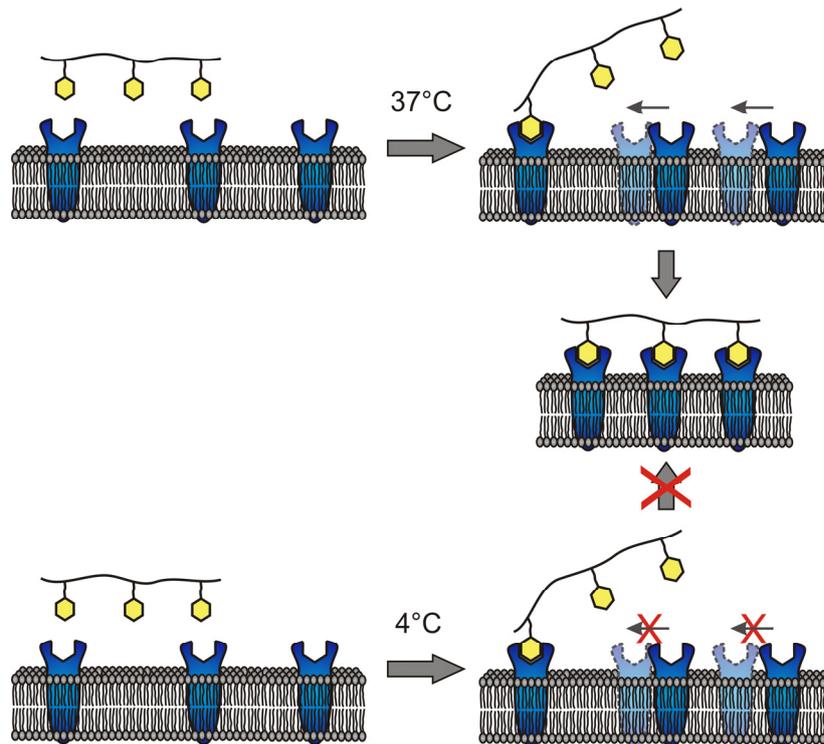


Abbildung 7.3: Geometrisches Mittel der Fluoreszenz der mit den Polypeptiden **70F** (kohlenhydrat-frei), **74F** (galactose-funktionalisiert), **75F** (mannose-funktionalisiert), **76F** (glucose-funktionalisiert) inkubierten T-Zellen.

Darüber hinaus ergaben die durchflusscytometrischen Analysen, dass die Bindung des galactose-funktionalisierten Polypeptids stark temperaturabhängig ist. Die Inkubation der T-Zellen bei 4°C führt zu einer vernachlässigbaren Steigerung der grünen Fluoreszenz. Die Inkubation bei 37°C führt dagegen zu einem signifikanten Anstieg der grünen Fluoreszenz. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Aufnahme des galactose-funktionalisierten Polypeptids auf einem aktiven, energieverbrauchenden, rezeptor-vermittelten, endocytotischen Transportprozess beruht und nicht auf einen passiven Diffusionsvorgang.

Eine andere Erklärung für die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzfärbung wäre, dass die fluoreszenzmarkierten Glycopeptide über polyvalente Wechselwirkungen gebunden werden, die ein Rezeptorclustering erfordern (Schema 7.2).



Schema 7.2: polyvalente Bindung eines multivalenten kohlenhydrat-funktionalisierten Polymers bei 37°C und 4°C.

Bei 37°C können sich die Rezeptormoleküle innerhalb der Zellmembran bewegen und sich dem, durch das Glycosylierungsmuster der relativ starren α -helicalen Glycopeptide vorgegebenen, Abstand der Liganden anpassen (Schema 7.2 oben). Bei 4°C ist die Beweglichkeit der Rezeptoren entlang der Zellmembran so stark eingeschränkt, dass dieses Rezeptorclustering nicht möglich ist (Schema 7.2 unten). Die Polymere können daher nur über schwache monovalente Wechselwirkungen gebunden werden.

7.3 Bindungsstudien an Erythrocyten

Im Arbeitskreis von Prof. Dr. INGOLF BERNHARDT wurde der Effekt von FITC-markierten kohlenhydrat-funktionalisierten Polypeptiden auf Erythrocyten untersucht. Diese kernlosen Zellen wurden mit den FITC-markierten Glycopeptiden **74F**, **78F** und **79F** sowie mit dem kohlenhydrat-freien Polypeptid **70F** inkubiert.

Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften an Erythrocyten wurden die Polypeptide mit 2 μ l Zellsuspension versetzt und mit einer HIS-TRIS-Lösung auf ein Gesamtvo-

lumen von 500 μl verdünnt. Die Konzentration der fluoreszenzmarkierten Polypeptide wurde auf 100 $\mu\text{g/ml}$ festgesetzt. Die roten Blutzellen wurden für 30 min mit den Polypeptiden inkubiert und anschließend dreimal mit einer HIS-TRIS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen an einem inversen Fluoreszenzmikroskop untersucht.

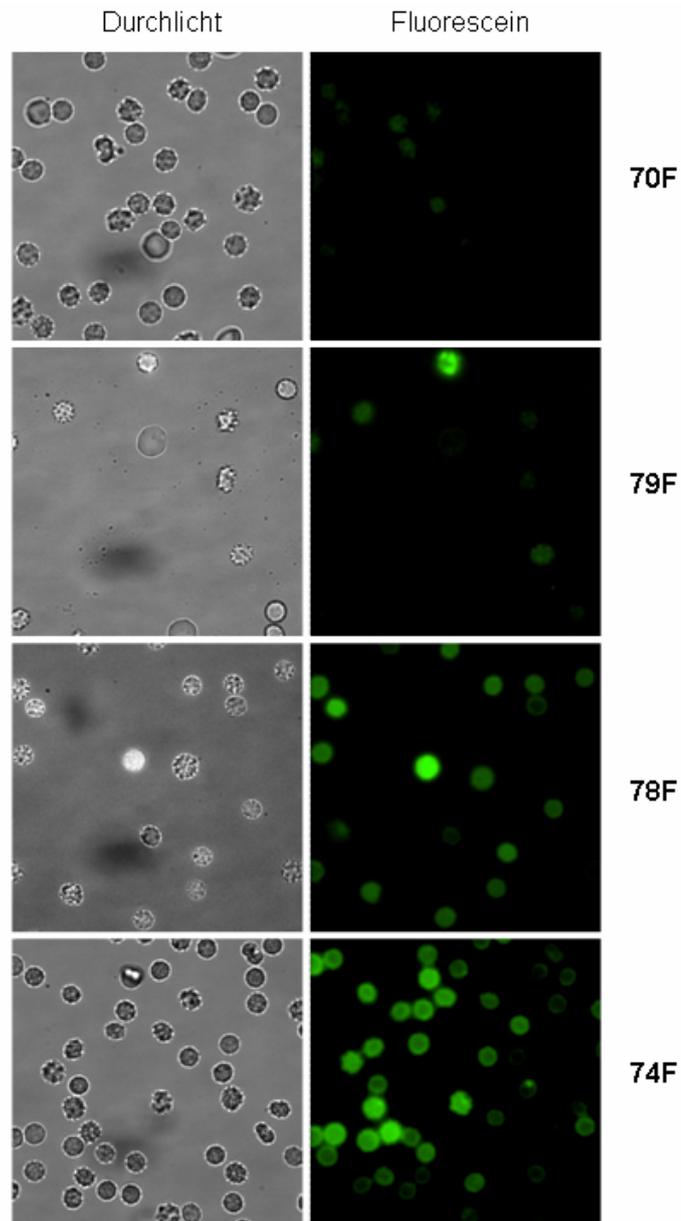


Abbildung 7.4: Fluoreszenzanalysen polypeptid-behandelter Erythrocyten.

Wie man Abb. 5.4 und Tab. 7.1 entnehmen kann wiesen dabei Zellen, die mit dem kohlenhydrat-freien Polypeptid **70F** inkubiert wurden nahezu keine grüne Fluoreszenzfärbung auf. Erythrocyten die mit dem glucose-funktionalisierten Polypeptid

Tabelle 7.1: Auszählung der Fluoreszenzanalyse (bei der Auszählung wurde nicht zwischen stark und schwach gefärbten Zellen unterschieden)

Glycopeptid	Zucker	Anteil gefärbter Zellen
70F	---	20%
74F	Galactose	93%
78F	Mannose	100%
79F	Glucose	67%

79F inkubiert wurden, weisen dagegen eine leichte Fluoreszenzfärbung auf. Die mannose- und galactose-funktionalisierten Polypeptide **78F** bzw. **74F** führen dagegen bei der Inkubation mit Erythrocyten zu einer deutlichen Fluoreszenzfärbung.

Die im Vergleich zu dem kohlenhydrat-freien Polypeptide

70F starke Bindung der Glycopeptide **74F**, **78F** und **79F** zeigt, dass die Bindung dieser Glycopeptide nicht auf unspezifischen Wechselwirkungen sondern auf der Erkennung der Glycopeptide durch Kohlenhydratrezeptoren (beispielsweise Lectinen) beruht.

Die unterschiedlich starke Bindung der glucose-, mannose- und galactose-funktionalisierten Polypeptide weist zudem auf eine kohlenhydratspezifische Erkennung der Glycopeptide durch die Erythrocyten hin.^[114, 207, 208]

Für eine genauere Analyse der Zuckerspezifität der Wechselwirkungen zwischen Glycopeptiden und Erythrocytenmembran reichen die Daten jedoch nicht aus, da hierbei weitere Faktoren wie die Blutgruppe oder die Zellform der Erythrocyten (Discocyten oder Echinocyten) berücksichtigt werden müssen.

7.4 Zusammenfassung und Ausblick

Zunächst wurde eine cytotoxische Wirkung der Glycopeptide durch XTT Assays ausgeschlossen. Anschließend wurden die spezifischen Bindungsfähigkeiten der fluoreszenz-markierten Glycopeptide an Erythrocyten und T-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusscytometrie untersucht.

Hierbei fiel besonders die starke Bindungsaffinität des galactose-funktionalisierten Polypeptids **74F** zu T-Zellen ins Auge. Die mannose- und glucose-tragenden Polypeptide **75F** und **76F** zeigten, genau wie das kohlenhydrat-freie Polypeptid **70F**, allenfalls eine geringe Bindungsfähigkeit an T-Zellen. Die durchflusscytometrischen Analysen ergaben außerdem, dass für die Bindung des galactose-funktionalisierten Polypeptids vermutlich ein Clustering der membranständigen Rezeptoren erforderlich ist.

Bei den Bindungsstudien an Erythrocyten führte das glucose-funktionalisierte Polypeptid **79F** zu einer schwachen, die mannose- und galactose-funktionalisierten Polypeptide **78F** und **74F** zu einer starken Fluoreszenzfärbung der Erythrocyten. Im Gegensatz dazu war bei dem kohlenhydrat-freien Polypeptid **70F** keine Anbindung an Erythrocyten feststellbar.

Die Unterschiede in den Bindungsaffinitäten sprechen für eine spezifische Erkennung der an die Polypeptide gebundenen Kohlenhydrate durch Rezeptoren auf den Zellmembranen sowohl der T-Zellen als auch der Erythrocyten.

Die synthetisierten Glycopeptide erfüllen damit die wichtigsten Grundvoraussetzungen für eine spätere biologische oder pharmakologische Anwendung. Zukünftig ist auch eine, zur Fluoreszenz-Markierung analoge, kovalente Bindung pharmakologischer Wirkstoffe denkbar. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kann man bereits sagen, dass die dargestellten Glycopeptide viel versprechende Kandidaten für eine zukünftige Anwendung im Bereich der gezielten Anfärbung von Zellen und dem gerichteten Transport von pharmakologischen Wirkstoffen sind.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit behandelt die Synthese kohlenhydrat-funktionalisierter Polypeptide für die multivalente Präsentation von Kohlenhydraten. Die Darstellung dieser Glycopeptide erfolgte durch ringöffnende Polymerisation kohlenhydrat-funktionalisierter NCAs.

Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-NCA **56a**, Lys(Ac₄Glc(EO)₂NCS)-NCA **56b** und Lys(Ac₄Gal(EO)₂NCS)-NCA **56c** wurden, ausgehend von den jeweiligen Zucker, über eine sechsstufige Syntheseroute synthetisiert. Die Anknüpfung der Kohlenhydratmoleküle an die ϵ -Aminogruppe von L-Lysin erfolgte hierbei über Thioharnstoff-Gruppen, die Überführung der erhaltenen Lysin-derivate in die entsprechenden NCAs mit Dichlormethylmethylether.

Durch Kombination dieser mannose-, glucose- und galactose-funktionalisierten *N*-Carboxyanhydride mit dem diethylenglycol-funktionalisierten Lysin-*N*-carboxyanhydrid **43**, gelang anschließend die direkte Synthese wasserlöslicher Glycopeptide, ohne auf ionische Aminosäurereste zurückzugreifen. Sowohl die (2,2'-Bipyridin)(1,5-Cyclooctadien)Nickel(0)- als auch die triethylamin-initiierte Polymerisation lieferte hierbei hochmolekulare ($M = 30\text{-}130$ kDa) statistische Copolypeptide, deren Zusammensetzung sich durch die Zusammenstellung der polymerisierten NCA-Gemische gut kontrollieren lässt. Die zur Abspaltung der Schutzgruppen durchgeführte Zemplén-Reaktion lieferte schließlich die nicht-ionischen wasserlöslichen Glycopeptide **63E**, **65E** und **67E** in quantitativer Ausbeute. Die dargestellten Glycopeptide weisen eine α -helicale Struktur auf und sind in Wasser über einen breiten pH-Bereich löslich, womit sie eine grundlegende Voraussetzung für eine biotechnologische Anwendung erfüllen.

Durch die zusätzliche Verwendung des Cobausteins *N*_ε-Trifluoracetyl-L-lysin gelang darüber hinaus auch die polymeranaloge Fluoreszenzmarkierung der synthetisierten Glycopeptide.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden unterschiedliche basen- und säurelabil geschützte NCAs polymerisiert um geeignete Polypeptide für die Herstellung von kohlenhydrat-modifizierten Nanopartikeln zu synthetisieren.

Mit Hilfe der Emulsions-Diffusions-Verdampfungs-Technik gelang daraus die Darstellung von sphärischen Nanopartikeln mit einem mittleren Durchmesser von 167-189 nm. Die Anknüpfung von Kohlenhydraten an die Nanopartikeloberfläche war jedoch nicht möglich, da die Nanopartikel bei der Abspaltung der Schutzgruppen zerstört wurden.

Dieses Problem konnte durch die Verwendung kohlenhydrat-funktionalisierter Polypeptide umgangen werden. So gelang es Nanopartikel aus den mannose-funktionalisierten Triblockcopolypeptiden **57** und **58** darzustellen. Angesichts der hohen Polydispersitätsindices der erhaltenen Nanopartikel (**Nano 7** und **Nano 8**) besteht bei der Identifizierung geeigneter Glycopeptide jedoch noch Optimierungsbedarf. Erfolgversprechend wäre möglicherweise die Verwendung von hydrophoben statistischen Glycopeptide oder Blockcopolypeptiden mit hydrophoben Phenylalanin-Blöcken.

Schließlich konnte in Durchflusszytometrie- und Fluoreszenz-Analysen gezeigt werden, dass die synthetisierten fluoreszenz-markierten Glycopeptide zu kohlenhydratspezifischen Bindungen mit T-Zellen und Erythrocyten fähig sind. Hierbei fiel besonders die starke Bindungsaffinität des galactose-funktionalisierten Polypeptids **74F** zu T-Zellen ins Auge. Die Temperaturabhängigkeit dieser molekularen Erkennung deutet darauf hin, dass die polyvalente Bindung des galactose-funktionalisierten Polypeptids ein Clustering der membranständigen Rezeptoren erfordert.

Da außerdem eine cytotoxische Wirkung der Glycopeptide durch XTT Assays ausgeschlossen werden konnte, erfüllen die synthetisierten Glycopeptide die wichtigsten Grundvoraussetzungen für eine spätere biotechnologische Anwendung.

Abschließend bleibt zu erwähnen, dass die zur Darstellung der kohlenhydrat-funktionalisierten NCAs **49** und **56a-c** erarbeitete Syntheseroute grundsätzlich auch

für die Synthese von Lysin-NACs geeignet ist, die anstelle von Einfachzuckern mit komplexeren Kohlenhydraten oder anderen biologischen Liganden funktionalisierten sind. In Kombination mit dem, gegenüber biologischen Rezeptormolekülen inerten, Baustein Lys(DEG)-NCA **43** eröffnet die vorgestellte Synthesestrategie den Zugang zu einem breiten Spektrum von biologisch kompatiblen, gezielt funktionalisierten Polypeptiden. In Analogie zu der erfolgreich durchgeführten kovalenten Fluoreszenzmarkierung ist darüber hinaus auch eine kovalente Bindung pharmakologischer Wirkstoffe denkbar.

Auf der Grundlage der vorliegenden Arbeit kann man daher sagen, dass die synthetisierten Glycopeptide viel versprechende Kandidaten für eine zukünftige Anwendung im Bereich der gezielten Anfärbung von Zellen und dem gerichteten Transport pharmakologischer Wirkstoffe darstellen.

9 Experimenteller Teil

9.1 Feinchemikalien und Lösemittel

Feinchemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Lancaster, ABCR, Acros Organics oder Riedel-deHaën, N_α -Benzyloxycarbonyl-L-lysin wurde von der Firma Aroz Technologies LLC (USA) erworben und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Lösemittel für Synthesen wurden in technischer Reinheit eingesetzt. Absolutierte Lösemittel wurden entweder in wasserfreier p. a. Qualität eingesetzt, oder über gängige Verfahren getrocknet und destilliert. Lösemittel für spektroskopische Untersuchungen wurden in spektroskopischer Reinheit erworben. Puffer- und Nanopartikel-Lösungen wurden mit frisch entionisiertem Wasser (MilliQ-Qualität) angesetzt, das über eine Simplicity Anlage der Firma Millipore Corp. erhalten wurde.

9.2 Methoden und Geräte

Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

NMR-Spektren wurden mit einem Spektrometer des Typs AVANCE 500 (^1H : 500.27 MHz, ^{13}C : 125.79 MHz) oder des Typs Magnet System 400 MHz Ultra shield plus (^1H : 400.00 MHz) der Firma Bruker Biospin aufgenommen. Die Messtemperatur betrug 25°C. Zur Messung der Spektren wurden 10-30 mg der Substanz in 650-700 μl Lösemittel gelöst. Polypeptide, die in den gängigen NMR-Lösemitteln nur mäßig löslich sind, wurden in Suspension gemessen.

Zur Kalibrierung der chemischen Verschiebung wurden die Signale der nicht vollständig deuterierten Lösemittel verwendet.^[209] Für ^{13}C -Spektren in D_2O wurde Acetonitril als interner Standard zugegeben und das Signal des CH_3 -Kohlenstoffs ($\delta = 1.32$ ppm) zur Kalibrierung herangezogen.

Die Rohdaten wurden mit der Software ACDLabs 7 (Version 7.11, Build: 15. Juli 2003) der Firma Advanced Chemistry Development Inc. ausgewertet. Die chemischen Verschiebungen sind in parts per million (ppm) angegeben. Bei der Angabe der Multiplizitäten in den ^1H -NMR-Spektren wurde **s** für Singulets, **d** für Dubletts, **dd** für

Doppeldoublets, **t** für Triplets, **q** für Quartetts und **quin** für Quintett verwendet. Überlagernde Signale und Multipletts wurden mit **m**, breite Signale mit **br** gekennzeichnet.

Infrarotspektroskopie

Infrarotspektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer Tensor 27 der Firma Bruker Optik GmbH als Reflexionsspektren mit der GoldenGate-Micro-ATR-Technik aufgenommen. Zur Auswertung der Spektren wurde das Programm OPUS 4 (Version 4.2, Build: 4.2.73) verwendet.

Massenspektrometrie (MS)

Alle ESI-Spektren wurden von der Firma magrochem mit einem Micromass ZQ-4000 Massenspektrometer der Firma Waters GmbH aus methanolischer Lösung aufgenommen und mit der Software MassLynx (Version: 4.0 SP1) ausgewertet.

Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

Massenmittel M_w und Polydispersität PD wurden mittels organischer GPC ermittelt. In Abhängigkeit von der Löslichkeit der Substanzen wurde entweder THF oder DMAc als Lösungsmittel verwendet. Die GPC-Messungen in THF erfolgten unter Einsatz einer Reihenschaltung aus einer Vor-(MCX) und zweier Trennsäulen (MCX 10^3 und MCX 10^6) der Firma Polymer Standard Service GmbH. Zur Detektion wurde ein PSS SLD 7000 BI-MwA Lichtstreu-Detektor der Firma Polymer Standard Service GmbH, ein LR40 Brechungsindex-Detektor der Firma VisoTek GmbH (Wellenlänge: 670 nm) und 2487 Dual λ UV-Detektor der Firma Waters GmbH (Wellenlänge: 315 nm) verwendet. Für die GPC-Messungen in DMAc wurde hingegen eine SDV Säule der Firma Polymer Standard Service GmbH mit einer Partikelgröße von 10^5 Å gewählt (Trennbereich 1-1000 kDa). Zur Detektion diente hier nur ein RI-Detektor 2410 der Firma Waters. Die Molmassen wurden relativ zu Polystyrolstandards ($M_n = 1.62-1090$ kDa) ermittelt.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden auf Fertigfolien der Firma Macherey-Nagel & Co. (ALUGRAM SIL G/ UV254; Schichtdicke 0.25 mm) durchgeführt. Die Verbindungen wurden direkt unter UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) oder durch Eintauchen in eine schwefelsaure, ethanolische, Anisaldehyd-Lösung (2:190:8) und anschließender Erwärmung mit einem Heißluftfön sichtbar gemacht.

pH-Wert

pH-Wert-Messungen und Einstellungen erfolgten mit dem pH-Meter MP220 der Firma Mettler-Toledo GmbH.

Kontinuierliche Ultrafiltration

Zur Ultrafiltration wurden die Polypeptide in Methanol gelöst und mit dem etwa zehnfachen Volumen an Methanol gegen eine UF-C5 Membran der Firma Microdyn-Nadir GmbH kontinuierlich filtriert (Membranmaterial: Regeneratcellulose, Ausschlussgrenze Herstellerangabe: 5 kDa). Als Rührzellen dienten Filtrationszellen der Firma Berg-hof GmbH. Der kontinuierliche Lösungsmittelzufluss wurde mit einer Gamma/L Pumpe der Firma ProMinent Dosiertechnik GmbH geregelt (Druck < 5bar).

Bestimmung von Größe und Oberflächenladung (ζ -Potential) bei Nanopartikeln

Die Bestimmung der Größe und Größenverteilung der Nanopartikel erfolgte durch Photonenkorrelationsspektroskopie mit dem Zeta Sizer Nano-ZS der Firma Malvern Instruments in wässrigen Lösungen mit einer Massenkonzentration von $\beta = 0.1$ mg/ml. Die Messung des ζ -Potentials wurde ebenfalls mit dem Zeta Sizer Nano-ZS in salzsaurigen Lösungen (pH = 2.5) mit einer Massenkonzentration von $\beta = 0.1$ mg/ml durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde die Software Zetasizer Software 6.01 verwendet.

Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy AFM)

Die Morphologie der Partikel wurde mittels AFM untersucht. Hierzu wurde ein Rasterkraftmikroskop von Typ Bioscope verwendet, das mit einem Bioscope BS3-Z2-Scankopf (Digital Instruments Inc./Veeco, Santa Barbara, California, USA), einem Zeiss Axiovert und einem Nanoscope IV NS 4-Controller (Digital Instruments Inc./Veeco, Santa Barbara, California, USA) ausgestattet war. Die Partikel wurden unter Umgebungsbedingungen im Intermittierenden-Modus (Tapping-Mode) mittels einer NSC-16-Messspitze (Mikromasch, San Jose, Californien, USA), mit einer Resonanzfrequenz von 150-190 kHz und einer Federkonstante von ca. 40 N/m untersucht. Die Proben wurden unverdünnt auf Glimmer (INCI: Mica) aufgetragen und an der Luft getrocknet. Zur Auswertung der Daten wurde die Software NanoScope SPM verwendet.

Durchflussscytometrie (FACS)

Die Fluoreszenzintensitäten der zuvor mit Polymeren inkubierten T-Lymphozyten wurden mit einem Durchflussscytometer des Typs FACSCalibur der Firma Becton Dickinson gemessen. Dabei betrug die Exzitationswellenlänge 488 nm (luftgekühlter Argon-Laser). Das von den Zellen emittierte Licht wurde in einem Wellenlängenspektrum von 530 nm (+/- 15 nm) mit einem optischen FL1-Detektor detektiert. Die Rohdaten wurden mit dem Programm BD CellQuest Pro (V 5.1.1) der Firma Becton Dickinson ausgewertet.

Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzanalysen wurden an einem Mikroskop des Typs Eclipse TE 2000-E der Firma Nikon durchgeführt. Als Lichtquelle diente das VisiChrome high speed Polychromator System der Firma Visitron Systems in Verbindung mit einem Exitationsfilter (450-490 nm) der Firma AHF. Die Detektion des Fluoreszenzlichts erfolgte mit einer DCC Kamera, Model 512B der Firma Cascade Photometrics (USA), in Verbindung mit dem Software Programm MetaVue der Firma MDS Analytical Technologies.

9.3 Synthesen

9.3.1 Monomere

Die Synthese der α -Aminosäure-*N*-carboxyanhydride **6-13** erfolgte nach der Fuchs-Farthing-Methode^[57] durch die direkte Phosgenierung der jeweiligen geschützten L-Aminosäuren mit Triphosgen (Bis(trichlormethyl)carbonate) **5**. Alle Reaktionen wurden in Anlehnung an die von CÉLINE GUILLERMAIN^[134, 135] und DREW S. POCHER^[142] publizierten Vorschriften durchgeführt. Da die Synthesebedingungen aller acht Reaktionen identisch waren, wird hier lediglich eine allgemeine Synthesevorschrift für einen 10 mmol Ansatz (bezogen auf die eingesetzte Aminosäure) angegeben. Im Rahmen dieser Arbeit hat sich jedoch gezeigt, dass mit Hilfe dieser Synthesevorschrift NCAs problemlos auch in kleineren oder größeren Mengen hergestellt werden können. Im Anschluss an die allgemeine Synthesevorschrift wird die Synthese des in dieser Arbeit häufig verwendeten *N*_ε-Trifluoracetyl-L-lysin-*N*-carboxyanhydrids **6** ausführlich beschrieben. Für die übrigen NCAs werden nur gegebenenfalls zusätzlich durchgeführte Reinigungsschritte sowie die analytischen Daten angegeben.

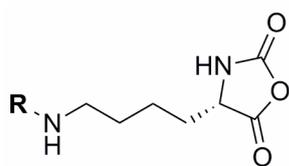
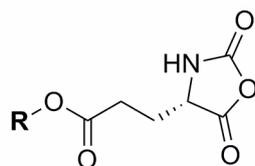
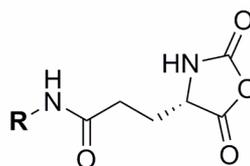
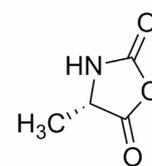
Allgemeine Synthesevorschrift für α -Aminosäure-*N*-carboxyanhydride

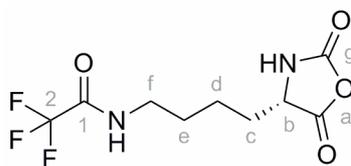
10 mmol der entsprechenden geschützten α -Aminosäure werden unter Stickstoffatmosphäre in 100 ml wasserfreiem THF gelöst bzw. suspendiert und auf 65°C erwärmt. Unter Stickstoffgegenstrom werden 4 mmol Triphosgen zugegeben. In einigen Fällen bildet sich direkt nach der Zugabe des Triphosgens ein weißer Niederschlag, der sich jedoch schnell wieder auflöst. Die Reaktionslösung wird unter Rückfluss gerührt. Zur Entfernung des entstehenden Chlorwasserstoffs wird ein kontinuierlicher Schutzgasstrom durch das Reaktionsgefäß geleitet. Falls sich die Aminosäure nach 1 h nicht vollständig gelöst hat, wird eine zusätzliche Spatelspitze Triphosgen zugegeben. Nach 3 h wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer abdestilliert und der erhaltene Rückstand in 100 ml Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und mit eiskalter wässriger Natriumchloridlösung, dreimal mit eiskalter wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und noch einmal mit eiskalter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen. Hierbei muss unbedingt zügig gearbeitet werden. Die organische

Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und auf 10 ml eingengt. Diese Lösung tropft man zu 200 ml *n*-Hexan und rührt 30 min bei 0°C nach. Um einen flockigen, gut filtrierbaren Niederschlag zu erhalten, sollte das *n*-Hexan hierbei stark gerührt werden während die NCA-Lösung zugetropft wird. Andernfalls bildet sich häufig ein zäher Niederschlag, der noch große Mengen des Lösungsmittels enthält und an den Gefäßwänden auskristallisiert. Zur vollständigen Fällung wird das Gemisch anschließend 18 h bei -20°C ruhen gelassen. Das Produkt wird abgesaugt, mit viel *n*-Hexan gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die so erhaltenen Produkte sind in der Regel NMR-spektroskopisch rein. Zur weiteren Reinigung können diese weißen Feststoffe noch umkristallisiert werden. Ein universal einsetzbares Lösemittel gibt es hierfür jedoch nicht. Die Ausbeuten der über die allgemeine Synthesevorschrift erhaltenen Produkte sind in Tab. 9.1 zusammengefasst.

Tabelle 9.1: Ausbeute isolierter NCAs

NCA	Aminosäure	Schutzgruppe R	Ausbeute
Lys(TFA)-NCA 6	L-Lysin	TFA	80%
Lys(Z)-NCA 7	L-Lysin	Z	85%
Lys(Boc)-NCA 8	L-Lysin	Boc	56%
Glu(Bzl)-NCA 9	L-Glutaminsäure	Benzyl	78%
Glu(<i>t</i> -Bu)-NCA 10	L-Glutaminsäure	<i>tert.</i> -Butyl	71%
Glu(TCE)-NCA 11	L-Glutaminsäure	Trichlorethyl	51%
Ala-NCA 12	L-Alanin	---	70%
Gln(Trt)-NCA 13	L-Glutamin	Trityl	70%

**6/7/8****9/10/11****13****12**

N_ϵ -Trifluoracetyl-L-lysin- N -carboxyanhydrid (TFA-Lys-NCA) 6

2.4 g (10 mmol) N_ϵ -Trifluoracetyl-L-lysin werden unter Stickstoffatmosphäre in 100 ml wasserfreiem THF suspendiert und auf 65°C erwärmt. Unter Stickstoffgegenstrom werden 1.2 g (4.0 mmol) Triphosgen zugegeben. Der entstehende weiße Niederschlag löst sich schnell wieder auf und die klare Reaktionslösung wird 3 h unter Rückfluss und Stickstoffstrom gerührt. Anschließend wird das THF am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der erhaltene Rückstand wird in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und zügig mit eiskalter wässriger Natriumchloridlösung, dreimal mit eiskalter wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und noch einmal mit eiskalter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und auf 10 ml eingengt. Diese Lösung tropft man zu 200 ml stark gerührtem *n*-Hexan und rührt 30 min bei 0°C nach. Zur vollständigen Fällung wird das Gemisch 18 h bei -20°C ruhen gelassen. Das Produkt wird abgesaugt, mit *n*-Hexan gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält das Produkt als weißen pulvrigen Feststoff.

Ausbeute: 2.15 g (8.0 mmol)

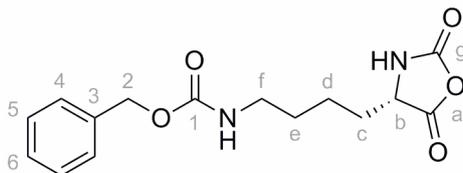
80% (bezogen auf N_ϵ -Trifluoracetyl-L-lysin)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (DMSO- d_6) = 1.23-1.41 (**m**, 2H, d); 1.49 (**quin**, $^3J_{\text{H-H}} = 7.27$ Hz, 2H, e); 1.61-1.79 (**m**, 2H, c); 3.16 (**q**, $^3J_{\text{H-H}} = 6.64$ Hz, 2H, f); 4.42 (**t**, $^3J_{\text{H-H}} = 5.27$ Hz, 1H, b); 9.07 (**s**, 1H, α -NH); 9.36 (**s-Br**, 1H, ϵ -NH)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (DMSO- d_6) = 21.58 (d); 27.64 (e); 30.52 (c); 38.82 (f); 56.94 (b); 115.96 (**q**, $^1J_{\text{C-F}} = 288.0$ Hz 2); 151.94 (g); 155.64/155.99/156.35/156.71 (1); 171.58 (a)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 1166$ (s); 1257 (s); 1297 (m); 1313 (m); 1377 (m); 1476 (w); 1547 (s, $\delta_{\text{N-H}}$); 1692 (s, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1762 (s, $\nu_{\text{C=O}}$ Anhydrid); 1807 (s, $\nu_{\text{C=O}}$ Anhydrid); 2955 (m); 3316 (s)

*N*_ε-Benzyloxycarbonyl-L-lysin-*N*-carboxyanhydrid (Lys(Z)-NCA) 7



Die Darstellung erfolgt über die allgemeine Synthesevorschrift auf Seite 123.

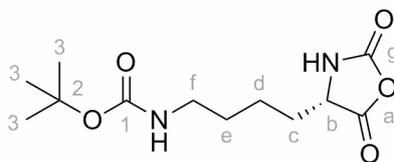
Ausbeute: 2.60 g (8.5 mmol)

85% (bezogen auf *N*_ε-Benzyloxycarbonyl-L-lysin)

¹H-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 1.25-1.42 (m, 4H, d/e); 1.61-1.75 (m, 2H, c); 2.98 (q, ³J_{H-H} = 6.53 Hz, 2H, f); 4.41 (t, ³J_{H-H} = 5.77 Hz, 1H, b); 5.00 (s, 2H, 2); 7.23 (t-br, ³J_{H-H} = 5.52 Hz, 1H, ε-NH); 7.27-7.38 (m, 5H, 4/5/6); 9.05 (s-br, 1H, α-NH)

¹³C-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 21.56 (d); 28.74 (e); 30.60 (c); 39.92 (f); 56.97 (b); 65.10 (2) 127.67/127.70/128.31 (4/5/6); 137.23 (3); 151.93 (g); 156.07 (1); 171.61 (a)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 1138$ (s); 1247 (s); 1286 (m); 1341 (w); 1369 (m); 1454 (m); 1529 (s, $\delta_{\text{N-H}}$); 1686 (s, $\nu_{\text{C=O}}$ Urethan); 1772 (s, $\nu_{\text{C=O}}$ Anhydrid); 1805 (s, $\nu_{\text{C=O}}$ Anhydrid); 1849 (s); 2865 (m); 2938 (m); 3337 (s)

***N*_ε-*tert*.-Butyloxycarbonyl-L-lysin-*N*-carboxyanhydrid (Lys(Boc)-NCA) 8**

Die Darstellung erfolgt über die allgemeine Synthesevorschrift auf Seite 123.

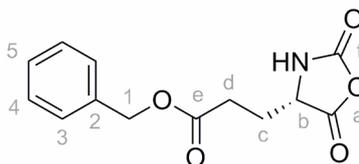
Ausbeute: 1.52 g (5.6 mmol)

56% (bezogen auf *N*_ε-*tert*.-Butyloxycarbonyl-L-lysin)

¹H-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 1.15-1.40 (**m**, 4H, d/e); 1.36 (**s**, 9H, 3); 1.58-1.75 (**m**, 2H, c); 2.88 (**q**, ³J_{H-H} = 6.52 Hz, 2H, f); 4.42 (**dd**, ³J_{H-H} = 7.15 Hz/³J_{H-H} = 5.14 Hz 1H, b); 6.75 (**t-br**, ³J_{H-H} = 5.27 Hz, 1H, ε-NH); 9.04 (**s-br**, 1H, α-NH)

¹³C-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 21.56 (d); 28.21 (3); 28.83 (e); 30.60 (c); 39.71 (f); 56.98 (b); 77.21 (2); 151.92 (g); 155.44 (1); 171.60 (a)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 1248 (**s**); 1345 (**m**); 1380 (**m**); 1455 (**m**); 1525 (**s**, δ_{N-H}); 1650 (**s**, ν_{C=O} Urethan); 1768 (**s**, ν_{C=O} Anhydrid); 1806 (**s**, ν_{C=O} Anhydrid); 2867 (**m**); 2935 (**m**); 3335 (**s**)

***γ*-Benzyl-L-glutaminsäure-*N*-carboxyanhydrid (Glu(Bzl)-NCA) 9**

Die Darstellung erfolgt über die allgemeine Synthesevorschrift auf Seite 123.

Ausbeute: 2.10 g (7.8 mmol)

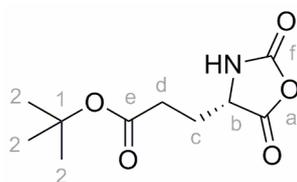
78% (bezogen auf L-Glutaminsäure- γ -benzylester)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 2.03-2.15 (**m**, 1H, **c**); 2.21-2.29 (**m**, 1H, **c'**); 2.57 (**t**, $^3J_{\text{H-H}} = 7.03$ Hz, 2H, **d**); 4.37 (**t**, $^3J_{\text{H-H}} = 5.52$ Hz, 1H, **b**); 5.12 (**s**, 2H, **1**); 6.76 (**s-br**, 1H, $\alpha\text{-NH}$); 7.30-7.38 (**m**, 5H, 3/4/5)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 26.80 (**c**); 29.64 (**d**); 56.82 (**b**); 67.02 (**1**); 128.28/128.51/128.65 (3/4/5); 139.21 (**2**); 152.04 (**f**); 169.40 (**e**); 172.31 (**a**)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 1185$ (**s**); 1197 (**s**); 1254 (**s**); 1284 (**w**); 1313 (**m**); 1340 (**m**); 1362 (**m**); 1388 (**m**); 1447 (**m**); 1496 (**m**); 1583 (**w**); 1606 (**w**); 1703 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$ Ester); 1775 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$ Anhydrid); 1843 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$ Anhydrid); 1866 (**m**); 2936 (**w**); 3251 (**s**)

γ -*tert*-Butyl-L-glutaminsäure-*N*-carboxyanhydrid (Glu(*t*-Bu)-NCA) 10



Die Darstellung erfolgt über die allgemeine Synthesevorschrift auf Seite 123.

Ausbeute: 1.60 g (7.1 mmol)

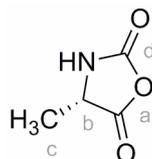
71% (bezogen auf L-Glutaminsäure- γ -*tert*-butylester)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.43 (**s**, 9H, **2**); 2.01-2.10 (**m**, 1H, **c**); 2.18-2.26 (**m**, 1H, **c'**); 2.44 (**t**, $^3J_{\text{H-H}} = 7.03$ Hz, 2H, **d**); 4.38 (**m**, 1H, **b**); 6.79 (**s-br**, 1H, $\alpha\text{-NH}$);

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 26.94 (**c**); 27.97 (**2**); 30.95 (**d**); 57.09 (**b**); 81.83 (**1**); 151.98 (**f**); 169.56 (**e**); 171.90 (**a**)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 1156$ (s); 1245 (s); 1284 (s); 1310 (m); 1335 (m); 1370 (m);
1394 (w); 1413 (w); 1455 (m); 1696 (s, $\nu_{\text{C=O}}$ Ester); 1791 (s, $\nu_{\text{C=O}}$ Anhydrid);
1834 (w); 1859 (s, $\nu_{\text{C=O}}$ Anhydrid); 2985 (m); 3350 (s)

Alanin-*N*-carboxyanhydrid (Ala-NCA) 12



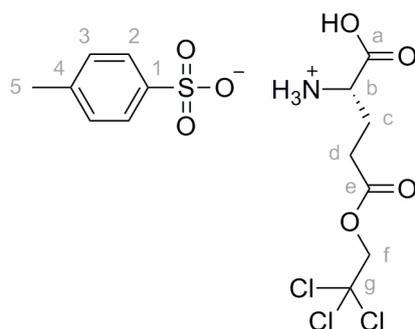
Die Darstellung erfolgt über die allgemeine Synthesevorschrift auf Seite 123.

Ausbeute: 0.80 g (7.0 mmol)

70% (bezogen auf L-Alanin)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (DMSO- d_6) = 1.33 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.03$ Hz, 3H, c); 4.46 (q, $^3J_{\text{H-H}} = 7.03$ Hz, 1H, b); 8.98 (s-br, 1H, NH);

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (DMSO- d_6) = 16.77(c); 52.81 (b); 151.68 (d); 172.49 (a)

γ -(2,2,2-trichlorethyl)-L-glutaminsäure Hydrosylat 2

Die Synthese von **2** erfolgte in Anlehnung an eine von KAZUNORI ISHIKAWA und TAKESHI ENDO veröffentlichten Vorschrift.^[144]

10 g (68 mmol) L-Glutaminsäure, 12 g (80 mmol) 2,2,2-Trichlorethanol und 19,4 g (102 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat werden in 130 ml Toluol suspendiert und 6 h bei 140°C am Wasserabscheider gerührt. Zur Abtrennung noch ungelöster Feststoffe wird die Reaktionslösung heiß durch einen vorgeheizten Büchnertrichter filtriert. Man lässt das Filtrat abkühlen und fällt das Produkt in 800 ml Diethylether. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit 600 ml Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Auf diese Weise erhält man **38** als weißen pulverförmigen Feststoff.

Ausbeute: 21.05 g (46.7 mmol)

69% (bezogen auf L-Glutaminsäure)

¹H-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 1.94-2.17 (**m**, 2H, **c**); 2.28 (**s**, 3H, **5**); 2.32-2.83 (**m**, 2H, **d**); 3.98 (**t**, ³J_{H-H} = 6.28 Hz, 1H, **b**); 4.85-4.92 (**m**, 2H, **f**); 7.11 (**m**, 2H, **3**); 7.41 (**m**, 2H, **2**); 8.26 (**s-br**, 3H, α -NH₃)

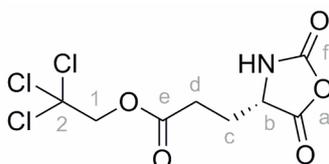
¹³C-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 20.77 (**5**); 24.94 (**c**); 29.08 (**d**); 51.12 (**b**); 73.23 (**f**); 95.18 (**g**); 125.47 (**2**); 128.06 (**3**); 137.71 (**4**); 145.51 (**1**); 170.38 (**a**); 170.47 (**e**)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 1111 (**m**); 1187 (**m**); 1230 (**m**); 1251 (**m**); 1282 (**w**); 1308 (**m**); 1373 (**m**); 1447 (**m**); 1545 (**m**, $\nu_{C=C}$); 1652 (**m**, $\nu_{C=C}$); 1742 (**s**, $\nu_{C=O}$ Säure); 1793 (**s**, $\nu_{C=O}$ Ester); 1848 (**m**); 2961 (**w**); 3168 (**m**); 3271 (**s**)

Molmasse: 276.97 g/mol

MS(ESI): m/z (MeOH) = 277.95 [M-OTos]⁺

γ -(2,2,2-Trichlorethy)-L-glutaminsäure-N-carboxyanhydrid (Glu(TCE)-NCA) **11**



Die Darstellung erfolgt über die allgemeine Synthesevorschrift auf Seite 123. Zur weiteren Reinigung wird das Produkt zweimal aus 1,2-Dichlorethan umkristallisiert.

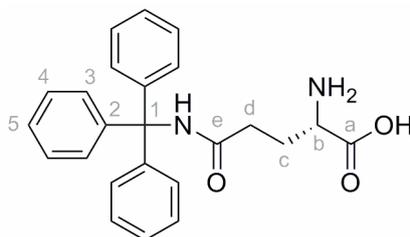
Ausbeute: 1.55 g (5.1 mmol)

51% (bezogen auf **2**)

¹H-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 2.16-2.25 (**m**, 1H, c); 2.28-2.37 (**m**, 1H, c'); 2.72 (**t**, ³J_{H-H} = 7.03 Hz, 2H, d); 4.46 (**t**, ³J_{H-H} = 6.78 Hz, 1H, b); 4.77 (**s**, 2H, 1); 6.46 (**s-br**, 1H, α -NH)

¹³C-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 26.63 (c); 29.25 (d); 56.62 (b); 74.24 (1); 94.48 (2); 152.01 (f); 169.03 (e); 170.78 (a)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 1111 (**m**); 1187 (**m**); 1207 (**w**); 1230 (**m**); 1250 (**m**); 1282 (**m**); 1329 (**m**); 1372 (**w**); 1417 (**w**); 1447 (**m**); 1526 (**w**); 1739 (**s**, $\nu_{C=O}$ Ester); 1792 (**s**, $\nu_{C=O}$ Anhydrid); 1847 (**m**, $\nu_{C=O}$ Anhydrid); 2960 (**s**); 3167 (**m**); 3253 (**m**)

***N*_δ-Triphenylmethyl-L-glutamin (Gln(Trt)-OH) 4**

Die selektive Entschützung des *N*_α-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*_δ-triphenylmethyl-L-glutamins (Fmoc-Gln(Trt)-OH) **3** erfolgte nach einer literaturbekannten Methode.^[145, 146]

5 g (8.2 mmol) Fmoc-Gln(Trt)-OH **3** werden in 50 ml wasserfreiem DMF gelöst, mit 10 ml Piperidin versetzt und 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird am Rotationsverdampfer auf 10 ml eingengt und das Produkt in 300 ml Diethylether ausgefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit 500 ml Diethylether gewaschen. Man erhält das Produkt **4** als weißes Pulver.

Ausbeute: 3.17 g (8.2 mmol)

100% (bezogen auf **3**)

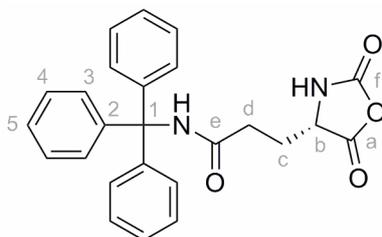
¹H-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 1.70-1.89 (**m**, 2H, **c**); 2.32-2.46 (**m**, 2H, **d**); 3.11 (**t**, ³J_{H-H} = 6.53 Hz, 1H, **b**); 7.16-7.27 (**m**, 15H, 3/4/5); 7.70 (**s-br**, 1H, α-NH); 8.99 (**s**, 1H, δ-NH)

¹³C-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 27.51 (**c**); 32.89 (**d**); 53.54 (**b**); 69.18 (**1**); 126.26 (**5**); 127.41 (**3**); 128.48 (**4**); 144.95 (**2**); 170.24/171.72 (**a/e**)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 1080 (**w**); 1115 (**w**); 1258 (**w**); 1289 (**w**); 1327 (**m**); 1381 (**m**); 1445 (**m**); 1490 (**m**); 1518 (**s**, δ_{N-H} Amid); 1595 (**m**, δ_{N-H} Amin); 1649 (**s**, ν_{C=O} Amid); 2360 (**m**); 3028 (**m**); 3255 (**m**)

Molmasse: 388.46 g/mol

MS(ESI): m/z (MeOH) = 387.31 [M-H]⁻

***N*₈-Triphenylmethyl-L-glutamin-*N*-carboxyanhydrid (Gln(Trt)-NCA) 13**

Die Darstellung erfolgt über die allgemeine Synthesevorschrift auf Seite 123.

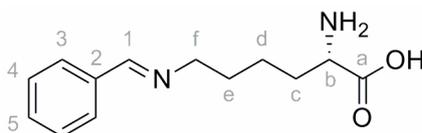
Ausbeute: 2.88 g (6.9 mmol)

70% (bezogen auf **4**)

¹H-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 1.76-1.94 (**m**, 2H, **c**); 2.32-2.47 (**m**, 2H, **d**); 4.33 (**t**,
³J_{H-H} = 6.78 Hz, 1H, **b**); 7.15-7.28 (**m**, 15H, **3/4/5**); 8.66 (**s**, 1H, δ- NH);
 9.02 (**s**, 1H, α-NH)

¹³C-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 26.85 (**c**); 30.77 (**d**); 56.42 (**b**); 69.28 (**1**); 126.35
 (**5**); 127.47 (**3**); 128.48 (**4**); 144.79 (**2**); 151.86 (**f**); 170.59/171.38 (**a/e**)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 1105 (**s**); 1186 (**w**); 1214 (**w**); 1253 (**w**); 1278 (**w**); 1358 (**w**);
 1446 (**m**); 1490 (**s**); 1597 (**w**); 1662 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1779 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$ Anhydrid);
 1853 (**m**, $\nu_{\text{C=O}}$ Anhydrid); 2931 (**w**); 3057 (**w**); 3304 (**m**)

***N*_ε-Benzyliden-L-lysin 37**

Die Synthese wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von YUNGUI PENG und TAO YE durchgeführt.^[165]

50 g (274 mmol) L-Lysin Monohydrochlorid werden in 140 ml 2 M wässriger Lithiumhydroxidlösung gelöst und mit einem Kryostaten auf 0°C gekühlt. Man tropft 30 ml (297 mmol) Benzaldehyd langsam zu und rührt die erhaltene Emulsion mit Hilfe eines KPG-Rührers 4 h bei 0°C. Die durch den gebildeten weißen Niederschlag breiige Suspension wird noch 45 min bei 4°C nachgerührt und anschließend mit 250 ml kaltem Ethanol verdünnt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit 100 ml kaltem Ethanol gewaschen. Das Produkt wird in 250 ml kaltem Ethanol resuspendiert, erneut abgesaugt und mit 500 ml kaltem Ethanol gewaschen. Man erhält **37** in Form eines weißen Feststoffs.

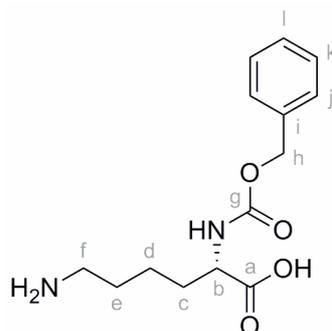
Ausbeute: 26.5 g (113 mmol)

42% (bezogen auf L-Lysin Monohydrochlorid)

¹H-NMR: δ/ppm (D₂O) = 1.16-1.56 (**m**, 6H, c/d/e); 3.11 (**m**, 2H, f); 3.35 (**t**, ³J_{H-H} = 6.78, b); 7.09-7.51 (**m**, 5H, 3/4/5); 7.98 (**s**, 1H, 1)

¹³C-NMR: δ/ppm (D₂O) = 22.94 (d); 29.08 (c); 31.64 (e); 55.80 (b); 60.12 (f); 127.87/128.54/130.75 (3/4/5); 135.04 (2); 162.66 (1); 183.20 (a)

*N*_α-Benzyloxycarbonyl-L-lysin (**Z-Lys-OH**) **38**



Die Synthese von **38** erfolgte in Anlehnung an eine von AIMEE BENCE und PETER CROOKS veröffentlichte Vorschrift zur regioselektiven Schützung von Lysin.^[164]

25 g (106 mmol) **37** werden in einem Gemisch aus 50 ml 1 M wässriger Natriumhydroxidlösung und 50 ml Ethanol gelöst und mit einem Eis/Kochsalz-Bad auf -20°C

gekühlt. 15.6 ml (106 mmol) eiskalter Chlorameisensäurebenzylester werden zusammen mit 154 ml eines vorgekühlten Gemisches aus 1 M wässriger Natriumhydroxidlösung und Ethanol im Verhältnis (v/v) 2.5 : 1 über einen Zeitraum von 1 h portionsweise zugegeben. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt ist, gibt man 22 ml konzentrierte Salzsäure zu und rührt 10 min nach. Es bildet sich ein weißer Niederschlag. Die Suspension wird 5 min bei 50°C gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer auf 100 ml eingeeengt. Nachdem der pH-Wert mit 1 M wässriger Natriumhydroxidlösung auf pH = 6.2 eingestellt ist, wird die nun fast klare Lösung filtriert und zweimal mit je 100 ml Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wird gefriergetrocknet und man erhält **38** als weißes Pulver.

Ausbeute: 13.46 g (48 mmol)

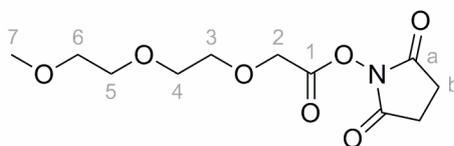
45% (bezogen auf **37**)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (Methanol- d_4) = 1.35-1.80 (**m**, 6H, c/d/e); 3.09 (**t**, $^3J_{\text{H-H}} = 6.78$, 2H, f); 3.99-4.03 (**m**, 1H, b); 5.03-5.08 (**m**, 1H, h); 7.24-7.36 (**m**, 5H, 1/k/l)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (Methanol- d_4) = 23.96 (**d**); 30.58 (**e**); 33.80 (**c**); 41.63 (**f**); 57.60 (**b**); 67.38 (**h**); 128.77/128.91/129.42 (**j/k/l**); 138.35 (**i**); 158.20 (**g**); 179.51 (**a**)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 1048$ (**m**); 1130 (**w**); 1243 (**s**); 1341 (**w**); 1407 (**m**); 1454 (**w**); 1517 (**s**, $\delta_{\text{N-H}}$ Urethan); 1588 (**s**, $\delta_{\text{N-H}}$ Amin); 1689 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$ Urethan); 2935 (**m**); 3033 (**w**); 3286 (**m**)

N-{2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]acetyl}-oxysuccinimid **41**



30 g (0.168 mol) 2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]essigsäure und 22.5 g (0.195 mol) NHS werden in 900 ml THF gelöst und mit einem Eisbad gekühlt. Zu dieser Lösung gibt man 36 g (0.174 mol) DCC und rührt 30 min bei 0°C. Hierbei bildet sich nach kurzer Zeit ein weißer Niederschlag. Das Reaktionsgemisch wird für 20 h in den Kühlschrank (4°C) gestellt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abgesaugt und das Filtrat auf 30 ml eingengt. Die Lösung wird wegen des ausfallenden Niederschlags erneut filtriert und anschließend am Rotationsverdampfer vom restlichen Lösemittel befreit. Das ölige Produkt wird mit 30 ml THF verdünnt und für 2 h auf 4°C gekühlt. Man filtriert über Celite und spült mit wenig THF nach. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis sich beim Abkühlen kein Niederschlag mehr bildet. Nach der Trocknung im Vakuum erhält man das Produkt **41** als blassgelbes Öl.

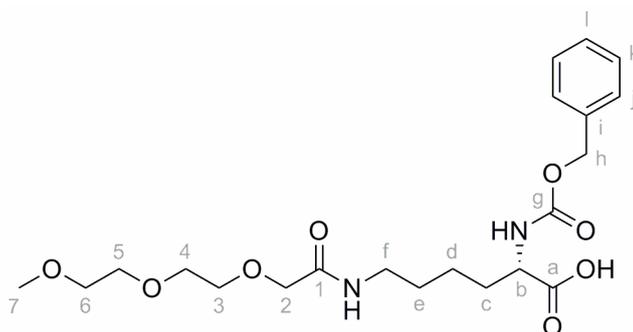
Ausbeute: 43.82 g (0.159 mol)

95% (bezogen auf 2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]essigsäure)

¹H-NMR: δ/ppm (CDCl₃) = 2.81 (**s-br**, 4H, b); 3.34 (**s**, 3H, 7); 3.50-3.53 (**m**, 2H, 6); 3.60-3.62 (**m**, 2H, 5); 3.65-3.68 (**m**, 2H, 4); 3.76-3.78 (**m**, 2H, 3); 4.48 (**s**, 2H, 2)

¹³C-NMR: δ/ppm (CDCl₃) = 25.47 (b); 58.93 (7); 66.41 (2); 70.47 (4/5); 71.23 (3); 71.77 (6); 165.93 (1); 168.73 (a)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 1065 (**s**, $\nu_{\text{C-O-C}}$); 1198 (**s**, $\nu_{\text{CO-O-C}}$); 1250 (**w**); 1297 (**w**); 1355 (**m**); 1429 (**w**); 1455 (**w**); 1531 (**w**); 1732 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$); 1784 (**m**, $\nu_{\text{C=O}}$ Succinimid); 1817 (**m**, $\nu_{\text{C=O}}$ Succinimid); 2881 (**s**)

N_{α} -Benzyloxycarbonyl- N_{ϵ} -(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysin **42**

20 g (71.3 mmol) Z-Lys-OH **38** werden in einer Lösung von 8.6 g (102 mmol) Natriumcarbonat in 300 ml Wasser suspendiert. Durch Zugabe von 200 ml THF wird die Aminosäure gelöst. Hierbei ist eine leichte Gasentwicklung erkennbar. Man stellt die Temperatur der Lösung mit einem Wasserbad auf 20°C ein und gibt 21.6 g (78.5 mmol) *N*-{2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]acetyl}-oxysuccinimid **41** gelöst in 150 ml THF zu. Die Lösung erwärmt sich unter Gasentwicklung auf 25°C. Nach 2 h Rühren bei 20°C wird das THF am Rotationsverdampfer abdestilliert. Die wässrige Lösung wird mit Essigsäure auf pH 4 angesäuert und dreimal mit je 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Der erhaltene weiße Feststoff wird aus einem Gemisch aus Diethylether und Methanol im Verhältnis (v/v) 1:1 umkristallisiert. Man erhält das Produkt **42** als farblose Kristalle.

Ausbeute: 18.48 g (55,6 mmol)

78% (bezogen auf **38**)

DC: $R_f = 0.15$ (Ethylacetat/Ethanol/Essigsäure 100:2:0.6)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.29-1.61 (**m**, 4H, d/e); 1.72-1.90 (**m**, 2H, c); 3.28 (**q-br**, $^3J_{\text{H-H}} = 6.28$ Hz, 2H, f); 3.35 (**s**, 3H, 7); 3.53-3.56 (**m**, 2H, 6); 3.62-3.66 (**m**, 6H, 3/4/5); 3.97 (**m**, 2H, 2); 4.36 (**q**, $^3J_{\text{H-H}} = 6.52$ Hz, 1H, b);

5.68 (**m**, 2H, **h**); 5.71 (**d-br**, $^3J_{\text{H-H}} = 8.03$ Hz, 2H, α -NH); 7.18 (**t-br**, $^3J_{\text{H-H}} = 5.77$ Hz, 1H, ϵ -NH); 7.26-7.33 (**m**, 5H, **f/k/l**)

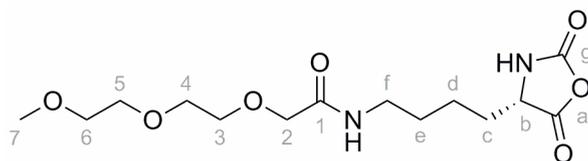
$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 21.83 (**d**); 28.47 (**e**); 31.39 (**c**); 38.17 (**f**); 53.50 (**b**); 58.83 (**7**); 66.82 (**h**); 69.99 (**2**); 70.05/70.77 (**3/4**); 70.26 (**5**); 71.64 (**6**); 128.02/128.08/128.45 (**j/k/l**); 136.29 (**i**); 156.04 (**g**); 170.70 (**1**); 174.24 (**a**)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 1038$ (**m**); 1092 (**s**, $\nu_{\text{C-O-C}}$); 1110 (**w**); 1133 (**w**); 1162 (**w**); 1177 (**w**); 1215 (**m**, $\nu_{\text{CO-O-C}}$); 1233 (**m**); 1268 (**m**); 1290 (**m**); 1312 (**w**); 1344 (**m**); 1372 (**w**); 1427 (**m**); 1464 (**m**); 1540 (**s**, $\delta_{\text{N-H}}$ Urethan); 1617 (**s**, $\delta_{\text{N-H}}$ Amid); 1712 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$); 2888 (**m**); 2927 (**m**); 3066 (**w**); 3301 (**s**)

Molmasse: 440.49 g/mol

MS(ESI): m/z (MeOH) = 463.08/463.21 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 439.22 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 475.12 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$

N_ϵ -(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysin-*N*-carboxyanhydrid (Lys(DEG)-NCA) **43**



Zu einer Lösung von 10 g (22.7 mmol) **42** in 180 ml wasserfreiem Dichlormethan gibt man unter Stickstoffatmosphäre 3 ml (33.2 mmol) Dichlormethylmethylether. Das Reaktionsgemisch wird 26 h unter Rückfluss gerührt, wobei nach 20 h weitere 0.5 ml (5.5 mmol) Dichlormethylmethylether zugegeben werden. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert, das ölige Rohprodukt in 50 ml wasserfreiem THF aufgenommen und mit 30 ml *n*-Hexan verdünnt. Hierdurch bildet sich ein Zweiphasensystem. Man trennt die untere gelbe Phase ab, versetzt den Überstand mit weiteren 20 ml *n*-Hexan und kühlt die Lösung für 18 h auf -20°C . Das auskristallisierte Produkt wird abgesaugt, mit wenig *n*-Hexan gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Man erhält **43** in Form farbloser nadelförmiger Kristalle.

Ausbeute: 5.54 g (16.7 mmol)

74% (bezogen auf **42**)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.41-1.49 (**m**, 2H, d); 1.54-1.62 (**m**, 2H, e); 1.75-1.84 (**m**, 1H, c); 1.93-2.01 (**m**, 1H, c'); 3.28 (**q**, $^3J_{\text{H-H}} = 6.53$ Hz, 2H, f); 3.35 (**s**, 3H, 7); 3.54-3.56 (**m**, 2H, 6); 3.61-3.69 (**m**, 6H, 3/4/5); 3.98 (**m**, 2H, 2); 4.27 (**dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 7.03$ Hz/ $^3J_{\text{H-H}} = 4.52$ Hz, 1H, b); 7.32 (**t-br**, $^3J_{\text{H-H}} = 5.52$ Hz, 1H, ϵ -NH); 7.77 (**m**, 1H, α -NH)

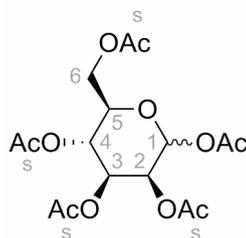
$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 21.29 (d); 28.32 (e); 30.67 (c); 37.82 (f); 57.42 (b); 58.81 (7); 69.96 (2); 70.02/70.33/70.98 (3/4/5); 71.65 (6); 152.25 (g); 170.41 (1); 170.90 (a)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 1040$ (**m**); 1096 (**s**, $\nu_{\text{C-O-C}}$); 1187 (**w**); 1200 (**w**); 1278 (**m**); 1303 (**m**); 1346 (**m**); 1439 (**m**); 1466 (**m**); 1557 (**m**); 1639 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1775 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$ Anhydrid); 1829 (**w**); 1847 (**m**, $\nu_{\text{C=O}}$ Anhydrid); 2866 (**s**); 2927 (**m**); 3097 (**s**); 3329 (**s**)

Molmasse: 332.35 g/mol

MS(ESI): m/z (MeOH) = 333.26 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 355.23 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 331.18/332.25 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 367.25 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$

1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-mannopyranose **45a**



10 g (55.5 mmol) D-(+)-Mannose **44a** werden in einem Gemisch aus 80 ml Pyridin und 80 ml Essigsäureanhydrid gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 1 d zeigt die Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Hexan/Ethylacetat 1:1), dass die Mannose vollständig umgesetzt ist.

Die Lösung wird langsam auf 400 ml Eiswasser gegossen und der ausfallende Niederschlag dreimal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird dreimal nacheinander mit je 100 ml 2 M Salzsäure, dreimal mit je 150 ml gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und zweimal mit je 200 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Anschließend wird das Produkt über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Nach der Trocknung im Vakuum erhält man einen kompakten Feststoff, der innerhalb einiger Monate langsam auskristallisiert.

Ausbeute: 19.46 g (50 mmol)

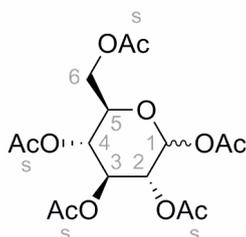
90% (bezogen auf die eingesetzte Mannose **44a**)

DC: $R_f = 0.33$ (Ethylacetat/Hexan 1:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.97/1.97/2.02/2.06/2.06/2.13/2.14/2.18 (8xs, 15H, s- CH_3); 3.75-3.80 (m, 0.32H, β -5); 4.00-4.13 (m, 1.68H, α -5/ α -6/ β -6); 4.22-4.29 (m, 1H, α -6'/ β -6'); 5.10 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 10.04$ Hz/ $^3J_{\text{H-H}} = 3.26$ Hz, 0.32H, β -3); 5.22-5.32 (m, 2.36H, α -2/ α -3/ α -4/ β -4); 5.45 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 3.26$ Hz/ $^3J_{\text{H-H}} = 1.00$ Hz, β -2); 5.83 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 1.26$ Hz, 0.32H, β -1); 6.05 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 1.75$ Hz, 0.68H, α -1)

^{13}C -NMR: δ/ppm (CDCl_3) = 20.44/20.54/20.57/20.61/20.67/20.77 (*s*- CH_3); 62.00 (β -6); 62.04 (α -6); 65.36 (β -4); 65.49 (α -4); 68.12 (β -2); 68.27 (α -2); 68.67 (α -3); 70.55 (α -5); 70.57 (β -3); 73.22 (β -5); 90.36 (β -1); 90.54 (α -1);
167.97/168.27/168.44/168.48/168.64/169.69/169.77/170.10/170.53 (*s*- $\text{C}=\text{O}$)

1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-glucopyranose 45b



Die Darstellung erfolgt über die für 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-mannopyranose formulierte Synthesevorschrift auf Seite 140.

Ausbeute: 19.25 g (49.3 mmol)

89% (bezogen auf die eingesetzte Glucose **44b**)

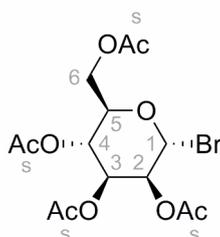
DC: $R_f = 0.33$ (Ethylacetat/Hexan 1:1)

^1H -NMR: δ/ppm (CDCl_3) = 1.99/1.99/2.00/2.01/2.02/2.06/2.07/2.09/2.16 (9 \times *s*, 15H, *s*- CH_3); 3.80-3.84 (*m*, 0.27H, β -5); 4.05-4.11 (*m*, 1.73H, α -5/ α -6/ β -6); 4.22-4.29 (*m*, 1H, α -6'/ β -6'); 5.05-5.14 (*m*, 2H, α -2/ β -2/ α -4/ β -4); 5.23 (*t*, $^3J_{\text{H-H}} = 9.79$ Hz, 0.27H, β -3); 5.45 (*t*, $^3J_{\text{H-H}} = 9.54$ Hz, 0.73H, α -3); 5.69 (*d*, $^3J_{\text{H-H}} = 8.28$ Hz, 0.27H, β -1); 6.30 (*d*, $^3J_{\text{H-H}} = 3.76$ Hz, 0.73H, α -1)

^{13}C -NMR: δ/ppm (CDCl_3) = 20.41/20.52/20.62/20.65/20.77/20.84 (*s*- CH_3); 61.38 (α -6/ β -6); 67.67 (β -4); 67.81 (α -4); 69.12 (α -2); 69.76 (α -3/ α -5); 70.15 (β -2); 70.65 (β -5); 72.72 (β -3); 89.00 (α -1); 91.63 (β -1);

168.72/168.92/169.21/169.35/169.61/170.06/170.19/170.57/170.59 (s-C=O)

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-brom- α -D-mannose **46**



14 g (35.9 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-mannopyranose werden bei 0°C in 60 ml einer 33 Gew.% Lösung von HBr in Essigsäure gelöst und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung auf 500 ml Eiswasser gegossen und zweimal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit Wasser, zweimal mit wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und noch einmal mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Nach der Trocknung im Vakuum erhält man ein hochviskoses farbloses Öl, das glasartig erstarrt.

Ausbeute: 13.73 g (33.4 mmol)

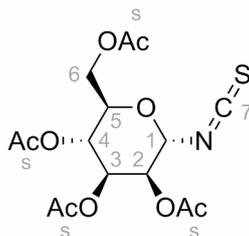
93% (bezogen auf **45a**)

DC: $R_f = 0.43$ (Ethylacetat/Hexan 1:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 2.00/2.07/2.09/2.17 (4xs, 4x3H, s- CH_3); 4.13 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 12.30 \text{ Hz}/^3J_{\text{H-H}} = 2.26 \text{ Hz}$, 1H, 6); 4.19-4.24 (m, 1H, 5); 4.32 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 12.30 \text{ Hz}/^3J_{\text{H-H}} = 5.02 \text{ Hz}$, 1H, 6'); 5.36 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 10.04 \text{ Hz}$, 1H, 4); 5.44 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 3.51 \text{ Hz}/^3J_{\text{H-H}} = 1.76 \text{ Hz}$, 1H, 2); 5.71 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 10.04 \text{ Hz}/^3J_{\text{H-H}} = 3.51 \text{ Hz}$, 1H, 3); 6.29 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 1.26 \text{ Hz}$, 1H, 1)

^{13}C -NMR: δ/ppm (CDCl_3) = 20.50/20.57/20.60/20.69 (*s*- CH_3); 61.40 (6); 65.28 (4); 67.89 (3); 72.09 (2); 72.80 (5); 83.03 (1); 169.48/169.50/169.61/170.43 (*s*- CH_3)

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-isothiocyanato- α -D-mannose **47**



Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von DAVIDE PROSPERI und GIOVANNI RUSO durchgeführt.^[167]

12.3 g (33.3 mmol) Tetrabutylammoniumiodid und 6.5 g (66.9 mmol) Kaliumrhodanid werden unter Stickstoffatmosphäre in 300 ml über Molekularsieb 4 Å getrocknetem Acetonitril gelöst und mit 50 g gepulvertem Molekularsieb 4 Å versetzt. Zu dieser Suspension tropft man langsam eine Lösung von 13.7 g (33.3 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-brom- α -D-mannose **46** in 150 ml wasserfreiem Acetonitril und rührt 3 h unter Rückfluss. Das Reaktionsgemisch wird über Celite filtriert und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (Kieselgel; Ethylacetat/Hexan 3:5) erhält man das Produkt **47** als leicht gelblichen kristallinen Feststoff.

Ausbeute: 10.23 g (26.3 mmol)

79% (bezogen auf **46**)

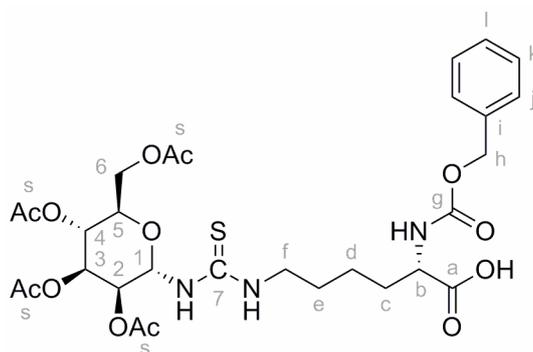
DC: R_f = 0.27 (Ethylacetat/Hexan 3:5)

^1H -NMR: δ/ppm (CDCl_3) = 1.99/2.05/2.09/2.16 (4xs, 4x3H, *s*- CH_3); 4.07-4.16 (**m**, 2H, 5/6); 4.27 (**dd**, $^2J_{\text{H-H}} = 12.30$ Hz/ $^3J_{\text{H-H}} = 5.27$ Hz, 1H, 6'); 5.25-5.34 (**m**, 3H, 2/3/4); 5.54 (**d**, $^3J_{\text{H-H}} = 2.01$ Hz, 1H, 1)

^{13}C -NMR: δ/ppm (CDCl_3) = 20.52/20.61/20.67/20.72 (s- CH_3); 61.82 (6); 65.31 (4); 68.33 (3); 69.65 (2); 71.61 (5); 82.78 (1); 144.24 (7); 169.53/169.67/170.49 (s- CH_3)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 1009 (m); 1042 (m); 1071 (m); 1133 (m); 1216 (s, $\nu_{\text{CO-O-CH}}$); 1335 (w); 1370 (s); 1431 (w); 1735 (s, $\nu_{\text{C=O}}$); 2068 (s, $\nu_{\text{N=C=S}}$); 2146 (m); 2989 (w)

***N* $_{\epsilon}$ -(2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-ethyl))-*N* $_{\alpha}$ -(benzyloxycarbonyl)-L-lysin (Z-Lys(Man-NCS)-OH) 48**



5.28 g (13.56 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-isothiocyanato- α -D-mannose **47** werden in 100 ml DMF gelöst und mit 7.60 g (27.12 mmol) *Z*-Lys-OH **38** versetzt. Zu der erhaltenen Suspension gibt man 6 ml (35 mmol) DIPEA und rührt 30 min nach. Es wird so lange Wasser zugetropft, bis sich das *Z*-Lys-OH löst (ca. 50 ml). Die klare gelbliche Lösung wird 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit Essigsäure auf pH 5 angesäuert und am Rotationsverdampfer auf etwa 30 ml eingengt. Nach der Zugabe von 100 ml Wasser wird die Lösung dreimal mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden erst mit wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und dann mit wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Kieselgel;

Essigsäure/Ethylacetat 0.3:100) gereinigt. Die vereinigten organischen Extrakte werden auf 10 ml eingengt und in 150 ml Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wird so lange mit wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen bis der Geruch nach Essigsäure verschwunden ist. Anschließend wird die organische Phase mit wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Nach der Trocknung im Hochvakuum erhält man **48** als leicht gelblichen kristallinen Feststoff.

Ausbeute: 2.94 g (4.4 mmol)

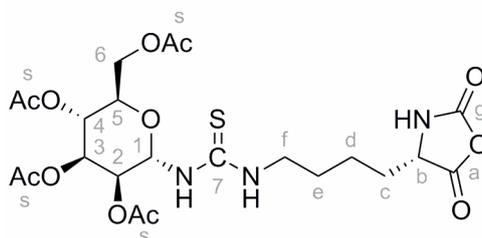
32% (bezogen auf **47**)

DC: $R_f = 0.33$ (Ethylacetat/Hexan 100:0.3)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.41-1.49 (**m**, 2H, d); 1.60-1.65 (**m**, 2H, e); 1.72-1.81 (**m**, 1H, c); 1.87-1.96 (**m**, 1H, c') überlagert mit 1.92/2.02/2.06/2.14 (4xs, 4x3H, s- CH_3); 3.51-3.67 (**m**, 2H, f); 4.03-4.07 (**m**, 1H, 5); 4.13-4.25 (**m**, 2H, 6); 4.41 (**q-br**, $^3J_{\text{H-H}} = 7.28$ Hz, 1H, b); 5.09 (**s**, 2H, h); 5.24 (**t**, $^3J_{\text{H-H}} = 9.28$ Hz, 1H, 4); 5.31-5.37 (**m**, 3H, 1/2/3); 5.78 (**d-br**, $^3J_{\text{H-H}} = 8.03$ Hz, 1H, $\alpha\text{-NH}$); 6.89 (**m**, 1H, $\epsilon\text{-NH}$); 7.28-7.34 (**m**, 5H, j/k/l); 7.78 (**s-br**, 1H, NH-C=S)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 20.49/20.56/20.63/20.74 (s- CH_3); 22.37 (d); 28, 32 (e); 32.09 (c); 45.08 (f); 53.34 (b); 62.11 (6); 66.07 (4); 67.12 (h); 68.50/68.63 (2/3); 69.34 (5); 80.80 (1); 128.12/128.19/128.50 (j/k/l); 136.13 (i); 156.26 (g); 169.60/169.92/170.86/175.80 (s- C=O); 176.00 (a); 211.63 (7)

N*_ε-[2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-ethyl)]-L-lysine-*N*-carboxyanhydrid (Lys(Man-NCS)-NCA) **49*



1.24 g (1.85 mmol) **48** werden unter Stickstoffatmosphäre in 50 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst, mit 335 μ l (3.7 mmol) Dichlormethylmethylether versetzt und 18 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend gibt man weitere 100 μ l (1.1 mmol) Dichlormethylmethylether zu und rührt weitere 6 h unter Rückfluss. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert, der Rückstand in 150 ml Ethylacetat aufgenommen und nacheinander zügig mit eiskalten wässrigen Lösungen von Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat und erneut Natriumchlorid gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Das Produkt wird in 20 ml wasserfreiem THF gelöst, auf 200 ml *n*-Hexan gegossen und 30 min im Eisbad gerührt. Zur vollständigen Fällung lässt man das Gemisch für 20 h bei -20°C ruhen. Das Produkt wird abgesaugt, mit *n*-Hexan gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Auf diese Weise erhält man Lys(Man-NCS)-NCA **49** als weißen pulverförmigen Feststoff.

Ausbeute: 362 mg (0.64 mmol)

35% (bezogen auf **48**)

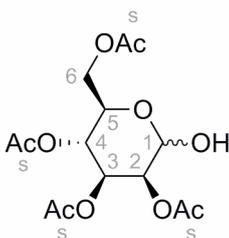
$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.14-1.83 (**m**, 6H, *c/d/e*); 1.97/2.00/2.04/2.17 (4xs, 4x3H, *s*- CH_3); 3.15-3.27 (**m**, 2H, *f*); 3.78 (**m**, 1H, *5*); 4.00-4.26 (**m**, 3H, *6/b*); 5.00-5.52 (**m**, 4H, *1/2/3/4*)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 20.63/20.68/21.04 (*s*- CH_3); 24.03 (*d*); 28, 87 (*e*); 32.42 (*c*); 43.89 (*f*); 57.23 (*b*); 62.84 (*6*); 66.27 (*4*); 66.79 (*2*); 71.55 (*3*); 74.02 (*5*); 99.97 (*1*); 151.89 (*g*); 169.67/170.12/170.71 (*s*- $\text{C}=\text{O}$); 211.64 (*7*)

Kohlenhydrat-funktionalisierte α -Aminosäure-*N*-carboxyanhydride

Die Darstellung der Lys(Zucker)-NCAs aus den entsprechenden 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-pyranosen erfolgt in einer fünfstufigen Synthese. Da die Synthesebedingungen für alle drei Zucker jeweils gleich gewählt wurden, werden im Folgenden lediglich die Synthesevorschriften für die einzelnen Stufen der Synthese von N_ϵ -(8-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl))-L-lysin-*N*-carboxyanhydrid (Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-NCA) **56a** ausformuliert. Für die entsprechenden Glucose- und Galactosederivate werden nur die Ausbeuten und analytischen Daten angegeben.

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose **50a**



11.0 g (28.2 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-mannose **45a** werden in 120 ml DMF gelöst. Es werden 3.2 g (34.7 mmol) Hydrazinacetat zugegeben und 50 min bei 50°C gerührt. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Ethylacetat/Hexan 1:1) auf Vollständigkeit überprüft. Anschließend wird die Lösung mit 300 ml Ethylacetat verdünnt, dreimal mit je 100 ml wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Man erhält **50a** als leicht gelblichen Feststoff.

Ausbeute: 9.80 g (28.1 mmol)

100% (bezogen auf **45a**)

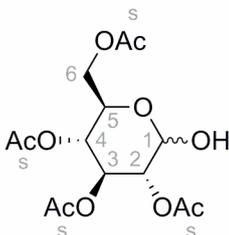
DC: $R_f = 0.29$ (Ethylacetat/Hexan 1:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.98/2.02/2.08/2.13 (4xs, 4x3H, s- CH_3); 3.67-3.72 (**m**, 0.1 H, β -5); 4.07-4.26 (**m**, 2.9H, α -5/ α -6/ β -6); 4.97 (**d**, $^3J_{\text{H-H}} = 1.26$ Hz, 0.1H, β -1); 5.05 (**dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 10.04$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 3.26$ Hz, 0.1H, β -3); 5.19 (**t**, $^3J_{\text{H-H}} = 10.04$ Hz, 0.1H, β -4); 5.21 (**d**, $^3J_{\text{H-H}} = 1.75$ Hz, 0.9H, α -1); 5.24 (**dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 3.26$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 1.76$ Hz, 0.9H, α -2); 5.27 (**t**, $^3J_{\text{H-H}} = 10.04$ Hz, 0.9H, α -4); 5.39 (0.1 H, β -2 überlagert von: **dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 10.04$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 3.26$ Hz, 0.9H, α -3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 20.64/20.66/20.71/20.89 (s- CH_3); 60.34 (β -6); 62.56 (α -6); 65.57 (β -4); 66.18 (α -4); 68.40 (α -5); 68.78 (α -3); 70.01 (β -2); 70.05 (α -2); 71.09 (β -3); 72.44 (β -5); 92.12 (α -1); 92.84 (β -1); 169.81/170.05/170.21/170.85 (s-C=O)

Molmasse: 348.30 g/mol

MS(ESI): m/z (MeOH) = 366.32 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; 492.92/493.17 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-glucose 50b

Die Darstellung erfolgt über die für 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose formulierte Synthesevorschrift auf Seite 147.

Ausbeute: 8.92 g (25.6 mmol)

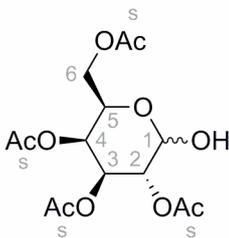
91% (bezogen auf **45b**)

DC: $R_f = 0.25$ (Ethylacetat/Hexan 1:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.99/2.01/2.06/2.07 (4xs, 4x3H, s- CH_3); 3.71-3.75 (m, 0.25 H, β -5); 4.09-4.27 (m, 2.75H, α -5/ α -6/ β -6); 4.72 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.03$ Hz, 0.25H, β -1); 4.87 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 10.04$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 3.52$ Hz, 1H, α -2/ β -2); 5.06 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 10.04$ Hz, 1H, α -4/ β -4); 5.22 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 9.54$ Hz, 0.25H, β -3); (5.44 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 3.52$ Hz, 0.75H, α -1); 5.51 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 10.04$ Hz, 0.75H, α -3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 20.59/20.65/20.68/20.72 (s- CH_3); 61.91 (α -6/ β -6); 67.10 (α -5); 68.35 (β -4); 68.43 (α -4); 69.87 (α -3); 71.04 (α -2); 71.98 (β -5); 72.20 (β -3); 73.10 (β -2); (90.06 (α -1); 169.66/170.19/170.20/170.88 (s-C=O)

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-galactose 50c



Die Darstellung erfolgt über die für 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose formulierte Synthesevorschrift auf Seite 147.

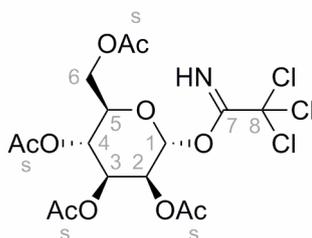
Ausbeute: 9.78 g (28.1 mmol)

100% (bezogen auf 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-galactose **45c**)

DC: $R_f = 0.30$ (Ethylacetat/Hexan 1:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.97/2.03/2.07/2.12 (4xs, 4x3H, s- CH_3); 3.94 (**dt**, $^3J_{\text{H-H}} = 6.28 \text{ Hz}/^3J_{\text{H-H}} = 1.25 \text{ Hz}$, 0.29H, β -5); 4.06-4.14 (**m**, 2H, α -6/ β -6); 4.49 (**dt**, $^3J_{\text{H-H}} = 6.53 \text{ Hz}/^3J_{\text{H-H}} = 1.00 \text{ Hz}$, 0.71H, α -5); 4.78 (**dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 7.78 \text{ Hz}/^3J_{\text{H-H}} = 1.26 \text{ Hz}$, 0.29H, β -1); 5.05 (**m**, 0.29H, β -2); (5.13 (**dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 10.79 \text{ Hz}/^3J_{\text{H-H}} = 3.51 \text{ Hz}$, 0.79H, α -2); 5.39 (**dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 10.79 \text{ Hz}/^3J_{\text{H-H}} = 3.26 \text{ Hz}$, 1H, α -3/ β -3); 5.45 (**dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 3.26 \text{ Hz}/^3J_{\text{H-H}} = 1.25 \text{ Hz}$, 1H, α -4/ β -4); 5.49 (**d**, $^3J_{\text{H-H}} = 3.51 \text{ Hz}$, 0.79H, α -1)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 20.59/20.61/20.66/20.77 (s- CH_3); 61.43 (β -6); 61.77 (α -6); 66.14 (α -5); 67.13 (β -3); 67.24 (α -3); 68.18 (α -4/ β -4); 68.33 (α -2); 70.37 (β -2); 70.96 (β -5); 90.61 (α -1); 95.93 (β -1); 170.05/170.24/170.39/170.55 (s-C=O)

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-trichloracetimidato- α -D-mannose **51a**

Zu einer Lösung von 10 g (28.7 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose **50a** in 100 ml wasserfreiem Dichlormethan gibt man unter Stickstoffatmosphäre 29 ml (288 mmol) Trichloracetonitril und 10.3 g (31.6 mmol) Cäsiumcarbonat. Die erhaltene Suspension färbt sich nach wenigen Sekunden orange. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur gerührt, bis die dünnschichtchromatographische Analyse (Kieselgel; Hexan/Ethylacetat 7:10) den vollständigen Umsatz des Edukts **50a** anzeigt (nach etwa 3 h). Anschließend wird das Reaktionsgemisch über Celite filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Produkt wird säulenchromatographisch (Kieselgel; Ethylacetat/Hexan 7:10) gereinigt und im Hochvakuum getrocknet. Man erhält **51a** als nahezu farblosen kristallinen Feststoff.

Ausbeute: 9.50 g (19.3 mmol)

67% (bezogen auf **50a**)

DC: $R_f = 0.33$ (Ethylacetat/Hexan 7:10)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.98/2.03/2.05/2.17 (4xs, 4x3H, s- CH_3); 4.12-4.19 (m, 2H, 5/6); 4.25 (dd, , $^2J_{\text{H-H}} = 11.79$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 4.77$ Hz, 1H, 6^o); 5.34-5.40 (m, 2H, 3/4); 5.44 (dd, , $^3J_{\text{H-H}} = 3.01$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 2.01$ Hz, 1H, 2); 6.25 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 1.76$ Hz, 1H, 1); 8.77 (bs, 1H, NH)

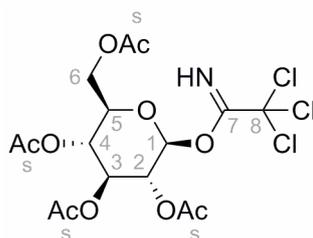
$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 20.53/20.61/20.70 (s- CH_3); 61.99 (6); 65.34 (4); 67,81 (2); 68.74 (3); 71.15 (5); 90.45 (8); 94.46 (1); 159.68 (7); 169.53/169.63/169.71/170.47 (s-C=O)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 972$ (**m**); 1041 (**s**); 1087 (**w**); 1154 (**m**); 1210 (**s**, $\nu_{\text{CO-O-CH}}$); 1367 (**m**); 1433 (**w**); 1678 (**m**); 1743 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$); 2960 (**w**); 3318 (**w**)

Molmasse: 492.69 g/mol

MS(ESI): m/z (MeOH) = 498.31/500.25 $[\text{M}+\text{Li}]^+$; 541.29 $[\text{M}+\text{CH}_3\text{-CN}+\text{Li}]^+$

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-trichloracetimidato- β -D-glucose **51b**



Die Darstellung erfolgt über die für 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-trichloracetimidato- α -D-mannose formulierte Synthesevorschrift auf Seite 151.

Ausbeute: 7.80 g (15.8 mmol)

55% (bezogen auf **50b**)

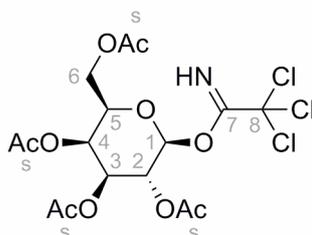
DC: $R_f = 0.37$ (Ethylacetat/Hexan 7:10)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 2.00/2.01/2.03/2.05 (4xs, 4x3H, s- CH_3); 4.07-4.13 (**dd**, $^2J_{\text{H-H}} = 12.30$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 2.01$ Hz, 1H, 6); 4.17-4.21 (**m**, 1H, 5); 4.25 (**dd**, $^2J_{\text{H-H}} = 12.30$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 4.27$ Hz, 1H, 6'); 5.11 (**dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 10.29$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 3.77$ Hz, 1H, 2); 5.16 (**t**, $^3J_{\text{H-H}} = 10.29$ Hz, 1H, 4); 5.55 (**t**, $^3J_{\text{H-H}} = 9.79$ Hz, 1H, 3); 6.54 (**d**, $^3J_{\text{H-H}} = 3.77$ Hz, 1H, 1); 8.68 (**bs**, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 20.38/20.54/20.62 (s- CH_3); 61.35 (6); 67.77 (4); 69.70 (2); 69.85 (3); 69.99 (5); 90.66 (8); 92.89 (1); 160.77 (7); 169.45/169.80/169.94/170.50 (s-C=O)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 1034$ (s); 1156 (w); 1215 (s, $\nu_{\text{CO-O-CH}}$); 1340 (w); 1367 (m); 1433 (w); 1655 (m); 1723 (s, $\nu_{\text{C=O}}$); 2966 (w); 3281 (m)

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-trichloracetimidato- β -D-galactose **51c**



Die Darstellung erfolgt über die für 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-trichloracetimidato- α -D-mannose formulierte Synthesevorschrift auf Seite 151.

Ausbeute: 9.78 g (19.8 mmol)

69% (bezogen auf **50c**)

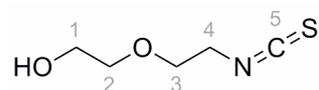
DC: $R_f = 0.38$ (Ethylacetat/Hexan 7:10)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.99/1.99/2.00/2.14 (4xs, 4x3H, s- CH_3); 4.06 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.29$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 6.78$ Hz, 1H, 6); 4.15 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.29$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 6.52$ Hz, 1H, 6'); 4.42 (dt, $^3J_{\text{H-H}} = 6.52$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 0.75$ Hz, 1H, 5); 5.34 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 10.79$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 3.51$ Hz, 1H, 2); 5.40 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 10.79$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 3.01$ Hz, 1H, 3); 5.54 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 3.01$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 1.26$ Hz, 1H, 4); 6.58 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 3.26$ Hz, 1H, 1); 8.65 (bs, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 20.48/20.54/20.57/20.59 (s- CH_3); 61.21 (6); 66.87 (2); 67.35 (4); 67.47 (3); 68.97 (5); 90.74 (8); 93.51 (1); 160.89 (7); 169.91/170.01/170.04/170.28 (s-C=O)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 1024$ (s); 1061 (w); 1103 (m); 1153 (m); 1210 (s, $\nu_{\text{CO-O-CH}}$); 1370 (m); 1431 (w); 1656 (m); 1744 (s, $\nu_{\text{C=O}}$); 2980 (w); 3319 (m)

2-(2-Isothiocyanatoethoxy)ethanol **52**



Die Synthese von **52** erfolgt in Anlehnung an eine von H. TAJIMA und G. LI veröffentlichte Vorschrift.^[173]

16.55 g (157 mmol) 2-(2-Hydroxyethoxy)ethylamin werden zusammen mit 2.2 ml (15.9 mmol) Triethylamin unter einer Stickstoffatmosphäre in 150 ml THF gelöst. Nachdem die Reaktionslösung mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt wurde, werden 46 ml (0.98 mol) Schwefelkohlenstoff zugegeben. Hierbei bildet sich zunächst ein gelber Niederschlag, der sich jedoch schnell wieder löst. Die Lösung wird 40 min bei 30°C-35°C gerührt. Das erneute Abkühlen der Lösung auf 0°C führt zur Bildung eines klebrigen gelben Niederschlags. Nachdem das Reaktionsgemisch 1 h bei dieser Temperatur gerührt wurde, werden unter ständiger Kühlung 44 ml einer 30% Wasserstoffperoxidlösung so langsam zugetropft, dass die Temperatur 10°C nicht übersteigt. Hierbei geht der Niederschlag wieder vollständig in Lösung. Nach der Zugabe von 1 ml konzentrierter Salzsäure wird mit 100 ml destilliertem Wasser verdünnt und die Reaktionslösung wird am Rotationsverdampfer auf ca. 80 ml eingeengt. Zur Abtrennung des ausgefallenen Schwefels wird die Lösung filtriert. Anschließend wird dreimal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden zweimal mit je 50 ml Wasser und einmal mit 50 ml wässriger Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Man filtriert das Trockenmittel ab, entfernt das Lösemittel am Rotationsverdampfer und erhält nach der säulenchromatographischen Reinigung (Kieselgel; Chloroform/Ethylacetat 3:1) und der Trocknung im Hochvakuum 18.2 g eines gelben Öls.

Ausbeute: 18.2 g (124 mmol)

79% (bezogen auf 2-(2-Hydroxyethoxy)ethylamin)

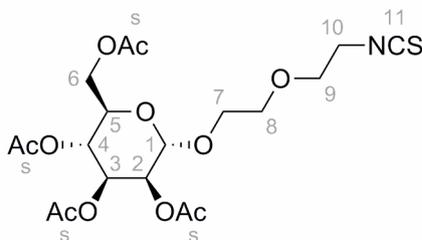
DC: $R_f = 0.26$ (Chloroform/Ethylacetat 3:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 2.13 (**s**, 1H, OH); 3.60-3.63 (**m**, 2H, 2); 3.64-3.71 (**m**, 4H, 3/4); 3.74-3.76 (**m**, 2H, 1)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 45.33 (4); 61.71 (1); 69.21 (3); 72.41 (2); 133.81 (5);

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 808 (**w**); 885 (**m**); 913 (**m**); 1060 (**s**, $\nu_{\text{C-O-C}}$); 1125 (**s**, $\nu_{\text{C-OH}}$); 1248 (**w**); 1342 (**m**, $\delta_{\text{O-H}}$); 1438 (**w**); 1722 (**w**); 2085 (**s**, $\nu_{\text{N=C=S}}$); 2195 (**m**); 2868 (**m**); 2933 (**m**); 3407 (**s**)

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-(5-isothiocyanato-3-oxapentyl)- α -D-mannopyranose **53a**



8 g (16.2 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-trichloracetimidato- α -D-mannopyranose **51a** werden unter einer Stickstoffatmosphäre in 150 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung gibt man nacheinander 1 g Molekularsieb 4 Å und 4.8 g (32.6 mmol) 2-(2-Isothiocyanatoethoxy)ethanol **52**. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit einem Trockeneis/Aceton-Bad auf -78°C gekühlt. Es werden 1.2 ml (6.5 mmol) Trimethylsilyltrifluormethansulfat (TMSOTf) zugegeben und das Reaktionsgemisch wird 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Molekularsieb wird abfiltriert, das Filtrat zweimal mit je 50 ml einer wässrigen Natriumhydrogencarbonatlösung und zweimal mit je 20 ml wässriger Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet. Nachdem das Produkt säulenchromatographisch (Kieselgel; Chloroform/Ethylacetat 85:15) gereinigt ist, erhält man **53a** als einen leicht gelben Feststoff.

Ausbeute: 5.44 g (11.4 mmol)

70% (bezogen auf **51a**)

DC: $R_f = 0.31$ (Chloroform/Ethylacetat 85:15)

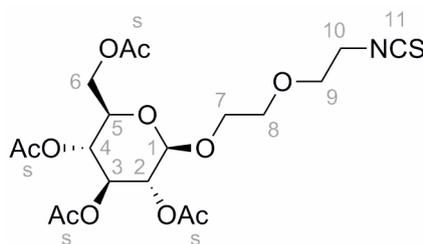
$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.96/2.01/2.07/2.12 (4xs, 4x3H, s-CH₃); 3.63-3.68 (**m**, 7H, 7/8/9/10); 3.78-3.85 (**m**, 1H, 7); 4.01-4.06 (**m**, 1H, 5); 4.07-4.11 (**m**, 1H, 6); 4.26 (**dd**, $^2J_{\text{H-H}} = 12.29$ Hz/ $^3J_{\text{H-H}} = 5.27$ Hz, 1H, 6'); 4.86 (**d**, $^3J_{\text{H-H}} = 1.75$ Hz, 1H, 1); 5.24 (**dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 3.51$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 1.75$ Hz, 1H, 2); 5.25 (**t**, $^3J_{\text{H-H}} = 10.04$ Hz, 1H, 4); 5.33 (**dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 10.04$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 3.51$ Hz, 1H, 3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 20.62/20.66/20.70/20.83 (s-CH₃); 45.26 (10); 62.47 (6); 66.07 (4); 67.30 (7); 68.47 (5); 69.02 (3); 69.37 (9); 69.46 (2); 70.15 (8); 97.68 (1); 133.01 (11); 169.68/169.85/169.97/170.57 (s-C=O)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 824$ (**m**); 919 (**w**); 977 (**w**); 1043 (**s**, $\nu_{\text{C-O-C}}$); 1081 (**m**); 1132 (**m**); 1217 (**s**, $\nu_{\text{CO-O-CH}}$); 1367 (**m**); 1436 (**w**); 1531 (**w**); 1608 (**w**); 1738 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$); 2106 (**s**, $\nu_{\text{N=C=S}}$); 2198 (**w**); 2876 (**w**); 2938 (**w**); 3241 (**w**); 3360 (**w**)

Molmasse: 477.48 g/mol

MS(ESI): m/z (MeOH) = 484.41 $[\text{M}+\text{Li}]^+$; 500.36 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 516.35 $[\text{M}+\text{K}]^+$

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-(5-isothiocyanato-3-oxapentyl)- β -D-glucopyranose 53b

Die Darstellung erfolgt über die für 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-(5-isothiocyanato-3-oxapentyl)- α -D-mannopyranose formulierte Synthesevorschrift auf Seite 155.

Ausbeute: 67% (bezogen auf **51b**)

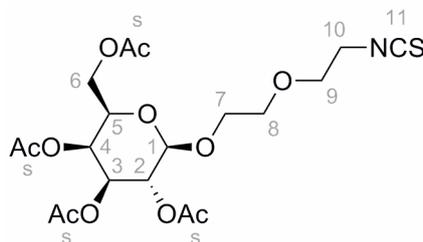
DC: $R_f = 0.36$ (Chloroform/Ethylacetat 85:15)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.98/2.02/2.04/2.07 (4xs, 4x3H, s-CH₃); 3.61-3.67 (m, 6H, 8/9/10); 3.69-3.76 (m, 2H, 7/5); 3.92-3.97 (m, 1H, 7'); 4.13 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 12.30$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 2.51$ Hz, 1H, 6); 4.25 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 12.30$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 4.51$ Hz, 1H, 6'); 4.59 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.03$ Hz, 1H, 1); 4.97 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 9.54$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 8.03$ Hz, 1H, 2); 5.06 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 9.54$ Hz, 1H, 4); 5.21 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 9.54$ Hz, 1H, 3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 20.57/20.58/20.67/20.73 (s-CH₃); 45.21 (10); 61.86 (6); 68.30 (4); 69.10 (7); 69.31 (9); 70.35 (8); 71.23 (2); 71.76 (5); 72.72 (3); 100.73 (1); 132.71 (11); 169.42/169.44/170.23/170.68 (s-C=O)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 959 (w); 1032 (s, $\nu_{\text{C-O-C}}$); 1069 (m); 1106 (w); 1121 (w); 1168 (m); 1208 (s, $\nu_{\text{CO-O-CH}}$); 1287 (w); 1333 (w); 1363 (m); 1430 (w); 1453 (w); 1616 (w); 1745 (s, $\nu_{\text{C=O}}$); 2140 (s, $\nu_{\text{N=C=S}}$); 2201 (m); 2884 (w); 2955 (w); 3238 (w); 3356 (w)

**2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-(5-isothiocyanato-3-oxapentyl)- β -D-galactopyranose
53c**



Die Darstellung erfolgt über die für 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-(5-isothiocyanato-3-oxapentyl)- α -D-mannopyranose formulierte Synthesevorschrift auf Seite 155.

Ausbeute: 74% (bezogen auf **51c**)

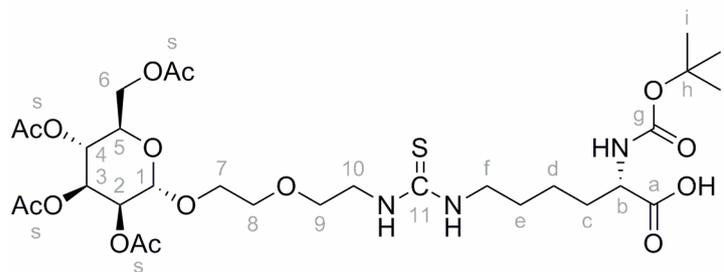
DC: $R_f = 0.36$ (Chloroform/Ethylacetat 85:15)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.96/2.03/2.04/2.12 (4xs, 4x3H, s- CH_3); 3.62-3.67 (**m**, 6H, 8/9/10); 3.71-3.77 (**m**, 1H, 7); 3.89-3.97 (**m**, 2H, 7', 5); 4.06-4.18 (**m**, 2H, 6); 4.55 (**d**, $^3J_{\text{H-H}} = 8.03$ Hz, 1H, 1); 5.02 (**dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 10.54$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 3.27$ Hz, 1H, 3); 5.18 (**dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 10.54$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 8.03$ Hz, 1H, 2); 5.37 (**dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 3.27$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 1.01$ Hz, 1H, 4)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 20.53/20.62/20.64/20.76 (4xs- CH_3); 45.26 (10); 61.21 (6); 66.97 (4); 68.75 (2); 69.06 (7); 69.31 (9); 70.37 (8); 70.64 (5); 70.81 (3); 101.24 (1); 132.69 (11); 169.96/170.07/170.20/170.36 (s-C=O)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 955$ (**w**); 1042 (**s**, $\nu_{\text{C-O-C}}$); 1129 (**w**); 1174 (**w**); 1214 (**s**, $\nu_{\text{C-O-CH}}$); 1367 (**m**); 1434 (**w**); 1606 (**w**); 1741 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$); 2113 (**s**, $\nu_{\text{N=C=S}}$); 2200 (**m**); 2875 (**w**); 2941 (**w**); 3183 (**w**); 3357 (**w**)

N*_ε-(8-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxaoctyl))-*N*_α-(*tert.*-butyloxycarbonyl)-L-lysin (Boc-Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-OH) **54a*



2 g (4.18 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*-(5-isothiocyanato-3-oxapentyl)- α -D-mannopyranose **53a** werden in 80 ml DMF gelöst und mit 1.35 g (5.45 mmol) Boc-Lys-OH **39** versetzt. Zu der erhaltenen Suspension gibt man 2 ml DIPEA, wodurch sich das Reaktionsgemisch rosa färbt. Es wird so lange Wasser zugetropft, bis sich das *N*_α-Boc-L-Lysin löst (ca. 35 ml). Die noch leicht trübe, bräunliche Lösung wird 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die nun vollständig klare Lösung wird mit Essigsäure auf pH 5 angesäuert und am Rotationsverdampfer auf etwa 30 ml eingengt. Nach der Zugabe von 100 ml Wasser wird die Lösung dreimal mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird erst mit wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und dann mit wässriger Natriumchloridlösung gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wird die Lösung am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Man erhält 2 g eines bräunlichen Feststoffs. Bei der säulenchromatographischen Reinigung dient ein Gemisch aus Ethylacetat, Ethanol und Essigsäure in Verhältnis (v/v/v) 100:2:0.6 als Eluent. Das Eluat wird auf 10 ml eingengt und das Produkt in 150 ml Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wird so lange mit wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen bis der Geruch nach Essigsäure verschwunden ist. Anschließend wird die organische Phase mit wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Nach der Trocknung im Hochvakuum erhält man das Produkt als weißen Feststoff.

Ausbeute: 1.35 g (1.87 mmol)

45% (bezogen auf **53a**)

DC: $R_f = 0.32$ (Ethylacetat/Ethanol/Essigsäure 100:2:0.6)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.38 (**s-br**, 11H, d/i); 1.54 (**m**, 3H, c/e); 1,72 (**m**, 1H, c $^{\circ}$); 1.98/2.03/2.08/2.14 (4xs, 4x3H, s- CH_3); 3.44 (**m**, 2H, f); 3.63-3.67 (**m**, 6H, 7/8/9/10); 3.76-3.80 (**m**, 2H, 7'/10'); 3.93 (**m**, 1H, b); 4.00 (**m**, 1H, 5); 4.07-4.12 (**m**, 1H, 6); 4.26 (**dd**, $^2J_{\text{H-H}} = 12.30$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 5.01$ Hz, 1H, 6 $^{\circ}$); 4.88 (**d**, $^3J_{\text{H-H}} = 1.01$ Hz, 1H, 1); 5.22-5.31 (**m**, 3H, 2/3/4); 6.96 (**s-br**, 2x1H, NH-CS-NH)

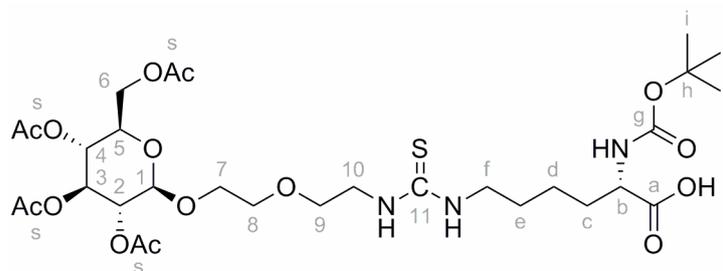
$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 20.71/20.76/20.94 (s- CH_3); 23.06 (d); 28.32 (i); 28.50 (e); 31.74 (c); 44.09/44.15 (f/10); 55.55 (b); 62.45 (6); 66.02 (4); 66.05 (7); 68.43 (5); 69.08 (3); 69.56 (2); 69.69 (9); 70.15 (8); 79.87 (h); 97.48 (1); 156.38 (g); 169.72/170.22/170.44/170,75 (a/s-C=O); 211.60 (11)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 977$ (**w**); 1043 (**s**, $\nu_{\text{C-O-C}}$); 1136 (**w**); 1164 (**w**); 1216 (**s**, $\nu_{\text{CO-O-CH}}$); 1366 (**m**); 1454 (**w**); 1544 (**m**, $\delta_{\text{N-H}}$ Urethan); 1596 (**m**, $\delta_{\text{N-H}}$ Thioharnstoff); 1693 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$ Thioharnstoff, Urethan); 1742 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$ Acetyl, Säure); 2870 (**w**); 2934 (**m**); 3352 (**m**)

Molmasse: 732.79 g/mol

MS(ESI): m/z (MeOH) = 722.32 $[\text{M-H}]^-$

N_{ϵ} -(8-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxaoctyl))- N_{α} -(*tert.*-butyloxycarbonyl)-L-lysin (Boc-Lys($\text{Ac}_4\text{Glc}(\text{EO})_2\text{NCS}$)-OH) **54b**



Die Darstellung erfolgte analog zu der auf Seite 159 beschriebenen Synthese von **54a**.

Ausbeute: 17% (bezogen auf **53b**)

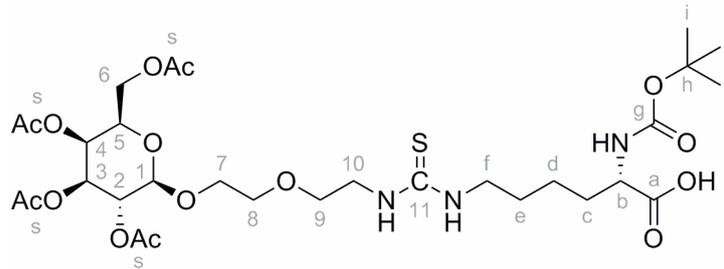
DC: $R_f = 0.34$ (Ethylacetat/Ethanol/Essigsäure 100:2:0.6)

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.43 (s, 11H, d/i); 1.62(m, 2H, e); 1,72 (m, 1H, c); 1.84 (m, 1H, c'); 2.01/2.02/2.05/2.08 (4xs, 4x3H, s- CH_3); 3.48 (m, 2H, f); 3.58-3.84 (m, 8H, 5/7/8/9/10); 3.95 (m, 1H, 7); 4.15 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 12.30$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 2.25$ Hz, 1H, 6); 4.23 (m, 1H, b); 4.27(dd, $^2J_{\text{H-H}} = 12.30$ Hz / $^3J_{\text{H-H}} = 4.51$ Hz, 1H, 6'); 4.54 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7.78$ Hz, 1H, 1); 4.98 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 9.54$ Hz, 1H, 2); 5.09 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 9.54$ Hz, 1H, 4); 5.22 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 9.54$ Hz, 1H, 3); 6.38/6.69 (2xs-br, 2x1H, NH-CS-NH)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 20.59/20.73/20.81 (s- CH_3); 22.40 (d); 28.29/28.36 (e/i); 31.95 (c); 44.26 (f/10); 55,57 (b); 61.88 (6); 68.39/68.97/69.06/69.61/69.73/71.75/71.90 (2/3/4/5/7/8/9); 79.68 (h); 100.86 (1); 156.33 (g); 169.60/170.23/170.78/171.55 (a/s-C=O); 211.64 (11)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 962$ (w); 1044 (s, $\nu_{\text{C-O-C}}$); 1170 (w); 1217 (s, $\nu_{\text{CO-O-CH}}$); 1366 (m); 1447 (w); 1544 (m, $\delta_{\text{N-H}}$ Urethan); 1601 (m, $\delta_{\text{N-H}}$ Thioharnstoff); 1672 (s, $\nu_{\text{C=O}}$ Thioharnstoff, Urethan); 1744 (s, $\nu_{\text{C=O}}$ Acetyl, Säure); 2864 (w); 2919 (m); 3345 (m)

***N*_ε-(8-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxaoctyl))-*N*_α-(*tert.*-butyloxycarbonyl)-L-lysin (Boc-Lys(Ac₄Gal(EO)₂NCS)-OH) 54c**



Die Darstellung erfolgte analog zu der auf Seite 159 beschriebenen Synthese von **54a**.

Ausbeute: 20% (bezogen auf **53c**)

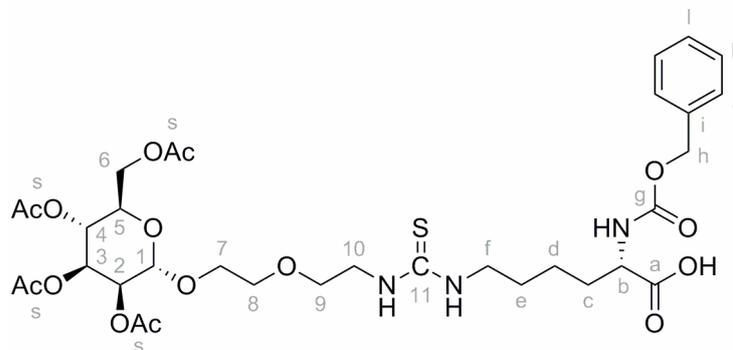
DC: $R_f = 0.32$ (Ethylacetat/Ethanol/Essigsäure 100:2:0.6)

¹H-NMR: δ /ppm (CDCl₃) = 1.42 (s, 9H, i); 1.46 (m, 2H, d); 1.62 (m, 2H, e); 1.70-1.77 (m, 1H, c); 1.83-1.89 (m, 1H, c'); 1.99/2.04/2.06/2.15 (4xs, 4x3H, s-CH₃); 3.50 (m, 2H, f); 3.56-3.70 (m, 6H, 7/8/9/10); 3.78 (m, 1H, 10'); 3.90-3.99 (m, 2H, 5/7'); 4.08-4.20 (m, 2H, 6); 4.28 (q-br, ³J_{H-H} = 6.52 Hz, 1H, b) 4.50 (d, ³J_{H-H} = 7.78 Hz, 1H, 1); 5.05 (dd, ³J_{H-H} = 10.54 Hz / ³J_{H-H} = 3.26 Hz, 1H, 3); 5.16 (dd, ³J_{H-H} = 10.54 Hz / ³J_{H-H} = 7.78 Hz, 1H, 2); 5.18 (m, 1H, α-NH-Lysin) 5.39 (dd, ³J_{H-H} = 3.26 Hz / ³J_{H-H} = 1.00 Hz, 1H, 4); 6.39/6.79 (2xs-br, 2x1H, NH-CS-NH)

¹³C-NMR: δ /ppm (CDCl₃) = 20.59/20.63/20.68/20.91 (s-CH₃); 22.47 (d); 28.28 (i); 28.49 (e); 31.90 (c); 44.00 (f); 44.21 (10); 53.19 (b); 61.21 (6); 66.92 (4); 68.97 (7); 69.23 (2); 69.55 (8/9); 70.53 (3); 70.72 (5); 80.19 (h); 101.35 (1); 155.65 (g); 170.21/170.26/170.57 (s-C=O); 176.82 (a); 199.25 (11)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 955 (w); 1045 (s, ν_{C-O-C}); 1169 (w); 1216 (s, ν_{CO-O-CH}); 1366 (m); 1437 (w); 1546 (m, δ_{N-H} Urethan); 1600 (m, δ_{N-H} Thioharnstoff); 1665 (s, ν_{C=O} Thioharnstoff, Urethan); 1744 (s, ν_{C=O} Acetyl, Säure); 2867 (w); 2933 (m); 3324 (m)

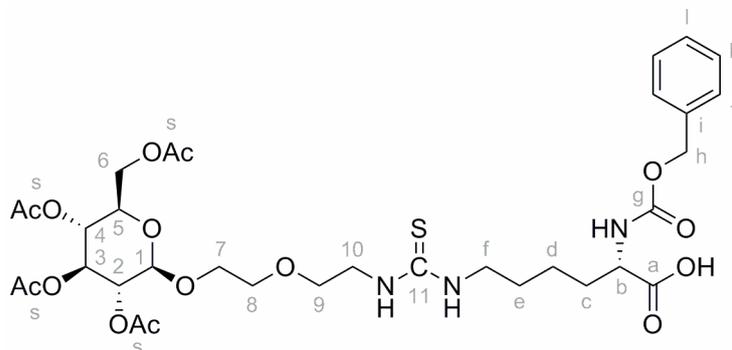
N*_ε-(8-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxaoctyl))-*N*_α-(benzyloxycarbonyl)-L-lysin (**Z-Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS**)-OH) **55a*



5.22 g (10.9 mmol) 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-*O*-(5-isothiocyanato-3-oxapentyl)- α -D-mannopyranose **53a** werden zusammen mit 4.6 g (16.4 mmol) **Z-Lys-OH 38** in 100 ml DMF suspendiert (**53a** löst sich vollständig, **38** nicht), mit 6 ml DIPEA versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Zu dieser Suspension tropft man so lange Wasser, bis das **Z-lys-OH** in Lösung geht (ca. 50 ml). Die noch leicht trübe Lösung wird 3 d bei Raumtemperatur gerührt, mit Essigsäure auf pH 5 angesäuert und am Rotationsverdampfer auf ca. 20 ml eingengt. Man verdünnt die Lösung mit 100 ml Wasser und extrahiert dreimal mit je 100 ml Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen werden mehrmals mit wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Man erhält 6.7 g (8.8 mmol) eines gelblichen Feststoffs, der säulenchromatographisch gereinigt werden muss. Als Eluent dient ein Gemisch aus Ethylacetat, Ethanol und Essigsäure in Verhältnis (v/v) 100:2:0.6. Die vereinigten organischen Extrakte werden auf 10 ml eingengt, mit 150 ml Ethylacetat verdünnt und so lange mit wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und wässriger Natriumchloridlösung gewaschen bis der Geruch nach Essigsäure verschwunden ist. Anschließend wird die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Nach der Trocknung im Hochvakuum erhält man **55a** als weißen Feststoff.

- Ausbeute: 3.60 g (4.75 mmol)
43% (bezogen auf **53a**)
- DC: $R_f = 0.39$ (Ethylacetat/Ethanol/Essigsäure 100:2:0.6)
- $^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.39 (**m**, 2H, d); 1.55 (**m**, 2H, e); 1,72 (**m**, 1H, c); 1,82 (**m**, 1H, c'); 1.96/2.02/2.07/2.12 (4xs, 4x3H, s- CH_3); 3.40 (**m**, 2H, f); 3.57-3.76 (**m**, 8H, 7/8/9/10); 4.00 (**m**, 1H, 5); 4.10 (**m**, 1H, 6); 4.24 (**dd**, $^2J_{\text{H-H}} = 12.30 \text{ Hz}$ / $^3J_{\text{H-H}} = 5.02 \text{ Hz}$, 1H, 6'); überlagert mit **m**, 1H, b); 4.88 (**s-br**, 1H, 1); 5.06 (**m**, 2H, h); 5.20-5.32 (Überlagerung aus: **dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 3.01 \text{ Hz}$ / $^3J_{\text{H-H}} = 1.76 \text{ Hz}$, 1H; 2; **t**, $^3J_{\text{H-H}} = 10.04 \text{ Hz}$, 1H, 4; **dd**, $^3J_{\text{H-H}} = 10.04 \text{ Hz}$ / $^3J_{\text{H-H}} = 3.01 \text{ Hz}$, 1H, 3); 5.77 (**s-br**, 1H, $\alpha\text{-NH-Lysin}$); 6.40/6.74 (2xs-**br**, 2x1H, NH-CS-NH), 7.30 (**m**, 5H, j/k/l)
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 20.67/20.72/20.90 (s- CH_3); 22.42 (d); 28.31 (e); 31.69 (c); 43.92 (10); 44.33 (f); 53.93 (b); 62.52 (6); 66.11 (4); 66.85 (7); 67.00 (h); 68.47 (5); 69.10 (3); 69.70 (2); 69.86/70.15 (8/9); 97.48 (1); 128.01/128.14/128.48 (j/k/l); 136.15 (i); 156.34 (g); 169.73/170.41/170.66/170,79/171.17 (a/s-C=O); 211.62 (11)
- IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 977$ (**w**); 1042 (**s**, $\nu_{\text{C-O-C}}$); 1135 (**m**); 1216 (**s**, $\nu_{\text{CO-O-CH}}$); 1367 (**m**); 1436 (**m**); 1454 (**m**); 1536 (**m**, $\delta_{\text{N-H}}$); 1739 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$); 2867 (**m**); 2935 (**s**); 3344 (**s**)
- Molmasse: 757.80 g/mol
- MS(ESI): m/z (MeOH) = 758.31 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 730.37/731.43 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 756.36 $[\text{M}-\text{H}]^-$

N*_ε-(8-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxaoctyl))-*N*_α-(benzyloxycarbonyl)-L-lysin (**Z-Lys(Ac₄Glc(EO)₂NCS)-OH**) **55b*



Die Darstellung erfolgte analog zu der auf Seite 163 beschriebenen Synthese von **55a**.

Ausbeute: 36% (bezogen auf **53b**)

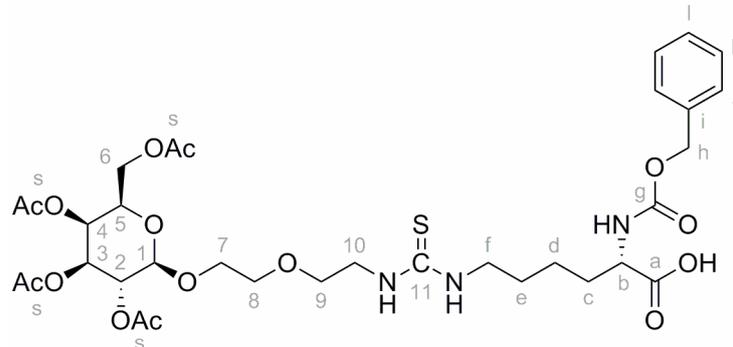
DC: $R_f = 0.34$ (Ethylacetat/Ethanol/Essigsäure 100:2:0.6)

¹H-NMR: δ /ppm (CDCl₃) = 1.39-1.50 (**m**, 2H, **d**); 1.62 (**m**, 2H, **e**); 1.73-1.92 (**m**, 2H, **c**); 1.99/2.01/2.03/2.06 (4xs, 4x3H, s-CH₃); 3.46 (**m**, 2H, **f**); 3.55-3.85 (**m**, 8H, 5/7/8/9/10); 3.91-3.96 (**m**, 1H, 7'); 4.14 (**dd**, ²J_{H-H} = 12.30 Hz / ³J_{H-H} = 2.51 Hz, 1H, 6); 4.26 (**dd**, ²J_{H-H} = 12.30 Hz / ³J_{H-H} = 4.52 Hz, 1H, 6'); 4.37 (**m**, 1H, **b**); 4.54 (**d**, ³J_{H-H} = 8.03 Hz, 1H, 1); 4.97 (**dd**, ³J_{H-H} = 9.53 Hz / ³J_{H-H} = 7.78 Hz, 1H, 2); 5.09 (**t**, ³J_{H-H} = 9.79 Hz, 1H, 4; überlagert mit **s-br**, 2H; **h**); 5.22 (**d**, ³J_{H-H} = 9.53 Hz, 1H, 3); 5.60 (**d**, ³J_{H-H} = 7.78 Hz, 1H, α-NH-Lysin); 6.33/6.72 (2xs-**br**, 2x1H, NH-CS-NH), 7.27-7.34 (**m**, 5H, **j/k/l**)

¹³C-NMR: δ /ppm (CDCl₃) = 20.57/20.70/20.78 (s-CH₃); 22.26 (**d**); 28.30 (**e**); 31.78 (**c**); 43.82 (10); 44.36 (**f**); 53.49 (**b**); 61.86 (6); 67.04 (**h**); 68.37 (4); 68.91 (7); 69.61/69.88 (8/9); 71.58 (2); 71.88 (5); 72.45 (3); 100.83 (1); 128.07/128.18/128.52 (**j/k/l**); 136.19 (**i**); 156.12 (**g**); 169.61/170.34/170.79 (s-C=O); 174.81 (**a**); 211.63 (11)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 909 (**w**); 1031 (**s**, ν_{C-O-C}); 1118 (**m**); 1213 (**s**, ν_{CO-O-CH}); 1366 (**m**); 1455 (**w**); 1531 (**s**, δ_{N-H}); 1738 (**s**, ν_{C=O}); 2871 (**w**); 2938 (**m**); 3356 (**s**)

N*_ε-(8-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxaoctyl))-*N*_α-(benzyloxycarbonyl)-L-lysin (**Z**-Lys(Ac₄Gal(EO)₂NCS)-OH) **55c*



Die Darstellung erfolgte analog zu der auf Seite 163 beschriebenen Synthese von **55a**.

Ausbeute: 20% (bezogen auf **53c**)

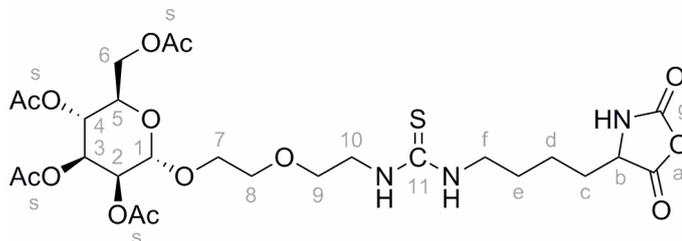
DC: $R_f = 0.34$ (Ethylacetat/Ethanol/Essigsäure 100:2:0.6)

¹H-NMR: δ /ppm (CDCl₃) = 1.42 (m, 2H, d); 1.60 (m, 2H, e); 1,71-1.92 (m, 2H, c); 1.98/2.03/2.04/2.13 (4xs, 4x3H, s-CH₃); 3.46 (m, 2H, f); 3.54-3.77 (m, 7H, 7/8/9/10); 3.89-3.97 (m, 2H, 5/7'); 4.10 (dd, ²J_{H-H} = 11.29 Hz / ³J_{H-H} = 6.78 Hz, 1H, 6); 4.16 (dd, ²J_{H-H} = 11.29 Hz / ³J_{H-H} = 6.53 Hz, 1H, 6'); 4.35 (m, 1H, b); 4.48 (d, ³J_{H-H} = 8.03 Hz, 1H, 1); 5.04 (dd, ³J_{H-H} = 10.54 Hz / ³J_{H-H} = 3.51 Hz, 1H, 3); 5.08 (s-br, 2H, h); 5.15 (dd, ³J_{H-H} = 10.54 Hz / ³J_{H-H} = 7.78 Hz, 1H, 2); 5.38 (dd, ³J_{H-H} = 3.51 Hz / ³J_{H-H} = 1.00 Hz, 1H, 4); 5.65 (d, ³J_{H-H} = 7.53 Hz, 1H, α-NH-Lysin); 6.37/6.83 (2xs-br, 2x1H, NH-CS-NH), 7.27-7.33 (m, 5H, j/k/l)

¹³C-NMR: δ /ppm (CDCl₃) = 20.57/20.62/20.67/20.88 (s-CH₃); 22.29 (d); 28.32 (e); 31.74 (c); 43.77 (10); 44.23 (f); 53.54 (b); 61.19 (6); 66.91 (4); 67.02 (h); 68.93 (7); 69.17 (2); 69.54 (8/9); 71.53 (3); 70.69 (5); 101.30 (1); 128.06/128.18/128.51 (j/k/l); 136.10 (i); 156.13 (g); 170.18/170.22/170.56 (s-C=O); 175.12 (a); 211.60 (11)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 955 (w); 1040 (s, ν_{C-O-C}); 1132 (w); 1175 (w); 1215 (s, ν_{CO-O-CH}); 1367 (m); 1436 (w); 1455 (w); 1532 (s, δ_{N-H}); 1738 (s, ν_{C=O}); 2870 (w); 2935 (m); 3353 (s)

N*_ε-(8-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxaoctyl))-L-lysin-*N*-carboxyanhydrid (Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-NCA) **56a*



2 g (2.6 mmol) Boc-Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-OH **54a** bzw. Z-Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-OH **55a** werden unter Stickstoffatmosphäre in 100 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst und mit 0.6 ml (6.6 mmol) Dichlormethylmethylether versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 20 h unter Rückfluss gerührt, bevor man weitere 0.2 ml (2.2 mmol) Dichlormethylmethylether zugibt. Nach weiteren 6 h Rühren unter Rückfluss wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird in 150 ml Ethylacetat aufgenommen und nacheinander zügig mit eiskalten wässrigen Lösungen von Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat und erneut Natriumchlorid gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Das Produkt wird in 20 ml wasserfreiem THF gelöst, auf 200 ml *n*-Hexan gegossen und 30 min im Eisbad gerührt. Zur vollständigen Fällung wird das Gemisch für 18 h auf -20°C gekühlt. Das Produkt wird abgesaugt, mit wenig *n*-Hexan gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Man erhält das Produkt als schwach gelbliches Pulver.

Die Ausbeuten der aus den Verbindungen **54a-c** und **55a-c** hergestellten NCAs sind in Tab. 9.2 zusammengefasst.

Tabelle 9.2: Bei der Umsetzung der Boc- und Z-geschützten kohlenhydrat-funktionalisierten Aminosäuren **54a-c** und **55a-c** zu den entsprechenden NCAs erzielte Ausbeuten.

Produkt	Edukt	Ausbeute
Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)-NCA 56a	Boc-Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)-OH 54a	55 %
Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)-NCA 56b	Boc-Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)-OH 54b	71 %
Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)-NCA 56c	Boc-Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)-OH 54c	55 %
Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)-NCA 56a	Z-Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)-OH 55a	76 %
Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)-NCA 56b	Z-Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)-OH 55b	80 %
Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)-NCA 56c	Z-Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)-OH 55c	82 %

Ausbeute: 55% (bezogen auf **54a**)

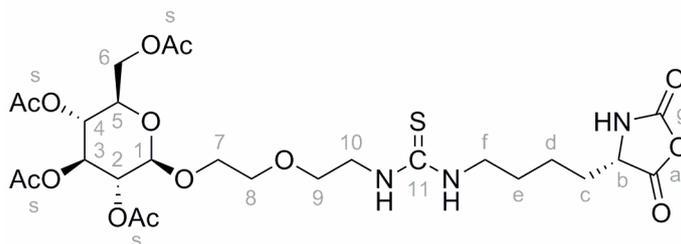
76% (bezogen auf **55a**)

¹H-NMR: δ/ppm (CDCl₃) = 1.32-1.70 (**m**, 4H, d/e); 1.89 (**m**, 2H, c); 1.95/2.02/2.07/2.12 (4xs, 4x3H, s-CH₃); 3.18 (**m**, 2H, f); 3.35 (**m**, 2H, 10); 3.45-3.86 (**m**, 6H, 7/8/9); 4.02-4.07 (**m**, 3H, 5/6/b); 4.25 (**m**, 1H, 6'); 4.84 (**m**, 1H, 1); 5.22-5.26 (**m**, 3H, 2/3/4)

¹³C-NMR: δ/ppm (CDCl₃) = 20.68/20.85 (s-CH₃); 23.59 (d); 30.73 (c); 31.12 (e); 37.85 (b); 46.21 (f/10); 62.37 (6); 66.06 (4); 67.29 (7); 68.40 (5); 69.05 (3); 69.44 (2); 69.80/71.06 (8/9); 97.68 (1); 150.90 (g); 169.69/169.92/170.65 (a/s-C=O); 211.45 (11)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 973 (**w**); 1043 (**s**, $\nu_{\text{C-O-C}}$); 1134 (**m**); 1217 (**s**, $\nu_{\text{CO-O-CH}}$); 1367 (**m**); 1432 (**w**); 1532 (**s**, $\delta_{\text{N-H}}$); 1657 (**m**, $\nu_{\text{C=OAmid}}$); 1740 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$); 2934 (**m**)

N*_ε-(8-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxaoctyl))-L-lysin-*N*-carboxyanhydrid (Lys(Ac₄Glc(EO)₂NCS)-NCA) **56b*



Die Darstellung erfolgte über die zur Synthese von Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-NCA **56a** beschriebenen Vorschrift auf Seite 167.

Ausbeute: 71% (bezogen auf **54b**)

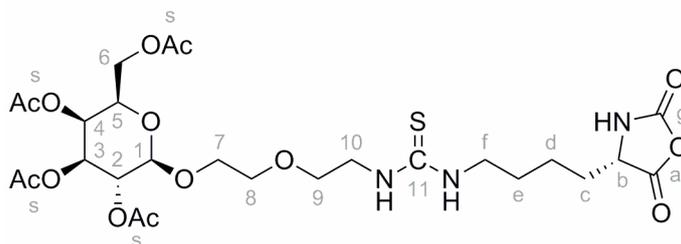
80% (bezogen auf **55b**)

¹H-NMR: δ/ppm (CDCl₃) = 1.27-1.91 (m, 6H, c/d/e); 1.98/2.00/2.05/2.06 (4xs, 4x3H, s-CH₃); 3.12-3.89 (m, 12H, 5/7/8/9/10/b/f); 4.07-4.13 (m, 1H, 6); 4.21-4.25 (m, 1H, 6'); 4.56 (m, 1H, 1); 4.94 (m, 1H, 2); 5.06 (t-br, ³J_{H-H} = 9.54, 1H, 4); 5.19 (m, 1H, 3)

¹³C-NMR: δ/ppm (CDCl₃) = 20.57/20.72/21.00 (s-CH₃); 23.69 (d); 31.19 (c); 31.44 (e); 36.39 (b); 46.31 (f/10); 61.93 (6); 68.41 (4); 69.02 (7); 69.93 (8/9); 71.22 (2); 71.77 (5); 72.78 (3); 100.86 (1); 151.28 (g); 169.27/169.37/170.16/170.23/170.62 (a/s-C=O); 211.63 (11)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 907 (m); 1032 (s, ν_{C-O-C}); 1120 (w); 1213 (s, ν_{CO-O-CH}); 1365 (m); 1433 (w); 1454 (w); 1532 (m, δ_{N-H}); 1651 (m, ν_{C=OAmid}); 1742 (s, ν_{C=O}); 2867 (w); 2939 (m); 3306 (w)

N*_ε-(8-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxaoctyl))-L-lysine-*N*-carboxyanhydrid (Lys(Ac₄Gal(EO)₂NCS)-NCA) **56c*



Die Darstellung erfolgte über die zur Synthese von Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)-NCA **56a** beschriebenen Vorschrift auf Seite 167.

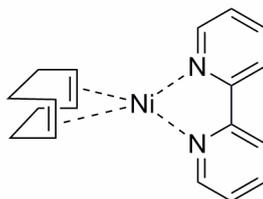
Ausbeute: 55% (bezogen auf **54c**)

82% (bezogen auf **55c**)

¹H-NMR: δ/ppm (CDCl₃) = 1.09-1.86 (**m**, 6H, c/d/e); 1.96/2.03/2.13 (3xs, 12H, s-CH₃); 3.27-4.38 (**m**, 14H, 5/6/7/8/9/10/b/f); 4.53 (**m**, 1H, 1); 5.03 (**m**, 1H, 3); 5.13 (**m**, 1H, 2); 5.37 (**m**, 1H, 4)

¹³C-NMR: δ/ppm (CDCl₃) = 20.54/20.63/20.76 (s-CH₃); 24.04 (d); 31.16 (c); 31.25 (e); 38.74 (b); 46.33 (f/10); 61.21 (6); 67.01 (4); 68.77 (2); 68.91 (7); 69.96/70.05 (8/9); 70.67 (5); 70.84 (3); 101.32 (1); 151.68 (g); 170.09/170.18/170.32 (a/s-C=O); 211.62 (11)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 955 (**w**); 1043 (**s**, ν_{C-O-C}); 1126 (**w**); 1173 (**w**); 1215 (**s**, ν_{CO-O-CH}); 1366 (**m**); 1432 (**w**); 1531 (**s**, δ_{N-H}); 1658 (**m**, ν_{C=OAmid}); 1742 (**s**, ν_{C=O}); 2870 (**w**); 2936 (**m**); 3295 (**w**)

(2,2'-Bipyridin)(1,5-Cyclooctadien)Nickel(0) (bpyNi(COD))

Die Synthese von bpyNi(COD) erfolgte in Anlehnung an literaturbekannte Vorschriften.^[147, 210]

Wegen der hohen Luftempfindlichkeit der Nickel(0)-Komplexe werden für die Synthese mit Chlortrimethylsilan silanisierte Glasapparaturen verwendet. Die eingesetzten Lösungsmittel werden vor Gebrauch frisch absolutiert und durch Anlegen eines Vakuums und anschließender Belüftung mit Argon dreimal entgast.

In einer Glove Box wird eine Apparatur, bestehend aus einer Umkehrfritte und zwei Zweihalskolben mit Septum, unter Argonatmosphäre mit 1 g (3.6 mmol) Bis(1,5-Cyclooctadien)Nickel(0) und 0.44 g (2.8 mmol) 2,2'-Bipyridin befüllt. Die Apparatur wird verschlossen und aus der Glove Box entnommen. Das orange Feststoffgemisch wird in 11 ml wasserfreiem THF gelöst und die erhaltene tiefviolette Lösung 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand mit 50 ml wasserfreiem Ether aufgenommen. Zur Kristallisation des gebildeten (2,2'-Bipyridin)(1,5-Cyclooctadien)Ni(0)-Komplexes wird das Reaktionsgemisch mit einem Aceton/Trockeneis-Bad auf -78°C gekühlt. Der schwarz-violette Niederschlag wird durch die Umkehrfritte abgesaugt, mit 150 ml wasserfreiem Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Entnahme des Produktes wird die gesamte Reaktionsapparatur evakuiert und in die Glove Box eingeschleust. Auf diese Weise erhält man das Produkt als schwarz-violette Kristalle.

Ausbeute: 85% (bezogen auf 2,2'-Bipyridin)

Da sich im Rahmen dieser Arbeit herausgestellt hat, dass es für die Polymerisation nicht notwendig ist das beim Ligandenaustausch freiwerdende 1,5-Cyclooctadien abzu-

trennen, konnte auf diesen Schritt verzichtet werden. Die Herstellung der Initiatorlösung erfolgte nach folgender Vorschrift.

bpyNi(COD)-Lösung

Auch hier wird mit silanisierten Kolben und frisch absolutierten, mehrfach entgasten Lösungsmitteln gearbeitet.

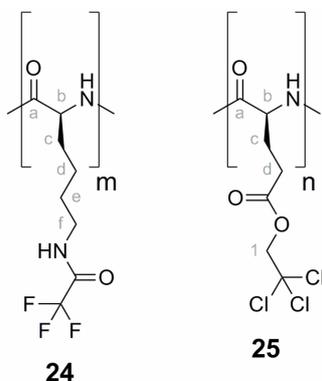
0.4 g (1.45 mmol) Bis(1,5-Cyclooctadien)Nickel(0) werden in einer Glove Box unter Argonatmosphäre in einen Schlenkkolben gefüllt. Der Kolben wird mit einem Septum verschlossen und aus der Glove Box entnommen. Der vorgelegte orangefarbene Feststoff wird in 20 ml THF bzw. DMF gelöst. Zu dieser Lösung tropft man langsam 10 ml einer 0.145 molaren Lösung von 2,2'-Bipyridin in THF bzw. DMF, wobei sich die Reaktionslösung rasch tief violett färbt. Anschließend wird die Reaktionslösung 3 h bei Raumtemperatur gerührt, auf die gewünschte Konzentration verdünnt und ohne weitere Aufreinigung als Initiatorlösung eingesetzt.

9.3.2 Polymerisation

Auf Grund der Feuchtigkeitsempfindlichkeit der NCAs wurden alle hier besprochenen Polymerisationen in silanisierten Zweihalskolben mit Septum unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Die verwendeten Lösemittel wurden nach gängigen Vorschriften getrocknet und destilliert. Im Falle der Ni(0)-Komplex initiierten Polymerisationen wurde, wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Ni(0)-Zentrums, Argon als Schutzgas verwendet. Außerdem wurden die Lösemittel und auch die Monomerlösungen vor der Zugabe des Initiators durch das Anlegen eines Vakuums und anschließender Belüftung mit Argon jeweils mindestens dreimal entgast.

Im Folgenden werden für die Darstellung der verschiedenen Gruppen von Polypeptiden allgemeine Synthesevorschriften formuliert. Die Ansätze und Ausbeuten der über die jeweilige Vorschrift dargestellten Polypeptide sind in den darunter stehenden Tabellen zusammengefasst. Für die einzelnen Polypeptide werden nachfolgend lediglich die analytischen Daten angegeben

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von hydrophoben Homopolyptiden mit Triethylamin als Initiator.



Das NCA wird unter Stickstoffatmosphäre in soviel wasserfreiem DMF gelöst, dass eine 3 Gew.% Lösung erhalten wird. Zu dieser Lösung spritzt man 1/30 eq. einer 2 Vol.% Lösung von frisch destilliertem Triethylamin in DMF und rührt die erhaltene Lösung 3 d unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wird auf das fünffache Volumen verdünnt und das Polypeptid durch Eintropfen dieser Lösung in die 20-fache Menge eines Methanol/Wasser-Gemischs ausgefällt. Das Polymer wird abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Zur Reinigung wird das erhaltene Polypeptid in THF gelöst und erneut in einem Methanol/Wasser-Gemisch gefällt.

Alle auf diese Weise dargestellten Polypeptide sind in Tab. 9.3 zusammengefasst.

Tabelle 9.3: Ausbeuten und Molmassen M_w der isolierten Homopolypeptide. (I/M: Initiator/Monomer-Verhältnis, MeOH/H₂O: Zusammensetzung des Fällungsmittels, ¹: GPC-Messung erfolgte in THF, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc)

Polymer	Monomer	I/M	Lösemittel	MeOH/H ₂ O	M_w [g/mol]	Ausbeute
24	Lys(TFA)-NCA	1/30	DMF	1:1	86900 ¹	71 %
25	Glu(TCE)-NCA	1/30	DMF	1:2	1700-4.4 Mio ²	49 %

Poly(*N*_ε-trifluoracetyl-L-lysin) 24

¹H-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 1.30/1.48/1.84 (3xs-br, 6H, c/d/e); 3.14 (s-br, 2H, f); 3.82 (s-br, 1H, b); 9.26 (s-br, 1H, ε-NH)

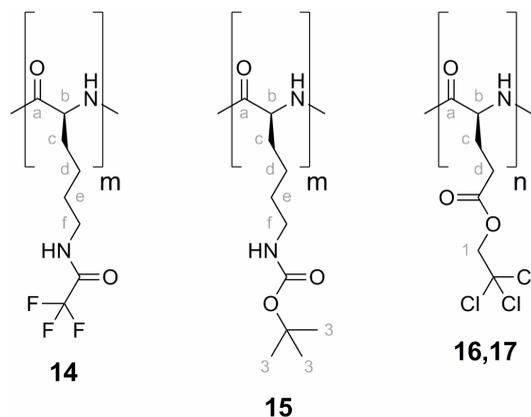
IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3288 (s); 3102 (w); 2938 (m); 2867 (w); 2194 (w); 1702 (s, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid(TFA)); 1651 (s, Amid I, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1541 (s, Amid II, $\delta_{\text{N-H}}$); 1442 (m); 1341 (w); 1150 (s); 1051 (m); 853 (w)

Poly[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat] 25

¹H-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 1.85-2.35 (m, 2H, c); 2.53-2.86 (m, 2H, d); 4.01 (s-br, 1H, b); 4.87 (s-br, 1H, l)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3283 (s); 2953 (w); 1750 (s, $\nu_{\text{C=O}}$ Ester); 1651 (s, Amid I, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1544 (s, Amid II, $\delta_{\text{N-H}}$); 1448 (m); 1387 (m); 1220 (m), 1147 (s); 1085 (w); 872 (m)

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von hydrophoben Homopolyptiden mit bpyNi(COD) als Initiator.



Das NCA wird unter Argonatmosphäre in so viel wasserfreiem THF gelöst, dass eine 3 Gew.% Lösung entsteht. Die Lösung wird dreimal durch Anlegen eines Vakuums entgast. Anschließend spritzt man die entsprechende Menge einer frisch hergestellten tiefviolettten Lösung von bpyNi(COD) in wasserfreiem THF zu. Die zunächst intensiv violette Reaktionslösung verfärbt sich rasch rot. Das Reaktionsgemisch wird 2 d unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Das Polymer wird durch Eintropfen der zuvor auf das fünffache Volumen verdünnten Reaktionslösung in die 20-fache Menge eines Methanol/Wasser-Gemischs ausgefällt, wobei die Rotfärbung verschwindet. Das Polymer wird abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Zur Reinigung wird das erhaltene Polypeptid aus THF umgefällt. Alle auf diese Weise dargestellten Polypeptide sind in Tab. 9.4 zusammengefasst.

Tabelle 9.4: Ausbeuten und Molmassen M_w der isolierten Homopolypeptide. (I/M: Initiator/Monomer-Verhältnis, MeOH/H₂O: Zusammensetzung des Fällungsmittels, ¹: GPC-Messung erfolgte in THF, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc)

Polymer	NCA	I/M	Lösemittel	MeOH/H ₂ O	M_w [g/mol]	Ausbeute
14	Lys(TFA)-NCA	1/80	THF	3:1	172200 ¹	81 %
15	Lys(Boc)-NCA	1/70	THF	1:1	559200 ²	86 %
16	Glu(TCE)-NCA	1/80	THF	1:1	31300 ²	27 %
17	Glu(TCE)-NCA	1/50	THF	0:1	22300 ²	15 %

Poly(*N*_ε-trifluoracetyl-L-lysin) **14**

¹H-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 1.30/1.48/1.84 (**3xs-br**, 6H, c/d/e); 3.14 (**s-br**, 2H, f); 3.82 (**s-br**, 1H, b); 9.26 (**s-br**, 1H, ϵ -NH)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3288 (**s**); 3102 (**w**); 2938 (**m**); 2867 (**w**); 2194 (**w**); 1702 (**s**, $\nu_{C=O}$ Amid(TFA)); 1651 (**s**, Amid I, $\nu_{C=O}$ Amid); 1541 (**s**, Amid II, δ_{N-H}); 1442 (**m**); 1341 (**w**); 1150 (**s**); 1051 (**m**); 853 (**w**)

Poly(*N*_ε-*tert*-butyloxycarbonyl-L-lysin) **15**

¹H-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 1.23-1.85 (**m**, 15H, c/d/e/3); 2.88 (**s-br**, 2H, f); 3.76 (**s-br**, 1H, b)

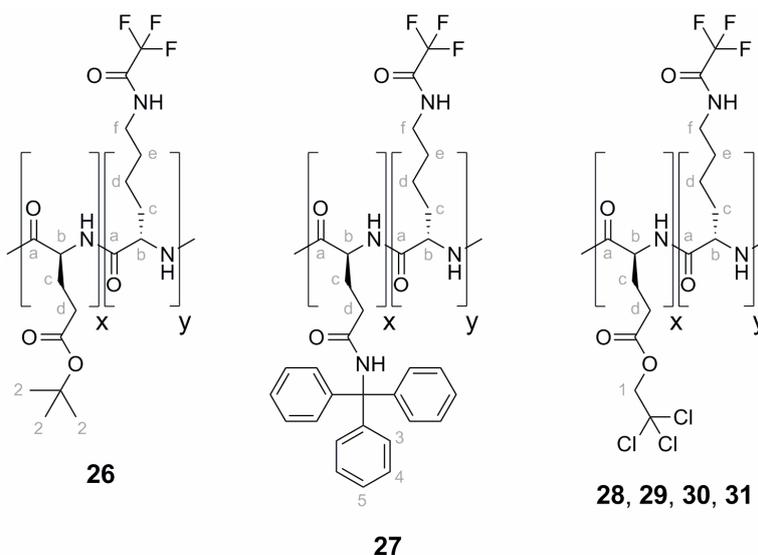
IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3290 (**s**); 2975 (**w**); 2993 (**m**); 2866 (**w**); 1689 (**s**, $\nu_{C=O}$ Amid(Boc)); 1650 (**s**, Amid I, $\nu_{C=O}$ Amid); 1518 (**s**, Amid II, δ_{N-H}); 1455 (**m**); 1391 (**w**); 1365 (**m**); 1269 (**m**); 1248 (**m**); 1166 (**s**); 1041 (**w**); 992 (**w**)

Poly[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat] **16, 17**

¹H-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 1.85-2.35 (**m**, 2H, c); 2.53-2.86 (**m**, 2H, d); 4.01 (**s-br**, 1H, b); 4.87 (**s-br**, 1H, l)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3283$ (s); 2953 (w); 1750 (s, $\nu_{\text{C=O Ester}}$); 1651 (s, Amid I, $\nu_{\text{C=O Amid}}$); 1544 (s, Amid II, $\delta_{\text{N-H}}$); 1448 (m); 1387 (m); 1220 (m), 1147 (s); 1085 (w); 872 (m)

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von statistischen Copolypeptiden mit Amin-Initiatoren.



Ein gemäß Tab. 9.5 zusammengesetztes NCA-Gemisch wird unter Stickstoffatmosphäre in so viel wasserfreiem Lösemittel gelöst, dass eine 3 Gew.% Lösung erhalten wird. Zu dieser Lösung spritzt man die entsprechende Menge einer 2 Vol.% Lösung des frisch destillierten Amin-Initiators im verwendeten Lösemittel. Das Reaktionsgemisch wird 3 d unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird auf das fünffache Volumen verdünnt und das Polypeptid durch Eintropfen dieser Lösung in die 20-fache Menge des Fällungsmittels ausgefällt. Das Polymer wird abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Zur Reinigung wird das erhaltene Polypeptid aus THF umgefällt. Alle auf diese Weise dargestellten Polypeptide sind in Tab. 9.5 zusammengefasst.

Tabelle 9.5: Ausbeuten und Molmassen M_w der isolierten statistischen Copolypeptide. (NCAs: polymerisierte NCAs, I/M: Initiator/Monomergesamtmenge-Verhältnis, MeOH/H₂O: Zusammensetzung des Fällungsmittels, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc)

Polymer	NCA ₁	NCA ₂	Initiator	I/M	LM	MeOH/H ₂ O	M_w [g/mol]	Ausbeute
26	1.0 Lys(TFA)	2.0 Glu(<i>t</i> -Bu)	NEt ₃	1/50	DMF	1:1	186500 ²	78 %
27	1.0 Lys(TFA)	5.0 Gln(Trt)	NEt ₃	1/50	DMF	2:1	7200 ²	56 %
28	1.0 Lys(TFA)	1.0 Glu(TCE)	NEt ₃	1/30	DMF	1:1	1413 ²	53 %
29	1.0 Lys(TFA)	1.0 Glu(TCE)	NEt ₃	1/30	THF	1:1	---	---
30	1.0 Lys(TFA)	5.0 Glu(TCE)	<i>n</i> -Hexylamin	1/50	DMF	1:1	---	---
31	1.0 Lys(TFA)	5.0 Glu(TCE)	<i>n</i> -Hexylamin	1/50	THF	1:2	2929 ²	38 %

Poly[(*N*_ε-trifluoracetyl-L-lysin)-*co*-(*γ*-*tert*-butyl-L-glutamat)] **26**

¹H-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 1.19-2.41 (**m**, *c/d/e*-Lysin, *c/d/2*-Glutamat); 3.12 (**s-br**, *f*-Lysin); 3.39 (**s-br**, *b*-Glutamat) überlagert mit 4.24 (**s-br**, *b*-Lysin); 8.21 (**s-br**, NH-Peptid); 9.32 (**s-br**, ϵ -NH-Lysin)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3291 (**s**); 3082 (**w**); 2979 (**m**); 2936 (**m**); 2872 (**w**); 1707 (**s**, $\nu_{C=O}$ Amid(TFA)+Ester); 1651 (**s**, Amid I, $\nu_{C=O}$ Amid); 1539 (**s**, Amid II, δ_{N-H}); 1453 (**m**); 1392 (**w**); 1367 (**m**); 1251 (**w**); 1208 (**w**); 1148 (**s**); 954 (**w**); 845 (**m**)

Poly[(*N*_ε-trifluoracetyl-L-lysin)-*co*-(*N*_δ-triphenylmethyl-L-glutamin)] **27**

¹H-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 1.23-2.39 (**m**, *c/d/e*-Lysin, *c/d*-Glutamin); 3.02 (**s-br**, *f*-Lysin); 3.89-4.24(**s-br**, *b*-Lysin, *b*-Glutamin); 7.16 (**m**, *3/4/5*-Glutamin) 7.88 (**s-br**, NH-Peptid); 8.47 (**s-br**, NH-Glutamin); 9.27 (**s-br**, ϵ -NH-Lysin)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3283 (**m**); 3058 (**w**); 3025 (**w**); 2930 (**w**); 1780 (**w**); 1650 (**s**, Amid I, $\nu_{C=O}$ Amid); 1597 (**w**); 1489 (**s**, Amid II, δ_{N-H}); 1446 (**m**); 1206 (**m**); 1183 (**s**); 1155 (**s**); 1083 (**w**); 1035 (**w**); 1002 (**w**); 934 (**w**)

Poly{[N_ε-trifluoracetyl-L-lysin]-co-[γ-(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]} 28

¹H-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 1.30-2.75 (**m**, c/d/e-Lysin, c/d-Glutamat); 3.14 (**s-br**, f-Lysin); 4.00 (**s-br**, b-Glutamat, b-Lysin); 4.86 (**s-br**, 1-Glutamat); 8.23 (**s-br**, NH-Peptid); 9.32 (**s-br**, ε-NH-Lysin)

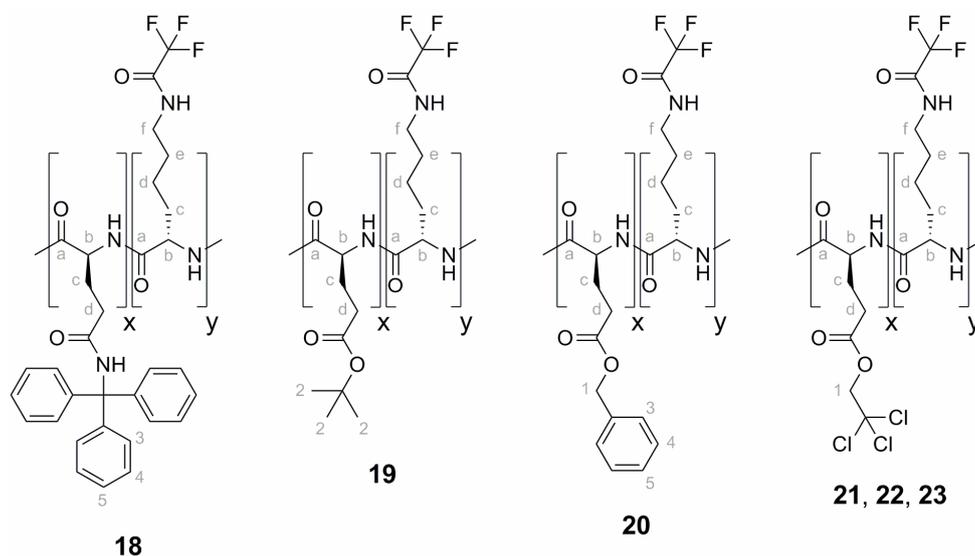
IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3283 (**s**); 3057 (**w**); 2955 (**m**); 2871 (**w**); 1750 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid(TFA)+Ester); 1651 (**s**, Amid I, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1541 (**s**, Amid II, $\delta_{\text{N-H}}$); 1447 (**m**); 1386 (**m**); 1313 (**w**); 1210 (**m**); 1147 (**s**); 1086 (**w**); 921 (**w**); 872 (**w**); 798 (**s**); 716 (**s**)

Poly{[N_ε-trifluoracetyl-L-lysin]-co-[γ-(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]} 31

¹H-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 0.86 (**s-br**, CH₃-Hexylamin); 1.16/1.56 (**s-br**, 4xCH₂-Hexylamin); 1.30-2.75 (**m**, c/d/e-Lysin, c/d-Glutamat); 3.14 (**s-br**, f-Lysin, CH₂-Hexylamin); 4.00 (**s-br**, b-Glutamat, b-Lysin); 4.86 (**s-br**, 1-Glutamat); 8.23 (**s-br**, NH-Peptid); 9.32 (**s-br**, ε-NH-Lysin)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3284 (**s**); 3057 (**w**); 2955 (**m**); 2871 (**w**); 1751 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid(TFA)+Ester); 1650 (**s**, Amid I, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1541 (**s**, Amid II, $\delta_{\text{N-H}}$); 1448 (**m**); 1418 (**w**); 1386 (**m**); 1313 (**w**); 1217 (**m**); 1146 (**s**); 1085 (**w**); 922 (**w**); 872 (**w**); 798 (**s**); 715 (**s**)

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von statistischen Copolymeren mit bpy-Ni(COD) als Initiator



Ein gemäß Tab. 9.6 zusammengesetztes NCA-Gemisch wird unter Argonatmosphäre in so viel wasserfreiem THF gelöst, dass eine 5 Gew.% Lösung entsteht. Die Lösung wird dreimal durch Anlegen eines Vakuums entgast. Anschließend spritzt man die entsprechende Menge einer frisch hergestellten tiefvioletten Lösung des Nickel(0)-Initiators in wasserfreiem THF zu. Die zunächst intensiv violette Reaktionslösung verfärbt sich rasch rot. Das Reaktionsgemisch wird 2 d unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Das Polymer wird durch Eintropfen der zuvor auf das fünffache Volumen verdünnten Reaktionslösung in die 20-fache Menge des Fällungsmittels gefällt, wobei die Rotfärbung verschwindet. Das Polymer wird abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Zur Reinigung wird das erhaltene Polypeptid aus THF umgefällt. Alle auf diese Weise dargestellten Polypeptide sind in Tab. 9.6 zusammengefasst.

Tabelle 9.6: Ausbeuten und Molmassen M_w der isolierten statistischen Copolypeptide. (NCAs: polymerisierte NCAs, I/M: Initiator/Monomer-Verhältnis, ¹: GPC-Messung erfolgte in THF, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc)

Polymer	NCA ₁	NCA ₂	I/M	Lösemittel	Fällungsmittel	M_w [g/mol]	Ausbeute
18	1 Lys(TFA)	5 Gln(Trt)	1/40	THF	<i>n</i> -Hexan	39400 ²	70 %
19	1 Lys(TFA)	4 Glu(<i>t</i> -Bu)	1/70	THF	MeOH/H ₂ O (1:1)	44700 ²	72 %
20	1 Lys(TFA)	5 Glu(Bzl)	1/70	THF	<i>n</i> -Hexan	26300 ²	87 %
21	1 Lys(TFA)	5 Glu(TCE)	1/50	THF	MeOH/H ₂ O (1:2)	19100 ¹	39 %
22	1 Lys(TFA)	8 Glu(TCE)	1/50	THF	MeOH/H ₂ O (0:1)	10300 ¹	26 %
23	8 Lys(TFA)	1 Glu(TCE)	1/50	THF	MeOH/H ₂ O (1:1)	32100 ¹	24 %

Poly[(*N*_ε-trifluoracetyl-L-lysin)-*co*-(*N*_δ-triphenylmethyl-L-glutamin)] **18**

¹H-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 1.23-2.39 (**m**, *c/d/e*-Lysin, *c/d*-Glutamin); 3.02 (**s-br**, *f*-Lysin); 3.89-4.24(**s-br**, *b*-Lysin, *b*-Glutamin); 7.16 (**m**, 3/4/5-Glutamin) 7.88 (**s-br**, NH-Peptid); 8.47 (**s-br**, NH-Glutamin); 9.27 (**s-br**, ϵ -NH-Lysin)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3283 (**m**); 3058 (**w**); 3025 (**w**); 2930 (**w**); 1780 (**w**); 1650 (**s**, Amid I, $\nu_{C=O}$ Amid); 1597 (**w**); 1489 (**s**, Amid II, δ_{N-H}); 1446 (**m**); 1206 (**m**); 1183 (**s**); 1155 (**s**); 1083 (**w**); 1035 (**w**); 1002 (**w**); 934 (**w**)

Poly[(*N*_ε-trifluoracetyl-L-lysin)-*co*-(γ -*tert.*-butyl-L-glutamat)] **19**

¹H-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 1.19-2.41 (**m**, *c/d/e*-Lysin, *c/d/2*-Glutamat); 3.12 (**s-br**, *f*-Lysin); 3.39 (**s-br**, *b*-Glutamat) überlagert mit 4.24(**s-br**, *b*-Lysin); 8.21 (**s-br**, NH-Peptid); 9.32 (**s-br**, ϵ -NH-Lysin)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3291 (**s**); 3082 (**w**); 2979 (**m**); 2936 (**m**); 2872 (**w**); 1707 (**s**, $\nu_{C=O}$ Amid(TFA)+Ester); 1651 (**s**, Amid I, $\nu_{C=O}$ Amid); 1539 (**s**, Amid II, δ_{N-H}); 1453 (**m**); 1392 (**w**); 1367 (**m**); 1251 (**w**); 1208 (**w**); 1148 (**s**); 954 (**w**); 845 (**m**)

Poly[(*N*_ε-Trifluoracetyl-L-lysin)-*co*-(*γ*-benzyl-L-glutamat)] 20

¹H-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 1.42-2.65 (**m**, *c/d/e*-Lysin, *c/d*-Glutamat); 3.09 (**s-br**, *f*-Lysin); 3.91-4.25 (**m**, *b*-Glutamat, *b*-Lysin); 5.03 (**s-br**, 1-Glutamat); 7.25 (**m**, 3/4/5-Glutamat); 8.27 (**s-br**, NH-Peptid); 9.29 (**s-br**, ε-NH-Lysin)

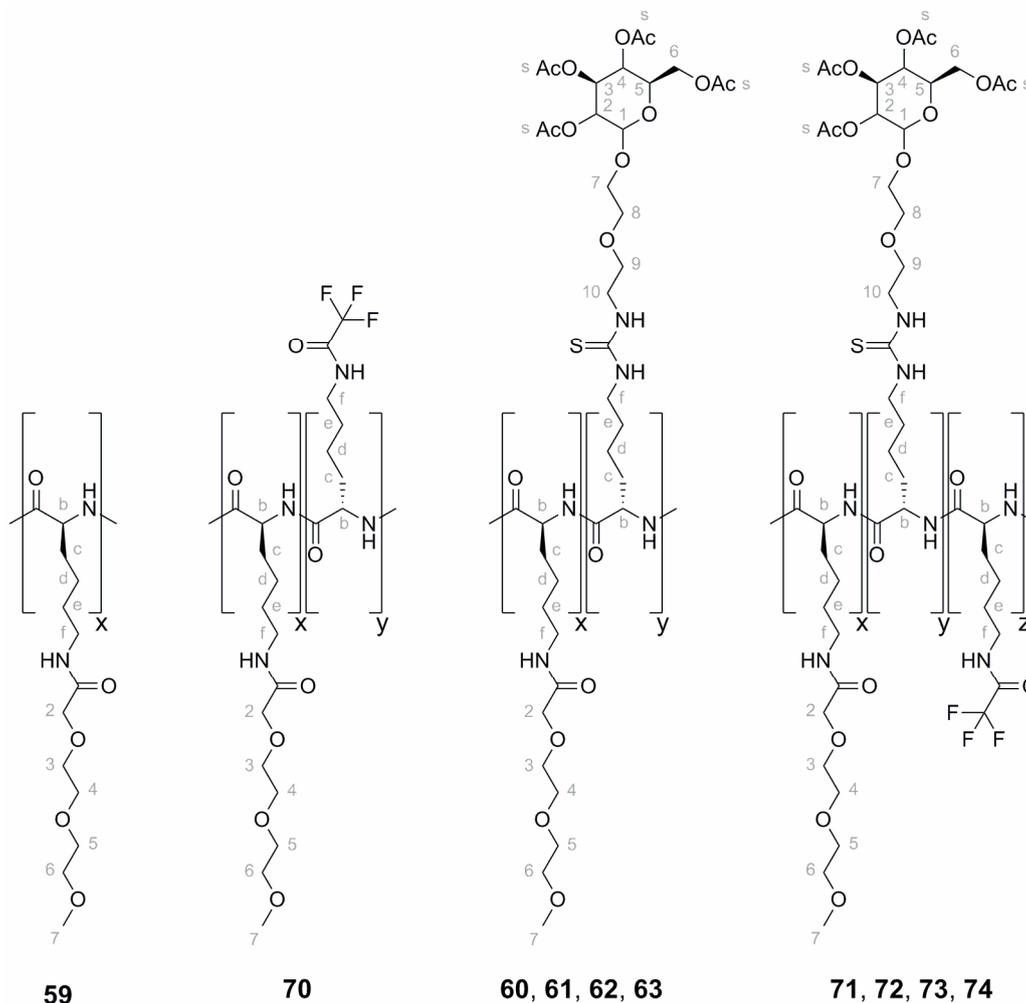
IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3289 (**s**); 3066 (**w**); 3035 (**w**); 2939 (**m**); 1723 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid(TFA)+Ester); 1650 (**s**, Amid I, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1541 (**s**, Amid II, $\delta_{\text{N-H}}$); 1498 (**w**); 1453 (**m**); 1388 (**w**); 1312 (**w**); 1157 (**s**); 1081 (**w**); 967 (**m**)

Poly{[*N*_ε-trifluoracetyl-L-lysin]-*co*-[*γ*-(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]} 21, 22, 23

¹H-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 1.30-2.75 (**m**, *c/d/e*-Lysin, *c/d*-Glutamat); 3.14 (**s-br**, *f*-Lysin); 4.00 (**s-br**, *b*-Glutamat, *b*-Lysin); 4.86 (**s-br**, 1-Glutamat); 8.23 (**s-br**, NH-Peptid); 9.32 (**s-br**, ε-NH-Lysin)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3283 (**s**); 3057 (**w**); 2955 (**m**); 2871 (**w**); 1750 (**s**, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid(TFA)+Ester); 1651 (**s**, Amid I, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1541 (**s**, Amid II, $\delta_{\text{N-H}}$); 1447 (**m**); 1386 (**m**); 1313 (**w**); 1210 (**m**); 1147 (**s**); 1086 (**w**); 921 (**w**); 872 (**w**); 798 (**s**); 716 (**s**)

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von statistischen Glycopeptiden, Poly[Lys(DEG)] und Poly[Lys(DEG)-*co*-Lys(TFA)] mit Triethylamin als Initiator



Lys(DEG)-NCA bzw. ein gemäß Tab. 9.7 zusammengesetzte NCA-Gemisch wird unter Stickstoffatmosphäre in so viel wasserfreiem DMF gelöst, dass eine 5 Gew.% entsteht. Zu dieser Lösung spritzt man die entsprechende Menge einer 2 Vol.% Lösung von frisch destilliertem Triethylamin in wasserfreiem DMF. Das Reaktionsgemisch wird 2 d unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Das Polymer wird durch Eintropfen der Lösung in die 20-fache Menge Diethylether gefällt. Das Lösemittel wird abdekantiert und der zähe klebrige Niederschlag im Vakuum getrocknet. Das Polypeptid wird in Methanol gelöst und durch kontinuierliche Ultrafiltration mit dem 10-fachen an Methanol gegen eine UF-C5 Membran (5 kDa) gereinigt. Das Lösemittel

wird am Rotationsverdampfer entfernt, das Produkt in Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Man erhält einen weißen watteartigen Feststoff. Die auf diese Weise dargestellten Polypeptide sind in Tab. 9.7 zusammengefasst.

Tabelle 9.7: Ausbeuten und Molmassen M_w der isolierten Polypeptide. (NCA₁₋₃: polymerisierte NCA, I/M: Initiator/Monomergesamtmenge-Verhältnis, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc)

Polymer	NCA ₁	NCA ₂	NCA ₃	I/M	M_w [g/mol]	Ausbeute
59	Lys(DEG)	---	---	1/50	93600 ²	91 %
60	8 Lys(DEG)	1 Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)	---	1/50	56800 ²	55 %
61	8 Lys(DEG)	1 Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)	---	1/30	40000 ²	74 %
62	8 Lys(DEG)	1 Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)	---	1/30	44000 ²	70 %
63	8 Lys(DEG)	1 Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)	---	1/30	37400 ²	91 %
70	18 Lys(DEG)	---	1 Lys(TFA)	1/50	44500 ²	67 %
71	16 Lys(DEG)	2 Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)	1 Lys(TFA)	1/50	79900 ²	76 %
72	16 Lys(DEG)	2 Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)	1 Lys(TFA)	1/30	40800 ²	59 %
73	16 Lys(DEG)	2 Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)	1 Lys(TFA)	1/30	41700 ²	82%
74	16 Lys(DEG)	2 Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)	1 Lys(TFA)	1/30	33300 ²	85 %

Poly[*N*_ε-(3,6,9-trioxa-decanoyl)-L-lysin] **59**

¹H-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 1.40 (**m**, 6H, c/d/e); 3.04 (**s-br**, 2H, f); 3.22 (**s**, 3H, 7); 3.41 (**m**, 2H, 6); 3.53 (**m**, 7H, b, 3, 4, 5); 3.84 (**s-br**, 2H, 2); 7.67 (**s-br**, 1H, NH)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3292 (**s**); 3065 (**w**); 2919 (**s**); 2865 (**s**); 1650 (**s**, Amid I, $\nu_{C=O}$ _{Amid}); 1534 (**s**, Amid II, δ_{N-H}); 1454 (**m**); 1339 (**w**); 1283(**m**); 1247 (**w**); 1199 (**w**); 1100 (**s**); 1027 (**w**); 934 (**w**); 850 (**w**)

Poly{[*N*_ε-(3,6,9-trioxa-decanoyl)-L-lysine]-*co*-[*N*_ε-trifluoracetyl-L-lysine]} 70

¹H-NMR: δ/ppm (DMSO-*d*₆) = 1.14-1.90 (**m**, *c/d/e*); 3.05 (**s-br**, *f*); 3.22 (**s**, *7*); 3.42 (**m**, *6*); 3.53 (**m**, *b/3/4/5*); 3.84 (**m**, *2*); 7.66 (**s-br**, NH); 9.37 (**s**, ε-NH(TFA-Lysin))

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3287 (**s**); 3066 (**w**); 2923 (**s**); 2865 (**s**); 1717 (**w**, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid(TFA)); 1650 (**s**, Amid I, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1535 (**s**, Amid II, $\delta_{\text{N-H}}$); 1440 (**m**); 1339 (**w**); 1283(**m**); 1247 (**w**); 1199 (**w**); 1100 (**s**); 1028 (**w**); 934 (**w**); 850 (**m**)

Poly{[*N*_ε-(3,6,9-trioxa-decanoyl)-L-lysine]-*co*-[*N*_ε-(8-{2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl}{1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl})-L-lysine]} 60, 61

¹H-NMR: δ/ppm (CDCl₃) = 1.23-1.92 (3xs-br, *c/d/e*) überlagert mit 1.96/2.02/2.08/2.13 (4xs, *s*-CH₃); 3.22 (**s-br**, *f*); 3.34 (**s**, *7/f*-Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)); 3.52-4.28 (**m**, *b/2/3/4/5/6*-Lysin, *5/6/7/8/9/10*-Mannose); 4.85 (**m**, *1*-Mannose); 5.25 (**m**, *2/3/4*-Mannose); 7.16 (**s-br**, NH); 8.25 (**s**, ε-NH)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3288(**s**); 3069 (**w**); 2924 (**s**); 2866 (**s**); 1748 (**m**, $\nu_{\text{C=O}}$ Acetyl); 1650 (**s**, Amid I, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1534 (**s**, Amid II, $\delta_{\text{N-H}}$); 1440 (**m**); 1369 (**w**); 1338 (**w**); 1282 (**w**); 1242 (**m**); 1199 (**w**); 1100 (**s**); 934 (**w**); 849 (**m**)

Poly{[*N*_ε-(3,6,9-trioxa-decanoyl)-L-lysine]-*co*-[*N*_ε-(8-{2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl}{1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl})-L-lysine]-*co*-[*N*_ε-trifluoracetyl-L-lysine]} 71, 72

¹H-NMR: δ/ppm (CDCl₃) = 1.38-2.19 (**m**, *c/d/e/s*-CH₃); 3.21 (**s-br**, *f*-Lys(DEG)/*f*-Lys(TFA)); 3.34 (**s**, *7/f*-Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)); 3.52-4.25 (**m**, *b/2/3/4/5/6*-Lysin, *5/6/7/8/9/10*-Mannose); 4.84 (**m**, *1*-Mannose); 5.25 (**m**, *2/3/4*-Mannose); 7.17 (**s-br**, NH); 8.19 (**s**, ε-NH); 8.80 (**s**, ε-NH-Lys(TFA))

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3292 (**s**); 3066 (**w**); 2921 (**s**); 2867 (**s**); 1747 (**m**, $\nu_{\text{C=O}}$ Acetyl); 1719 (**w**, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid(TFA)); 1650 (**s**, Amid I, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1536 (**s**, Amid II, $\delta_{\text{N-}}$

H); 1440 (m); 1369 (w); 1338 (w); 1283 (w); 1224 (m); 1200 (w); 1100 (s); 1047 (w); 981 (w); 933 (w); 849 (m)

Poly{[N_ε-(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysine]-co-[N_ε-(8-{2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl}{1-thio-2-aza-5,8-dioxa-octyl})-L-lysine]} 62

¹H-NMR: δ/ppm (CDCl₃) = 1.23-2.06 (m, c/d/e/s-CH₃); 3.22 (s-br, f-Lys(DEG)); 3.34 (s, 7/f-Lys(Ac₄Glc(EO)₂NCS)); 3.52-4.23 (m, b/2/3/4/5/6-Lysin, 5/6/7/8/9/10-Glucose); 4.57 (s-br, 1-Glucose); 4.95 (t-br, 2-Glucose); 5.05 (t-br, 4-Glucose); 5.19 (m, 3-Glucose); 7.18 (s-br, NH); 8.20 (s, ε-NH)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3290(s); 3066 (w); 2924 (s); 2866 (s); 1753 (m, ν_{C=O} Acetyl); 1650 (s, Amid I, ν_{C=O} Amid); 1535 (s, Amid II, δ_{N-H}); 1439 (m); 1366 (w); 1339 (w); 1282 (w); 1225 (m); 1099 (s); 1033 (m); 932 (w); 848 (m)

Poly{[N_ε-(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysine]-co-[N_ε-(8-{2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl}{1-thio-2-aza-5,8-dioxa-octyl})-L-lysine]-co-[N_ε-trifluoroacetyl-L-lysine]} 73

¹H-NMR: δ/ppm (CDCl₃) = 1.23-2.06 (m, c/d/e/s-CH₃); 3.21 (s-br, f-Lys(DEG)/f-Lys(TFA)); 3.34 (s, 7/f-Lys(Ac₄Glc(EO)₂NCS)); 3.51-4.26 (m, b/2/3/4/5/6-Lysin, 5/6/7/8/9/10-Glucose); 4.57 (s-br, 1-Glucose); 4.95 (m, 2-Glucose); 5.05 (t-br, 4-Glucose); 5.19 (m, 3-Glucose); 7.17 (s-br, NH); 8.20 (s, ε-NH); 8.80 (s, ε-NH-Lys(TFA))

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3292 (s); 3067 (w); 2923 (s); 2866 (s); 1754 (m, ν_{C=O} Acetyl); 1719 (w, ν_{C=O} Amid(TFA)); 1650 (s, Amid I, ν_{C=O} Amid); 1537 (s, Amid II, δ_{N-H}); 1440 (m); 1365 (w); 1339 (w); 1281 (w); 1223 (m); 1099 (s); 1034 (m); 931 (w); 849 (m)

Poly{[N_ϵ -(3,6,9-trioxa-decanoyl)-L-lysin]-*co*-[N_ϵ -(8-{2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl}{1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl})-L-lysin]} 63

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.38-2.11 (**m**, *c/d/e/s*- CH_3); 3.21 (**s-br**, f-Lys(DEG)); 3.33 (**s**, 7/f-Lys(Ac4Gal(EO)2NCS)); 3.50-4.11 (**m**, *b/2/3/4/5/6*-Lysin, 5/6/7/8/9/10-Galactose); 4.51 (**s-br**, 1-Galactose); 5.00 (**m**, 3-Galactose); 5.12 (**s-br**, 2-Galactose); 5.35 (**s-br**, 4-Galactose); 7.21 (**s-br**, NH); 8.19 (**s**, ϵ -NH)

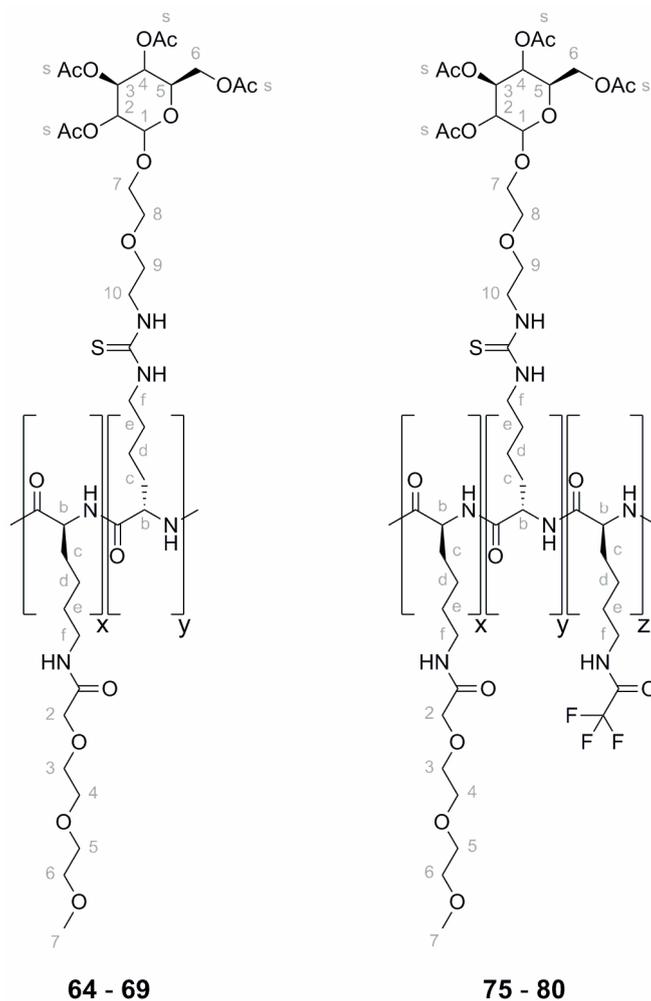
IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3288(**s**); 3067 (**w**); 2921 (**s**); 2865 (**s**); 1750 (**m**, $\nu_{\text{C=O}}$ Acetyl); 1650 (**s**, Amid I, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1538 (**s**, Amid II, $\delta_{\text{N-H}}$); 1439 (**m**); 1339 (**w**); 1283 (**w**); 1248 (**w**); 1100 (**s**); 997 (**w**); 933 (**w**); 891 (**w**); 848 (**m**)

Poly{[N_ϵ -(3,6,9-trioxa-decanoyl)-L-lysin]-*co*-[N_ϵ -(8-{2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl}{1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl})-L-lysin]-*co*-[N_ϵ -trifluoroacetyl-L-lysin]} 74

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.40-2.13 (**m**, *c/d/e/s*- CH_3); 3.22 (**s-br**, f-Lys(DEG)/f-Lys(TFA)); 3.34 (**s**, 7/f-Lys(Ac4Gal(EO)2NCS)); 3.52-4.12 (**m**, *b/2/3/4/5/6*-Lysin, 5/6/7/8/9/10-Galactose); 4.54 (**s-br**, 1-Galactose); 5.02 (**s-br**, 3-Galactose); 5.15 (**s-br**, 2-Galactose); 5.37 (**s-br**, 4-Galactose); 7.14 (**s-br**, NH); 8.19 (**s**, ϵ -NH); 8.79 (**s**, ϵ -NH-Lys(TFA))

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3287 (**s**); 3067 (**w**); 2921 (**s**); 2866 (**s**); 1749 (**m**, $\nu_{\text{C=O}}$ Acetyl); 1719 (**w**, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid(TFA)); 1650 (**s**, Amid I, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1534 (**s**, Amid II, $\delta_{\text{N-H}}$); 1439 (**m**); 1369 (**w**); 1339 (**w**); 1221 (**m**); 1100 (**s**); 928 (**w**); 849 (**m**)

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von statistischen Glycopeptiden mit bpy-Ni(COD) als Initiator



Ein gemäß Tab. 9.8 zusammengesetzte NCA-Gemisch wird unter Argonatmosphäre in so viel wasserfreiem Lösemittel gelöst, dass eine 5 Gew.% Lösung entsteht. Die Lösung wird dreimal durch Anlegen eines Vakuums entgast. Anschließend spritzt man die gewünschte Menge einer frisch hergestellten tiefvioletten Lösung des bpy-Ni(COD)-Komplexes im entsprechenden Lösemittel zu. Die zunächst intensiv violette Reaktionslösung verfärbt sich rasch rot. Das Reaktionsgemisch wird 2 d unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Das Polymer wird durch Eintropfen der Lösung in die 20-fache Menge Diethylether gefällt, wobei die Rotfärbung verschwindet. Das Lösemittel wird abdekantiert und der zähe klebrige Niederschlag im Vakuum ge-

trocknet. Das Polypeptid wird in Methanol gelöst und durch kontinuierliche Ultrafiltration mit dem 10-fachen an Methanol gegen eine UF-C5 Membran (5 kDa) gereinigt. Das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, das Produkt in Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Man erhält einen weißen watteartigen Feststoff. Die auf diese Weise dargestellten Polypeptide sind in Tab. 9.8 zusammengefasst.

Tabelle 9.8: Ausbeuten und Molmassen M_w der isolierten Polypeptide. (NCA₁₋₃: polymerisierte NCAs, I/M: Initiator/Monomergesamtmenge-Verhältnis, n. a.: nicht analysierbar, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc)

Polymer	NCA ₁	NCA ₂	NCA ₃	I/M	LM	M_w [g/mol]	Ausbeute
64	4 Lys(DEG)	1 Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)		1/50	DMF	n. a.	88%
65	4 Lys(DEG)	1 Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)		1/50	DMF	29400 ²	91%
66	8 Lys(DEG)	Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)		1/80	DMF	38100 ²	89 %
67	9 Lys(DEG)	1 Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)		1/40	THF	130000 ²	95 %
68	9 Lys(DEG)	1 Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)		1/40	THF	n. a.	58 %
69	9 Lys(DEG)	1 Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)		1/40	THF	n. a.	10%
75	16 Lys(DEG)	2 Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)	1 Lys(TFA)	1/80	DMF	38400 ²	89 %
76	16 Lys(DEG)	2 Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)	1 Lys(TFA)	1/80	DMF	37600 ²	90 %
77	16 Lys(DEG)	2 Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)	1 Lys(TFA)	1/80	DMF	38600 ²	66 %
78	36 Lys(DEG)	4 Lys(Ac ₄ Man(EO) ₂ NCS)	1 Lys(TFA)	1/40	THF	n. a.	99%
79	36 Lys(DEG)	4 Lys(Ac ₄ Glc(EO) ₂ NCS)	1.48 Lys(TFA)	1/80	THF	45600 ²	60 %
80	36 Lys(DEG)	4 Lys(Ac ₄ Gal(EO) ₂ NCS)	1 Lys(TFA)	1/80	THF	n. a.	26 %

Poly{[*N*_ε-(3,6,9-trioxa-decanoyl)-L-lysin]-*co*-[*N*_ε-(8-{2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl}){1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl})-L-lysin]} 64, 67

¹H-NMR: δ /ppm (CDCl₃) = 1.23-1.92 (3xs-br, c/d/e) überlagert mit 1.96/2.02/2.08/2.13 (4xs, s-CH₃); 3.22 (s-br, f); 3.34 (s, 7/f-Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)); 3.52-4.28 (m, b/2/3/4/5/6-Lysin, 5/6/7/8/9/10-Mannose); 4.85 (m, 1-Mannose); 5.25 (m, 2/3/4-Mannose); 7.16 (s-br, NH); 8.25 (s, ϵ -NH)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3288(s); 3069 (w); 2924 (s); 2866 (s); 1748 (m, $\nu_{C=O}$ Acetyl); 1650 (s, Amid I, $\nu_{C=O}$ Amid); 1534 (s, Amid II, δ_{N-H}); 1440 (m); 1369 (w); 1338 (w); 1282 (w); 1242 (m); 1199 (w); 1100 (s); 934 (w); 849 (m)

Poly{[*N*_ε-(3,6,9-trioxa-decanoyl)-L-lysin]-*co*-[*N*_ε-(8-{2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl}){1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl})-L-lysin]-*co*-[*N*_ε-trifluoracetyl-L-lysin]} 75, 78

¹H-NMR: δ /ppm (CDCl₃) = 1.38-2.19 (m, c/d/e/s-CH₃); 3.21 (s-br, f-Lys(DEG)/f-Lys(TFA)); 3.34 (s, 7/f-Lys(Ac₄Man(EO)₂NCS)); 3.52-4.25 (m, b/2/3/4/5/6-Lysin, 5/6/7/8/9/10-Mannose); 4.84 (m, 1-Mannose); 5.25 (m, 2/3/4-Mannose); 7.17 (s-br, NH); 8.19 (s, ϵ -NH); 8.80 (s, ϵ -NH-Lys(TFA))

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3292 (s); 3066 (w); 2921 (s); 2867 (s); 1747 (m, $\nu_{C=O}$ Acetyl); 1719 (w, $\nu_{C=O}$ Amid(TFA)); 1650 (s, Amid I, $\nu_{C=O}$ Amid); 1536 (s, Amid II, δ_{N-H}); 1440 (m); 1369 (w); 1338 (w); 1283 (w); 1224 (m); 1200 (w); 1100 (s); 1047 (w); 981 (w); 933 (w); 849 (m)

Poly{[*N*_ε-(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysin]-*co*-[*N*_ε-(8-{2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl}){1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl})-L-lysin]} 65, 68

¹H-NMR: δ /ppm (CDCl₃) = 1.23-2.06 (m, c/d/e/s-CH₃); 3.22 (s-br, f-Lys(DEG)); 3.34 (s, 7/f-Lys(Ac₄Glc(EO)₂NCS)); 3.52-4.23 (m, b/2/3/4/5/6-Lysin, 5/6/7/8/9/10-Glucose); 4.57 (s-br, 1-Glucose); 4.95 (t-br, 2-Glucose);

5.05 (**t-br**, 4-Glucose); 5.19 (**m**, 3-Glucose); 7.18 (**s-br**, NH); 8.20 (**s**, ϵ -NH)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3290(\text{s}); 3066(\text{w}); 2924(\text{s}); 2866(\text{s}); 1753(\text{m}, \nu_{\text{C=O Acetyl}}); 1650(\text{s}, \text{Amid I}, \nu_{\text{C=O Amid}}); 1535(\text{s}, \text{Amid II}, \delta_{\text{N-H}}); 1439(\text{m}); 1366(\text{w}); 1339(\text{w}); 1282(\text{w}); 1225(\text{m}); 1099(\text{s}); 1033(\text{m}); 932(\text{w}); 848(\text{m})$

Poly{[N_{ϵ} -(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysine]-*co*-[N_{ϵ} -(8-{2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl}){1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl})-L-lysine]-*co*-[N_{ϵ} -trifluoroacetyl-L-lysine]} **76, 79**

$^1\text{H-NMR}$: $\delta/\text{ppm}(\text{CDCl}_3) = 1.23\text{-}2.06(\text{m}, \text{c/d/e/s-CH}_3); 3.21(\text{s-br}, \text{f-Lys(DEG)/f-Lys(TFA)}); 3.34(\text{s}, \text{7/f-Lys(Ac}_4\text{Glc(EO)}_2\text{NCS)}); 3.51\text{-}4.26(\text{m}, \text{b/2/3/4/5/6-Lysin}, \text{5/6/7/8/9/10-Glucose}); 4.57(\text{s-br}, \text{1-Glucose}); 4.95(\text{m}, \text{2-Glucose}); 5.05(\text{t-br}, \text{4-Glucose}); 5.19(\text{m}, \text{3-Glucose}); 7.17(\text{s-br}, \text{NH}); 8.20(\text{s}, \epsilon\text{-NH}); 8.80(\text{s}, \epsilon\text{-NH-Lys(TFA)})$

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3292(\text{s}); 3067(\text{w}); 2923(\text{s}); 2866(\text{s}); 1754(\text{m}, \nu_{\text{C=O Acetyl}}); 1719(\text{w}, \nu_{\text{C=O Amid(TFA)}}); 1650(\text{s}, \text{Amid I}, \nu_{\text{C=O Amid}}); 1537(\text{s}, \text{Amid II}, \delta_{\text{N-H}}); 1440(\text{m}); 1365(\text{w}); 1339(\text{w}); 1281(\text{w}); 1223(\text{m}); 1099(\text{s}); 1034(\text{m}); 931(\text{w}); 849(\text{m})$

Poly{[N_{ϵ} -(3,6,9-trioxa-decanoyl)-L-lysine]-*co*-[N_{ϵ} -(8-{2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl}){1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl})-L-lysine]} **66, 69**

$^1\text{H-NMR}$: $\delta/\text{ppm}(\text{CDCl}_3) = 1.38\text{-}2.11(\text{m}, \text{c/d/e/s-CH}_3); 3.21(\text{s-br}, \text{f-Lys(DEG)}); 3.33(\text{s}, \text{7/f-Lys(Ac}_4\text{Gal(EO)}_2\text{NCS)}); 3.50\text{-}4.11(\text{m}, \text{b/2/3/4/5/6-Lysin}, \text{5/6/7/8/9/10-Galactose}); 4.51(\text{s-br}, \text{1-Galactose}); 5.00(\text{m}, \text{3-Galactose}); 5.12(\text{s-br}, \text{2-Galactose}); 5.35(\text{s-br}, \text{4-Galactose}); 7.21(\text{s-br}, \text{NH}); 8.19(\text{s}, \epsilon\text{-NH})$

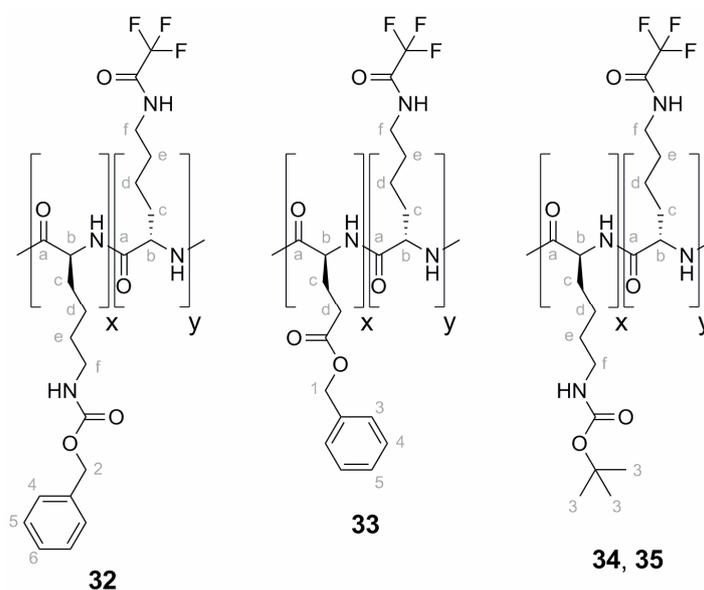
IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3288(\text{s}); 3067(\text{w}); 2921(\text{s}); 2865(\text{s}); 1750(\text{m}, \nu_{\text{C=O Acetyl}}); 1650(\text{s}, \text{Amid I}, \nu_{\text{C=O Amid}}); 1538(\text{s}, \text{Amid II}, \delta_{\text{N-H}}); 1439(\text{m}); 1339(\text{w}); 1283(\text{w}); 1248(\text{w}); 1100(\text{s}); 997(\text{w}); 933(\text{w}); 891(\text{w}); 848(\text{m})$

Poly{[N_ϵ -(3,6,9-trioxa-decanoyl)-L-lysin]-*co*-[N_ϵ -(8-{2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl}){1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl})-L-lysin]-*co*-[N_ϵ -trifluoracetyl-L-lysin]} 77, 80

$^1\text{H-NMR}$: δ/ppm (CDCl_3) = 1.40-2.13 (**m**, *c/d/e/s*- CH_3); 3.22 (**s-br**, f-Lys(DEG)/f-Lys(TFA)); 3.34 (**s**, 7/f-Lys($\text{Ac}_4\text{Gal}(\text{EO})_2\text{NCS}$)); 3.52-4.12 (**m**, b/2/3/4/5/6-Lysin, 5/6/7/8/9/10-Galactose); 4.54 (**s-br**, 1-Galactose); 5.02 (**s-br**, 3-Galactose); 5.15 (**s-br**, 2-Galactose); 5.37 (**s-br**, 4-Galactose); 7.14 (**s-br**, NH); 8.19 (**s**, ϵ -NH); 8.79 (**s**, ϵ -NH-Lys(TFA))

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3287 (**s**); 3067 (**w**); 2921 (**s**); 2866 (**s**); 1749 (**m**, $\nu_{\text{C=O}}$ Acetyl); 1719 (**w**, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid(TFA)); 1650 (**s**, Amid I, $\nu_{\text{C=O}}$ Amid); 1534 (**s**, Amid II, $\delta_{\text{N-H}}$); 1439 (**m**); 1369 (**w**); 1339 (**w**); 1221 (**m**); 1100 (**s**); 928 (**w**); 849 (**m**)

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von Diblockcopolypeptiden



1 eq. des ersten NCA (NCA_1) wird unter Argonatmosphäre in so viel wasserfreiem THF gelöst, dass eine 6 Gew.% Lösung entsteht. Die Lösung wird dreimal durch Anlegen eines Vakuums entgast. Anschließend spritzt man 1/77 eq. bpyNi(COD) als frisch hergestellte tiefviolette Lösung in wasserfreiem THF zu. Die zunächst intensiv

violette Reaktionslösung verfärbt sich rasch rot. Das Reaktionsgemisch wird unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Nach 10 h werden 0.1 eq. einer zuvor dreimal entgasten 6 Gew.% Lösung des zweiten NCAs (NCA₂) zugespritzt. Anschließend wird die Reaktionslösung 2 d unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Das Polymer wird durch Eintropfen der, zuvor auf das doppelte Volumen verdünnten, Reaktionslösung in die 20-fache Menge eines Methanol/1 mM Salzsäure-Gemischs gefällt, wobei die Rotfärbung verschwindet. Das Polymer wird abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Zur Reinigung wird das erhaltene Polypeptid aus THF umgefällt. Alle auf diese Weise dargestellten Polypeptide sind in Tab. 9.9 zusammengefasst.

Tabelle 9.9: Ausbeuten und Molmassen M_w der isolierten Diblockcopolymeren. (NCA 1: als erstes zugegebenes NCA, NCA 2: als zweites zugegebenes NCA, MeOH/H₂O: Zusammensetzung des Fällungsmittels, ¹: GPC-Messung erfolgte in THF, ²: GPC-Messung erfolgte in DMAc)

Polymer	NCA ₁	NCA ₂	MeOH/H ₂ O	M_w [g/mol]	Ausbeute
32	10 Lys(Z)	1 Lys(TFA)	20:1	150100 ²	70 %
33	10 Glu(Bzl)	1 Lys(TFA)	20:1	119800 ¹	76 %
34	10 Lys(TFA)	1 Lys(Boc)	1:1	196400 ¹	100 %
35	10 Lys(Boc)	1 Lys(TFA)	4:1	369450 ¹	86 %

Poly[(*N*_ε-benzyloxycarbonyl-L-lysin)₁₀-*block*-(*N*_ε-trifluoracetyl-L-lysin)₁] **32**

¹H-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 0.96-2.04 (m, c/d/e); 2.93 (s-br, f); 3.91 (s-br, b); 4.94 (m, 2); 7.25 (m, 4/5/6); 9.26 (s-br, ε-NH)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3296 (s); 3064 (w); 3033 (w); 2933 (s); 1694 (s, ν_{C=O} Amid(TFA)+Urethan); 1649 (s, Amid I, ν_{C=O} Amid); 1587 (w); 1525 (s, Amid II, δ_{N-H}); 1454 (m); 1370 (w); 1333 (w); 1239 (s); 1132 (m); 1023 (m); 913 (w)

Poly[(γ -benzyl-L-glutamat)_{9,77}-*block*-(N_ϵ -trifluoracetyl-L-lysin)₁] 33

¹H-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 1.22-2.64 (**m**, c/d/e-Lysin, c/d-Glutamat); 3.02 (**s-br**, f-Lysin); 3.92 (**m**, b-Glutamat, b-Lysin); 5.04 (**s-br**, 1-Glutamat); 7.25 (**m**, 3/4/5-Glutamat); 8.31 (**s-br**, NH-Peptid); 9.29 (**s-br**, ϵ -NH-Lysin)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3286 (**s**); 3063 (**w**); 3034 (**w**); 2941 (**m**); 1728 (**s**, $\nu_{C=O}$ Amid(TFA)+Ester); 1649 (**s**, Amid I, $\nu_{C=O}$ Amid); 1542 (**s**, Amid II, δ_{N-H}); 1498 (**w**); 1452 (**m**); 1418 (**w**); 1389 (**m**); 1312 (**w**); 1248 (**w**); 1210 (**w**); 1159 (**s**); 1120 (**w**); 1081 (**w**); 967 (**m**)

Poly[(N_ϵ -trifluoracetyl-L-lysin)_{9,49}-*block*-(N_ϵ -*tert.*-butyloxycarbonyl-L-lysin)₁] 34

¹H-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 1.24-1.85 (**m**, c/d/e) überlagert mit 1.34 (**s-br**, 3-Lys(Boc)); 2.87 (**s-br**, f-Lys(Boc)); 2.93 (**s-br**, f-Lys(TFA)); 3.91 (**s-br**, b); 4.94 (**m**, 2); 7.25 (**m**, 4/5/6); 9.26 (**s-br**, ϵ -NH)

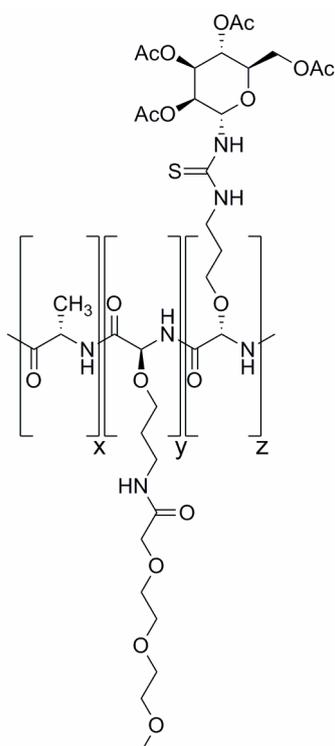
IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3287 (**s**); 3102 (**w**); 2941 (**m**); 2870 (**w**); 1701 (**s**, $\nu_{C=O}$ Amid(TFA)+Urethan); 1651 (**s**, Amid I, $\nu_{C=O}$ Amid); 1541 (**s**, Amid II, δ_{N-H}); 1443 (**m**); 1368 (**w**); 1341 (**w**); 1300 (**w**); 1205 (**w**); 1149 (**s**); 908 (**w**)

Poly[(N_ϵ -trifluoracetyl-L-lysin)₁-*block*-(N_ϵ -*tert.*-butyloxycarbonyl-L-lysin)₁₀] 35

¹H-NMR: δ /ppm (DMSO-*d*₆) = 1.23-1.85 (**m**, c/d/e) überlagert mit 1.34 (**s-br**, 3-Lys(Boc)); 2.86 (**s-br**, f-Lys(Boc)); 3.12 (**s-br**, f-Lys(TFA)); 3.79 (**s-br**, b); 4.94 (**m**, 2); 6.63 (**m**, 4/5/6); 9.27 (**s-br**, ϵ -NH)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3294 (**s**); 2976 (**w**); 2932 (**m**); 2866 (**w**); 1686 (**s**, $\nu_{C=O}$ Amid(TFA)+Urethan); 1649 (**s**, Amid I, $\nu_{C=O}$ Amid); 1538 (**s**, Amid II, δ_{N-H}); 1456 (**m**); 1391 (**w**); 1365 (**m**); 1271 (**w**); 1249 (**m**); 1167 (**s**); 1041 (**w**); 909 (**w**)

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von Triblockcopolymeren



57, 58

Eine 6 Gew.% Lösung von Ala-NCA **21** (NCA₁) in wasserfreiem DMF wird dreimal durch Anlegen eines Vakuums und anschließender Belüftung mit Argon entgast. Anschließend spritzt man 3.5 ml einer 21.4 mM (0.075 mmol) frisch hergestellten tiefvioletten Lösung von bpyNi(COD) in wasserfreiem THF zu. Die zunächst intensiv violette Reaktionslösung verfärbt sich rasch rot. Das Reaktionsgemisch wird unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Nach 8 h wird eine zuvor dreimal entgaste 6 Gew.% Lösung von Lys(DEG)-NCA **53** (NCA₂) in wasserfreiem DMF und nach weiteren 10 h eine zuvor dreimal entgaste 6 Gew.% Lösung von Lys(Man-NCS)-NCA **28** (NCA₃) in wasserfreiem DMF zugespritzt. Anschließend wird die Reaktionslösung noch 1 d unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Das Polymer wird durch Eintropfen der Reaktionslösung in die 20-fache Menge an Diethylether ausgefällt, wobei die Rotfärbung verschwindet. Der Niederschlag wird abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Zur Reinigung wird das erhaltene Polypeptid aus THF umge-

fällt. Die auf diese Weise dargestellten Triblockcopolypeptide sind in Tab. 9.10 zusammengefasst.

Tabelle 9.10: Ausbeuten der isolierten Triblockcopolypeptide (I/Alanin: Verhältnis Initiator/12)

Polymer	NCA ₁	NCA ₂	NCA ₃	I/Alanin	Ausbeute
57	10 Ala-NCA	10 Lys(DEG)-NCA	1 Lys(Man-NCS)-NCA	1:40	92%
58	2 Ala-NCA	10 Lys(DEG)-NCA	1 Lys(Man-NCS)-NCA	1:8	88%

Poly{[Ala]_{9,9}-*block*-[N_ε-(3,6,9-trioxa-decanoyl)-L-lysin]₁₀-*block*-[N_ε-[2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-ethyl)]-L-lysin]₁} **57**

¹H-NMR: δ/ppm (CDCl₃) = 1.38-2.20 (**m**, c/d/e-Lysin, c-Alanin, s-CH₃); 3.23 (**s-br**, f-Lys(DEG)); 3.36 (**s**, 7/f-Lys(Man-NCS)); 3.51-4.32 (**m**, b/2/3/4/5/6-Lysin, 5/6/7/8/9/10-Mannose); 4.94-5.47 (**m**, 1/2/3/4-Mannose); 7.16 (**s-br**, NH); 8.21 (**s**, ε-NH)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3288(**s**); 3079 (**w**); 2924 (**s**); 2866 (**s**); 1744 (**w**); 1714 (**m**, ν_{C=O} Acetyl); 1650 (**s**, Amid I, ν_{C=O} Amid); 1537 (**s**, Amid II, δ_{N-H}); 1437 (**m**); 1369 (**w**); 1340 (**w**); 1226 (**m**); 1200 (**w**); 1099 (**s**); 1028 (**w**); 965 (**w**)

Poly{[Ala]_{2,2}-*block*-[N_ε-(3,6,9-trioxa-decanoyl)-L-lysin]_{10,1}-*block*-[N_ε-[2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-ethyl)]-L-lysin)-L-lysin]₁} **58**

¹H-NMR: δ/ppm (CDCl₃) = 1.39-2.22 (**m**, c/d/e-Lysin, c-Alanin, s-CH₃); 3.24 (**s-br**, f-Lys(DEG)); 3.36 (**s**, 7/f-Lys(Man-NCS)); 3.54-4.30 (**m**, b/2/3/4/5/6-Lysin, 5/6/7/8/9/10-Mannose); 4.96-5.54 (**m**, 1/2/3/4-Mannose); 7.03 (**s-br**, NH); 8.30 (**s**, ε-NH)

IR(ATR): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3271(**s**); 3067 (**w**); 2929 (**s**); 2872 (**s**); 1714 (**m**, ν_{C=O} Acetyl); 1650 (**s**, Amid I, ν_{C=O} Amid); 1537 (**s**, Amid II, δ_{N-H}); 1443 (**m**); 1371 (**w**); 1340 (**w**); 1304 (**w**); 1221 (**s**); 1100 (**s**); 1050 (**w**); 965 (**w**)

9.3.3 Polymeranaloge Umsetzung

Allgemeine Vorschrift zur Abspaltung der Acetyl- und Trifluoracetyl-Schutzgruppen.

Die Acetyl- und Trifluoracetyl-Schutzgruppen werden über eine Zemplén-Reaktion in Methanol entfernt.^[181]

Zu einer 1 Gew.% Lösung des Polypeptids in wasserfreiem Methanol gibt man unter Stickstoffatmosphäre eine Spatelspitze Natriummethanolat und rührt die erhaltene Lösung 2 d bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Lösung durch Zugabe einiger Tropfen Essigsäure neutralisiert. Die Reinigung des Produktes erfolgt durch kontinuierliche Ultrafiltration mit dem 10-fachen Volumen an Methanol gegen eine UF-C5 Membran (5 kDa). Das Methanol wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand in destilliertem Wasser aufgenommen. Nach der Gefriertrocknung des Filtrates erhält man das entschützte Polypeptid als watteartigen Feststoff.

Da die Spektren aller entschützten Glycopeptide sehr ähnlich sind wird nachfolgend nur eine allgemeine Charakterisierung angegeben.

Poly{[*N*_ε-(3,6,9-trioxa-decanoyl)-L-lysin]-*co*-[*N*_ε-(8-{2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-pyranosyl}{1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl})-L-lysin]-*co*-lysin} 63E, 65E, 67E (Copolymere ohne Lysin), 70E, 71E, 73E-79E (Copolymere mit Lysin)

¹H-NMR: δ /ppm (CDCl₃) = 1.08-1.98 (**m**, c/d/e); 3.05 (**s-br**, f); 3.22-5.92 (**m**, b/2/3/4/5/6/7-Lysin, 1/2/3/4/5/6/7/8/9/10-Pyranose); 7.69 (**s-br**, NH); 8.53 (**s**, ϵ -NH)

IR(ATR): $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹ = 3284(**s**); 3067 (**w**); 2920 (**s**); 2865 (**s**); 1649 (**s**, Amid I, $\nu_{C=O}$ Amid); 1537 (**s**, Amid II, δ_{N-H}); 1439 (**m**); 1375 (**w**); 1339 (**w**); 1283 (**w**); 1247 (**m**); 1198 (**w**); 1099 (**s**); 934 (**w**); 848 (**m**)

Allgemeine Vorschrift zur Ankupplung von Fluorescein

200 mg des entschützten Polymers (dieses enthält 0.015 – 0.03 mmol freie Aminogruppen) werden unter Stickstoffatmosphäre in 30 ml wasserfreiem DMF gelöst und mit 100 μ l DIPEA versetzt. Zu dieser Lösung gibt man 60 mg (0.15 mmol) Fluoresceinisothiocyanat und rührt 1 d unter Lichtausschluss. Anschließend gibt man noch eine Spatelspitze Fluoresceinisothiocyanat zu und rührt einen weiteren Tag unter Stickstoffatmosphäre und Lichtausschluss. Das DMF wird am Rotationsverdampfer abdestilliert. Um die Polypeptide nicht zu denaturieren, sollte die Temperatur des Wasserbads hierbei 40°C nicht überschreiten. Der erhaltene Rückstand wird in 80 ml Methanol aufgenommen. Die leuchtend gelbe Lösung wird erst mit 250 ml einer 0.25 M Lösung von NaCl in einem Gemisch aus Methanol und Wasser im Verhältnis 1:1, dann mit 250 ml 1:1-Gemisches aus Methanol und Wasser und schließlich noch mit 1 l Methanol gegen eine 5 kDa Cellulose-Membran ultrafiltriert. Das leuchtend gelbe Retentat wird am Rotationsverdampfer vom Methanol befreit und der Rückstand in Wasser gelöst. Durch Gefriertrocknen dieser Lösung erhält man das fluoreszenzmarkierte Polypeptid als orangenen, watteartigen Feststoff.

9.3.4 Herstellung der Nanopartikel

Herstellung der Lösungen

Als wässrige Phase wurde eine 1 Gew.% Lösung von Polyvinylalkohol (PVA) in MilliQ Wasser verwendet. Der für die Herstellung dieser Lösung verwendete PVA Mowiol 4-88 wurde von der Firma Sigma Aldrich bezogen und besitzt eine mittlere Molmasse von ca. 31 kDa. Als organische Phase dienen Lösungen der synthetisierten Polypeptide in Ethylacetat, mit einer Massenkonzentration (β) von 1 mg/ml.

Die Herstellung der organischen Lösungen von Poly(N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-lysin) **14** und **24** und Poly[(N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-lysin)-*co*-(γ -*tert.*-butyl-L-glutamat)] **26** erfolgte durch Lösen von 10 mg des jeweiligen Polymers in 10 ml Ethylacetat bei Raumtemperatur. Wegen der geringen Löslichkeit von Poly(N_{ϵ} -*tert.*-butyloxycarbonyl-L-lysin) **15**, Poly[(N_{ϵ} -benzyloxycarbonyl-L-lysin)-*block*-(N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-lysin)] **32**, und Poly[(N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-lysin)-*block*-(N_{ϵ} -*tert.*-butyloxycarbonyl-L-lysin)] **34** in Ethylacetat

wurden zunächst jeweils 10 mg der Polymere in 10 ml THF gelöst. Diese Lösungen wurden dann mit 40 ml Ethylacetat verdünnt und am Rotationsverdampfer (Wasserbadtemperatur $< 40^{\circ}\text{C}$) auf etwa 8 ml eingeeengt. Wegen der tieferen Siedetemperatur wurde hierbei ein Großteil des THFs abgetrennt. Die so erhaltenen klaren Lösungen wurden, durch Zugabe der entsprechenden Menge Ethylacetat, auf eine Konzentration von 1mg/ml eingestellt.

Von den vier Diblockcopolypeptiden wurden anhand ihrer vergleichsweise guten Löslichkeit das basisch entschützbare Polymer **32** und das sauer entschützbare Polymer **34** zur Herstellung von Nanopartikel ausgewählt. Zusammen mit dem statistischen Copolymeren **26** und den drei Homopolypeptiden **14**, **15** und **24** standen damit für die Nanopartikelherstellung sechs unterschiedliche Polypeptid-Lösungen ($\beta = 1 \text{ mg/ml}$) zur Verfügung.

Nanopartikelsynthese

Zur Herstellung der Nanopartikel wurden je 0.5 ml der Polypeptidlösungen mit 2.0 ml wässriger PVA-Lösung gemischt. Diese Zwei-Phasen-Gemische wurden anschließend 15 Minuten lang bei 15500 U/min emulgiert. Hierzu wurde ein Dispergiergerät des Typs Ultra-Turrax T 18 basic der Firma IKA-Werke GmbH & Co.KG verwendet. Die erhaltene Emulsion wurde mit 2.5 ml MilliQ Wasser verdünnt und weitere 30 Sekunden homogenisiert. Anschließend wurde die Emulsion am Rotationsverdampfer, bei einer Wasserbadtemperatur von 40°C , vom Ethylacetat befreit. Auf diese Weise wurden kolloidale wässrige Lösungen der Nanopartikel mit einer Konzentration von ca. 0.1 mg/ml erhalten. Die dargestellten Partikel sind in Tab. 9.11 aufgelistet.

Tabelle 9.11: Größe und Polydispersität der Nanopartikel in Abhängigkeit von der Molmasse der zugrunde liegenden Polypeptide (PDI: Polydispersitätsindex).

Nanopartikel	Polypeptid	Durchmesser [nm]	PDI
Nano 1	Poly[Lys(TFA)] 24	171.5 ± 1.8	0.095
Nano 2	Poly[Lys(TFA)] 14	178.4 ± 3.2	0.098
Nano 3	Poly[Lys(Boc)] 15	182.1 ± 4.5	0.117
Nano 4	Poly{[Glu(<i>t</i> -Bu)] ₂ - <i>co</i> -[Lys(TFA)] ₁ } 26	189.3 ± 1.9	0.103
Nano 5	Poly{[Lys(Z)] ₁₀ - <i>block</i> -[Lys(TFA)] ₁ } 32	176.6 ± 0.2	0.052
Nano 6	Poly{[Lys(TFA)] _{9,49} - <i>block</i> -[Lys(Boc)] ₁ } 34	166.7 ± 5.5	0.098
Nano 7	Poly{Ala- <i>block</i> -[Lys(DEG)]- <i>block</i> -[Lys(Man-NCS)]} 57	150.8 ± 5.0	0.44
Nano 8	Poly{Ala- <i>block</i> -[Lys(DEG)]- <i>block</i> -[Lys(Man-NCS)]} 58	165.4 ± 4.3	0.42

10 Verzeichnis der Abkürzungen

Å	Ångström (10^{-10} m)
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl (C(O)CH ₃)
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl.: Atomic Force Microscopy)
ATR	abgeschwächte Totalreflexion (attenuated total reflection)
Boc	<i>tert.</i> -Butylcarbammat bzw. <i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
bpy	2,2'-Bipyridin
br	breites Signal (NMR-Spektroskopie)
Bzl	Benzyl
Co	Kobalt
COD	1,5-Cyclooctadien
d	Dublett (NMR-Spektroskopie)
d	Tag
Da	Masseneinheit Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
dd	Doppeldublett (NMR-Spektroskopie)
DEG	3,6,9-Trioxa-decanoyl
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin, Hünig-Base
DMAc	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dt	Doppeltriplett (NMR-Spektroskopie)
(EO) ₂	Diethylenglycol

eq.	Äquivalent(e)
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl (C ₂ H ₅)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
Glc	Glucose
Gln	L-Glutamin
Glu	L-Glutaminsäure
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
h	relative Häufigkeit
h	Stunden
<i>I</i>	NMR-Integration
I/M	Initiator/Monomer-Verhältnisse
IR	Infrarot(-Spektroskopie)
k	Präfix "Kilo" (10 ³)
l	Liter
LM	Lösungsmittel
Lys	L-Lysin
m	Multiplett (NMR-Spektroskopie)
m	mittelintensives Signal (IR-Spektroskopie)
M	Molmasse, Molekulargewicht (in g/mol)
M	Molar (mol/l)
m	Masse
Man	Mannose

Man-NCS	2-(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-mannopyranosyl)(1-thioxo-2-azaethyl)
Me	Methyl (CH ₃)
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
min	Minuten
\bar{M}_{mono}	durchschnittliche Molmasse einer imaginären Monomereinheit (in g/mol)
M_n	Zahlenmittel der Molmasse (in g/mol)
mol	Mol (Teilchenzahl)
MS	Massenspektrometrie
M_{theo}	theoretisch zu erwartende Molmasse (berechnet aus P_n oder I/M)
M_w	Gewichtsmittel der Molmasse (in g/mol)
n	Präfix für Nano (10 ⁻⁹)
NCA	α -Aminosäure- <i>N</i> -carboxyanhydrid
NCS	Isothiocyanat
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
Ni	Nickel
NMR	Kernmagnetische Resonanz(-Spektroskopie)
P	Phosphor
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PD	Polydispersität (bei Polymeren)
PDI	Polydispersitätsindex (bei Nanopartikeln)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLA	Polymilchsäure
PLG	Polyglycolsäure

PLGA	Poly(Milchsäure- <i>co</i> -Glycolsäure)
(PMe) ₄ Co	Tetrakis(trimethylphosphan)Kobalt(0)
PMS	Phenazin Methosulfat
P _n	Polymerisationsgrad
ppm	parts per million (NMR-Spektroskopie)
PVA	Polyvinylalkohol
q	Quartett (NMR-Spektroskopie)
quin	Quintett (NMR-Spektroskopie)
R	beliebiger organischer Rest
R _f	Retentionsfaktor (Dünnschichtchromatographie)
s	Singulett (NMR-Spektroskopie)
s	starkes Signal (IR-Spektroskopie)
SLe ^X	Sialyl-Lewis ^X
t	Triplett (NMR-Spektroskopie)
<i>t</i> -Bu	<i>tertiär</i> Butyl ((CH ₃) ₃ C)
<i>tert.</i>	tertiär
TFA	Trifluoracetyl
Th	Thomson, Masse-zu-Ladung-Verhältnis (Massenspektrometrie)
THF	Tetrahydrofuran
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
TosOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
Trt	Triphenylmethyl ((C ₆ H ₅) ₃ C)
UV/Vis	Ultraviolett- und Visible-Spektroskopie
w	schwaches Signal (IR-Spektroskopie)
x	Polymerisierungsgrad

$^xJ_{A-B}$	Kopplungskonstante über x Bindungen zwischen den Kernen A und B (in Hz)
XTT	(Natrium 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfonatophenyl)-tetrazolium-5-carboxanilid)
y	Polymerisierungsgrad
z	Polymerisierungsgrad
z	Ladungszahl (Massenspektrometrie)
Z	Benzyloxycarbonyl ($C_6H_5CH_2OCO$)
β	Massenkonzentration (in g/l)
δ	Deformationsschwingung (IR-Spektroskopie)
δ	chemische Verschiebung (in ppm) (NMR-Spektroskopie)
Δ	Wärmezufuhr
λ	Wellenlänge
μ	Präfix "Mikro" (10^{-6})
ν	Valenzschwingung (IR-Spektroskopie)
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl (in cm^{-1}) (IR-Spektroskopie)

11 Verzeichnis der Verbindungen

In der folgenden Tabelle sind die Nummern der im Text vorkommenden Verbindungen aufgelistet. Auf die Auflistung der Glycopeptide **60-69** und **71-80** sowie der entschützten und fluoreszenzmarkierten Glycopeptide wird wegen ihrer sehr langen und komplizierten Namen verzichtet. Ihre Zusammensetzungen können den Tabellen 5.5 und 5.6 entnommen werden. Für die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen sind die Seitenzahlen der Seiten angegeben, auf denen sich die jeweilige Synthesvorschrift und die analytischen Daten befinden.

1	L-Glutaminsäure	
2	γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutaminsäure Hydrotosylat	130
3	N_{α} -Fluorenylmethoxycarbonyl- N_{δ} -triphenylmethyl-L-glutamin	
4	N_{δ} -Triphenylmethyl-L-glutamin	132
5	Bis(trichlormethyl)carbonat (Triphosgen)	
6	N_{ϵ} -Trifluoracetyl-L-lysin- N -carboxyanhydrid	125
7	N_{ϵ} -Benzyloxycarbonyl-L-lysin- N -carboxyanhydrid	126
8	N_{ϵ} - <i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl-L-lysin- N -carboxyanhydrid	127
9	γ -Benzyl-L-glutaminsäure- N -carboxyanhydrid	127
10	γ - <i>tert.</i> -Butyl-L-glutaminsäure- N -carboxyanhydrid	128
11	γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutaminsäure- N -Carboxyanhydrid	131
12	L-Alanin- N -carboxyanhydrid	129
13	N_{δ} -Triphenylmethyl-L-glutamin- N -carboxyanhydrid	133
14	Poly(N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-lysin)	175
15	Poly(N_{ϵ} - <i>tert.</i> -butyloxycarbonyl-L-lysin)	175
16	Poly[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]	175

17	Poly[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]	175
18	Poly([N_{δ} -Triphenylmethyl-L-glutamin]- <i>co</i> -[N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-Lysin])	180
19	Poly([N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-Lysin]- <i>co</i> -(γ - <i>tert.</i> -butyl-L-glutamat)]	180
20	Poly([N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-Lysin]- <i>co</i> -(γ - <i>tert.</i> -benzyl-L-glutamat)]	180
21	Poly{[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]- <i>co</i> -[N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-Lysin]}	180
22	Poly{[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]- <i>co</i> -[N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-Lysin]}	180
21E	Poly{[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]- <i>co</i> -[L-Lysin]}	54
22E	Poly{[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]- <i>co</i> -[L-Lysin]}	54
23	Poly{[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]- <i>co</i> -[N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-Lysin]}	180
24	Poly(N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-lysin)	173
25	Poly[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]	173
26	Poly([N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-Lysin]- <i>co</i> -(γ - <i>tert.</i> -butyl-L-glutamat)]	177
27	Poly([N_{δ} -Triphenylmethyl-L-glutamin]- <i>co</i> -[N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-Lysin])	177
28	Poly{[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]- <i>co</i> -[N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-Lysin]}	177
29	Poly{[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]- <i>co</i> -[N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-Lysin]}	177
30	Poly{[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]- <i>co</i> -[N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-Lysin]}	177
31	Poly-[γ -(2,2,2-trichlorethy)-L-glutamat]- <i>co</i> -[N_{ϵ} -trifluoracetyl-L-Lysin])	177

32	Poly[(<i>N</i> _ε -Benzyloxycarbonyl-L-lysin)- <i>block</i> -(<i>N</i> _ε -trifluoracetyl-L-Lysin)]	192
33	Poly[(<i>N</i> _ε - <i>tert.</i> -Benzyl-L-glutamat)- <i>block</i> -(<i>N</i> _ε -trifluoracetyl-L-Lysin)]	192
34	Poly[(<i>N</i> _ε -trifluoracetyl-L-Lysin)- <i>block</i> -(<i>N</i> _ε - <i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl-L-lysin)]	192
35	Poly[(<i>N</i> _ε - <i>tert.</i> -butyloxycarbonyl-L-lysin)- <i>bock</i> -(<i>N</i> _ε -trifluoracetyl-L-Lysin)]	192
36	L-Lysin	
37	<i>N</i> _ε -Benzyliden-L-lysin	133
38	<i>N</i> _α -Benzyloxycarbonyl-L-lysin	134
39	<i>N</i> _α -(Benzyloxycarbonyl)-L-lysin	
41	<i>N</i> -{2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]acetyl}-oxysuccinimid	136
42	<i>N</i> _α -Benzyloxycarbonyl- <i>N</i> _ε -(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysin	137
43	<i>N</i> _ε -(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysin- <i>N</i> -carboxyanhydrid	138
44a	D-Mannose	
44b	D-Glucose	
45a	1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -acetyl-D-mannopyranose	140
45b	1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -acetyl-D-glucofuranose	141
46	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-1-brom-α-D-mannopyranose	142
47	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-1-isothiocyanato-α-D-mannopyranose	143
48	<i>N</i> _ε -[2-(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-α-D-mannopyranosyl)(1-thio-2-azaethyl)]- <i>N</i> _α -(benzyloxycarbonyl)-L-lysin	144
49	<i>N</i> _ε -[2-(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-α-D-mannopyranosyl)(1-thio-2-azaethyl)]-L-lysin- <i>N</i> -carboxyanhydrid	146
50a	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-D-mannose	147

50b	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-D-glucose	149
50c	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-D-galactose	150
51a	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-1- <i>O</i> -trichloracetimidato- α -D-mannopyranose	151
51b	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-1- <i>O</i> -trichloracetimidato- β -D-glucopyranose	152
51c	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-1- <i>O</i> -trichloracetimidato- β -D-galactopyranose	153
52	2-(2-Isothiocyanoethoxy)ethanol	154
53a	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-1- <i>O</i> -(5-isothiocyano-3-oxapentyl)- α -D-mannopyranose	155
53b	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-1- <i>O</i> -(5-isothiocyano-3-oxapentyl)- β -D-glucopyranose	157
53c	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-1- <i>O</i> -(5-isothiocyano-3-oxapentyl)- β -D-galactopyranose	158
54a	N_{ϵ} -[8-(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-mannopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl)]- N_{α} -(<i>tert.</i> -butyloxycarbonyl)-L-lysin	159
54b	N_{ϵ} -[8-(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl)]- N_{α} -(<i>tert.</i> -butyloxycarbonyl)-L-lysin	160
54c	N_{ϵ} -[8-(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-galactopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl)]- N_{α} -(<i>tert.</i> -butyloxycarbonyl)-L-lysin	162
55a	N_{ϵ} -[8-(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-mannopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl)]- N_{α} -(benzyloxycarbonyl)-L-lysin	163
55b	N_{ϵ} -[8-(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl)]- N_{α} -(benzyloxycarbonyl)-L-lysin	165
55c	N_{ϵ} -[8-(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-galactopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl)]- N_{α} -(benzyloxycarbonyl)-L-lysin	166
56a	N_{ϵ} -[8-(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-mannopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl)]-L-lysin- <i>N</i> -carboxyanhydrid	167

56b	N_ϵ -[8-(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl)]-L-lysin- <i>N</i> -carboxyanhydrid	169
56c	N_ϵ -[8-(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-galactopyranosyl)(1-thioxo-2-aza-5,8-dioxa-octyl)]-L-lysin- <i>N</i> -carboxyanhydrid	170
57	Poly{[Ala] ₁₀ - <i>block</i> -[N_ϵ -(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysin] ₁₀ - <i>block</i> -[N_ϵ -(2-{2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-mannopyranosyl}{1-thioxo-2-azaethyl})- N_α -L-lysin] ₁ }	195
58	Poly{[Ala] ₂ - <i>block</i> -[N_ϵ -(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysin] ₁₀ - <i>block</i> -[N_ϵ -(2-{2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-mannopyranosyl}{1-thioxo-2-azaethyl})- N_α -L-lysin] ₁ }	195
59	Poly[N_ϵ -(3,6,9-Trioxa-decanoyl)-L-lysin]	183

12 Literaturverzeichnis

- [1] P. C. Bourne, P. A. Ramsland, L. Shan, Z. C. Fan, C. R. DeWitt, B. B. Shultz, S. S. Terzyan, C. R. Moomaw, C. A. Slaughter, L. W. Guddat, A. B. Edmundson, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2002**, D58, 815.
- [2] S. Sheriff, W. A. Hendrickson, J. L. Smith, *J. Mol. Biol.* **1987**, 197, 273.
- [3] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie, 5. Auflage*, Spektrum Akademischer Verlag **2003**.
- [4] S. Jurjevic, *Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig* **2007**.
- [5] S. B. Mulrooney, D. R. Meinhardt, L. Waskell, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2004**, 1674, 319.
- [6] A. Wagner, J. Diez, C. Schulze-Briese, G. Schluckebier, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2009**, 74, 1018.
- [7] J. C. M. van Hest, D. A. Tirrell, *Chem. Commun.* **2001**, 1897.
- [8] E. R. Welsh, D. A. Tirrell, *Biomacromolecules* **2000**, 1, 23.
- [9] N. Kroger, R. Deutzmann, M. Sumper, *Science* **1999**, 286, 1129.
- [10] J. N. Cha, G. D. Stucky, D. E. Morse, T. J. Deming, *Nature* **2000**, 403, 289.
- [11] G. S. Kwon, M. Naito, K. Kataoka, M. Yokoyama, Y. Sakurai, T. Okano, *Colloids Surf., B* **1994**, 2, 429.
- [12] K. Fujita, S. Kimura, Y. Imanishi, E. Rump, H. Ringsdorf, *Adv Biophys* **1997**, 34, 127.
- [13] Y. Ito, Y. Ochiai, Y. S. Park, Y. Imanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1619.
- [14] T. J. Deming, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2000**, 38, 3011.
- [15] I. Zundorf, T. Dingermann, *Pharm Unserer Zeit* **2001**, 30, 27.
- [16] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, 60, 2447.
- [17] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.
- [18] R. B. Woodward, C. H. Schramm, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69, 1551.
- [19] T. J. Deming, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, 54, 1145.

- [20] H. R. Kricheldorf, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5752.
- [21] H. Leuchs, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, *39*, 857.
- [22] H. Leuchs, W. Manasse, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, *40*, 3235.
- [23] H. Leuchs, W. Geiger, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1908**, *41*, 1721.
- [24] T. Curtius, W. Sieber, *Ber. Dtsch. Chem. Ges. B* **1921**, *54B*, 1430.
- [25] T. Curtius, W. Sieber, *Ber. Dtsch. Chem. Ges. B* **1922**, *55B*, 1543.
- [26] T. Curtius, *J. Prakt. Chem.* **1930**, *125*, 211.
- [27] F. Wesseley, *Z. physiol. Chem.* **1925**, *146*, 72.
- [28] F. Sigmund, F. Wessely, *Z. physiol. Chem.* **1926**, *157*, 91.
- [29] F. Wessely, F. Sigmund, *Z. physiol. Chem.* **1926**, *159*, 102.
- [30] F. Wessely, M. John, *Z. physiol. Chem.* **1927**, *170*, 38.
- [31] F. Wessely, J. Mayer, *Monatsh. Chem.* **1928**, *50*, 439.
- [32] F. Wessely, K. Riedl, H. Tuppy, *Monatsh. Chem.* **1950**, *81*, 861.
- [33] F. Wessely, W. Swoboda, *Monatsh. Chem.* **1951**, *82*, 621.
- [34] K. Schlogl, F. Wessely, G. Korger, *Monatsh. Chem.* **1952**, *83*, 845.
- [35] R. G. Denkewalter, H. Schwam, R. G. Strachan, T. E. Beesley, D. F. Veber, E. F. Schoenwaldt, H. Barkemeyer, W. J. Paleveda, Jr., T. A. Jacob, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3163.
- [36] R. Hirschmann, R. G. Strachan, H. Schwam, E. F. Schoenewaldt, H. Joshua, B. Barkemeyer, D. F. Veber, W. J. Paleveda, Jr., T. A. Jacob, T. E. Beesley, R. G. Denkewalter, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 3415.
- [37] D. F. Veber, K. Pfister, III, R. F. Hirschmann, *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 968.
- [38] R. S. Dewey, E. F. Schoenewaldt, H. Joshua, W. J. Paleveda, Jr., H. Schwam, H. Barkemeyer, B. H. Arison, D. F. Veber, R. G. Denkewalter, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 3254.
- [39] R. G. Denkewalter, D. F. Veber, F. W. Holly, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 502.
- [40] D. F. Veber, R. Hirschmann, R. G. Denkewalter, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 753.

- [41] R. Hirschmann, H. Schwam, R. G. Strachan, E. F. Schoenewaldt, H. Barkemeyer, S. M. Miller, J. B. Conn, V. Garsky, D. F. Veber, R. G. Denkewalter, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2746.
- [42] H. R. Kricheldorf, *Springer-Verlag: New York* **1987**, 1.
- [43] W. N. E. Van Dijk-Wolthuis, L. Van de Water, P. Van de Wetering, M. Van Steenbergen, J. J. Kettenes-Van den Bosch, W. Schuyl, W. E. Hennink, *Macromol. Chem. Phys.* **1997**, *198*, 3893.
- [44] F. Rypacek, M. Dvorak, I. Stefko, L. Machova, V. Skarda, D. Kubies, *ACS Symp. Ser.* **2001**, *786*, 258.
- [45] T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1653.
- [46] H. R. Kricheldorf, C. Von Lossow, G. Schwarz, *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, *205*, 918.
- [47] W. Vayaboury, O. Giani, H. Cottet, A. Deratani, F. Schue, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 1221.
- [48] H. R. Kricheldorf, C. von Lossow, G. Schwarz, *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, *206*, 282.
- [49] S. Penczek, P. Kubisa, R. Szymanski, *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **1991**, *12*, 77.
- [50] K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1993**, *26*, 1787.
- [51] M. Takaki, R. Asami, Y. Hanada, N. Ochiai, *Polym. Bull.* **1987**, *18*, 105.
- [52] Y. Ohkatsu, E. Suzuki, T. Kusano, *Yukagaku* **1992**, *41*, 465.
- [53] V. S. Rao, P. Lapointe, D. N. McGregor, *Makromol. Chem.* **1993**, *194*, 1095.
- [54] J.-W. Meng, Y.-B. Tan, *Gaofenzi Cailiao Kexue Yu Gongcheng* **2004**, *20*, 100.
- [55] S. Penczek, *CRC Press: Boca Raton* **1990**.
- [56] E. R. Blout, R. H. Karlson, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 941.
- [57] I. Dimitrov, H. Schlaad, *Chem. Commun.* **2003**, 2944.
- [58] H. Cui, V. Krikorian, J. Thompson, A. P. Nowak, T. J. Deming, D. J. Pochan, *Macromolecules* **2005**, *38*, 7371.
- [59] L. M. Pakstis, B. Ozbas, K. D. Hales, A. P. Nowak, T. J. Deming, D. Pochan, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 312.

- [60] L. E. Euliss, T. M. Trnka, T. J. Deming, G. D. Stucky, *Chem. Commun.* **2004**, 1736.
- [61] K. R. Brzezinska, T. J. Deming, *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 566.
- [62] V. Breedveld, A. P. Nowak, J. Sato, T. J. Deming, D. J. Pine, *Macromolecules* **2004**, *37*, 3943.
- [63] E. G. Bellomo, M. D. Wyrsta, L. Pakstis, D. J. Pochan, T. J. Deming, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 244.
- [64] S. W. Seidel, T. J. Deming, *Macromolecules* **2003**, *36*, 969.
- [65] A. P. Nowak, V. Breedveld, D. J. Pine, T. J. Deming, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15666.
- [66] L. E. Euliss, S. G. Grancharov, S. O'Brien, T. J. Deming, G. D. Stucky, C. B. Murray, G. A. Held, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1489.
- [67] J. N. Cha, H. Birkedal, L. E. Euliss, M. H. Bartl, M. S. Wong, T. J. Deming, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8285.
- [68] A. P. Nowak, V. Breedveld, L. Pakstis, B. Ozbas, D. J. Pine, D. Pochan, T. J. Deming, *Nature* **2002**, *417*, 424.
- [69] K. R. Brzezinska, S. A. Curtin, T. J. Deming, *Macromolecules* **2002**, *35*, 2970.
- [70] J. Cheng, T. J. Deming, *Macromolecules* **2001**, *34*, 5169.
- [71] J. Cheng, T. J. Deming, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9457.
- [72] K. R. Brzezinska, T. J. Deming, *Macromolecules* **2001**, *34*, 4348.
- [73] T. J. Deming, S. A. Curtin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5710.
- [74] M. Yu, A. P. Nowak, T. J. Deming, D. J. Pochan, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12210.
- [75] A. A. Goodwin, X. Bu, T. J. Deming, *J. Organomet. Chem.* **1999**, *589*, 111.
- [76] T. J. Deming, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4500.
- [77] S. A. Curtin, T. J. Deming, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7427.
- [78] J. Cheng, T. J. Deming, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4745.
- [79] T. J. Deming, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4240.
- [80] T. J. Deming, *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 299.

-
- [81] T. J. Deming, *Nature* **1997**, 390, 386.
- [82] T. J. Deming, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2759.
- [83] T. J. Deming, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **1996**, 37, 435.
- [84] H. R. Kricheldorf, *Makromol. Chem.* **1979**, 180, 2387.
- [85] H. R. Kricheldorf, M. Mutter, F. Maser, D. Müller, H. Förster, *Biopolymers* **1983**, 22, 1357.
- [86] E. R. Blout, C. De Loze, S. M. Bloom, G. D. Fasman, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 3787.
- [87] S. M. Bloom, G. D. Fasman, C. de Loze, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 458.
- [88] E. R. Blout, A. Asadourian, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 955.
- [89] P. Doty, R. D. Lundberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 4810.
- [90] M. Idelson, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 3948.
- [91] J. C. Mitchell, A. E. Woodward, P. Doty, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 3955.
- [92] H. Gohlke, G. Klebe, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, 41, 2644.
- [93] L. Ding, W. Cheng, X. Wang, S. Ding, H. Ju, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 7224.
- [94] M. Inatani, F. Irie, A. S. Plump, M. Tessier-Lavigne, Y. Yamaguchi, *Science* **2003**, 302, 1044.
- [95] P.-H. Liang, C.-Y. Wu, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 86.
- [96] I. J. Chen, H.-L. Chen, M. Demetriou, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 35361.
- [97] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985.
- [98] D. E. Koshland, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, 44, 98.
- [99] D. E. Koshland, Jr., *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2468.
- [100] A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth, Editors, *Essentials of Glycobiology*, **1999**.

- [101] H.-J. Gabius, H.-C. Siebert, S. Andre, J. Jimenez-Barbero, H. Ruediger, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 740.
- [102] S. H. Barondes, D. N. W. Cooper, M. A. Gitt, H. Leffler, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20807.
- [103] P. Argueeso, A. Guzman-Aranguez, F. Mantelli, Z. Cao, J. Ricciuto, N. Panjwani, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 23037.
- [104] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97.
- [105] S.-H. Wu, M. Shimazaki, C.-C. Lin, L. Qiao, W. J. Moree, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 88.
- [106] A. Giannis, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 188.
- [107] F. Eisele, D. J. Owen, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 193.
- [108] K. N. Houk, A. G. Leach, S. P. Kim, X. Zhang, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 4872.
- [109] M. Mammen, S.-K. Chio, G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755.
- [110] Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321.
- [111] C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science* **2001**, *291*, 2357.
- [112] D. Rabuka, M. B. Forstner, J. T. Groves, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5947.
- [113] D. Rabuka, R. Parthasarathy, G. S. Lee, X. Chen, J. T. Groves, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5462.
- [114] K.-H. Park, K. Na, Y. S. Lee, W.-K. Chang, J.-K. Park, T. Akaike, D. K. Kim, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2007**, *82A*, 281.
- [115] O. Seitz, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 214.
- [116] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683.
- [117] P. M. Rudd, R. J. Woods, M. R. Wormald, G. Opdenakker, A. K. Downing, I. D. Campbell, R. A. Dwek, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1995**, *1248*, 1.
- [118] O. Seitz, I. Heinemann, A. Mattes, H. Waldmann, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2247.
- [119] X. Zhu, R. R. Schmidt, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1900.

- [120] B. G. Davis, J. B. Jones, *Synlett* **1999**, 1495.
- [121] B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579.
- [122] M. I. Gibson, G. J. Hunt, N. R. Cameron, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2756.
- [123] K. J. Doores, Y. Mimura, R. A. Dwek, P. M. Rudd, T. Elliott, B. G. Davis, *Chem. Commun.* **2006**, 1401.
- [124] M. Schelhaas, H. Waldmann, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2056.
- [125] T. Kappes, H. Waldmann, *Liebigs Ann./Recl.* **1997**, 803.
- [126] B. Westermann, A. Walter, N. Diedrichs, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 3384.
- [127] E. Rude, O. Westphal, E. Hurwitz, S. Fuchs, M. Sela, *Immunochemistry* **1966**, *3*, 137.
- [128] K. Aoi, K. Tsutsumiuchi, M. Okada, *Macromolecules* **1994**, *27*, 875.
- [129] K. Aoi, K. Tsutsumiuchi, A. Yamamoto, M. Okada, *Macromol. Rapid Commun.* **1998**, *19*, 5.
- [130] K. Tsutsumiuchi, K. Aoi, M. Okada, *Macromolecules* **1997**, *30*, 4013.
- [131] K. Aoi, K. Tsutsumiuchi, E. Aoki, M. Okada, *Macromolecules* **1996**, *29*, 4456.
- [132] V. Goury, D. Jhurry, A. Bhaw-Luximon, *Des. Monomers Polym.* **2008**, *11*, 357.
- [133] M. A. Gauthier, M. I. Gibson, H.-A. Klok, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 48.
- [134] C. Guillermain, B. Gallot, *Liq. Cryst.* **2002**, *29*, 141.
- [135] C. Guillermain, B. Gallot, *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203*, 1346.
- [136] S. Chen, R. Wetzel, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 887.
- [137] E. L. Altschuler, N. V. Hud, J. A. Mazrimas, B. Rupp, *J Pept Res* **1997**, *50*, 73.
- [138] A. C. Farthing, R. J. W. Reynolds, *Nature* **1950**, *165*, 647.
- [139] F. Fuchs, *Ber. Dtsch. Chem. Ges. B* **1922**, *55B*, 2943.
- [140] W. H. Daly, D. Poche, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5859.
- [141] H. R. Kricheldorf, *Springer-Verlag, Berlin* **1987**.
- [142] D. S. Poche, M. J. Moore, J. L. Bowles, *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 843.
- [143] K. Poduska, H. Gross, *Chem. Ber.* **1961**, *49*, 527.
- [144] K. Ishikawa, T. Endo, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2016.

- [145] R. Al-Hellani, A. D. Schlueter, *Macromolecules* **2006**, *39*, 8943.
- [146] J. R. Hernandez, H.-A. Klok, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2003**, *41*, 1167.
- [147] J. J. Eisch, A. M. Piotrowski, K. I. Han, C. Kruger, Y. H. Tsay, *Organometallics* **1985**, *4*, 224.
- [148] K. Ishikawa, T. Endo, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1990**, *28*, 3525.
- [149] J. Rodriguez-Hernandez, M. Gatti, H.-A. Klok, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 249.
- [150] J. Grun, J. D. Revell, M. Conza, H. Wennemers, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6197.
- [151] M. J. Krysmann, V. Castelletto, A. Kelarakis, I. W. Hamley, L. Noirez, R. A. Hule, D. J. Pochan, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **2008**, *49*, 444.
- [152] N. C. Pomroy, C. M. Deber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *245*, 618.
- [153] C. Li, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 695.
- [154] S. Zalipsky, C. Lee, *Poly(Ethylene Glycol) Chem.* **1992**, 347.
- [155] S. I. Ertel, A. Nathan, S. Zalipsky, S. N. Agathos, J. Kohn, *Polym. Mater. Sci. Eng.* **1992**, *66*, 486.
- [156] A. Gabizon, H. Shmeeda, A. T. Horowitz, S. Zalipsky, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1177.
- [157] S. Zalipsky, R. Seltzer, S. Menon-Rudolph, *Biotechnol Appl Biochem* **1992**, *15*, 100.
- [158] S. Zalipsky, R. Kiwan, N. Mullah, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **2002**, *43*, 693.
- [159] C. S. Cho, J. W. Nah, Y. I. Jeong, J. B. Cheon, S. Asayama, H. Ise, T. Akaike, *Polymer* **1999**, *40*, 6769.
- [160] C. S. Cho, Y. I. Jeong, S. H. Kim, J. W. Nah, M. Kubota, T. Komoto, *Polymer* **2000**, *41*, 5185.
- [161] A. Harada, S. Cammas, K. Kataoka, *Macromolecules* **1996**, *29*, 6183.
- [162] K. L. Prime, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714.

- [163] K. P. Ravindranathan Kartha, L. Ballell, J. Bilke, M. McNeil, R. A. Field, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 770.
- [164] A. K. Bence, P. A. Crooks, *Synth. Commun.* **2002**, 32, 2075.
- [165] Y. Peng, H. W. Pang, T. Ye, *Org. Lett.* **2004**, 6, 3781.
- [166] M. A. Maier, C. G. Yannopoulos, N. Mohamed, A. Roland, H. Fritz, V. Mohan, G. Just, M. Manoharan, *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 18.
- [167] D. Prosperi, S. Ronchi, L. Panza, A. Rencurosi, G. Russo, *Synlett* **2004**, 1529.
- [168] S. Bay, V. Huteau, M.-L. Zarantonelli, R. Pires, J. Ughetto-Monfrin, M.-K. Taha, P. England, P. Lafaye, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 3916.
- [169] B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay, Editors, *Carbohydrates in Chemistry and Biology, Part I: Chemistry of Saccharides, Volume 1: Chemical Synthesis of Glycosides and Glycomimetics*, **2000**.
- [170] S. Halazy, V. Berges, A. Ehrhard, C. Danzin, *Bioorg. Chem.* **1990**, 18, 330.
- [171] J. M. de la Fuente, S. Penades, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, 13, 1879.
- [172] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Thieme Verlag* **2002**, 6. überarbeitete Auflage.
- [173] H. Tajima, G. Li, *Synlett* **1997**, 773.
- [174] E. K. Woller, M. J. Cloninger, *Org. Lett.* **2002**, 4, 7.
- [175] S. L. Mangold, J. R. Morgan, G. C. Strohmeyer, A. M. Gronenborn, M. J. Cloninger, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2354.
- [176] E. G. Bellomo, P. Davidson, M. Imperor-Clerc, T. J. Deming, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9101.
- [177] J. Wang, M. I. Gibson, R. Barbey, S.-J. Xiao, H.-A. Klok, *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, 30, 845.
- [178] L. van Kralingen, M. W. Bredenkamp, R. D. Sanderson, *Macromol. Symp.* **2007**, 255, 90.
- [179] H. R. Kricheldorf, D. Müller, J. Stulz, *Makromol. Chem.* **1983**, 184, 1407.
- [180] J. Hwang, T. J. Deming, *Biomacromolecules* **2001**, 2, 17.
- [181] G. Zemplén, A. Kuntz, *Brit.* **1923**, 56B, 1705.
- [182] G. Boeck, M. Hilchenbach, K. Schauenstein, G. Wick, *J. Histochem. Cytochem.* **1985**, 33, 699.

- [183] R. M. Doornbos, B. G. de Grooth, J. Greve, *Cytometry* **1997**, *29*, 204.
- [184] B. Weiss, M. Schneider, L. Muys, S. Taetz, D. Neumann, U. F. Schaefer, C.-M. Lehr, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1087.
- [185] E. Allemann, R. Gurny, E. Doelker, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1993**, *39*, 173.
- [186] L. Nobs, F. Buchegger, R. Gurny, E. Allemann, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 483.
- [187] S. McClean, E. Prosser, E. Meehan, D. O'Malley, N. Clarke, Z. Ramtoola, D. Brayden, *Eur. J. Pharm. Sci.* **1998**, *6*, 153.
- [188] J. Luengo, B. Weiss, M. Schneider, A. Ehlers, F. Stracke, K. Koenig, K. H. Kostka, C. M. Lehr, U. F. Schaefer, *Skin Pharmacol. Physiol.* **2006**, *19*, 190.
- [189] L. Costantino, F. Gandolfi, G. Tosi, F. Rivasi, M. A. Vandelli, F. Forni, *J. Controlled Release* **2005**, *108*, 84.
- [190] R. A. Jain, *Biomaterials* **2000**, *21*, 2475.
- [191] I. Bala, S. Hariharan, M. N. V. R. Kumar, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2004**, *21*, 387.
- [192] Y. Wu, J. A. MacKay, J. R. McDaniel, A. Chilkoti, R. L. Clark, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 19.
- [193] T. A. P. F. Pimentel, Z. Yan, S. A. Jeffers, K. V. Holmes, R. S. Hodges, P. Burkhard, *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *73*, 53.
- [194] Z. Tian, A.-Y. Zhang, L. Ye, M. Wang, Z.-G. Feng, *Biomed. Mater. (Bristol, U. K.)* **2008**, *3*, 044116.
- [195] Z. Tian, M. Wang, A.-y. Zhang, Z.-g. Feng, *Polymer* **2008**, *49*, 446.
- [196] R. Tong, J. Cheng, *Polym. Rev. (Philadelphia, PA, U. S.)* **2007**, *47*, 345.
- [197] T. J. Deming, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 858.
- [198] A. Doi, I. Maeda, M. Furuta, K. Okamoto, *Pept. Sci.* **2006**, *42nd*, 281.
- [199] M.-a. Morikawa, N. Kimizuka, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2005**, 4866.
- [200] E. P. Holowka, D. J. Pochan, T. J. Deming, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12423.
- [201] J.-P. G. Senet, *Chim. Oggi* **2004**, *22*, 24.

-
- [202] Y.-I. Jeong, S.-J. Seo, I.-K. Park, H.-C. Lee, I.-C. Kang, T. Akaike, C.-S. Cho, *Int. J. Pharm.* **2005**, *296*, 151.
- [203] M. N. V. R. Kumar, U. Bakowsky, C. M. Lehr, *Biomaterials* **2004**, *25*, 1771.
- [204] E. K. Woller, E. D. Walter, J. R. Morgan, D. J. Singel, M. J. Cloninger, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8820.
- [205] M. Chorny, I. Fishbein, H. D. Danenberg, G. Golomb, *J. Controlled Release* **2002**, *83*, 389.
- [206] H. Y. Kwon, J. Y. Lee, S. W. Choi, Y. Jang, J. H. Kim, *Colloids Surf., A* **2001**, *182*, 123.
- [207] L. Gattegno, D. Bladier, J. Vaysse, L. Saffar, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1991**, *307*, 329.
- [208] J. Lehmann, M. Scheuring, *Carbohydr. Res.* **1995**, *276*, 57.
- [209] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512.
- [210] E. Dinjus, I. Gorski, E. Uhlig, H. Walther, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1976**, *422*, 75.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, die im Kleinen und Großen an der Anfertigung dieser Arbeit beteiligt waren, ganz herzlich danken.

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenz für die interessante und spannende Themenstellung, sein stetes Interesse an meiner Arbeit, seine Unterstützung und die Freiheiten, die er mir bei der Bearbeitung meines Themas gewährt hat.

Meinem wissenschaftlichen Begleiter Herrn Prof. Dr. Claus-Michael Lehr möchte ich für sein Interesse an meiner Arbeit danken und dafür, dass er sich bereit erklärt hat, die Aufgabe des Zweitgutachters zu übernehmen.

Manuel J. Santander Ortega aus dem Arbeitskreis für Biopharmazie und Pharmazeutische Biotechnologie von Prof. Dr. Claus-Michael Lehr danke ich für die Hilfe bei der Darstellung und Charakterisierung der Nanopartikel.

Ein großes Dankeschön geht an Juniorprofessor Dr. Marc Schneider und Achim Nauer für die Aufnahme der AFM-Bilder.

Bei André-René Blaudszun vom KIST Europe sowie Daniel Mörsdorf und Pierre Hogounenq aus dem Arbeitskreis für Biophysik von Prof. Dr. Ingolf Bernhardt möchte ich mich für die Durchführung der biologischen Bindungsstudien und der Toxizitätstests bedanken.

Jutta Ganz und Christian Teuchert danke ich für die GPC-Messungen, Annegret Engelke für die Aufnahme der Absorptionsspektren, meinem ehemaligen Vertiefer Jens Mittel für die präparative Unterstützung, Dr. Joseph Zapp für die NMR-Messungen und Dr. Mathias Großer danke für die MS-Messungen. Mein Dank gilt außerdem Alexander Kolb für die Unterstützung beim Arbeiten an der Glove Box.

Für das gute Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen, sowie allen ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises ganz herz-

lich: Andreas Lippach, Anja Kasten, Axel Müller, Carolin Thiele, Christian Straßnig, Christian Teuchert, Christoph Michel, Gerti Radünz, Daniela Hausen, Irina Straßnig, Katrin Ohlinger, Mathias Großer, Manuel Keil, Masajuki Hirose, Melanie Schnabel, Michael Hahn, Petra Thinner, Sebastian Witt, Tanja Seibert, Thomas Albuzat, Thomas Jung, Thomas Stauner, Tobias Bernard.

Besonderer Dank gilt meinem langjährigen Studien- und Arbeitskollegen Thomas Albuzat, mit dem ich seit dem ersten Semester erfolgreich zusammenarbeite.

Für die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit und ihre kritischen Bemerkungen möchte ich mich besonders bei Axel Müller und Sabrina Heisel bedanken.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern Angelika und Friedel Stöhr danken, die mich in auf meinem bisherigen Lebensweg stets voll unterstützt und gefördert haben. Der Schlusssatz sei Sabrina Heisel gewidmet, für ihren unentbehrlichen Rückhalt und ihre Motivationskünste, sowie für ihren liebevollen Beistand in allen Lebenslagen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thomas Stöhr
Anschrift: Am Rebenberg 23
66130 Saarbrücken
Geburtsdatum: 22.02.1980
Geburtsort: Zweibrücken
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion

seit 10/2005 Promotion zum Dr. rer. nat. im Arbeitskreis für Organische Makromolekulare Chemie von Prof. Dr. Gerhard Wenz, Universität des Saarlandes
Thema: „Kohlenhydrat-funktionalisierte Polypeptide: Synthese und molekulare Erkennung von Zellen“

Studium & Schulausbildung

01/2005 – 08/2005 Diplomarbeit zum Thema: „Synthese von Cyclodextrin-Zucker-Konjugaten zur Untersuchung des Clustereffektes bei der Bindung an Proteine“
Durchgeführt am Lehrstuhl für Organische Makromolekulare Chemie,
Prof. Dr. Gerhard Wenz, Universität des Saarlandes

10/2000 – 09/2005 Diplom-Chemie, Universität des Saarlandes
Abschluss: Diplom
Schwerpunktfach: Organische Chemie
Wahlpflichtfach: Medizinische Chemie

09/2000 mathematisches Vorsemester, Universität des Saarlandes

08/1990 – 07/1999	Von der Leyen Gymnasium, Blieskastel
	Abschluss: Abitur
07/1986 – 07/1990	Grundschule Blieskastel