

UNIVERSITÄT
BAYREUTH

Synthese von Glycoformen lysosomaler Sphingolipidaktivatorproteine

Dissertation

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

vorgelegt von

Christopher Günther Franz Graf

aus Neunburg vorm Wald

Bayreuth 2017

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von August 2013 bis April 2017 am Lehrstuhl für Bioorganische Chemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Carlo Unverzagt durchgeführt.

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

Dissertation eingereicht am: 18.05.2017

Zulassung durch die Prüfungskommission: 31.05.2017

Wissenschaftliches Kolloquium: 25.07.2017

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Stefan Schuster

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Carlo Unverzagt	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Frank Hahn	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Andreas Möglich	(Vorsitz)
Prof. Dr. Rhett Kempe	

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	7
1.1 Bedeutung von Glycoproteinen	7
1.2 Darstellung homogener Glycoproteine.....	8
1.3 LANSBURY-Aspartylisierung und Aspartimidbildung	10
1.4 Ligationsmethoden zur Synthese von Proteinen und Glycoproteinen	12
1.5 Synthese von Peptidthioestern.....	14
1.6 Immunglobulin G1	16
1.7 Erythropoietin.....	17
1.8 Sphingolipidaktivatorproteine: Saposin A–D.....	18
2 Ziel der Arbeit	20
3 Sequenzabhängige Aspartimidbildung bei Peptiden	21
3.1 Aspartimidbildung in der Peptidsynthese.....	21
3.2 Aspartimidbildung, Isomerisierung und Desamidierung bei nativen Peptiden.....	24
4 Synthese eines IgG1 Fc 223-260 Thioesters	31
5 Synthese von EPO Glycopeptiden.....	34
5.1 Synthese und Entschützung eines Phacm-geschützten EPO 29-67 Peptids.....	34
5.2 Synthese und Ligation von S-tritylierten EPO Glycopeptiden.....	39
6 Synthese von Saposin D	49
6.1 Synthese von glycosylierten Saposin D 1-35 Thioestern	49
6.2 Synthese von Saposin D 36-82.....	57
6.3 NCL und oxidative Rückfaltung zu homogenen Glycoformen von Saposin D	59
6.4 Kristallstrukturanalyse von glycosyliertem Saposin D	64
6.5 Biologische Aktivitätstests der synthetischen Saposin D Glycoformen	65
7 Synthese von Fragmenten des Glycoproteins Saposin B	67
7.1 Synthese von glycosylierten Saposin B 1-35 Thioestern	67
7.2 Synthese von Saposin B 36-81	74
8 Synthese von Saposin C	76

Inhaltsverzeichnis

8.1	Synthese von glycosylierten Saposin C 1-35 Thioestern	76
8.2	Synthese von Saposin C 36-81	83
8.3	NCL und oxidative Rückfaltung von Saposin C	84
9	Zusammenfassung	87
10	Summary.....	90
11	Experimenteller Teil	93
11.1	Allgemeines	93
11.2	Versuche zu Kapitel 3.1	96
11.3	Versuche zu Kapitel 3.2	100
11.4	Versuche zu Kapitel 4	111
11.5	Versuche zu Kapitel 5.1	113
11.6	Versuche zu Kapitel 5.2	117
11.7	Versuche zu Kapitel 6.1	128
11.8	Versuche zu Kapitel 6.2	138
11.9	Versuche zu Kapitel 6.3	141
11.10	Versuche zu Kapitel 6.4	144
11.11	Versuche zu Kapitel 7.1	145
11.12	Versuche zu Kapitel 7.2	153
11.13	Versuche zu Kapitel 8.1	156
11.14	Versuche zu Kapitel 8.2	163
11.15	Versuche zu Kapitel 8.3	166
12	Literaturverzeichnis	169
13	Danksagung	179

Abkürzungsverzeichnis

Acm	Acetamidomethyl
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
All	Allyl
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
ber	berechnet
B _H	Beladungsgrad
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CHO	Ovarien des chinesischen Hamsters (<i>chinese hamster ovary</i>)
Cl-HOBt	6-Chlor-1-hydroxybenzotriazol
CM	ChemMatrix
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DETA	[2-(Dicyclohexylphosphino)-ethyl]trimethylammoniumchlorid
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
Dmb	2,4-Dimethoxybenzyl
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ENGase	<i>endo</i> - β - <i>N</i> -Acetylglucosaminidase
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietinrezeptor
eq	Äquivalent
ESI-MS	<i>electrospray ionisation mass spectrometry</i>
Exp.	Experiment
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fuc	L-Fucose
Gal	D-Galactose
gef	gefunden
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-Glucosamin
GlcNAc-NH ₂	<i>N</i> -Acetyl-D-Glucosaminylamin
GdmCl	Guanidiniumchlorid

HCTU	<i>N</i> -[(6-Chlor-1 <i>H</i> -benzo-1,2,3-triazol-1-yl)-(dimethylamino)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorpropan-2-ol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
hEPO	humanes Erythropoietin
Ig	Immunglobulin
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
Man	D-Mannose
MeCN	Acetonitril
MMBA	4-(Mercaptomethyl)benzoesäure
MPAA	2-(4-Mercaptophenyl)essigsäure
<i>n</i> -Bu-3-McP	<i>n</i> -Butyl-3-mercaptopropionat
NeuNAc	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NI	nicht isoliert
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NVOC	6-Nitroveratryloxycarbonyl
p.a.	<i>pro analysi</i>
Phacm	Phenylacetamidomethyl
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PG	<i>protecting group</i>
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(pyrrolidino)-phosphonium-hexafluorophosphat
rel. Abs.	relative Absorption
rel. I.	relative Intensität
RP	<i>reversed-phase</i>
RT	Raumtemperatur
Sar	Sarcosin, <i>N</i> -Methylglycin
SG	Schutzgruppe
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance spectroscopy</i>
TBTU	<i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzo-1,2,3-triazol-1-yl)-(dimethylamino)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-tetrafluoroborat- <i>N</i> -oxid
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TES	Triethylsilan

Abkürzungsverzeichnis

TFA	Trifluoressigsäure
theo	theoretisch
Thz	Thiazolidin
Trt	Trityl
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Xaa	Aminosäure
β A	β -Alanin
ψ pro	Pseudoprolin

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Glycoproteinen

Proteine, die mit einem Kohlenhydrat verknüpft sind, werden als Glycoproteine bezeichnet. Die Bindung zu den Kohlenhydraten kann *N*-, *O*-, *P*-, *S*- oder *C*-glycosidischer Natur sein,^[1] wobei die *N*-Glycosylierung an der Asparaginseitenkette gefolgt von der *O*-Glycosylierung am Serin- oder Threoninrest die häufigste ist. Man geht davon aus, dass über 50 % des humanen Proteoms glycosyliert vorliegen, davon sind über 90 % *N*-glycosyliert.^[2] Die *N*-Glycane lassen sich in drei Haupttypen unterteilen, den mannosereichen, den komplexen und den hybriden Typ, wobei allen das *Core*-Pentasaccharid gemeinsam ist (Abbildung 1).^[3]

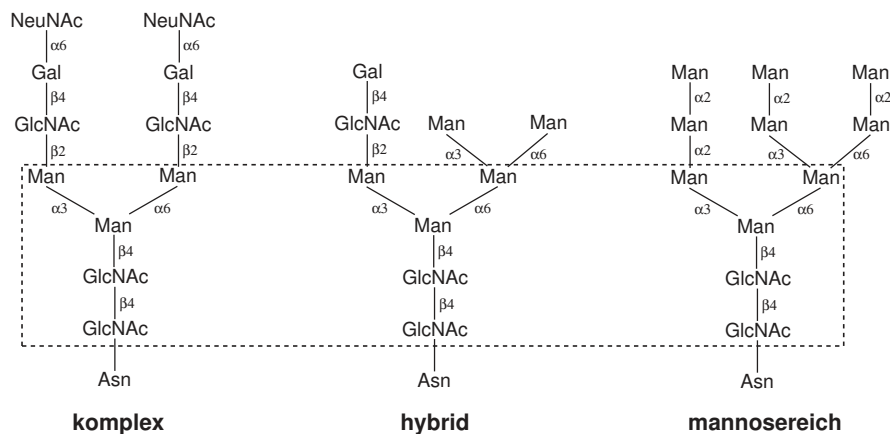


Abbildung 1: Haupttypen der in Glycoproteinen vorkommenden *N*-Glycane mit *Core*-Pentasaccharid (Box).^[3]

Biosynthetisch erfolgt die *N*-Glycosylierung der Proteine translational im endoplasmatischen Reticulum, wenn im Protein die Konsensussequenz Asn-Xaa-Ser/Thr vorliegt (Xaa = beliebige Aminosäure außer Prolin). Dies geschieht durch das Transmembranenzym Oligosaccharyltransferase, welches ein Tetradasaccharid auf die Asparaginseitenkette überträgt.^[4,5] Anschließend erfolgen im endoplasmatischen Reticulum und im Golgi-Apparat verschiedene Prozessierungen des Glycans, wodurch eine hohe Diversität zustande kommt.^[6,7] Die unterschiedlichen Glycoformen eines Proteins besitzen zwar ein identisches Peptidrückgrat, unterscheiden sich aber in der Art (Mikroheterogenität), Anzahl und Position der Glycane (Makroheterogenität).^[8,9]

Die für komplexe Lebewesen nötige Funktionalisierung von Proteinen wird durch eine Reihe posttranslativ Modifikationen erreicht.^[10] Hierfür spricht auch, dass das Verhältnis der unterschiedlichen Glycoformen eines Proteins nicht zufällig ist. Vielmehr ist es von dem Gewebetyp, dem Alter und dem physiologischen Zustand einer Zelle abhängig.^[11–13] Bei

verschiedenen Erbkrankheiten oder Krankheitsbildern sind die Glycosylierungen spezifisch verändert oder verändern sich im Verlauf der Krankheit.^[14–16] Die genauen Struktur-Wirkungs-Zusammenhänge der unterschiedlichen Glycoformen sind bis jetzt aber nur ansatzweise verstanden. Zwar ist es möglich, durch aufwendige Analysemethoden die Glycosylierung einzelner Proteine zu untersuchen,^[17] die Isolierung homogener glycosylierter Proteine für entsprechende Struktur-Wirkungs-Studien ist allerdings mit den heutigen Trennmethoden nicht in ausreichender Menge und Reinheit möglich.

Die bisherigen Untersuchungen zum Einfluss der Glycane bezogen sich daher stets auf Mischungen verschiedener Glycoformen. Diese Studien zeigten, dass die unterschiedlichen Kohlenhydratanteile einen Einfluss auf die Faltung, Ladung, Löslichkeit, Stabilität, Plasmahalbwertszeit und auf die Aktivität der Proteine ausüben können. Darüber hinaus wird das Protein-Targeting, die Zelladhäsion, Zelldifferenzierung, Zellwachstum und die Immunantwort beeinflusst.^[18–23] Ein eindeutiger Vergleich der Funktionen und Aktivitäten homogener Glycoproteine in Bezug auf ihre Kohlenhydratreste ist momentan nur durch die chemische Synthese bzw. Semisynthese mit anschließenden Biotests möglich.^[24–26]

1.2 Darstellung homogener Glycoproteine

Biopharmazeutika gewinnen zunehmend an Bedeutung. Glycoproteine stellen dabei einen großen Teil dieser Wirkstoffe dar. Der Umsatz des Erythropoietin Präparats Eprex/Procrit von Johnson & Johnson lag beispielsweise im Jahr 2004 bei 3.6 Mrd. US-Dollar.^[27] Glycoproteinpräparate werden meist durch Expression in eukaryotischen Zelllinien wie *CHO* Zellen gewonnen.^[28] Glycoproteine können auch in *Pichia pastoris* exprimiert werden und sogar *E. coli* konnte bereits für die Gewinnung von Glycoproteinen modifiziert werden.^[29,30]

Generell werden Mischungen von unterschiedlichen Glycoformen erhalten, deren Zusammensetzung durch eine strikte Überwachung der Expressions- und Reinigungsmethoden weitgehend konstant gehalten werden muss, um eine gleichbleibende Wirkung zu gewährleisten.^[31,32] Zwar wird versucht durch *Glycosylation Engineering* die Wirkung zu verbessern und eine weniger heterogene Mischung zu erhalten,^[33,34] relativ homogene Glycoproteine konnten dadurch allerdings nur in Einzelfällen gewonnen werden.^[35,36] Für die Synthese bzw. Semisynthese homogener Glycoproteine stehen mehrere Methoden zur Verfügung, die miteinander kombinierbar sind (Abbildung 2).

Im Fall des *Glycoprotein Remodeling* werden durch eine chemo-enzymatische Semisynthese homogene Glycoproteine dargestellt. Hierzu wird zunächst durch rekombinante Expression

eine heterogene Mischung von Glycoformen gewonnen, deren Glycane durch eine *endo*- β -N-Acetylglucosaminidase (ENGase) bis auf das terminale GlcNAc vom Protein abgespalten werden. Danach wird über die Umkehrreaktion, die ebenfalls von einer ENGase katalysiert wird, ein definiertes Oligosaccharid auf das Akzeptorprotein (GlcNAc-Glycoprotein) übertragen.^[37–39] Diese Methode konnte durch die Verwendung von Oligosaccharidoxazolinen als aktiviertem Substrat verbessert werden.^[40] Ebenso steigerte die Mutation von ENGasen zu hydrolytisch inaktiven Glycosynthasen die Effizienz des Saccharidtransfers.^[41]

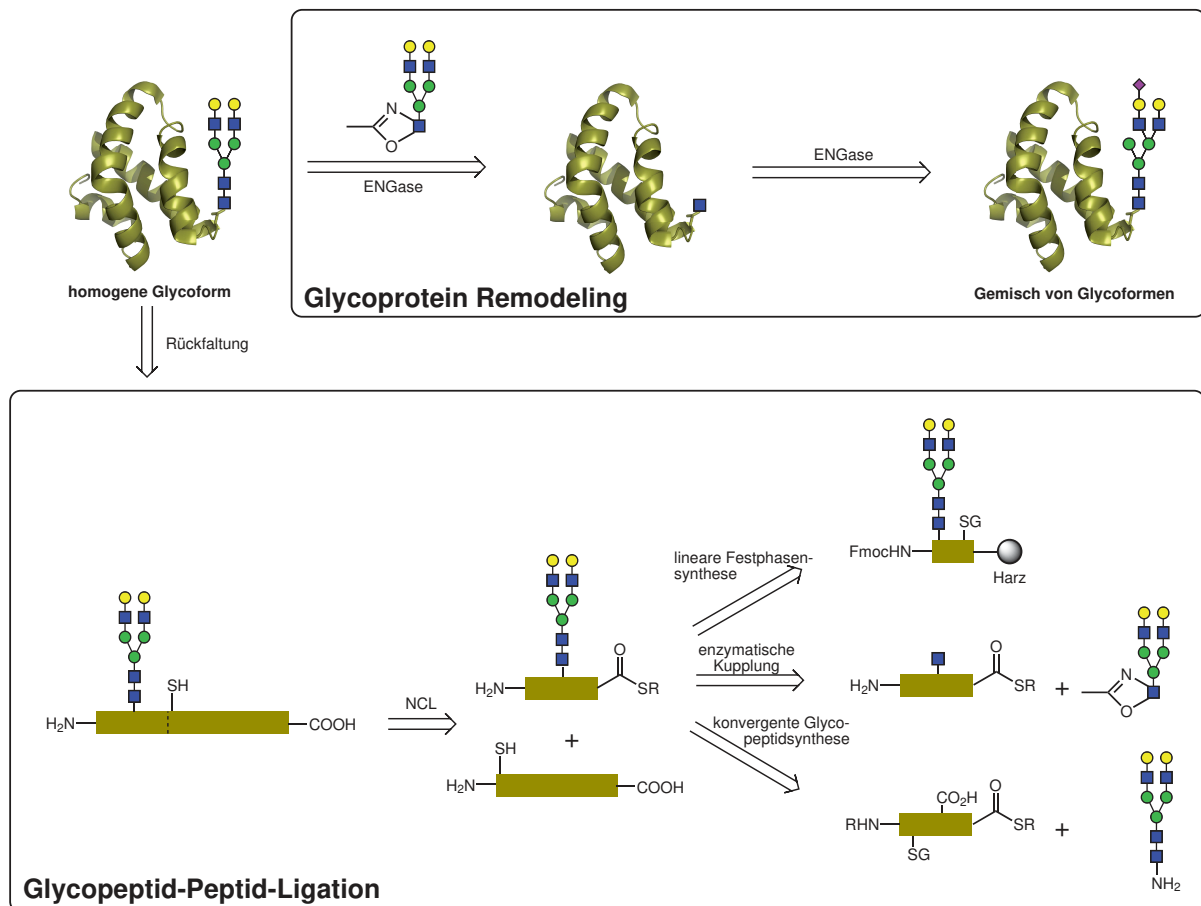


Abbildung 2: Darstellungsmöglichkeiten für homogene Glycoproteine.

Eine sehr flexibler Ansatz ist die Glycopeptid-Peptid-Ligation, bei der rekombinant oder durch chemische Synthese gewonnene Peptide mit chemisch dargestellten Glycopeptiden zum Volllängenglycoprotein verknüpft werden.^[42,43] Die Glycopeptide können durch lineare oder konvergente Synthese erhalten werden. Im Fall der linearen Synthese wird das Glycopeptid durch Einsatz von Glycosylaminosäuren in der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) aufgebaut.^[44,45] Bei dieser Methode können ungeschützte Oligosaccharide die Löslichkeit des geschützten Peptids negativ beeinflussen und es kann zu Nebenreaktionen an den freien

Hydroxylfunktionen kommen. Dies führt häufig zu geringen Gesamtausbeuten.^[46,47] Bei der konvergenten Glycopeptidsynthese wird dieses Problem vermieden. Hierfür wird an der *N*-Glycosylierungsstelle anstatt des nativen Asparagins ein Aspartat mit einer orthogonalen Seitenkettenschutzgruppe verwendet, wodurch die Kupplung eines Glycosylamins nach beendeter Festphasenpeptidsynthese möglich ist (LANSBURY-Aspartylierung).^[48] Bei diesem Verfahren kommt es jedoch häufig während der Peptidsynthese oder der Glycokupplung zur Bildung eines cyclischen Aspartimids (Abbildung 3).^[49]

Die von MERRIFIELD 1963 entwickelte SPPS stellt die Grundlage für die chemische Synthese von Proteinen und Glycoproteinen dar.^[50] Dabei wird das Peptid über einen *Linker* reversibel an einer festen Matrix immobilisiert und sequentiell vom C- zum N-Terminus aufgebaut. Um einen definierten Peptidaufbau zu ermöglichen, müssen die verwendeten Aminosäuren entsprechende Schutzgruppen tragen. Je nach Schutzgruppenstrategie ist dabei der N-Terminus basenlabil (Fmoc) oder säurelabil (Boc) und die Seitenketten entsprechend orthogonal geschützt. Die weitere SPPS stellt eine repetitive Abfolge von N^α-Entschützungs-, Elongations- und Waschschritten dar. Auf Grund der Akkumulation von nicht abtrennbaren Nebenprodukten mit wachsender Kettenlänge ist eine effiziente Synthese meist auf 40-50 Aminosäuren beschränkt.^[51,52] Um die Synthese von schwierigen Sequenzen und hydrophoben Peptiden zu ermöglichen, können als Oxazolidin geschützte Serine oder Threonine (Pseudoprolin, ψ pro) sowie Peptidrückgrat-Schutzgruppen wie 2,4-Dimethoxybenzyl (Dmb) eingesetzt werden. Diese vermindern die Aggregationsneigung und verbessern die Löslichkeit sowie die Kupplungskinetik.^[53,54] Die Synthese längerer Peptide kann auch durch Festphasensegmentkondensation erfolgen. Als epimerisierungsfreie Schnittstelle für die Kupplung eines geschützten Peptidfragments dient ein C-terminales Glycin, Prolin oder Pseudoprolin.^[47]

1.3 LANSBURY-Aspartylierung und Aspartimidbildung

Bei der Kupplung eines Glycosylamins an eine Aspartatseitenkette des Peptids im Zuge der LANSBURY-Aspartylierung,^[48,55] kommt es häufig zur Bildung eines cyclischen Aspartimid-Nebenprodukts (Abbildung 3). Diese Cyclisierung kann auch bereits während der Peptidsynthese auftreten.^[49]

Diese Nebenreaktion ist sehr häufig in der Peptidsynthese und kann sowohl unter basischen als auch sauren Bedingungen auftreten. Das zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe verwendete Piperidin bewirkt im Gegensatz zu tertiären Aminen eine erhöhte Aspartimidbildung. Diese ist zudem von dem verwendeten Harz, den Schutzgruppen und den allgemeinen Kupplungs-

bedingungen abhängig.^[49] Die Bildung von Succinimiden ist nicht nur in der Peptidsynthese bekannt, sondern tritt auch bei Proteinen auf. In diesem Fall findet die Cyclisierung meist an einem Asparagin statt. Durch eine nukleophile Öffnung des Rings führt die Aspartimidbildung anschließend zu einer Desamidierung, Isomerisierung oder auch Epimerisierung des jeweiligen Asparagins.^[56,57] Dieser Prozess steht in engem Zusammenhang mit natürlichen biologischen Prozessen und dem Altern von Geweben.^[58] Solche degenerativen Reaktionen konnten bei einer Vielzahl von Proteinen und Peptiden nachgewiesen werden.^[59–64] Beispielsweise tritt beim α -Crystallin der Augenlinse eine altersabhängige Akkumulation von Desamidierungen und Isomerisierungen auf.^[65]

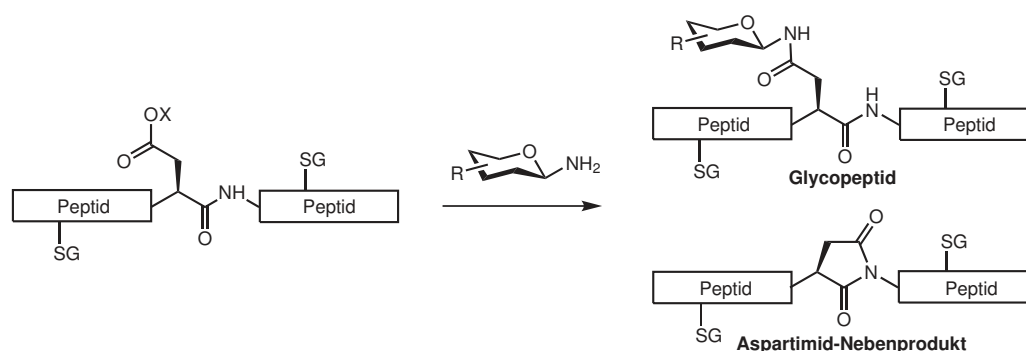


Abbildung 3: LANSBURY-Aspartylierung zu N-Glycopeptiden und Bildung des Aspartimid-Nebenprodukts. OX =Abgangsgruppe.

Auch wenn sich die Aspartimidbildung in natürlichen Systemen nicht vermeiden lässt, so existieren doch einige Methoden zur Unterdrückung dieser Nebenreaktion bei der Peptid- und der konvergenten Glycopeptidsynthese. Dies kann unter anderem durch milde Fmoc-Abspaltungsbedingungen mit Hexamethylenimin/Cl-HOBt/NMP^[66] sowie durch den Einsatz sterisch anspruchsvoller Seitenkettenschutzgruppen am Aspartat, wie dem Phenylisopropyl- oder Dmab-Ester, erreicht werden.^[67,68] Da in der konvergenten Glycopeptidsynthese das Aspartat häufig durch einen sterisch wenig anspruchsvollen Allylester geschützt wird,^[69] wurden Methoden zur Reduktion der Aspartimid-Bildung während der LANSBURY-Aspartylierung entwickelt. Der Ringschluss kann durch den Einsatz einer Amidrückgrat-Schutzgruppe wie 2,4-Dimethoxybenzyl, C-terminal zur Glycosylierungsstelle gänzlich vermieden werden.^[70] Im Fall der Pseudoprolin-vermittelten LANSBURY-Aspartylierung wird durch die Verwendung eines als Pseudoprolin geschützten Serins oder Threonins die Aspartimidbildung sehr effektiv unterdrückt. Dies ist auf Grund der Konsensussequenz der

N-Glycosylierung (Asn-Xaa-Ser/Thr) generell möglich, wodurch dies eine allgemein anwendbare Methode darstellt (Abbildung 4).^[66,71]

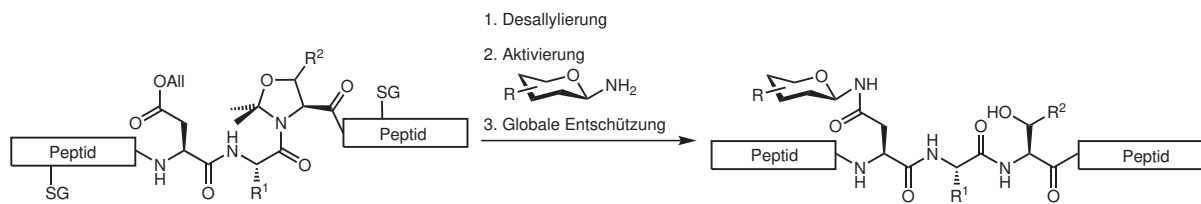


Abbildung 4: Synthese von *N*-Glycopeptiden durch Pseudoprolin-vermittelte LANSBURY-Aspartylierung. R^1 = Seitenkette beliebiger Aminosäure (außer Prolin), R^2 = H(Ser), CH_3 (Thr).

Die Ursache der Unterdrückung des Ringschlusses durch das Pseudoprolin wurde noch nicht geklärt, es existieren jedoch mehrere Theorien. Es wurde angenommen, dass die *cis*-Peptidbindung des Pseudoprolins eine für den Ringschluss sterisch ungünstige und starre Konformation des Peptids hervorruft.^[66] Weiterhin wurde spekuliert, dass durch die Abwesenheit des Amidwasserstoffs eine stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung einer β -Turn-Struktur nicht mehr möglich sei^[72] oder dass dadurch ein intramolekularer Protonentransfer unterdrückt wird.^[73]

Eine weitere Methode zur konvergenten Glycopeptidsynthese ist die STAUDINGER Ligation.^[74,75] Durch eine „spurlose“ Variante dieser Reaktion konnten native *N*-Glycopeptide erhalten werden. Hierbei reagiert unter Ausbildung einer Amidbindung ein Phosphin-tragender Thioester des Aspartats mit einem Glycosylazid.^[76,77]

1.4 Ligationsmethoden zur Synthese von Proteinen und Glycoproteinen

Um ungeschützte Peptide in wässrigem Medium chemo- und regioselektiv unter Ausbildung einer nativen Peptidbindung zu verknüpfen, wurden verschiedene Ligationsverfahren entwickelt. KENT legte mit der Entwicklung der nativen chemischen Ligation (NCL) den Grundstein für effiziente Synthesen von (Glyco-)Proteinen (Abbildung 5).^[78,79] Bei dieser Verknüpfung erfolgt zunächst ein reversibler Thiol-Thioester-Austausch zwischen einem Peptidthioester und einem Peptid, das N-terminal ein Cystein trägt. Im Anschluss erfolgt die Ausbildung einer nativen Peptidbindung durch einen irreversiblen intramolekularen *S,N*-Acylshift.

Durch die sequentielle NCL ist die Synthese größerer Proteine aus drei und mehr Fragmenten möglich.^[80,81] Die internen Fragmente besitzen dabei sowohl einen C-terminalen Thioester als

auch ein N-terminales Cystein. Um bei der NCL eine Polymerisation oder Cyclisierung zu vermeiden, muss das N-terminale Cystein eine Schutzgruppe tragen, die nach erfolgter Ligation entfernt werden kann. Geeignet hierfür sind die Thiochutzgruppen des Acetamidomethyltyps (Acm und Phacm). Beide können mit Ag^{I} - oder Hg^{II} -Salzen entfernt werden.^[82–84] Eine Abspaltung von Phacm kann darüber hinaus enzymatisch durch Penicillin G Acylase erfolgen.^[84] Eine durch Methoxyamin einfach zu entschützende Thiazolidin-4-carbonsäure ermöglicht ebenfalls eine sequentielle NCL.^[85] Eine Kontrolle der NCL kann auch auf kinetischem Wege erfolgen. Hierfür macht man sich die höhere Reaktivität von Arylthioestern gegenüber Alkylthioestern zu Nutze. Auf diese Weise ist eine Ligation vom N- zum C-Terminus möglich.^[86] Der Einsatz von Peptidhydraziden, die nach Bedarf zum Thioester umgesetzt werden, erlaubt ebenfalls eine Ligation vom N- zum C-Terminus.^[87,88]

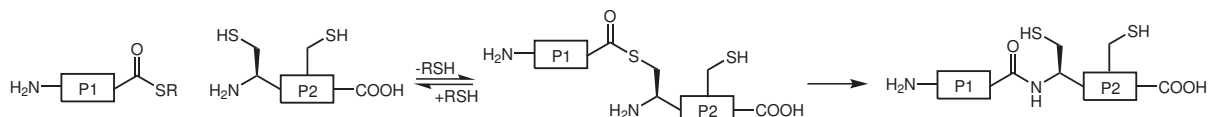


Abbildung 5: Native chemische Ligation (NCL) der Peptide P1 und P2.

Da Cystein nur etwa zu 2 % in den Proteinen eukaryotischer Zellen vorkommt,^[89] können häufig keine geeigneten oder zu wenige Schnittstellen für eine NCL gefunden werden. Daher wurden verschiedene Cystein-freie Ligationmethoden entwickelt. Dabei stellt die Aminolyse eines Thioesters den einfachsten Fall dar. Hierfür müssen allerdings Lysine und Cysteine geschützt vorliegen und neben einem erhöhten pH sind Zusätze von organischen Lösungsmitteln notwendig.^[90] Die Verwendung eines Thiol auxiliars, das am N-Terminus angebracht ist, ermöglicht eine Ligation unter den Bedingungen der NCL. Das Auxiliar fungiert

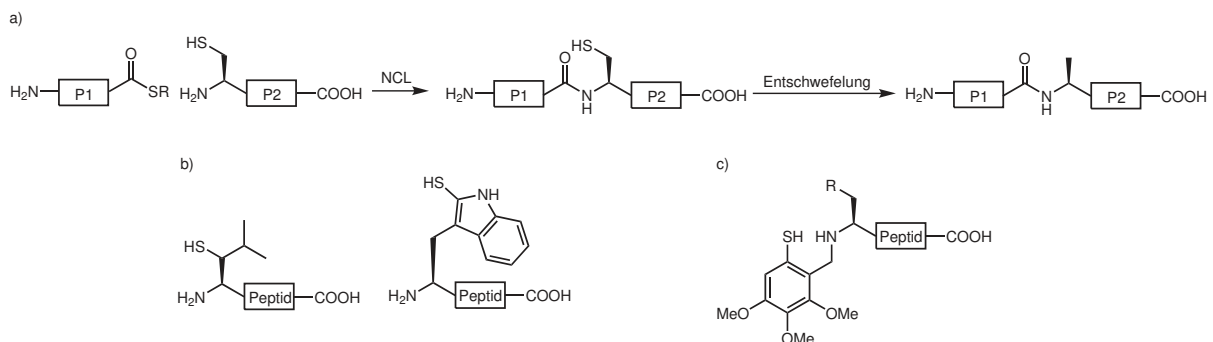


Abbildung 6: Methoden für Cystein-freie Ligationen: a) Alanin-Ligation der Peptide P1 und P2, b) Peptid mit einem N-terminalen Thiolderivat von Leucin und Tryptophan, c) Peptid mit dem Thiol auxiliars 4,5,6-Trimethoxy-2-mercaptobenzyl (R = beliebiger Aminosäurerest).

analog zu einem Cystein und ermöglicht nach der Umesterung die räumliche Nähe der C- und N-Termini und damit die Ausbildung einer Amidbindung. Da die Thiolauxiliare meist einen gewissen sterischen Anspruch besitzen, ist eine effiziente Ligation meist nur mit sterisch anspruchslosen Peptidthioestern möglich.^[91] Auxiliare wie 4,5,6-Trimethoxy-2-mercaptobenzyl (Abbildung 6c) können nach erfolgter Ligation unter sauren Bedingungen entfernt werden.^[92]

DAWSON konnte durch die Alanin-Ligation eine effektive und auxiliarfremige Ligrationsstrategie aufzeigen (Abbildung 6a). Die Ligation findet formal an Alanin statt und beruht auf einer Entschwefelung des für die Ligation verwendeten Cysteins zum nativen Alanin mit Pd/Al₂O₃ oder RANEY-Nickel.^[93] DANISHEFSKY konnte diese Methodik durch eine metallfreie radikalische Entschwefelung mit TCEP weiterentwickeln. Durch die milderen Bedingungen wurde eine größere Bandbreite an Proteinen zugänglich.^[94] Native Cysteine, die durch AcM geschützt sind, werden unter jenen Bedingungen nicht entschwefelt.^[95] Dieses Verfahren ließ sich bereits auf eine Vielzahl anderer Aminosäuren wie Arginin,^[96] Aspartat,^[97] Glutamin,^[98] Glutamat,^[99] Leucin (Abbildung 6b),^[100] Lysin,^[101] Phenylalanin,^[102] Prolin,^[103] Threonin,^[104] Tryptophan (Abbildung 6b),^[105] und Valin^[106] übertragen. Die bevorzugte Methode bleibt jedoch auf Grund ihrer Effizienz und einfachen Durchführung die Alanin-Ligation.

1.5 Synthese von Peptidthioestern

Die Darstellung von Peptiden mit einer C-terminalen Thioesterfunktion ist eine Voraussetzung für die Synthese von Proteinen durch NCL. Auf molekularbiologischem Weg können Thioester beliebiger Größe durch die thiolinduzierte Abspaltung von C-terminalen Inteinen gewonnen werden.^[107] Um Glycopeptidthioester zu gewinnen, muss man sich jedoch der chemischen Synthese bedienen. Für die Synthese von harzgebundenen C-terminalen Thioestern wird auf Grund ihrer Basenlabilität die Boc-basierte SPPS verwendet.^[108] Diese Strategie ist jedoch wegen der säurelabilen glycosidischen Bindungen meist nicht für die Synthese von empfindlichen Glycopeptidthioestern geeignet.^[109] Um durch Fmoc-SPPS Peptidthioester zu gewinnen, wurden daher verschiedene Verfahren entwickelt. Hierfür werden zunächst harzgebundene Peptide synthetisiert, die im weiteren Syntheseverlauf zu den entsprechenden Thioestern umgesetzt werden.^[110,111]

Durch die Verwendung von *Safety-Catch-Linkern* können nach abgeschlossener Fmoc-SPPS Peptidthioester erzeugt werden. KENNER und ELLMAN verwendeten hierfür einen Acylsulfonamid-*Linker*, der es nach Aktivierung durch Cyanomethylierung erlaubt, Thioester

durch Thiolyse des alkylierten Acylsulfonamids zu gewinnen (Abbildung 7a).^[112–114] MEZZATO entwickelte dieses System zu einem Dual-Linker-Konstrukt weiter, wodurch Reaktionskontrollen über HPLC-MS ermöglicht wurden.^[115] Ein weiteres Verfahren nach dem *Safety-Catch*-Prinzip zeigte DAWSON auf (Abbildung 7b). Dieser nutzte für die Peptidsynthese einen 3,4-Diaminobenzoyl-Linker (Dbz-Linker), der durch *p*-Nitrophenylchloroformiat in das entsprechende Imidazolidinon (Nbz) überführt wird. Das C-terminal aktivierte Peptid wird vom Harz abgespalten und kann direkt für die NCL eingesetzt werden, da der Thioester *in situ* generiert wird.^[116]

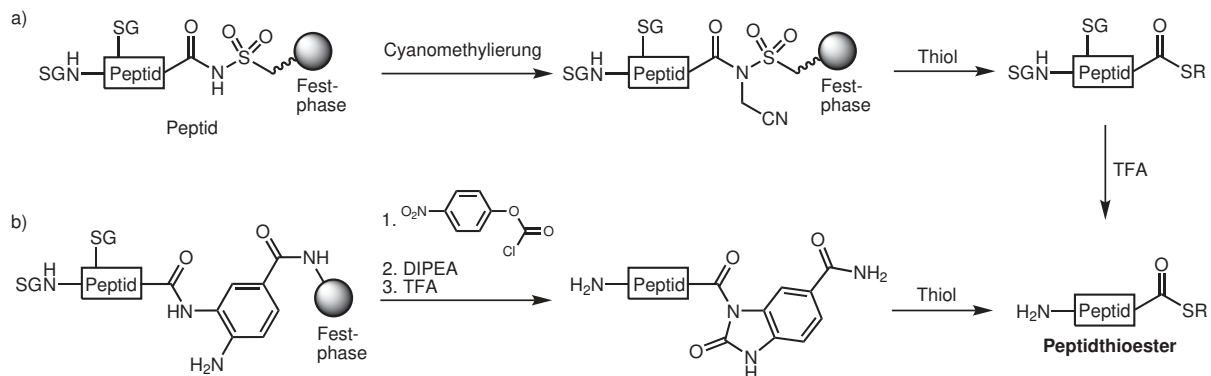


Abbildung 7: Synthesemethoden für Peptidthioester nach dem *Safety-Catch*-Prinzip: a) nach KENNER & ELLMAN, b) nach DAWSON.

Es sind zudem Synthesewege beschrieben, um eine geschützte Peptidylsäure nachträglich in den entsprechenden Peptidthioester zu überführen.^[117,118] Die Peptidsynthese wird hierfür an einem säurelabilen Linker wie dem 2-Cl-Trityl-Linker durchgeführt, von welchem die Peptidylsäure durch milde Acidolyse unter Erhalt der säurelabilen Schutzgruppen abgespalten werden kann.^[119] KAJIHARA verwendete für die anschließende Einführung des Thioesters PyBOP und DIPEA in DMF bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Abbildung 8a).^[120] Dieses Verfahren kann jedoch durch

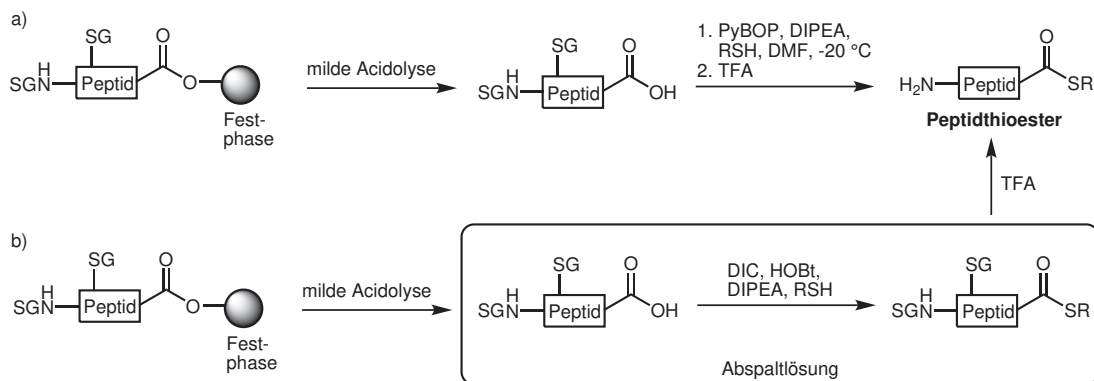


Abbildung 8: Synthesemethoden für Peptidthioester durch nachträgliche Einführung der Thioesterfunktion: a) nach KAJIHARA, b) nach FLEMER.

eine geringe Löslichkeit der verwendeten geschützten Peptidylsäuren erschwert werden. FLEMER umging dieses Problem, indem die Reaktion zum Thioester mit DIC, HOBT und DIPEA *in situ* in der Abspaltungslösung durchgeführt wurde (Abbildung 8b).^[121]

Die Neigung von Thioestern zur Racemisierung und basischen Hydrolyse kann durch die Verwendung latenter Thioester vermieden werden.^[122] Die Umwandlung von Peptidhydraziden in Thioester durch Diazotierung und anschließende Thiolyse des Acylazids ist bereits länger bekannt.^[87]

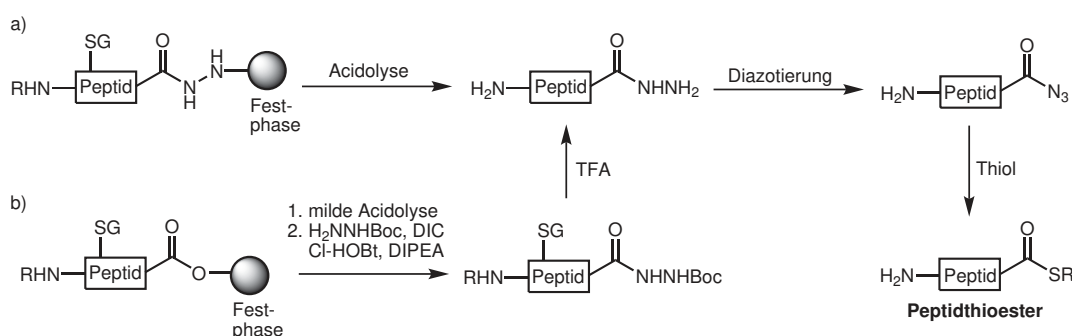


Abbildung 9: Gewinnung von Peptidthioestern über Peptidhydrazide: a) nach LIU durch Aufbau an der Festphase, b) durch nachträgliches Einbringen der Hydrazidfunktion.

LIU konnte ein Verfahren für den Einsatz von Hydraziden in der NCL entwickeln, bei dem der Thioester *in situ* erzeugt und direkt in einem Eintopfverfahren zur Ligation eingesetzt wird. Peptidhydrazide können im Gegensatz zu Thioestern direkt an einem säurelabilen *Linker* durch Fmoc-SPPS aufgebaut werden (Abbildung 9a).^[88] Vollständig geschützte Peptidhydrazide können, ähnlich wie geschützte Thioester, durch die nachträgliche Einführung der Hydrazidfunktion dargestellt werden (Abbildung 9b).^[123] Weiterhin ist eine molekularbiologische Darstellung durch eine Hydrazin-induzierte Abspaltung von C-terminalen Inteinen möglich.^[88]

1.6 Immunglobulin G1

Antikörper sind ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Immunantwort. Eine Gruppe davon sind die glycosylierten Immunglobuline des Typs G (IgG). Deren Proteingerüst besteht aus zwei identischen leichten und schweren Ketten, welche über Disulfidbrücken die typische Y-förmige quartäre Antikörperstruktur bilden (Abbildung 10).^[124] Im Fall von IgG1 findet man je ein *N*-Glycan an den schweren Ketten (Asn297). Das *N*-Glycan befindet sich in der Fc-Domäne,

die an Fc-Rezeptoren bindet. Antikörper können auch Glycosylierungen in der Fab-Domäne tragen, was einen Einfluss auf die Affinität zu den entsprechenden Antigenen hat.^[22,125–128]

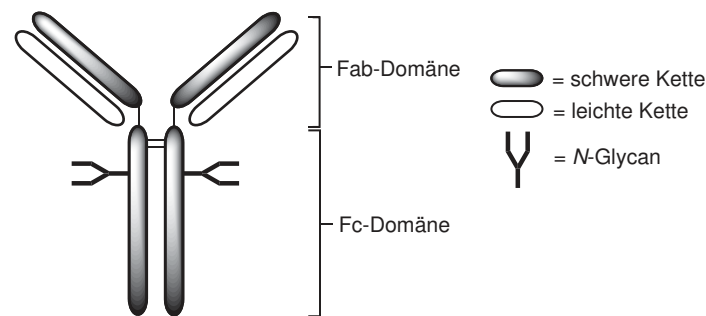


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Immunglobulins G1 mit N-Glycan.

Bei amyotropher Lateralsklerose (ALS) kommt es zur Schädigung der Motoneuronen, was von Muskelschwäche bis hin zum Tod innerhalb weniger Jahre führt.^[129] Studien von LICHTENSTEIN haben gezeigt, dass die N-Glycane in der Fc-Domäne des IgG1 von ALS-Patienten vermehrt ein *bisecting* GlcNAc besitzen. Dadurch wird die Affinität zum Fc-Rezeptor erhöht, was eine schnellere Degeneration der Neuronen zur Folge hat.^[130] Um genauere Affinitätsstudien und Struktur-Wirkungs-Beziehungen durchführen zu können, ist ein synthetischer Zugang für homogen glycosylierte IgG1 Fc-Domänen notwendig.

1.7 Erythropoietin

Das Cytokin Erythropoietin (EPO) wird in den Endothelzellen der Nebennierenrinde sowie in Hepatocyten bei hypoxischen Bedingungen gebildet und ist essentiell für die Erythrocyten-Homöostase. Es bindet an den transmembranen EPO-Rezeptor (EPOR) erythropoietischer Stammzellen im Knochenmark und bewirkt deren Proliferation und Differenzierung zu Erythrocyten.^[131] Weiterhin wird die Hämoglobinsynthese in den Endoblasten angeregt.^[132] Da EPO das wichtigste Hormon für die Bildung von Erythrocyten ist, können Anämien auf Grund von Niereninsuffizienz, Krebserkrankungen oder Chemotherapien hiermit behandelt werden.^[133,134] Die Expression des EPOR wurde auch in Zellen des Endothels sowie in Myoblasten und Neuronen beobachtet, weshalb EPO vermutlich auch in weiteren Organen eine aktive Rolle spielt.^[135–137] Daher ist EPO ein vielseitiges Therapeutikum und kann auch zur Behandlung von kardiovaskulären, neurologischen und neuro-psychologischen Erkrankungen eingesetzt werden.^[138–140] Das für diese Zwecke benötigte EPO wird rekombinant in CHO-Zellen exprimiert.^[141]

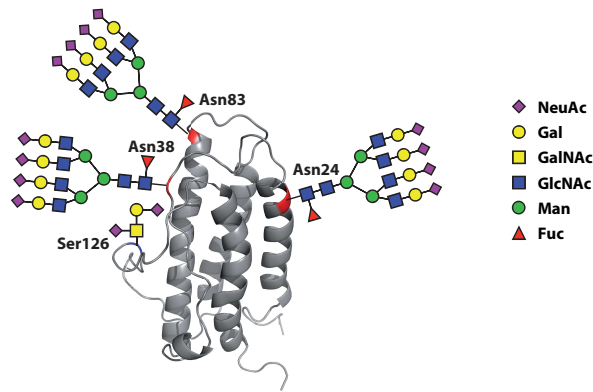


Abbildung 11: Tertiärstrukturmodell von humanem EPO (PDB: 1BUY)^[142] mit angefügten N-Glycanen und O-Glycan.

Humanes EPO (hEPO) besteht aus einer Sequenz von 166 Aminosäuren und hat ungefähr ein Molekulargewicht von 34 kDa. Die Tertiärstruktur zeichnet sich durch zwei parallele und zwei antiparallele α -Helices aus, die durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert werden (Abbildung 11).^[143] hEPO besitzt drei N-Glycosylierungsstellen (Asn24, Asn38, Asn83). Die Glycosylierung besteht zum größten Teil aus tetraantennären, sialylierten, komplexen N-Glycanen, die eine *core*-Fucosylierung tragen. Zusätzlich befindet sich an Ser126 ein O-Glycan des sialylierten Mucin-Typs.^[144–148] Dieses O-Glycan scheint keinen großen Einfluss auf die *in vivo* Aktivität auszuüben. Allerdings ist die Plasmahalbwertszeit von O-Glycan-tragenden Varianten verlängert.^[149,150] Die N-Glycane beeinflussen sowohl die Aktivität als auch die Halbwertszeit von EPO. Es konnte gezeigt werden, dass sialylierte Formen eine geringere Affinität zum EPOR besitzen. Ihre Plasmahalbwertszeit ist jedoch gegenüber dem nicht sialylierten Formen deutlich erhöht und führt zu einem verlangsamten Abbau von EPO. Hiermit erklärt sich, dass bei *in vitro* Versuchen unglycosyliertes EPO eine ähnliche Aktivität besitzt wie glycosyliertes EPO. *In vivo* ist die Wirkeffizienz von glycosylierten Formen jedoch um ein Vielfaches höher.^[151–153] Durch die Aufklärung weiterer Struktur-Wirkungs-Zusammenhänge sollte es möglich sein, optimierte EPO-Therapeutika zu entwickeln. Bei dem Präparat Darbepoetin α wurden dazu zusätzliche Glycosylierungen eingefügt, welche die Plasmahalbwertszeit verlängern.^[154,155]

1.8 Sphingolipidaktivatorproteine: Saposin A–D

Bei den Sphingolipidaktivatorproteinen Saposin A-D handelt es sich um enzymatisch inaktive lysosomale Glycoproteine, die am Abbau membrangebundener Sphingolipide beteiligt sind.^[156] Sphingolipide spielen eine Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation und der Signalweiterleitung

im Nervensystem. Genetische Defekte, die den Ausfall von Aktivatorproteinen zur Folge haben, sind die Ursache für mehrere lysosomale Speicherkrankheiten, bei denen Sphingolipide akkumulieren.^[157] Dies führt zu neurodegenerativen Erbkrankheiten wie metachromatischer Leukodystrophie^[158] oder der GAUCHER-Krankheit.^[159] Im humanen Proteom sind fünf Saposine vorhanden. Prosaposin (Abbildung 12a) stellt dabei das Vorläuferprotein für die vier Saposine A-D dar, die durch proteolytische Prozessierung des Prosaposins entstehen. Die Saposine A-D bestehen je aus ca. 80 Aminosäuren und besitzen eine ähnliche α -helicale Tertiärstruktur. Dies beruht auf zwei konservierten Prolinen und sechs konservierten Cysteinen, die durch Ausbildung von drei Disulfidbrücken strukturgebend sind. Darüber hinaus ist in jedem Saposin eine konservierte *N*-Glycosylierungsstelle vorhanden, wobei Saposin A eine zusätzliche *N*-Glycosylierungsstelle besitzt.^[160]

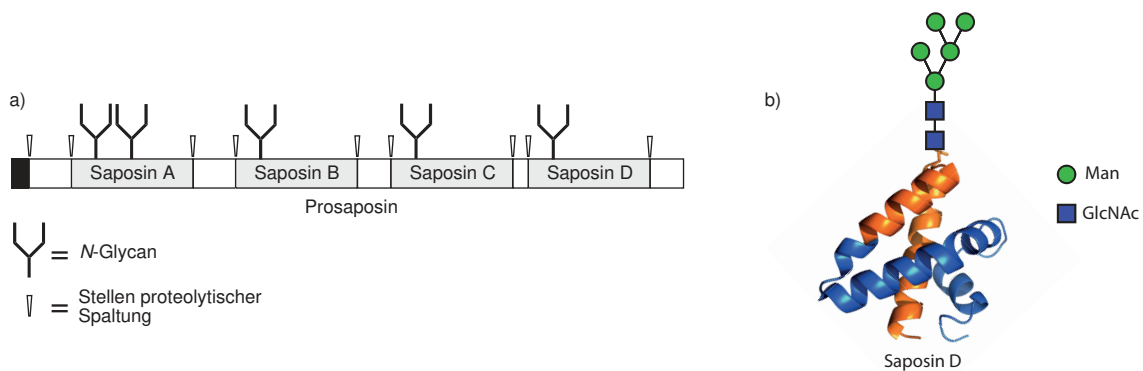


Abbildung 12: a) Schematische Darstellung von Prosaposin, b) Röntgenkristallstruktur (PDB: 3BQP)^[161] von humanem Saposin D mit angefügtem mannosereichen *N*-Glycan.

Die Saposine A-D haben aktivierende Wirkung auf verschiedene lysosomale Enzyme, die für den Abbau von Sphingolipiden verantwortlich sind. Dies geschieht durch eine Interaktion mit den jeweiligen Enzymen. Eine Ausnahme der Saposinfamilie ist hierbei Saposin B, welches die Enzym-Aktivierung durch Interaktion mit dem Substrat bewirkt.^[162–166] Die Saposine sind auch für die Extraktion der Sphingolipide aus Lipidmembranen verantwortlich. Es konnte festgestellt werden, dass das *N*-Glycan hierfür von Bedeutung ist. Unglycosliertes, durch Expression in *E. coli* gewonnenes Saposin B hat zwar eine hohe Affinität zur Membran, besitzt aber nahezu keine Extraktionskapazität.^[163] Vergleicht man die für die Saposine von GAUCHER-Patienten gefundenen Glycosylierungsmuster, so fällt auf, dass Saposin D im Gegensatz zu A und C eine nahezu einheitliche Glycosylierung (84 %) durch ein mannosereiches *N*-Glycan besitzt (Abbildung 12b). Ebenso bemerkenswert ist, dass Saposin B im gesunden Patienten kleinere und bereits stark hydrolytisch abgebaute Glycane trägt, die zusätzlich eine *core*-Fucosylierung besitzen. Bei dem Krankheitsbild der Gangliosidose Typ 1 findet man für Saposin B allerdings vorwiegend multiantennäre und nur wenig abgebaute *N*-Glycane.^[14,167]

2 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Methoden zur chemischen Synthese von homogenen Glycoproteinen an Modellsequenzen (IgG1, EPO) weiter zu entwickeln. Um unterschiedliche Glycoformen des Saposin D zugänglich zu machen, sollte eine konvergente Synthese entwickelt werden (Abbildung 13). Darüber hinaus sollte die in der konvergenten Glycopeptidsynthese häufig beobachtete Nebenreaktion der Aspartimidbildung untersucht werden.

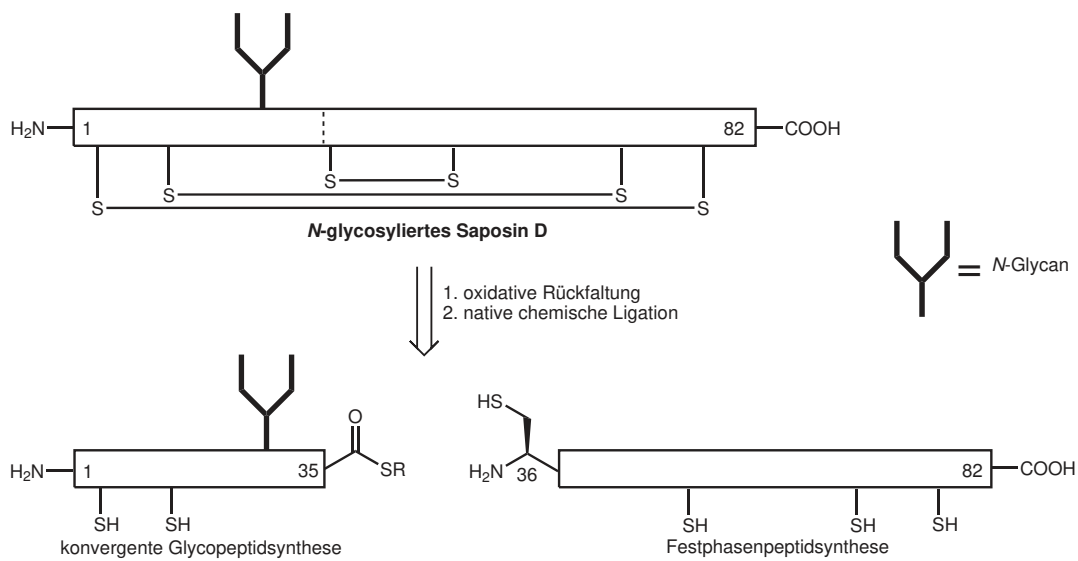


Abbildung 13: Retrosynthese von homogen glycosyliertem Saposin D.

3 Sequenzabhängige Aspartimidbildung bei Peptiden

3.1 Aspartimidbildung in der Peptidsynthese

Die Aspartimidbildung stellt eine häufige und gut untersuchte Nebenreaktion in der Peptidsynthese dar. Es wurde bereits eine Vielzahl an Methoden zur Vermeidung dieser Nebenreaktion entwickelt. Die meisten davon nutzen die Tatsache, dass es sich um eine basenkatalysierte (Abbildung 14) und von der Sterik der der Seitenkettenschutzgruppe des Aspartats abhängige Reaktion handelt.^[168] Es ist bekannt, dass die Größe der Seitenkette der Aminosäure in Position n+1 zum Aspartat die Aspartimidbildung beeinflusst,^[169] weitere Zusammenhänge mit der umgebenden Peptidstruktur waren allerdings bis jetzt nur von spekulativer Natur.^[170]

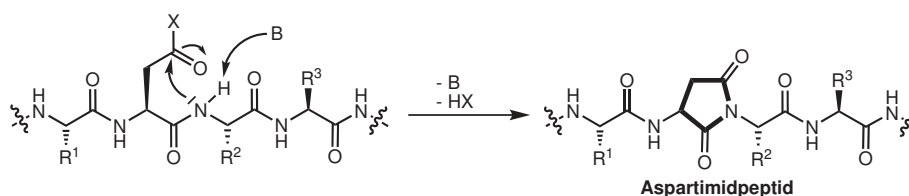


Abbildung 14: Mechanismus der basenkatalysierten Aspartimidbildung (R^{1-3} = beliebiger Aminosäurerest, X = Abgangsgruppe, B = Base).

Bei der Festphasensynthese des Testpeptids **1** entstand ein großer Anteil des Aspartimidpeptids **1ai** (Abbildung 15). Die Nebenproduktbildung konnte fast vollständig durch die Verwendung eines als Pseudoprolin geschützten Serins in Position n+2 zum Aspartat (Peptid **2**) unterdrückt

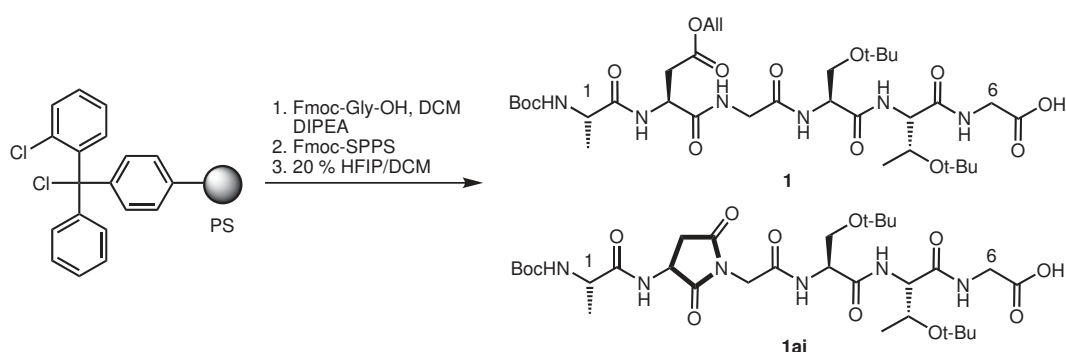


Abbildung 15: Fmoc-SPPS des Hexapeptids **1** und des Aspartimidpeptids **1ai**.

werden (Abbildung 16). NMR-Studien und Molekulardynamiksimulationen konnten den Grund für diesen Effekt des Pseudoprolins nicht klären.^[66,171] Es wurde angenommen, dass die starre *cis*-Peptidbindung am Pseudoprolin den nukleophilen Angriff des Amidstickstoffs beeinflusst.

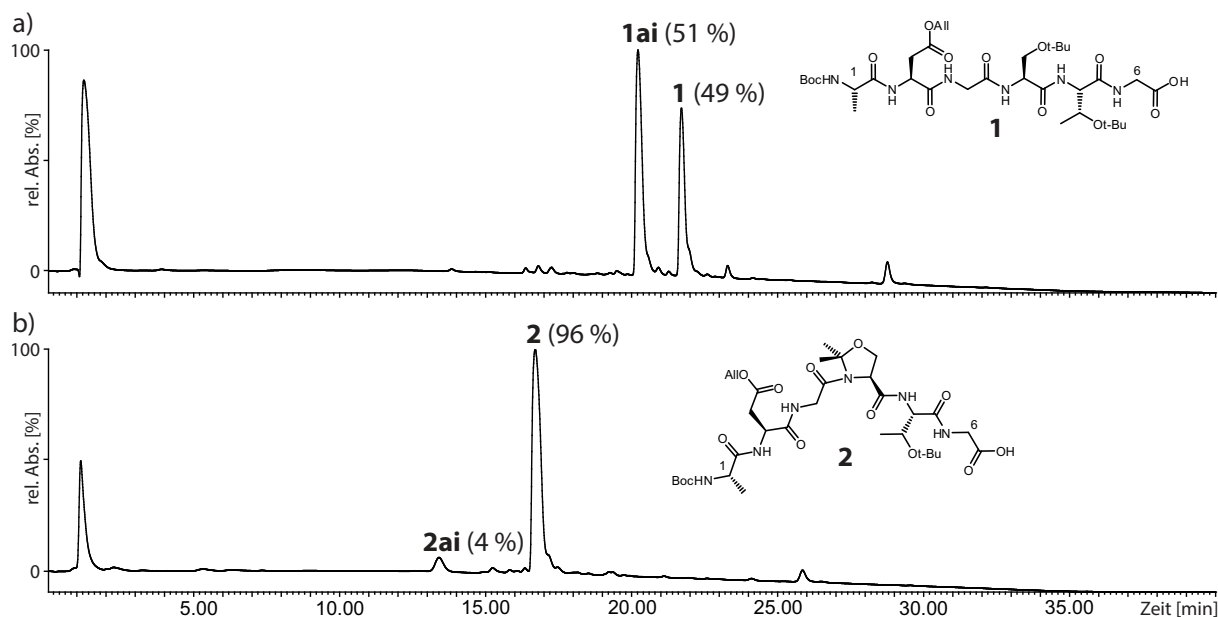


Abbildung 16: HPLC Chromatogramme mit HPLC-Produktverhältnissen der Synthese von Peptid 1 (a) und Peptid 2 (b).

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Synthese von Peptid 3 durchgeführt (Abbildung 17a), bei dem das Pseudoprolin in Position 4 gegen Prolin ersetzt wurde. Überraschenderweise war auch bei diesem Peptid die Aspartimidbildung sehr gering. Bei Prolin herrscht ein Gleichgewicht zwischen *cis*- und *trans*-Peptidbindung, wobei *trans* üblicherweise bevorzugt ist und *cis* sequenzabhängig bis zu ca. 20 % vorkommt.^[172] Mit Peptid 3 konnte ein Einfluss der *cis*-Peptidbindung und der beiden Methylgruppen des Pseudoprolins auf die Aspartimidbildung ausgeschlossen werden.

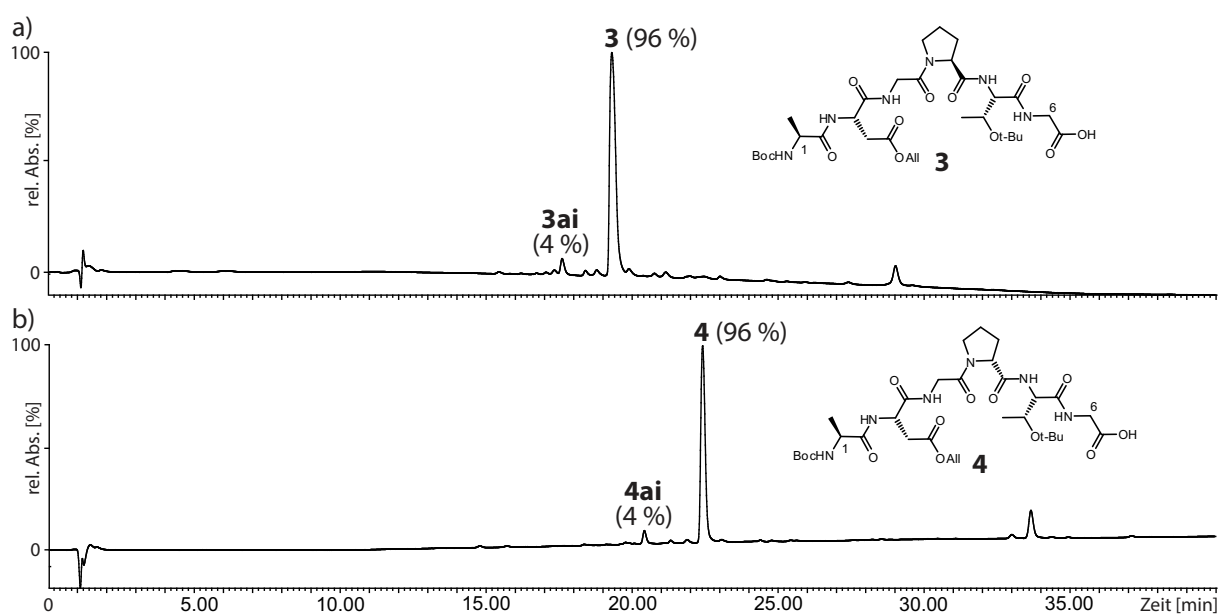


Abbildung 17: HPLC Chromatogramme mit HPLC Produktverhältnisse der Synthese von Peptid 3 (a) und Peptid 4 (b).

Um zu prüfen, ob die Konfiguration des Stereozentrums von Pro4 einen Einfluss haben könnte, wurde Peptid **4** mit einem D-Prolin synthetisiert (Abbildung 17b). Auch hier trat nur eine geringe Aspartimidbildung auf. Damit scheint die reduzierte Aspartimidbildung vorwiegend von der Abwesenheit des Amidwasserstoffes in Position n+2 zum Aspartat abhängig zu sein. Um auszuschließen, dass die Ringstruktur des Prolins ebenfalls einen Einfluss ausübt, wurden die Peptide **5** und **6** synthetisiert. Im Falle von **5** wurde Ser4 gegen ein Dmb-geschütztes Glycin ersetzt. Auch hier wurde nur eine geringe Aspartimidbildung beobachtet (Abbildung 18a). Bemerkenswert ist, dass dies das einzige der Peptide war, bei dem auch eine Piperididbildung **5pi** (2 %) auftrat. Bei Peptid **6** (*N*-Methylglycin) fand sich nur 1 % Aspartimid, was fast einer vollständigen Unterdrückung entspricht (Abbildung 18b).

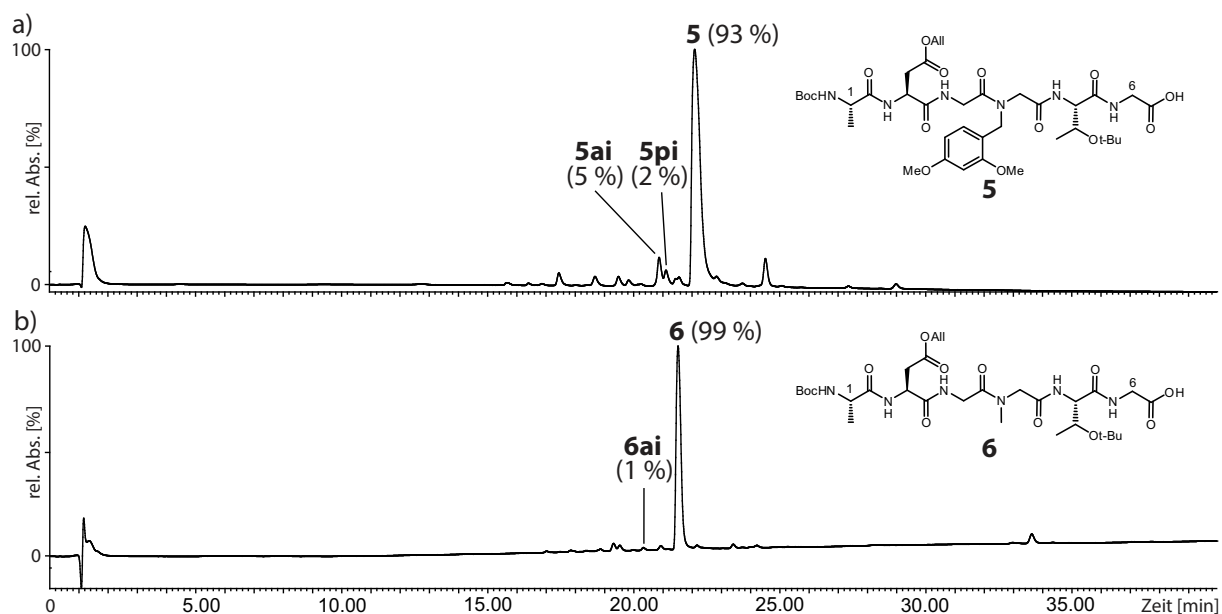


Abbildung 18: HPLC Chromatogramme mit HPLC Produktverhältnissen der Synthese von Peptid **5** (a) und Peptid **6** (b).

Mit den unerwarteten Ergebnissen der Peptide **1-6** konnte gezeigt werden, dass der Amidwasserstoff in Position n+2 zum Aspartat für die Bildung des Aspartimids eine wichtige Rolle spielt. Eine Hypothese, dass die Aspartimidbildung durch einen wasserstoffbrückenstabilisierten β -Turn (Typ II') begünstigt ist (Abbildung 19a),^[71] ist sehr

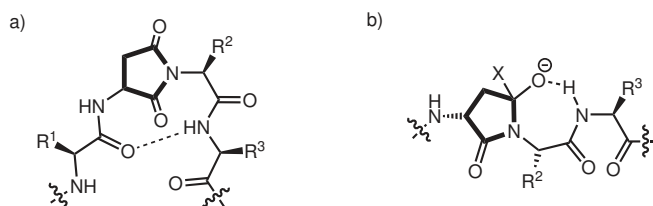


Abbildung 19: a) Wasserstoffbrückenstabilisierter Typ II' β -Turn,^[71] b) Wasserstoffbrückenstabilisierter bicyclischer Übergangszustand, R¹⁻³ = beliebiger AS-Rest, X = Abgangsgruppe.

wahrscheinlich nicht der Hauptgrund für die beobachtete Selektivität. Dagegen ist die Stabilisierung eines tetraedrischen Intermediats während der Ringschlussreaktion wahrscheinlicher. In einem siebengliedrigen Ring könnte eine Wasserstoffbrücke das Oxyanion stabilisieren (Abbildung 19b). Die Ausbildung einer solchen bicyclischen Struktur wurde bereits für native Proteine mit einer α -helicalen Struktur vorgeschlagen,^[170,172,173] experimentelle Beweise für die Beteiligung des Amidwasserstoffs in Position n+2 wurden jedoch nicht erbracht.

Um die Theorie des intramolekular stabilisierten Intermediats weiter zu untermauern, wurde die Synthese des β -Peptids **7** durchgeführt (Abbildung 20). Bei diesem wurde Gly3 gegen β -Alanin ausgetauscht, um den Cyclus der stabilisierenden Wasserstoffbrücke durch einen 8-Ring zu ersetzen. Auch hier war die Aspartimidbildung (3 %) stark unterdrückt.

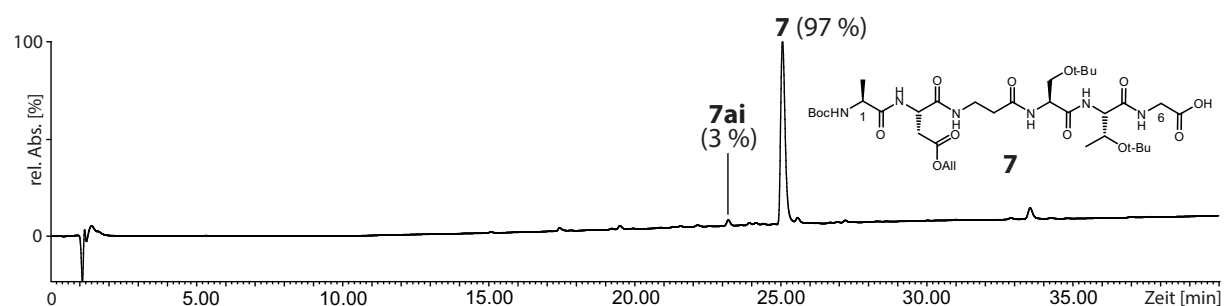


Abbildung 20: HPLC Chromatogramm mit HPLC Produktverhältnis der Synthese von Peptid **7**.

Durch die Analyse der Aspartimidbildung der Peptide **1-7** konnte gezeigt werden, dass die basenkatalysierte Aspartimidbildung durch einen Amidwasserstoff in Position n+2 zum Aspartat intramolekular katalysiert wird. Mögliche Szenarien, dass die Aspartimidbildung mit der Rigidität der Peptidstruktur (*cis*-, *trans*-Peptidbindung) korreliert, konnten widerlegt werden. Die Ergebnisse sprechen für eine intramolekulare Stabilisierung des Cyclisierungsintermediats durch eine Wasserstoffbrücke (Abbildung 19b). Diese Erkenntnisse sind nicht nur relevant für die chemische Peptidsynthese sondern könnten auch bei natürlichen Prozessen, bei denen eine Aspartimidbildung auftritt eine Rolle spielen.

3.2 Aspartimidbildung, Isomerisierung und Desamidierung bei nativen Peptiden

Aufgrund der Hinweise über eine intramolekulare Beschleunigung der basenkatalysierten Aspartimidbildung bei geschützten Peptiden (Kapitel 3.1) wurden auch entschützte Peptide mit natürlichen Sequenzen untersucht. Die Isomerisierung und Desamidierung bei Peptiden und

Proteinen stellen degenerative Reaktionen dar, die über die Bildung eines Aspartimids verlaufen.^[57,170] Um dies zu untersuchen, wurde die Sequenz des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) verwendet. Von Peptid **8** (ACTH 22-27) ist die über das Aspartimid verlaufende Isomerisierung und Desamidierung bekannt, wobei **8** zu einer starken Bildung der Abbauprodukte **8da,ai,iso** neigt.^[57] Zunächst wurde Peptid **8** in Phosphatpuffer (0.1 M, pH 7.4) gelöst, für 90 min bei 70 °C inkubiert (Abbildung 21) und danach per LC-MS untersucht (Abbildung 21). Das Edukt und die Abbauprodukte **8da** und **8iso** sowie **8ai** konnten chromatographisch getrennt und massenspektroskopisch nachgewiesen werden.

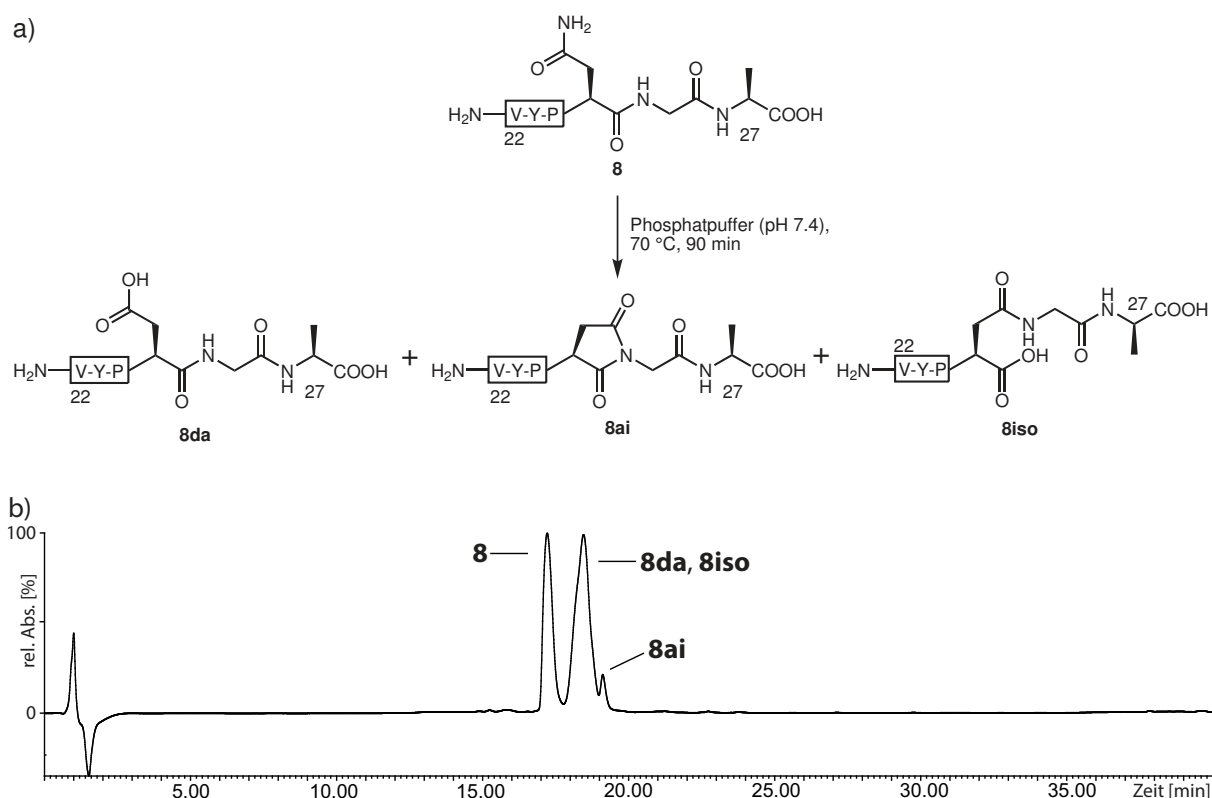


Abbildung 21: a) Reaktionen bei Inkubation des Hexapeptids **8** in Phosphatpuffer (pH 7.4) bei 70 °C. b) HPLC Chromatogramm des für 90 min bei 70 °C in Phosphatpuffer (pH 7.4) inkubierten Peptids **8**.

Ausgehend davon, dass sämtliche Abbauprodukte über das Succinimid gebildet werden, sollte eine gezielte Variation des Amidwasserstoffs an Position n+2 des Peptids **8** durchgeführt werden. Dazu wurden Peptidanaloga von **8** durch Fmoc-SPPS synthetisiert und in wässriger Umgebung auf ihre Stabilität getestet.

Im Fall der Hexapeptide **9** und **10** ist der n+2 Amidwasserstoff nicht vorhanden und es wurde im Vergleich zu **8** eine wesentlich geringere Bildung der Desamidierungsprodukte (**9da, 10da**) und Isomerisierungsprodukte (**9iso, 10iso**) beobachtet (Abbildung 22a/b). Auch die Inkubation von **11** mit verschobenem n+2 Amid führte zu einer stark reduzierten Bildung von **11da** und

11iso (Abbildung 22c). Der Einfluss des n+2 Amidprotons auf die Aspartimidbildung ist damit bei geschützten und ungeschützten Peptiden gegeben. Im Gegensatz zu **8** findet man bei **9-11** einen höheren Anteil an Aspartimid, was auf eine reduzierte Reaktivität der entsprechenden Aspartimide hinweist.

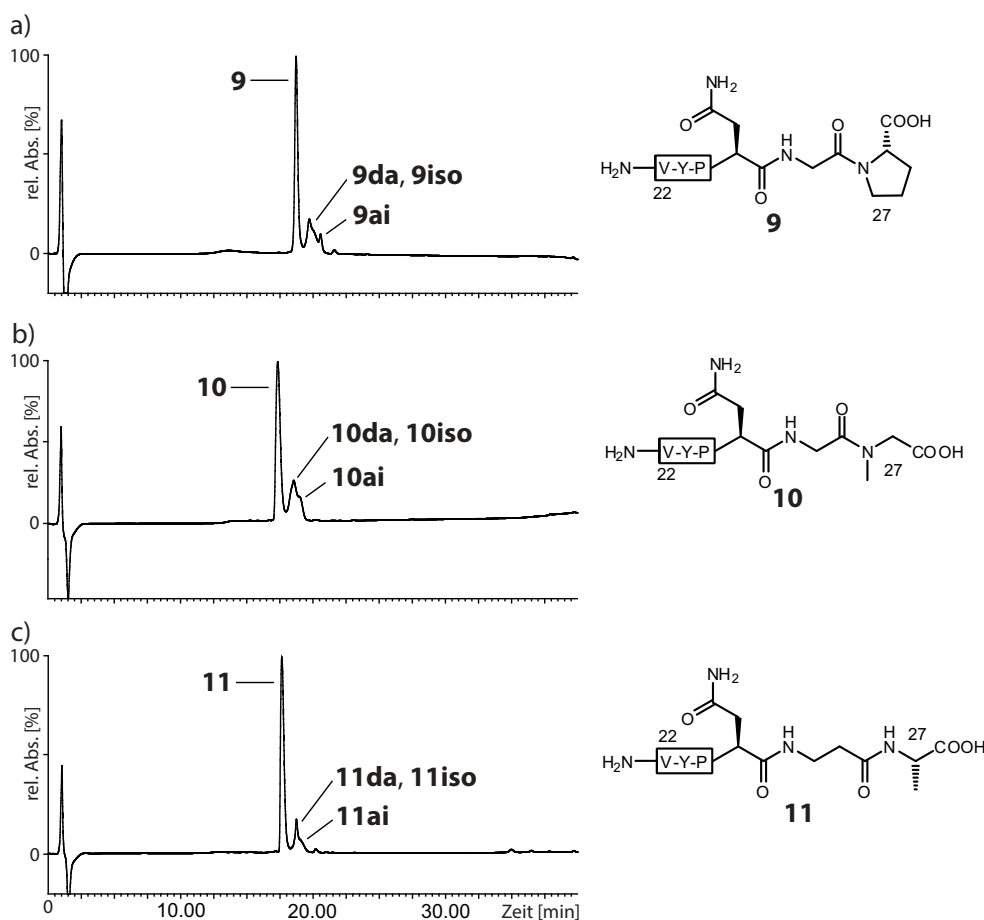


Abbildung 22: HPLC Chromatogramme und Strukturen der für 90 min bei 70 °C in Phosphatpuffer (pH 7.4) inkubierten Peptide **9** (a), **10** (b) und **11** (c).

Der Einfluss des Puffers wurde überprüft, indem **8** in Wasser (Peptidlösung mit pH 4) und in 0.1 M NaCl-Lösung (pH 7.4) bei 70 °C inkubiert wurde. Bei pH 4 trat eine Aspartimidbildung von lediglich 1 % und keine Desamidierung auf, was auf das saure Milieu zurückzuführen ist.

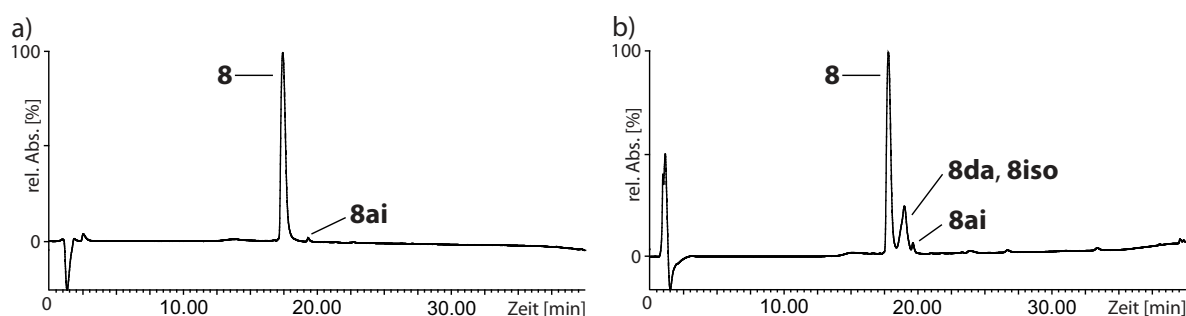


Abbildung 23: HPLC-Chromatogramme des inkubierten Peptids **8** in a) Wasser (pH 4) bei 70 °C für 90 min und b) NaCl-Lösung (pH 7.4) bei 70 °C für 90 min.

In 0.1 M NaCl (pH 7.4) entstand ein erheblich geringerer Anteil an **8da** und **8iso** (Abbildung 23) im Vergleich zu wässrigem Phosphatpuffer (pH 7.4). Vermutlich hat das Phosphat-Anion eine katalytische Wirkung auf die Aspartimidbildung und die daraus resultierende Desaminierung und Isomerisierung des Ausgangspeptids.

Um den Einfluss der Temperatur zu prüfen, wurden die Peptide **8-11** 90 min bei 55 °C in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4) inkubiert. Dadurch wurde der Anteil an Abbauprodukten bei den Sequenzen **8-11** stark verringert. Die Produktverhältnisse sind zusammenfassend in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Produktverhältnisse nach Inkubation von Peptid 8-11 bei unterschiedlicher Temperatur und Medium für 90 min.

Peptid	T [°C]	Medium	Produktverhältnisse	
8	70	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	8:8ai:8da,iso	34 : 3 : 63
8	55	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	8:8ai:8da,iso	76 : 6 : 18
8	70	Wasser (pH 4)	8:8ai	99 : 1
8	70	0.1 M NaCl (pH 7.4)	8:8ai:8da,iso	76 : 2 : 22
9	70	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	9:9ai:9da,iso	70 : 6 : 24
9	55	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	9:9ai:9da,iso	94 : 1 : 5
10	70	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	10:10ai,da,iso	70 : 30
10	55	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	10:10ai,da,iso	90 : 10
11	70	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	11:11ai,da,iso	86 : 14
11	55	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	11:11ai,da,iso	92 : 8
8: H ₂ N-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-COOH		9: H ₂ N-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Pro-COOH		
10: H ₂ N-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Sar-COOH		11: H ₂ N-Val-Tyr-Pro-Asn-βAla-Ala-COOH		

Um einen möglichen Einfluss der C-terminalen Carbonsäure, die ebenfalls eine stabilisierende Wasserstoffbrücke ausbilden könnte, ausschließen zu können, wurden die verlängerten ACTH 22-32 Peptide **12-15** synthetisiert und wie zuvor untersucht (Abbildung 24).

Um einen ähnlichen Einfluss der Seitenkette von Glu28 ausschließen zu können, wurden zusätzlich die Peptide **16** und **17** synthetisiert, bei diesen ist Glu28 gegen Gly substituiert, und deren Stabilität auf identische Weise untersucht (Abbildung 25).

Bei dem Undecapeptid **12** kommt es wie bei dem Ausgangspeptid **8** zu einer starken Bildung der Abbauprodukte. Diese ist im Vergleich etwas geringer, was auf die größere Kettenlänge zurückzuführen sein sollte. Auch bei den modifizierten Peptiden **13**, **14** und **15** trat eine starke

Reduktion der Aspartimid-basierten Reaktionen auf, die auf den substituierten Amidwasserstoff bzw. dessen C-terminale Verschiebung zurückzuführen ist. Die Abbauprodukte treten bei den modifizierten Undecapeptiden nicht signifikant geringer auf, so dass der freie C-Terminus der Hexapeptide nur einen geringen Einfluss haben kann.

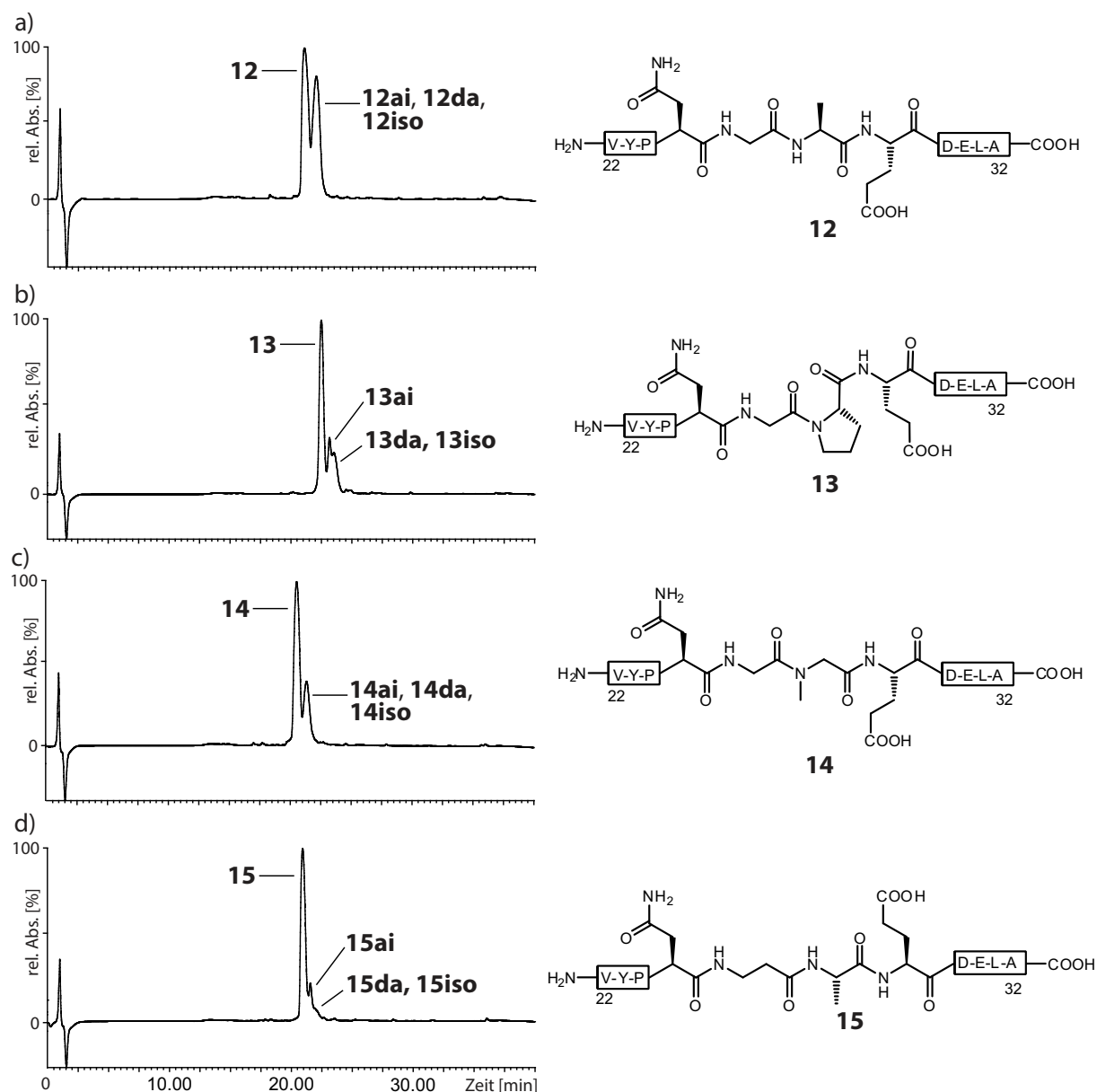


Abbildung 24: HPLC Chromatogramme und Strukturen der für 90 min bei 70 °C in Phosphatpuffer (pH 7.4) inkubierten Peptide **12** (a), **13** (b) **14** (c) und **15** (d).

Der Vergleich von **12** und **14** mit deren modifizierten Analoga **16** und **17** zeigt eine geringfügig stärkere Bildung der Abbauprodukte im Fall von **16** und **17**. Dies bedeutet, dass die Seitenkette des Glu28 die Aspartimidbildung sogar hemmt.

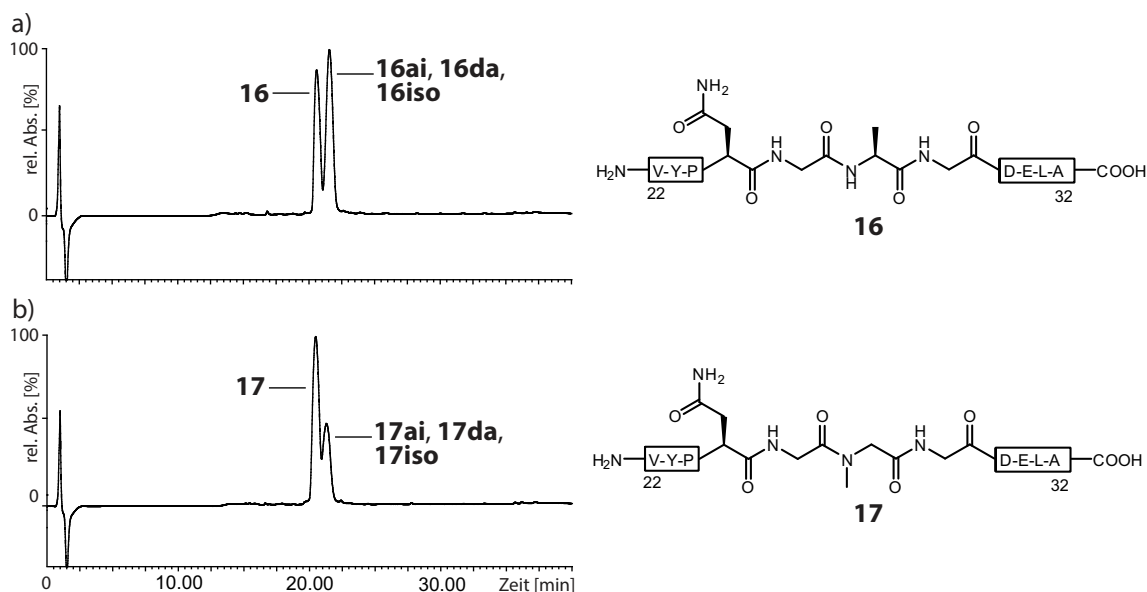


Abbildung 25: HPLC Chromatogramme und Strukturen der für 90 min bei 70 °C in Phosphatpuffer (pH 7.4) inkubierten Peptide **16** (a) und **17** (b).

Um bei den Undecapeptiden den Einfluss der Temperatur zu prüfen, wurden die Experimente ebenfalls bei 55 °C durchgeführt. Hierbei konnte eine der verringerten Temperatur entsprechende verlangsamte Reaktionskinetik beobachtet werden. Die gesamten HPLC-Produktverhältnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Produktverhältnisse nach Inkubation von Peptid 12-17 bei unterschiedlichen Temperaturen für 90 min.

Peptid	T [°C]	Medium	Produktverhältnisse
12	70	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	12:12ai,da,iso 52 : 48
12	55	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	12:12ai,da,iso 75 : 25
13	70	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	13:13ai,da,iso 69 : 31
13	55	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	13:13ai,da,iso 87 : 13
14	70	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	14:14ai,da,iso 69 : 31
14	55	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	14:14ai,da,iso 87 : 13
15	70	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	15:15ai,da,iso 83 : 17
15	55	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	15:15ai,da,iso 91 : 9
16	70	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	16:16ai,da,iso 43 : 57
16	55	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	16:16ai,da,iso 65 : 35
17	70	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	17:17ai,da,iso 74 : 26
17	55	0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)	17:17ai,da,iso 86 : 14

12: H₂N-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-COOH

14: H₂N-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Sar-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-COOH

16: H₂N-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Gly-Asp-Glu-Leu-Ala-COOH

13: H₂N-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Pro-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-COOH

15: H₂N-Val-Tyr-Pro-Asn-βAla-Ala-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-COOH

17: H₂N-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Sar-Gly-Asp-Glu-Leu-Ala-COOH

Durch die Experimente mit ungeschützten Testpeptiden aus dem ACTH konnte gezeigt werden, dass auch bei diesen Peptiden die basenkatalysierte Aspartimidbildung mit dem Amidwasserstoff in Position $n+2$ zusammenhängt. Aus dem Aspartimid resultieren durch Hydrolyse die Desamidierungs- und Isomerisierungsprodukte.^[57] Die Testpeptide **11** und **15**, bei denen diese NH-Gruppe um eine Methylengruppe verschoben ist, legen nahe, dass auch bei ungeschützten Peptiden ein bicyclisches stabilisiertes Intermediat durchlaufen wird, wie es für geschützte Peptide postuliert werden kann (vgl. Kapitel 3.1, Abbildung 19b). Die Ergebnisse zeigen, dass die Aspartimidbildung unter basischen Bedingungen auf die Katalyse durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zurückzuführen ist und dass dieser Mechanismus generell anwendbar ist.

4 Synthese eines IgG1 Fc 223-260 Thioesters

Um homogen glycosylierte Fc Domänen des IgG1 für Struktur-Wirkungs-Studien zugänglich zu machen, wurde eine Semisyntese entwickelt, die auf sequentieller NCL beruht. Die Strategie beinhaltet eine Alanin-Ligation mit anschließender Entschwefelung.^[94] Darüber hinaus erfolgt eine Ligation vom N- zum C-Terminus mit einem durch Expression in *E. coli* gewonnenen Fragment, was durch die Verwendung eines Hydrazids als latentem Thioester möglich ist (Abbildung 26).^[88]

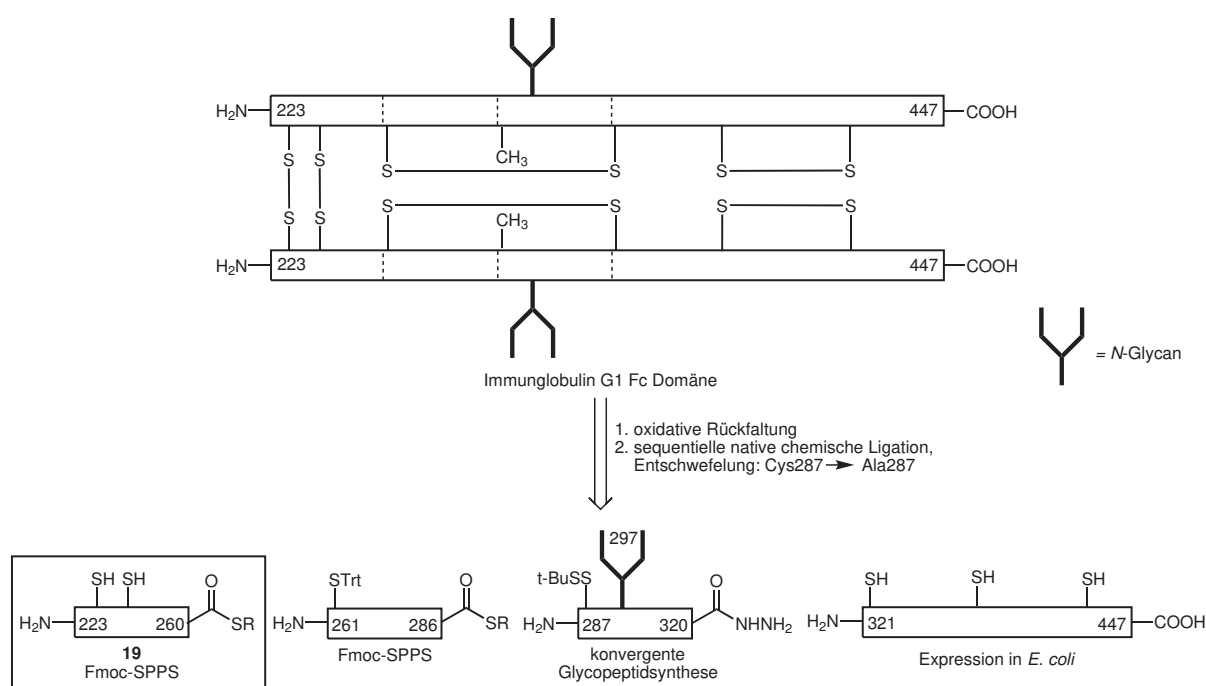


Abbildung 26: Retrosynthese einer glycosylierten Fc-Domäne des Immunglobulins G1 ($R = n\text{-Bu-3-McP}$).

Für die Synthese wird der IgG1 Fc 223-260 Thioester **19** benötigt. Die Synthese wurde bereits von MARISA RÄDISCH gezeigt, jedoch ließ sich das Peptid mit 20 % HFIP/DCM nur mit einer geringen Effizienz vom Harz abspalten.^[174] Das Peptidylharz **18** wurde nach MARISA RÄDISCH durch Fmoc-SPPS synthetisiert.^[174] Um die Gesamtausbeute des Thioesters **19** zu steigern, wurde zunächst versucht die Abspaltung und die Thioestersynthese in einer Eintopfreaktion durchzuführen (Abbildung 27).^[121] Dabei wurde das Peptidylharz **18** mit einer Lösung aus TFA/TES/DCM (1.5:2:96.5) behandelt, um durch die erhöhte Säurestärke die Abspaltungseffizienz zu erhöhen. Nach Neutralisation mit DIPEA wurde das Peptid mit DIC, Cl-HOBt und *n*-Butyl-3-mercaptopropionat (*n*-Bu-3-McP) umgesetzt. Anschließend wurde mit 96 % TFA global entschützt und das Rohprodukt per HPLC-MS analysiert (Abbildung 28).

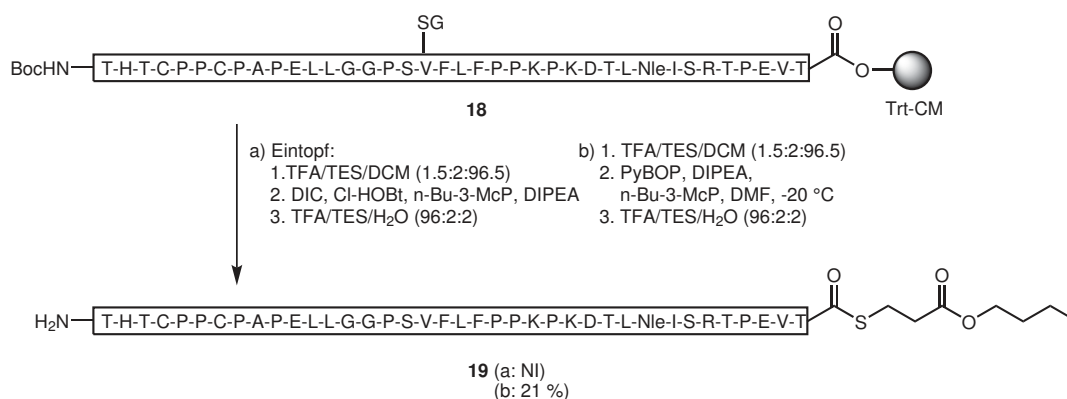


Abbildung 27: Synthese des IgG1 Fc 223-260 Thioesters **19**.

Neben dem gewünschten Thioester **19** und Verunreinigungen **19***, die aus der SPPS stammen, trat als Hauptprodukt die Verbindung **19a** auf, die eine weitere Thioesterfunktion trägt. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass während der Abspaltung des Peptids eine Seitenkettenfunktion eines Glutamats oder Aspartats entschützt wurde. Dies konnte weitgehend ausgeschlossen werden, nachdem die Thioestersynthese unter ständiger pH-Kontrolle das gleiche Ergebnis lieferte. Außerdem zeigte eine dünnschichtchromatographische Analyse lediglich eine Ausgangsspezies. Es wurde ebenfalls in Betracht gezogen, dass die zweite Thioesterfunktion während der Behandlung mit 96 % TFA mit dem überschüssigen Thiol gebildet wird.^[175] Dies konnte widerlegt werden, indem das überschüssige Thiol durch Präzipitation des Peptids entfernt wurde und die Synthese ebenfalls **19a** als Hauptprodukt ergab. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Bildung der zweiten Thioesterfunktion über ein Aspartimid erfolgen sollte, welches als Nebenprodukt **19ai** identifiziert werden konnte. Bei dem Neutralisationsschritt der *in situ* Thioveresterung kommt es wahrscheinlich bei Asp48 zu der Bildung des Aspartimids, welches von dem zugesetzten Thiol geöffnet wird.

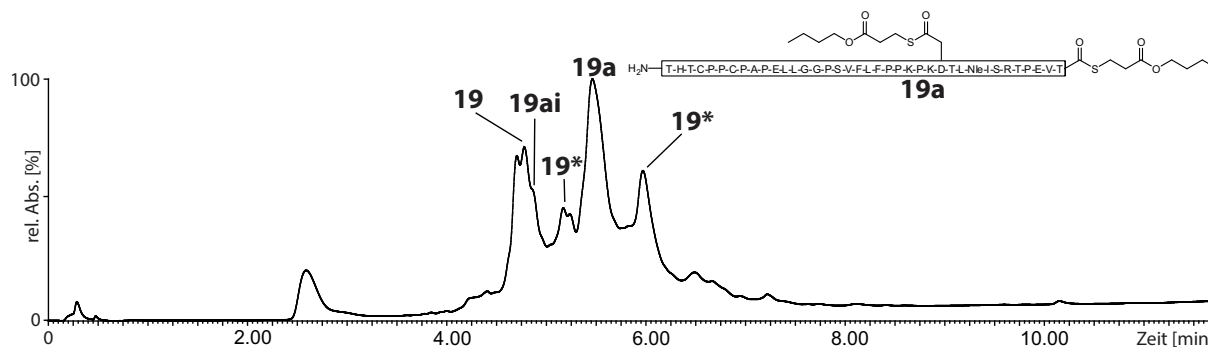


Abbildung 28: HPLC Chromatogramm des Rohprodukts der Synthese von **19** nach Methode a (Eintopf, vgl. Abbildung 27).

Der Schlüsselschritt für eine effektive Thioestersynthese war daher, TFA für die Abspaltung der Peptidylsäure zu verwenden, diese aber nicht mit einer Base zu neutralisieren sondern durch wässrige Extraktion zu entfernen. Dadurch konnte eine sehr hohe Abspaltungseffizienz (95 %) erreicht werden. Die geschützte Peptidylsäure wurde anschließend mit PyBOP, DIPEA und *n*-Butyl-3-mercaptopropionat in DMF bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zum Thioester umgesetzt.^[120] Dabei wurde PyBOP und DIPEA in äquimolaren Mengen in DMF simultan zugegeben, um einen pH-Anstieg zu vermeiden.

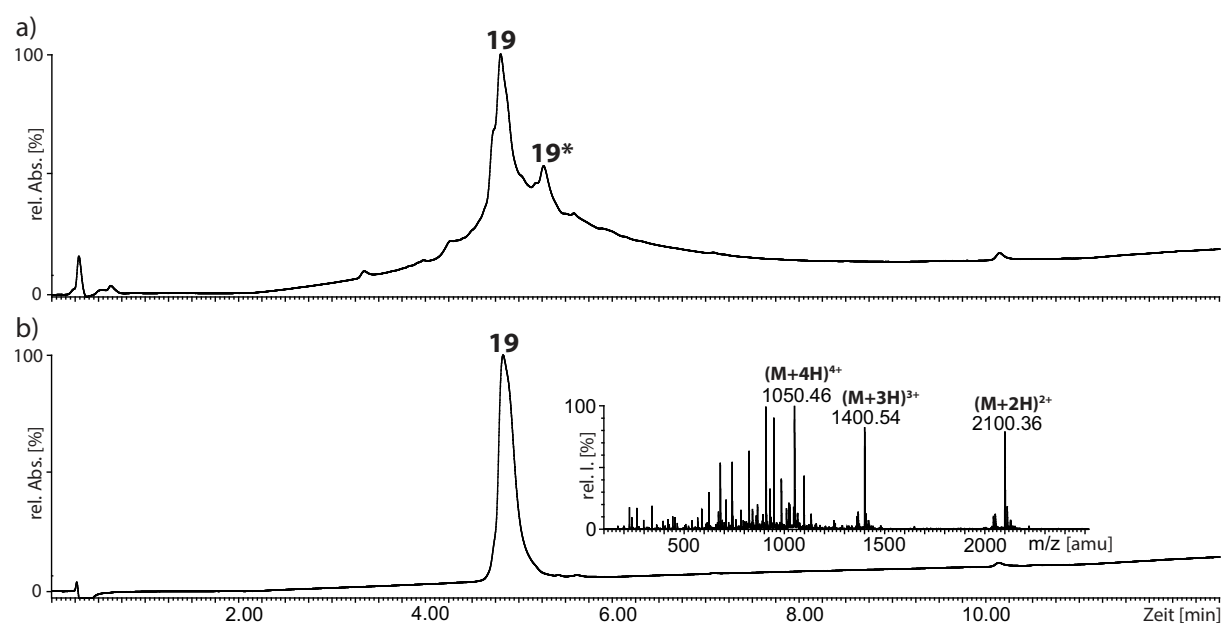


Abbildung 29: a) HPLC Chromatogramm des Rohprodukts der Synthese von **19** nach Methode b (vgl. Abbildung 27), b) HPLC-MS des HPLC-gereinigten Produktes **19**.

Nach Entschützung wurde das Rohprodukt per HPLC-MS analysiert (Abbildung 29a) und durch RP-HPLC gereinigt. Der IgG1 Fc 223-260 Thioester **19** konnte in guter Reinheit (Abbildung 29b) und mit einer Gesamtausbeute von 21 % über 3 Stufen gewonnen werden.

5 Synthese von EPO Glycopeptiden

Um 3-fach *N*-glycosyliertes Erythropoietin mit unterschiedlicher *N*-Glycosylierung für Struktur-Wirkungs-Studien zugänglich zu machen, wurde eine Synthesestrategie gewählt, die auf sequentieller NCL beruht (Abbildung 30). Diese Strategie beinhaltet die Substitution von Ala68 und Ala98 mit Cysteinen (Cys68/98), um Ligationsstellen zu schaffen. Diese Cysteine müssen im weiteren Syntheseverlauf auf der Stufe von EPO 29-166 zu nativen Alaninen entschweifelt werden.^[94] Daher müssen auf dieser Stufe die nativen Cysteine (Cys29, Cys33, Cys161) geeignete Schutzgruppen für die Entschweifung tragen. Darüber hinaus erfolgen Ligationen zu dem Fragment EPO 29-166 vom N-Terminus zum C-Terminus, was durch die Verwendung von Hydraziden als latente Thioester ermöglicht wird.^[88]

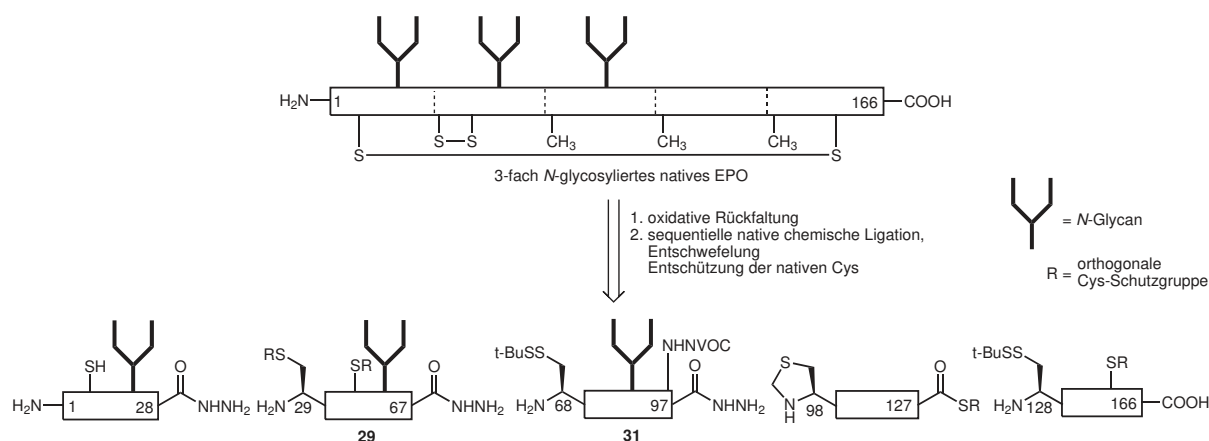


Abbildung 30: Retrosynthese von 3-fach *N*-glycosyliertem humanem EPO.

Um diese Synthese durchzuführen, werden die Glycopeptidhydrazide EPO 29-67 und EPO 68-97 benötigt. Da EPO 29-67 zwei native Cysteine beinhaltet, wurde die Synthese mit verschiedenen Cysteinschutzgruppen (Phacm, Trt) untersucht.

5.1 Synthese und Entschützung eines Phacm-geschützten EPO 29-67 Peptids

Die Acetamidomethylgruppe (Acm)^[176] fand Verwendung bei ersten Synthesen von Erythropoietin.^[177,178] N-terminale Cysteine wurden dabei bevorzugt als Thiazolidinderivate geschützt.^[85] ANGELINA GROSS verwendete diese Schutzgruppenkombination für das Fragment EPO 29-67. Im Syntheseverlauf zeigte sich, dass die Umsetzung eines C-terminalen Peptidhydrazids zum Peptidthioester über das Acylazid nicht mit dem N-terminalen Thiazolidin vereinbar ist und Acm durch Palladium bei der Desallylierung abgespalten wird.^[179]

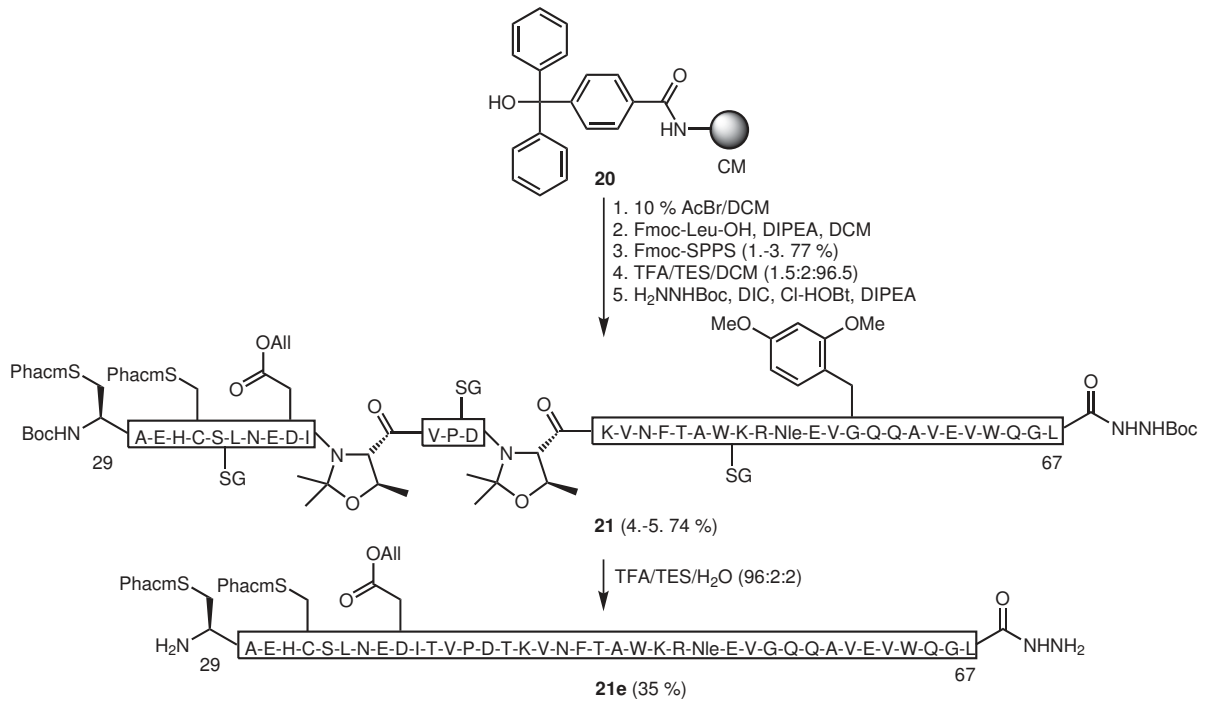


Abbildung 31: Synthese des geschützten EPO 29-67 Hydrazids **21** und des entschützten Hydrazids **21e**.

Daher wurde das Hydrazid EPO 29-67 mit Phacm-Schutz an Cys29 und Cys33 synthetisiert. Das Peptid wurde hierfür am Tritylcarboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz **20** aufgebaut (Abbildung 31). Nach Bromierung des *Linkers* am Harz **20** mit Acetyl bromid wurde Fmoc-Leu-OH angeknüpft. Im Anschluss erfolgte durch Fmoc-SPPS die Elongation zum geschützten

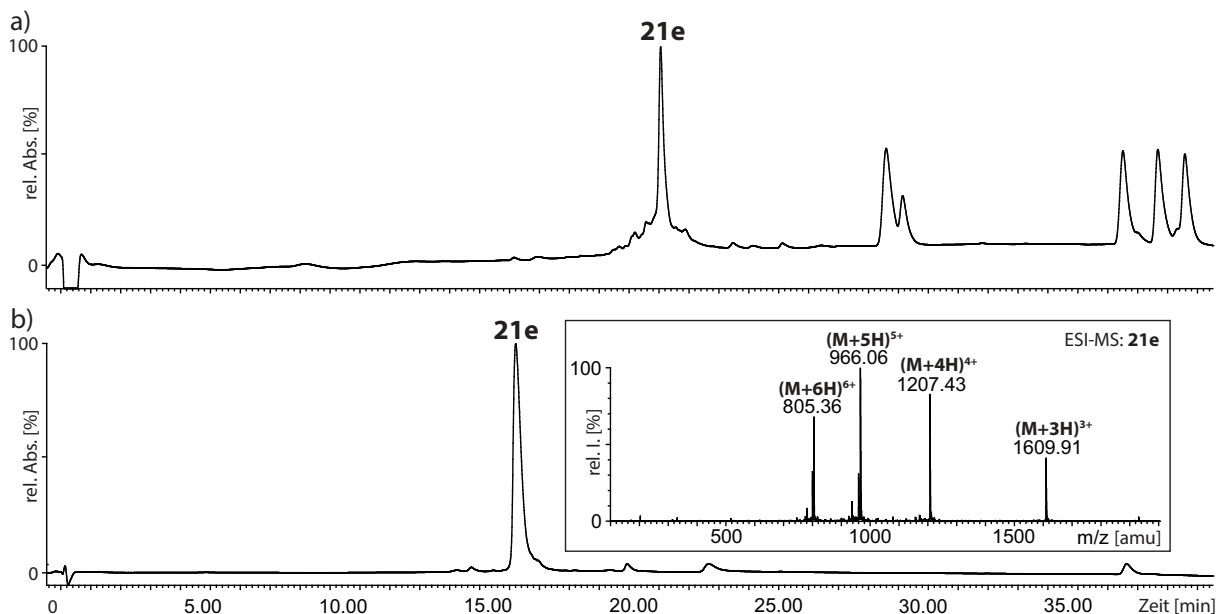


Abbildung 32: a) HPLC Chromatogramm des EPO 29-67 Hydrazids **21** nach präparativer Entschützung mit TFA zu **21e** b) HPLC-MS des HPLC-gereinigten EPO 29-67 Hydrazids **21e**.

Peptidylharz EPO 29-67. Dies konnte problemlos analog zu den vorausgegangenen Synthesen von ANGELINA GROSS durchgeführt werden.^[179] Boc/Fmoc-Cys(Phacm)-OH wurde als symmetrisches Anhydrid gekuppelt,^[180] wobei die Anhydride eine geringe Löslichkeit in DMF/DCM (1:4) besitzen. Eine gute Solubilisierung der Anhydride gelang mit höheren DMF-Anteilen. Nach beendeter SPPS wurde die Peptidylsäure mit TFA/TES/DCM (1.5:2:96.5) von der Festphase abgespalten und *in situ* unter Verwendung von DIC, Cl-HOBt und H₂NNHBoc zum geschützten EPO 29-67 Hydrazid **21** umgesetzt (Abbildung 31). Nach Reinigung durch Flashchromatographie konnte **21** in einer Ausbeute von 74 % und in guter Reinheit über 2 Stufen gewonnen werden (Abbildung 32). Das Produkt wurde mit TFA zu **21e** entschützt (Abbildung 31) und durch HPLC-MS analysiert (Abbildung 32a). Eine präparative Entschützung lieferte das entschützte Hydrazid **21e** nach Reinigung per RP-HPLC in einer Ausbeute von 35 % (Abbildung 32b). An dem Peptid **21e** wurden Möglichkeiten zur Abspaltung der Phacm-Gruppen am Fragment EPO 29-67 geprüft.

Bei Peptiden wurden Acn-Gruppen häufig durch AgOAc in AcOH/H₂O abgespalten.^[177,178,181] Diese Methode ist auch auf Phacm übertragbar. Darüber hinaus können Acn und Phacm durch Quecksilbersalze entfernt werden.^[176] In vorangegangenen Versuchen zur Entfernung von Phacm-Gruppen (Cys29, Cys33) sowie einer Acn-Gruppe (Cys161) eines EPO 29-166

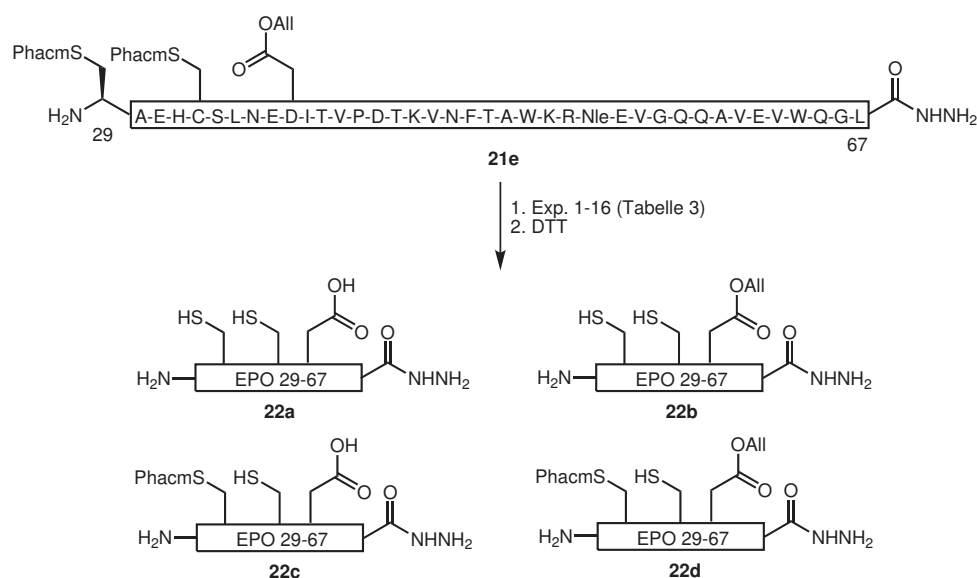


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Experimente 1-16 zur Phacm-Abspaltung des EPO 29-67 Hydrazids **21e**.

Fragments, war es nicht möglich eine vollständige Abspaltung der Phacm-Gruppen von Cys29 oder Cys33 mit AgOAc in 90 % AcOH/H₂O zu erreichen. Das Peptid konnte ebenfalls nur mit

einer schlechten Wiederfindungsrate isoliert werden.^[179] Um eine vollständige Abspaltung von Phacm und eine bessere Wiederfindung des Peptids zu ermöglichen, wurden verschiedene Ag^I- und Hg^{II}-vermittelte Methoden zur Entschützung der Phacm-tragenden Cysteine am EPO 29-67 Hydrazid **21e** getestet (Abbildung 33). Dafür wurde das Peptid unter den in Tabelle 3 aufgeführten Bedingungen umgesetzt und das Metall mit DTT als Thiolatkomplex ausgefällt. Das Peptid wurde anschließend durch Gelpermeationschromatographie isoliert und die Produkte per HPLC-MS analysiert. Die Produktverhältnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Experimente zur Ag^I- und Hg^{II}-vermittelten Phacm-Abspaltung bei **21e** und Produktverhältnisse nach HPLC-MS Analyse.

Exp.	c(Peptid) [mM]	c(AgOAc) [mM]	eq. (Ag ^I)	Lösungsmittel	<i>T</i>	<i>t</i> [h]	Produktverhältnisse 22a,b:22c,d
1	0.2	20	100	AcOH/H ₂ O (1:1)	RT	17	0 : 100
Exp.	c(Peptid) [mM]	c(Hg(OAc) ₂) [mM]	eq. (Hg ^{II})	Lösungsmittel	<i>T</i>	<i>t</i> [h]	Produktverhältnisse 22a,b:22c,d
2	0.2	20	100	AcOH/H ₂ O (1:1)	RT	19	48:52
3	0.2	40	200	AcOH/H ₂ O (1:1)	RT	19	58:42
4	0.2	40	200	AcOH/H ₂ O (1:1)	30 °C	19	63:37
5	0.2	40	200	AcOH/H ₂ O (1:1)	RT	72	55:45
6	0.2	40	200	AcOH/H ₂ O (1:1)	30 °C	72	53:47
7	0.2	60	300	AcOH/H ₂ O (1:1)	RT	24	71:29
8	0.2	80	400	AcOH/H ₂ O (1:1)	RT	24	72:28
9	0.2	80	400	AcOH/H ₂ O (1:1)	RT	72	73:27
10	0.2	40	200	AcOH/H ₂ O/EtOH/ <i>p</i> -Me-Anisol (21:21:6:2)	RT	24	52:48
11	0.2	40	200	AcOH/H ₂ O/Glycerin/ <i>p</i> -Me-Anisol (22:22:4:2)	RT	24	36:64
12	2.0	40	20	AcOH/H ₂ O (1:1)	RT	24	50:50
13	10	24	2.4	TFA/ <i>p</i> -Me-Anisol (95:5)	RT	17	88:12
14	10	30	3	TFA/ <i>p</i> -Me-Anisol (95:5)	RT	17	90:10
15	10	40	4	TFA/ <i>p</i> -Me-Anisol (95:5)	RT	17	85:15
16	10	80	8	TFA/ <i>p</i> -Me-Anisol (95:5)	RT	17	90:10

Es zeigte sich, dass AgOAc in 90 % AcOH/H₂O schwer löslich ist und eine gute Löslichkeit erst mit einem Wasseranteil von 50 % gewährleistet ist. Daher wurden die Entschützungen von **21e** in 50 % AcOH/H₂O durchgeführt (Exp. 1). Unter diesen Bedingungen war es möglich quantitativ eine der beiden Phacm-Gruppen zu entfernen. (Abbildung 34a). Ob die Schutzgruppe von Cys29 oder Cys33 abgespalten wurde, konnte nicht festgestellt werden.

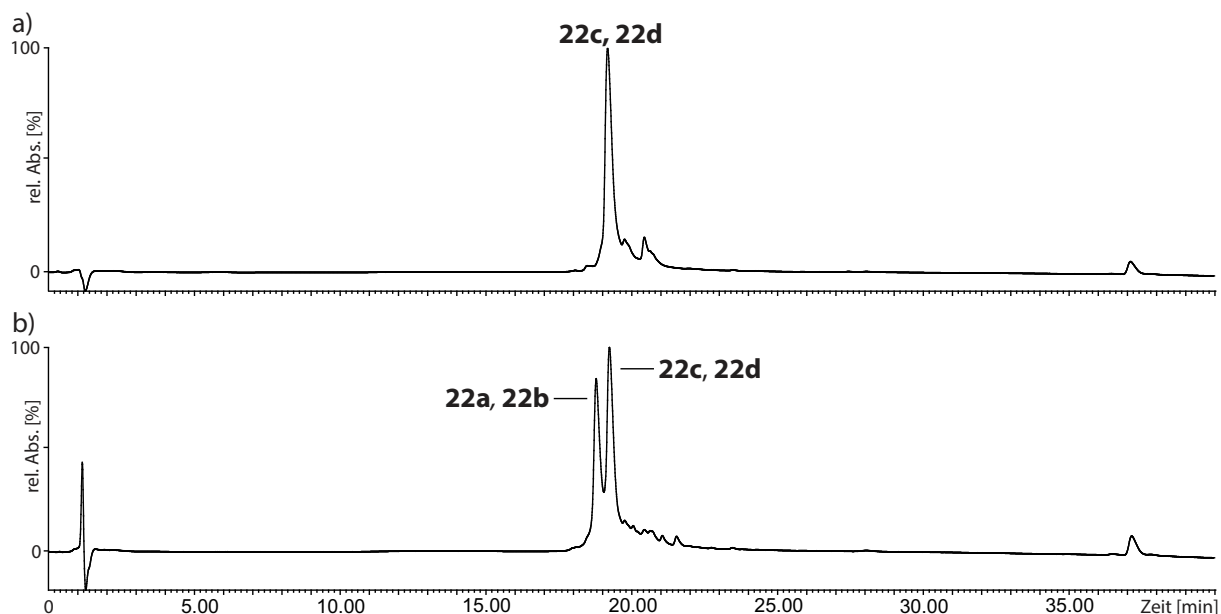


Abbildung 34: a) HPLC Chromatogramm der Übergangsmetall-vermittelten Abspaltung von Phacm von **21e** mit AgOAc (vgl. Tabelle 3, Exp. 1), b) mit Hg(OAc)₂ (vgl. Tabelle 3, Exp. 2).

Da die zweite Phacm-Gruppe mit AgOAc nicht entfernt werden konnte, wurde das gleiche Experiment mit Hg(OAc)₂ durchgeführt (Exp. 2). Dabei konnte der zweite Phacm-Rest zu 48 % entfernt werden (Abbildung 34b). Bei allen Versuchen wurde auch teilweise eine Desallylierung von Asp38 beobachtet. Ausgehend von Experiment 2 wurde durch Variation der in Tabelle 1 aufgeführten Parameter versucht, eine vollständige Abspaltung beider Phacm-Gruppen zu erreichen. Nachdem die Versuche 4-12 in wässriger Essigsäure und unter Zusatz verschiedener Additive^[182] zu keinem befriedigenden Ergebnis führten, wurde in den Experimenten 13-16 eine Entschützung in TFA/*p*-Me-Anisol (95:5) mit erheblich weniger Äquivalenten an Hg(OAc)₂ durchgeführt.^[183] Dabei konnte im Vergleich zu allen vorherigen Versuchen mit 2.4 eq Hg(OAc)₂ das beste Ergebnis erzielt werden (Exp. 13, Abbildung 35). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine der beiden Phacm-Gruppen

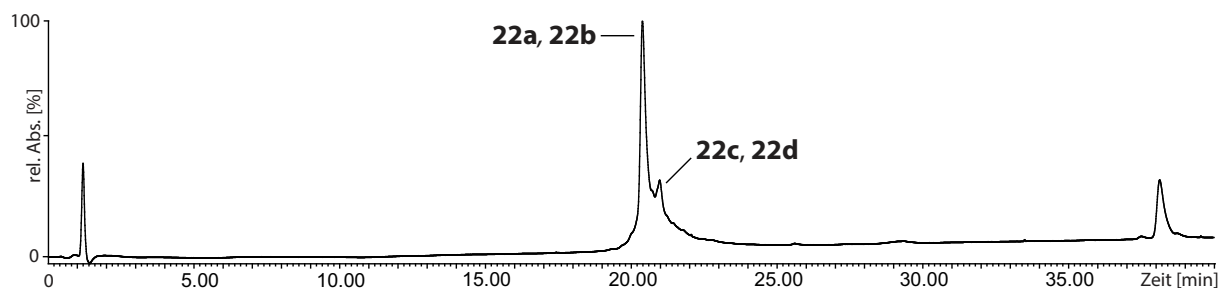


Abbildung 35: HPLC Chromatogramm der mit Hg(OAc)₂ in TFA/*p*-Me-Anisol (Exp. 13) durchgeführten Abspaltung von Phacm bei **21e**.

des Hydrazids EPO 29-67 **21e** stabiler ist. Diese lässt sich mit AgOAc nicht und mit Hg(OAc)₂ nicht vollständig entfernen. Eine effiziente Synthese von 3-fach glycosyliertem Erythropoietin ist mit einer Phacm Schutzgruppenstrategie nicht sinnvoll.

5.2 Synthese und Ligation von S-tritylierten EPO Glycopeptiden

Nachdem sich die Thiolschutzgruppen des Acetamidomethyl-Typs für die Synthese von EPO nicht bewährten, wurde eine alternative Schutzgruppenstrategie für das Glycopeptidhydrazid EPO 29-67 gesucht. Als Tritylthioether geschützte Cysteine sollten alle Ansprüche erfüllen.

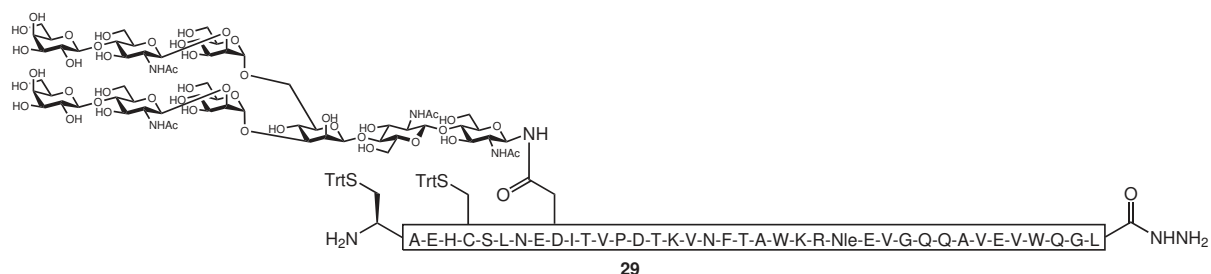


Abbildung 36: S-Trityl-geschütztes Glycopeptidhydrazid EPO 29-67 **29**.

Diese Schutzgruppe ist mit den Bedingungen einer metallfreien radikalischen Entschwefelung kompatibel.^[184] S-Tritylgruppen sind gegenüber Pd-Katalysatoren stabil und können leicht durch Säure entfernt werden.^[176,185] Daher werden Tritylthioether bei der Entschützung des Peptids mit TFA entfernt. Es ist jedoch möglich Thiole von ungeschützten Peptiden unter Verwendung von Triphenylmethanol und Säuren selektiv zu tritylieren.^[184,186] Zur Synthese des

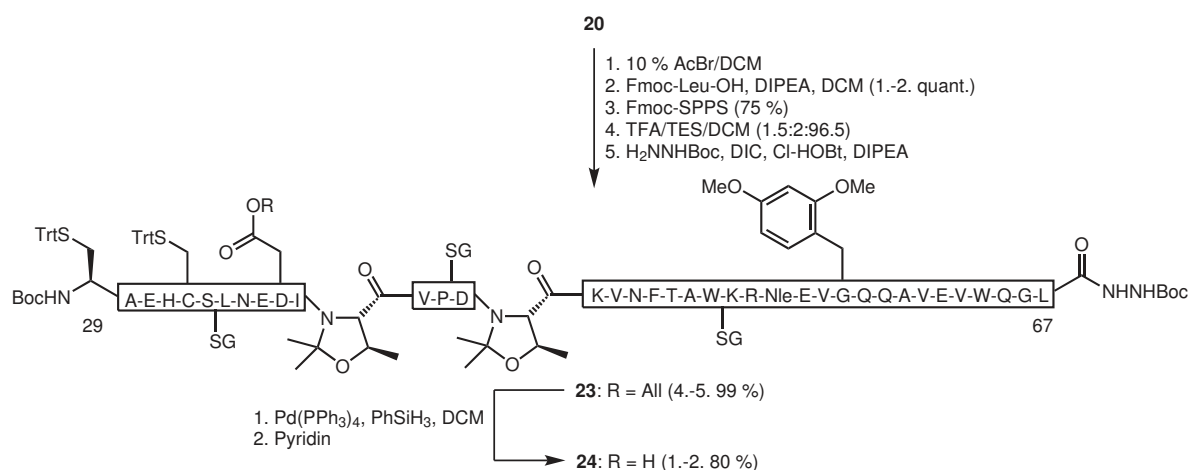


Abbildung 37: Synthese des EPO 29-67 Hydrazids **24**.

an Cys29 und Cys33 tritylierten Glycopeptidhydrazids EPO 29-67 **23** (Abbildung 36) wurde das Hydrazid **23** aufgebaut (Abbildung 37). Dies erfolgte unter analogen Bedingungen zur Synthese von Hydrazid **21** unter Verwendung von Tritylschutzgruppen an Cys29 und Cys33.

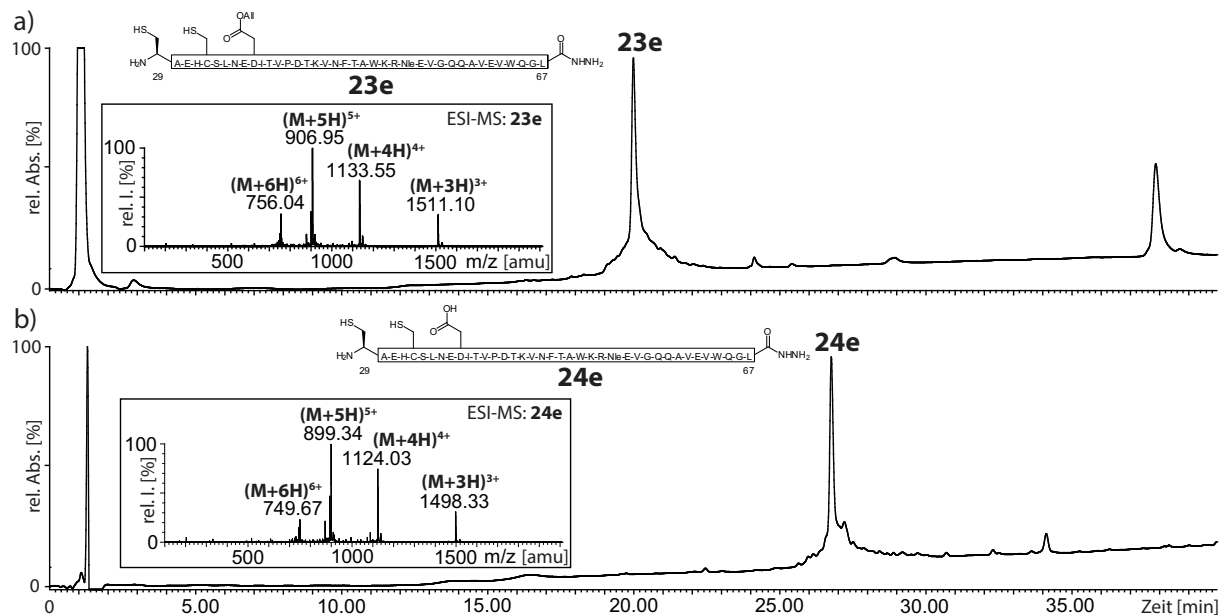


Abbildung 38: HPLC-MS der entschützten Hydrazide **23e** (a) und **24e** (b).

Die Synthese gelang in guten Ausbeuten und mit guter Reinheit (Abbildung 38a). Bei der folgenden Desallylierung zum Hydrazid **24** (Abbildung 38b) wurde beobachtet, dass die Tritylgeschützten Cysteine einen positiven Einfluss auf die Löslichkeit von **23** in DCM haben (Peptidkonzentration von 5 mM). Neben der Synthese von **24** über einen Allylester wurde die Verwendung des Phenylisopropylesters an Asp38 getestet (Abbildung 39). Hierfür wurde das Peptid analog zu **23** an der Festphase aufgebaut. Der Phenylisopropylester (Phipr) ermöglicht

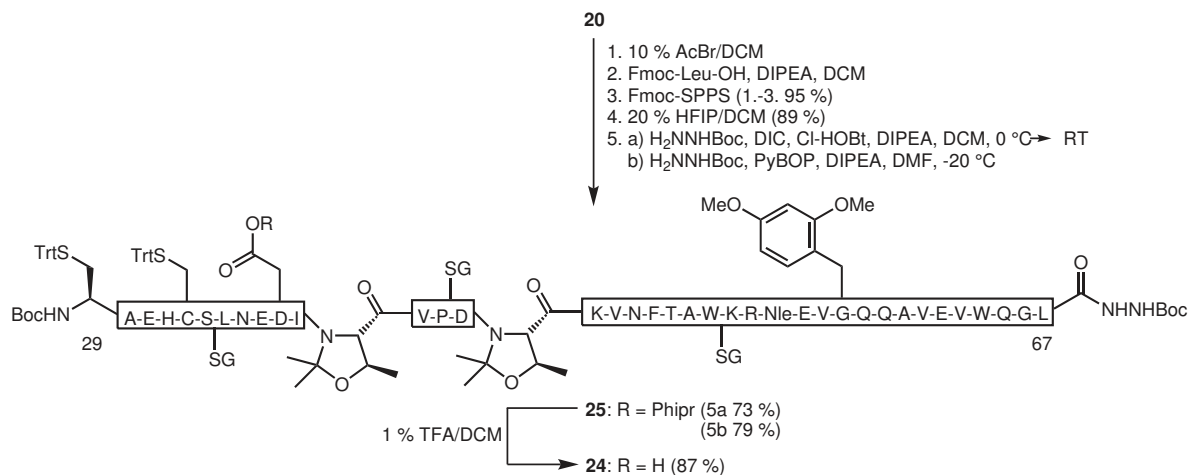


Abbildung 39: Synthese des Hydrazids EPO 29-67 **24** über selektive Esteracidolyse von **25**.

eine selektive Entschützung des Aspartats durch milde Säure, was von MARKUS HESSEFORT gezeigt werden konnte.^[187,188] Die Abspaltung der geschützten Peptidylsäure von der Festphase erfolgte mit 20 % HFIP/DCM, da der Phenylisopropylester bereits bei 1 % TFA in DCM instabil ist. Die Peptidylsäure wurde nach zwei Methoden zum Hydrazid **25** umgesetzt. Zum einen wurde dies mit DIC, Cl-HOBt und DIPEA in DCM bei 0 °C → RT,^[189] zum anderen mit PyBOP und DIPEA in DMF bei -20 °C durchgeführt.^[120] Beide Varianten ergaben ähnliche Ausbeuten (73 % und 79 %).

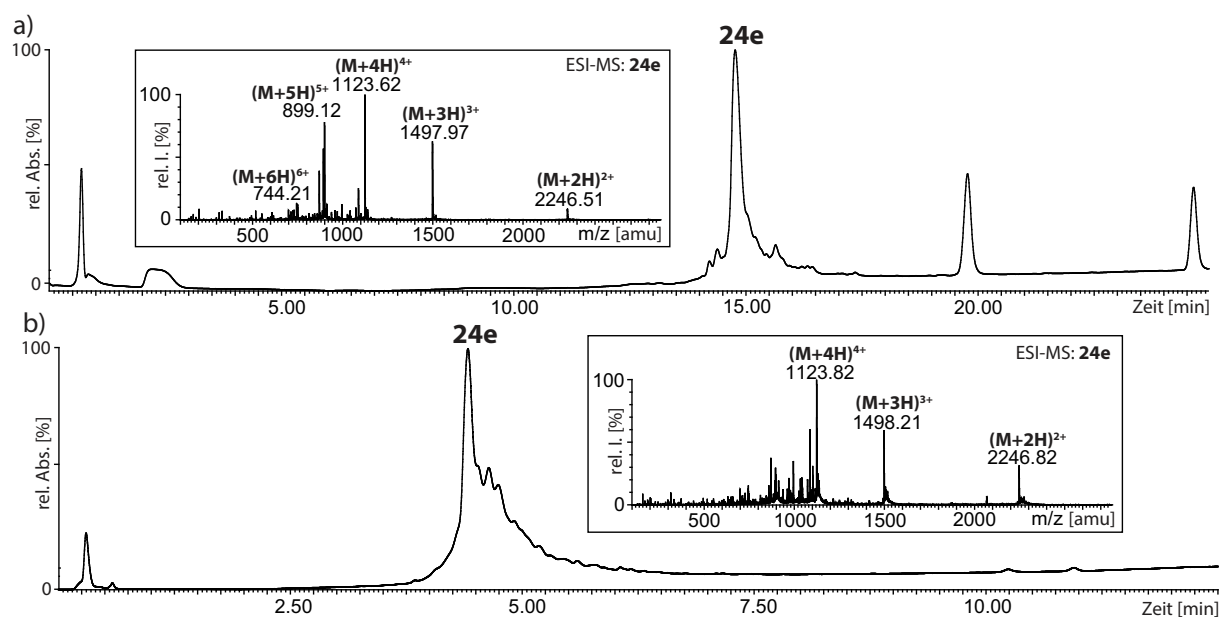


Abbildung 40: HPLC-MS des EPO 29-67 Hydrazids **24e**: a) Synthese durch DIC/HOBt-Kupplung, b) Synthese durch PyBOP-Kupplung.

Bei der Verwendung von PyBOP wurde jedoch eine geringere Qualität des Peptids gefunden (Abbildung 40). Außerdem war bei dieser Methode neben der Reinigung durch Flash-chromatographie eine wässrige Aufarbeitung nötig, um Reste von PyBOP zu entfernen. Das durch DIC/Cl-HOBt-Kupplung gewonnene Produkt **25** wurde im Anschluss mit 1 % TFA/DCM selektiv an Asp38 entschützt. Nach der Entfernung von TFA durch wässrige Extraktion konnte das Hydrazid **24** mit 87 % Ausbeute gewonnen werden.

Mit **24** wurde im Anschluss die Kupplung eines komplexen biantennären Nonasaccharids untersucht. Hierfür wurde das Nonasaccharidazid **26**^[190,191] mit 1,3-Propandithiol zum Nonasaccharidamin **27** umgesetzt (Abbildung 41).^[192] Für die Glycokupplung wurde das EPO 29-67 Hydrazid **24** mit HATU, HOAt und DIPEA in DMF/DMSO (1:1) aktiviert. Das Glycopeptidhydrazid wurde in Gegenwart von 50 eq Cystein in TFA/TES/H₂O (96:2:2) entschützt (Abbildung 41). Cystein wird zugegeben, um Aldehydverunreinigungen abzufangen

und das Peptid mit freiem N-terminalem Cystein zu erhalten. Nach Reinigung durch RP-HPLC wurde das EPO 29-67 Glycopeptidhydrazid **28** erhalten.

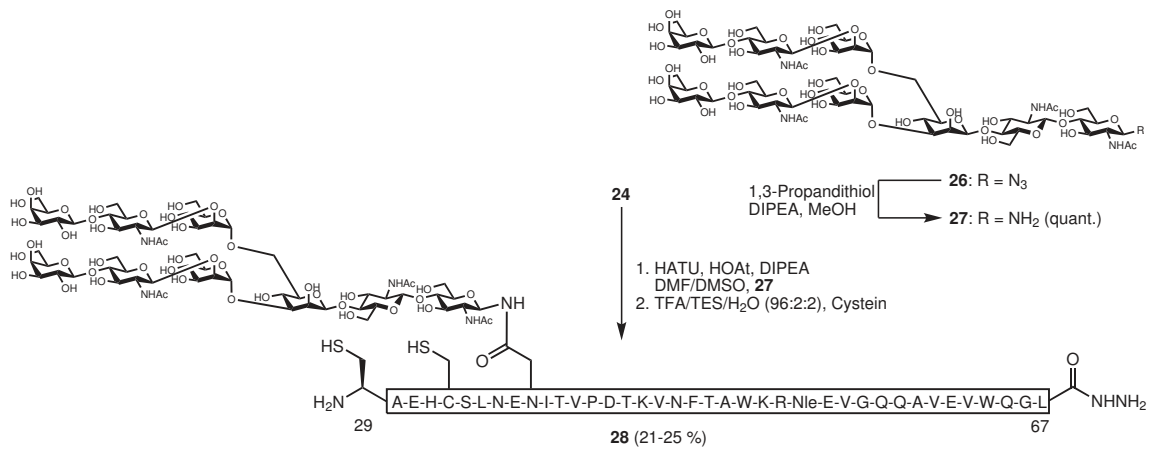


Abbildung 41: Synthese des EPO 29-67 Glycopeptidhydrazids **28**.

Die Synthese von **28** wurde sowohl mit dem durch Desallylierung, als auch mit dem durch Abspaltung der Phipr-Gruppe erhaltenen Peptid **24** durchgeführt (Abbildung 42a/b). Im ersten

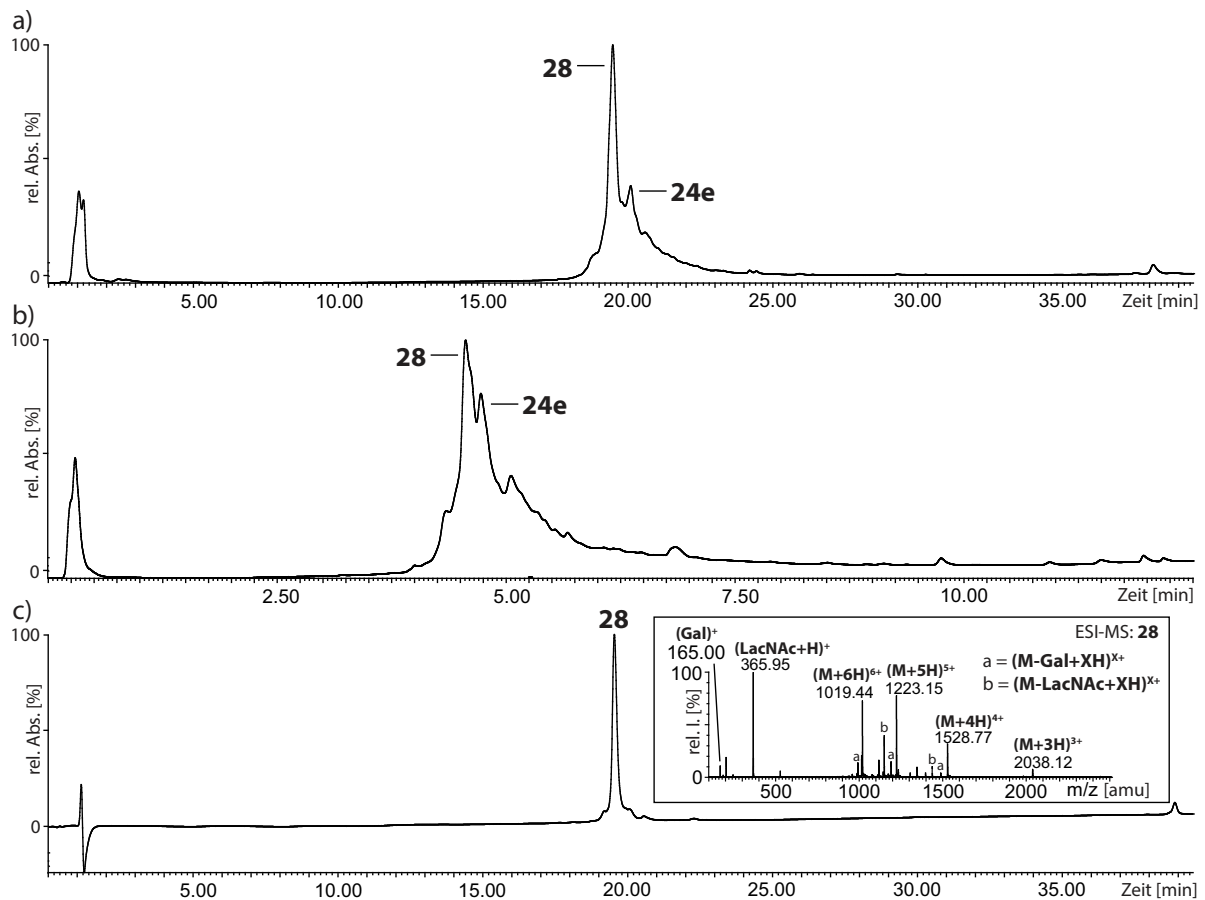


Abbildung 42: a) HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **28** ausgehend von Edukt **24** (erhalten durch Desallylierung), b) Edukt **24** (erhalten durch Acidolyse des Phipr-Esters). c) HPLC-MS Analyse von **28** nach RP-HPLC Reinigung.

Im ersten Fall wurden 25 % Ausbeute erhalten, im zweiten Fall 21 %. Außerdem wurde die Synthese sowohl mit 1.5 eq als auch mit 1.0 eq Nonasaccharidamin **27** (bezogen auf Peptid **24**) durchgeführt. Bei äquimolaren Mengen sank die Ausbeute von 25 % auf 16 %. In allen Fällen konnte **28** in vergleichbarer Reinheit erhalten werden (Abbildung 42c).

Das Glycopeptidhydrazid **28** sollte anschließend durch doppelte *S*-Tritylierung selektiv zu **29** umgesetzt werden (Abbildung 43). Dies wurde bisher nur an Peptiden ohne Modifikationen gezeigt.^[184,186] *S*-Tritylierungen können in TFA mit Triphenylmethanol durchgeführt werden, jedoch stehen in TFA Tritylierung und Detritylierung im Gleichgewicht.^[193,194] Daher wurde **28** zunächst in HFIP^[184] mit 2.5 eq Triphenylmethanol umgesetzt. In HFIP ist dieses Gleichgewicht zugunsten der tritylierten Verbindung verschoben. Die HPLC-MS Analyse des Rohproduktes ergab dabei (Abbildung 44a), dass neben dem gewünschten Produkt **29**, das Edukt **28**, eine Verbindung **29a**, die nur einen Tritylthioether trägt, und die Nebenprodukte **29b** und **29c** vorlagen, welche mehr als zwei Tritylgruppen aufwiesen. Histidin neigt neben Cystein zur Ausbildung einer stabilen Tritylierung in HFIP.^[184] Die zusätzlichen Tritylreste ließen sich nicht durch Zugabe von Ameisensäure oder Trifluoressigsäure selektiv entfernen.

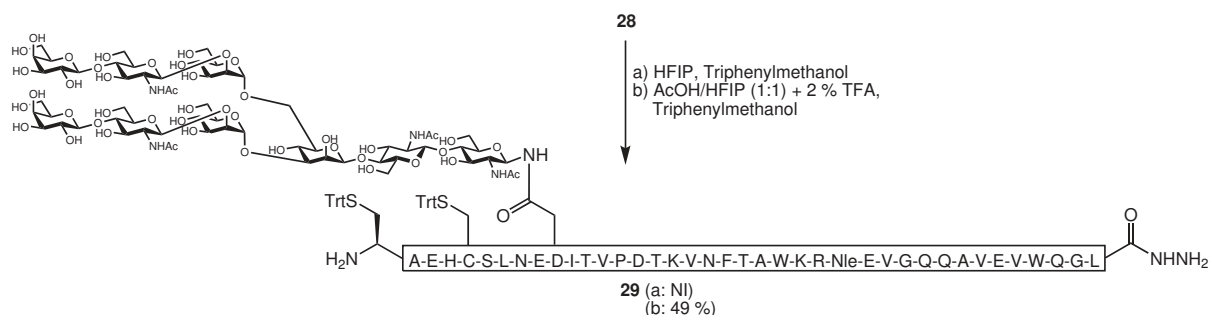


Abbildung 43: Synthese des *S*-tritylierten Glycopeptidhydrazids EPO 29-67 **29**.

Daraufhin wurde ein Gemisch aus AcOH/HFIP (1:1) + 2 % TFA^[186] mit unterschiedlichen Mengen Triphenylmethanol getestet. Das beste Ergebnis wurde mit 3.5 eq Triphenylmethanol erreicht (Abbildung 44b). Nach 2.5 h Reaktionszeit war keine überschüssige Tritylierung detektierbar. Bei einer Reaktionskontrolle durch LC-MS konnte allerdings festgestellt werden, dass diese zunächst ebenso gebildet werden, jedoch danach wieder zerfallen.

Das tritylierte Glycopeptid wurde zunächst mit Diethylether aus dem Reaktionsgemisch ausgefällt und gewaschen. Danach war es jedoch nicht möglich den Rückstand in MeCN/H₂O + 0.1 % TFA zu lösen und per RP-HPLC zu reinigen. Engt man das Reaktionsgemisch im Vakuum ein und versucht das Rohprodukt danach zu lösen, gelangt man zu einem identischen Ergebnis. Um das Glycopeptidhydrazid **29** in Lösung zu halten, wurde die Reaktionsmischung

schnell mit der 36-fachen Menge an 30 % MeCN/H₂O verdünnt. Auf diese Weise blieben die Tritylthioether stabil und das Glycopeptid konnte direkt durch RP-HPLC gereinigt werden. Auf Grund der hydrophoben Eigenschaften der Tritylgruppen konnte mit einer C₄-RP-HPLC Säule (YMC Protein RP 10 x 150 mm) eine bessere Trennung als mit einer C₁₈-RP-HPLC-Säule (YMC Hydrosphere C₁₈ 10 x 150 mm) erreicht werden. Das zweifach *S*-tritylierte Glycopeptidhydrazid **29** konnte in einer Ausbeute von 49 % erhalten werden (Abbildung 44c).

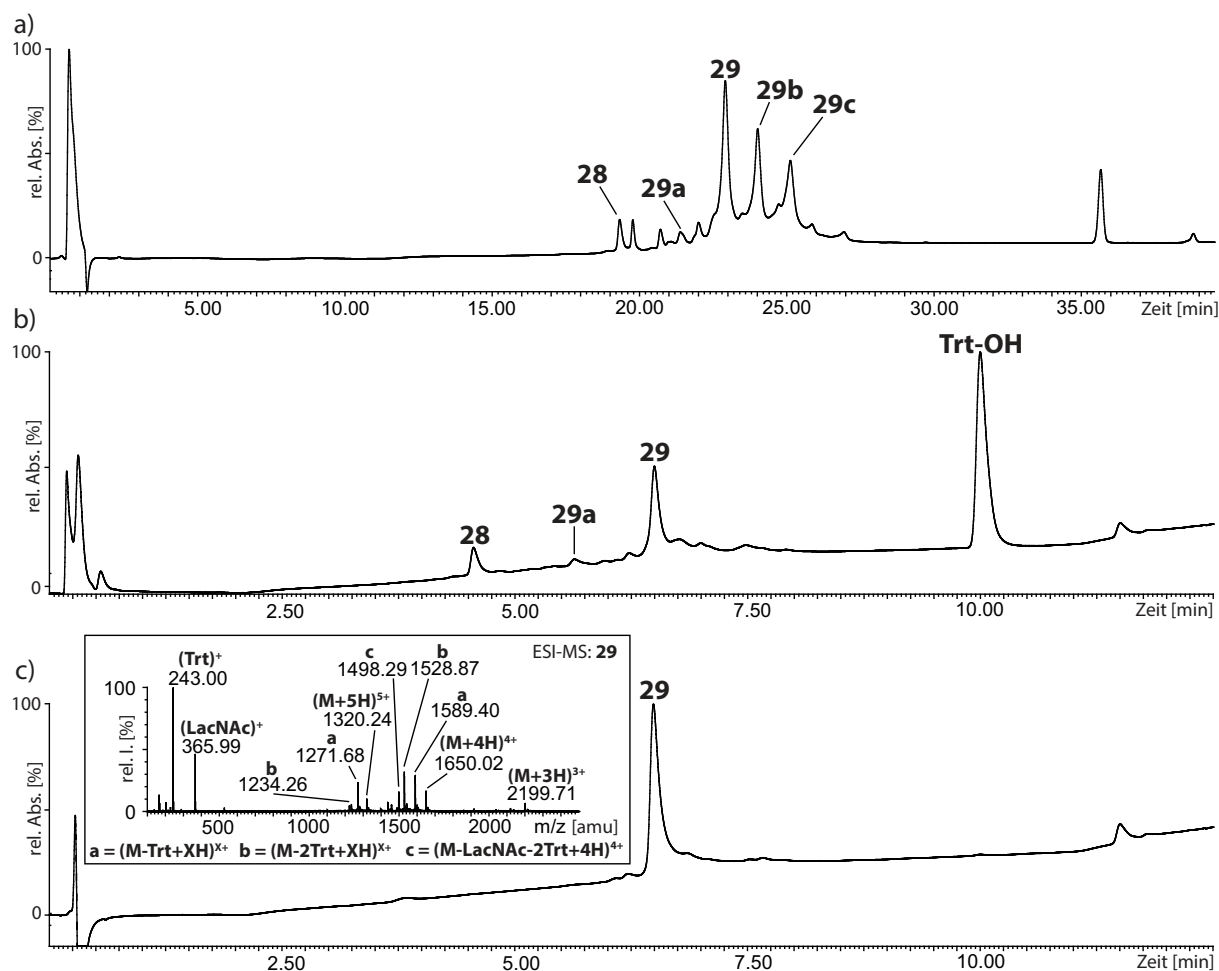


Abbildung 44: a) HPLC-Chromatogramme der Tritylierung des EPO 29-67 Glycopeptidhydrazids **28** in HFIP, b) in AcOH/HFIP (1:1) + 2 % TFA. c) HPLC-MS des Produkts **29** nach HPLC Reinigung.

Um die Gesamtausbeute an **29** zu steigern, wurde die Tritylierung auch ausgehend von dem Rohprodukt **28** versucht (Daten nicht gezeigt). Problematisch hierbei war die geringe Löslichkeit des Rohprodukts nachdem mit MeCN/H₂O verdünnt wurde. Eine Reinigung des löslichen Anteils über eine C₄-RP-HPLC Säule (YMC Protein RP 10 x 150 mm) gelang in diesem Fall nicht.

Um die Ligation zum Fragment EPO 29-97 zu ermöglichen, wurde das *S*-tritylierte EPO 29-67 Glycopeptidhydrazid **29** zum Thioester **30** umgesetzt (Abbildung 45). Hierfür wurde das

Hydrazid mit NaNO_2 in 6 M GdmCl (pH 4) bei -24°C in das Acylazid überführt und durch Zugabe von 4-(Mercaptomethyl)benzoesäure (MMBA) bei pH 6-7 zum Thioester **30** umgesetzt.^[195]

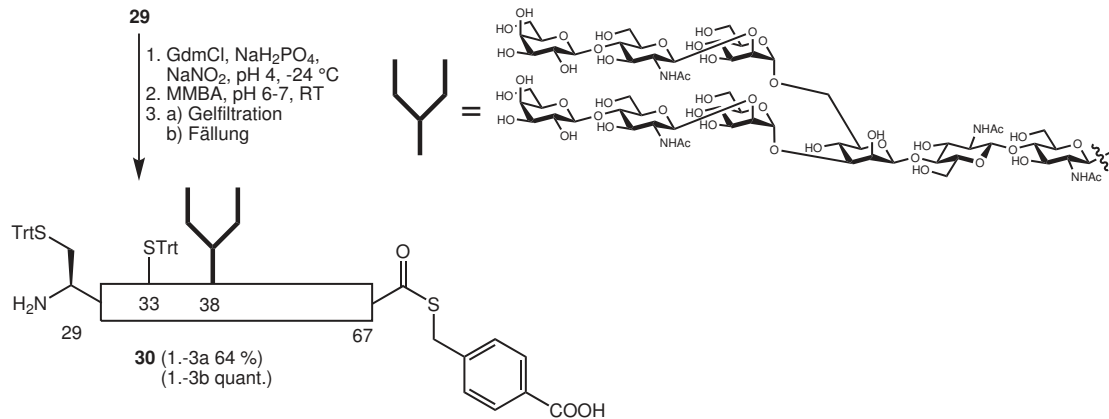


Abbildung 45: Synthese des Thioesters EPO 29-67 (STrt, STrt) **30**.

Das tritylierte Hydrazid **29** konnte problemlos in 6 M GdmCl gelöst werden. Nach der Zugabe von MMBA konnte eine zunehmende Trübung der Lösung beobachtet werden. Die geringere Löslichkeit des Produkts **30** liegt möglicherweise an den hydrophoben Tritylgruppen in Kombination mit dem C-terminalen Aromaten. Eine vollständige Löslichkeit des Präzipitats war in 50 % MeCN/H₂O nur in großer Verdünnung möglich. Das Produkt wurde durch Gelfiltration (Superdex Peptide 10/300 GL) isoliert. Dies gelang jedoch nur in einer Ausbeute von 64 %, was auf die schlechte Löslichkeit zurückgeführt wurde.

Um Verluste auf dieser Stufe möglichst gering zu halten, wurde der hydrophobe Thioester **30** ausgefällt. Dazu wurde die Reaktionslösung von 6 M GdmCl mit einem Phosphatpuffer (pH 6.5) auf 0.75 M GdmCl verdünnt. Dieser Puffer wurde verwendet, um pH-Schwankungen zu vermeiden und die Löslichkeit von überschüssigem MMBA zu gewährleisten. Nach zweimaligem Waschen mit Phosphatpuffer wurde das präzipitierte Produkt dreimal

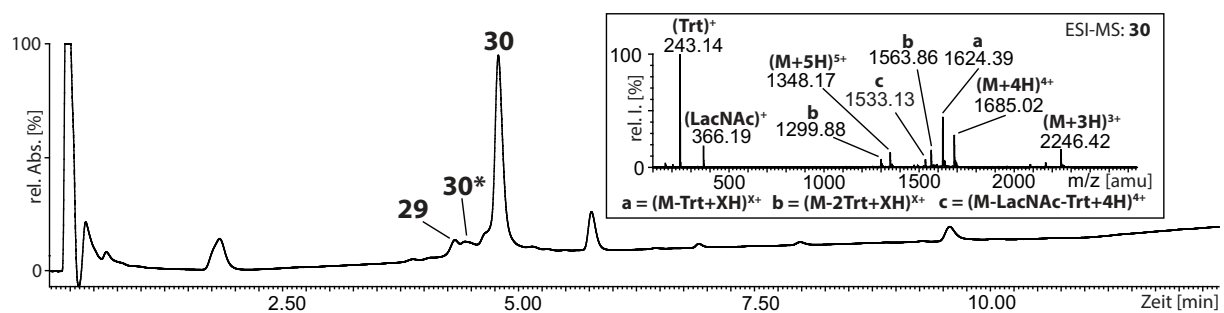


Abbildung 46: HPLC-MS des durch Fällung isolierten S-tritylierten Glycopeptidthioesters **30**.

mit $\text{H}_2\text{O} + 0.1\% \text{ HCOOH}$ gewaschen, um restliche Salze zu entfernen. Der *S*-tritylierte Glycopeptidthioester EPO 29-67 **30** konnte auf diese Weise in quantitativer Ausbeute isoliert werden (Abbildung 46). Die Produkte beider Aufarbeitungsvarianten zeigten neben dem gewünschten Thioester **30** geringe Mengen an Edukt **29** und zur freien Säure **30*** hydrolysierten Thioester. Als Ligationspartner für **30** wurde das EPO 68-97 Glycopeptidhydrazid **31** (dargestellt von ELISABETH ROZANSKI) eingesetzt (Abbildung 47).^[196] Dieses Fragment trägt ein biantennäres komplexes *N*-Glycan und die Seitenkette des C-terminalen Lysins ist mit der photolabilen Schutzgruppe 6-Nitroveratryloxycarbonyl (NVOC) versehen. Diese sollte eine Cyclisierung zum ϵ -Caprolactam während der Umsetzung des C-terminalen Hydrazids zum Thioester verhindern und kann photochemisch oder unter den Bedingungen einer radikalischen Entschwefelung entfernt werden.^[197]

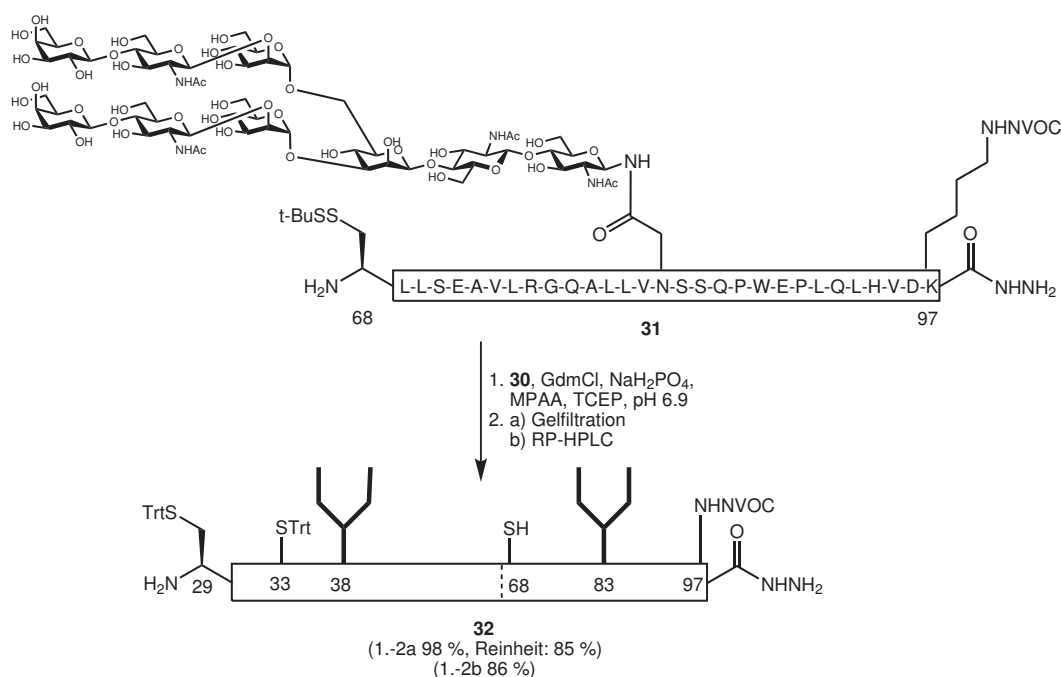


Abbildung 47: Ligation zum EPO 29-97 Glycopeptidhydrazid **32**.

Die Ligation wurde mit leichtem Überschuss an Thioester **30** im Ligationspuffer (8 M GdmCl, 100 mM NaH_2PO_4 , 100 mM MPAA, 5 mM TCEP, pH 6.9) durchgeführt. Nach 22 h konnte laut HPLC-MS eine vollständige Umsetzung erreicht werden (Abbildung 48a). Das Rohprodukt wurde durch Gelfiltration (Superdex Peptide 10/300 GL) oder durch RP-HPLC (Supelco Bio Wide Pore C5 150 x 4.6 mm) gereinigt. Nach Gelfiltration wurde **32** in einer Ausbeute von 98 % und einer Reinheit von 85 % erhalten (Abbildung 48b), da die Reste des überschüssigen Thioesterfragments nicht abgetrennt werden konnten. Bei einer Reinigung per RP-HPLC wurde **32** in hoher Reinheit und mit 86 % Ausbeute erhalten (Abbildung 48c).

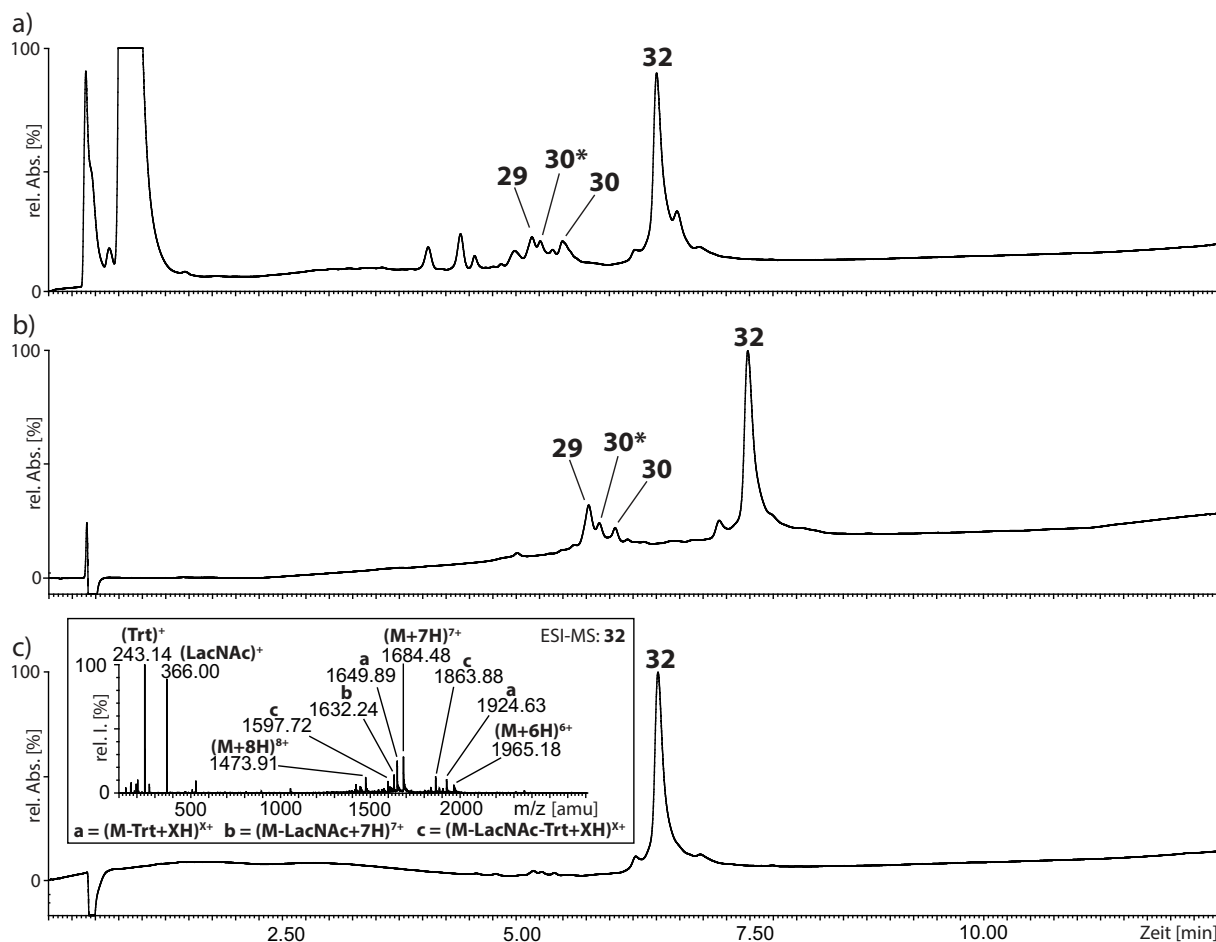


Abbildung 48: a) HPLC-Chromatogramm der Ligation zu dem EPO 29-97 Glycopeptidhydrazid **32**, b) HPLC-Chromatogramm des durch Gelfiltration isolierten Produkts **32**, c) HPLC-MS des HPLC-gereinigten Produkts **32**.

Diese Ligation wurde mehrmals in einem kleinen Maßstab (0.5 mg **30** + 0.4 mg **31**) durchgeführt. Ein größerer Maßstab (2.9 mg **30** + 2.1 mg **31**) führte jedoch zu einem in 55 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA schwer löslichen Ligationsprodukt. Dies konnte zwar mit 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gefällt werden, es konnte allerdings keine zufriedenstellende

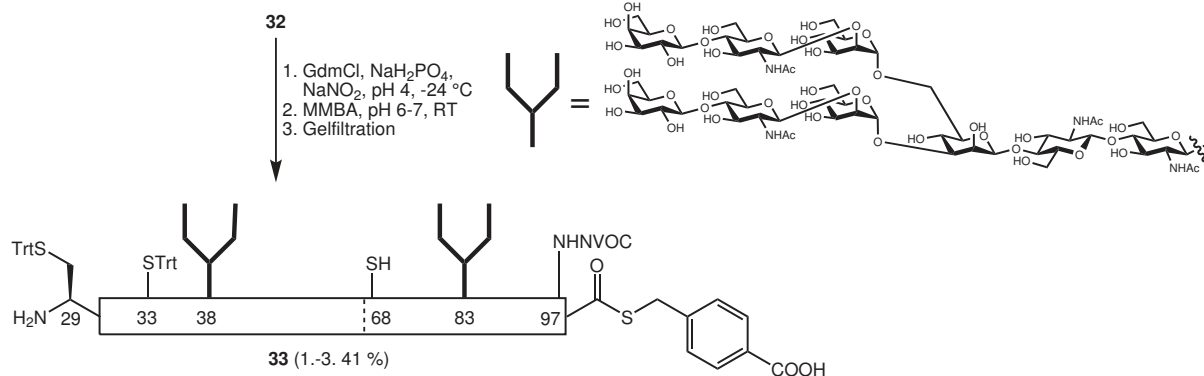


Abbildung 49: Synthese des EPO 29-97 (STrt, STrt, SH, NHNVOC) Glycopeptidthioesters **33**.

Reinigung erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Grund für diese schwierige Übertragung auf einen größeren Maßstab sollten die hydrophoben Schutzgruppen (Trt, NVOC) des Ligationsprodukts **32** sein. Im nächsten Schritt wurde das durch Gelfiltration gereinigte Hydrazid **32** verwendet und analog zur Synthese von **30** zum MMBA-Thioester **33** umgesetzt (Abbildung 49). Ein Ausfällen des Thioesters **33** durch eine Verdünnung von 6 M GdmCl auf 0.75 M GdmCl gelang in diesem Fall nicht. Daher wurde der Thioester **33** durch Gelfiltration (Superdex Peptide 10/300 GL) gereinigt (Ausbeute 41 %) Das Produkt zeigte eine stark verzögerte Elution bei der Gelfiltration, die den Ausbeuteverlust bedingte. Der Thioester **33** zeigte keine C-terminale Lactambildung. Es waren lediglich die bereits im Edukt enthaltenen Verunreinigungen vorhanden (Abbildung 50).

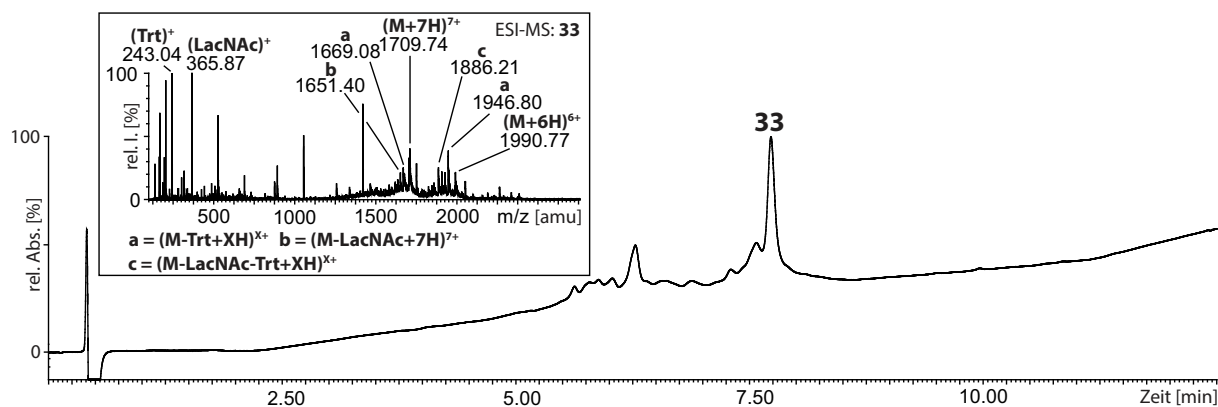


Abbildung 50: HPLC-MS des durch Gelfiltration isolierten Glycopeptidthioesters **33**.

Die Synthese des Erythropoietins mit Trityl-geschützten Fragmenten erscheint vorteilhaft, jedoch ist diese Gruppe sehr hydrophob. Dies erschwert Reaktionen in wässrigen Medien und Chromatographien in nicht vorhersehbarer Weise. Möglicherweise können die Löslichkeitsprobleme durch substituierte Tritylgruppen verbessert werden.

6 Synthese von Saposin D

Die prävalente Glycoform des Saposin D von GAUCHER-Patienten trägt ein pentamannosidisches *N*-Glycan.^[167] Welche Eigenschaften die Glycoformen aufweisen, ist nicht geklärt, da einheitliche Glycoformen von Saposin D bisher nicht zugänglich waren. Aus diesem Grund wurde eine auf nativer chemischer Ligation und anschließender Rückfaltung beruhende Synthesestrategie für homogene Glycoformen des humanen Saposins D entwickelt (Abbildung 51).^[198] Als Ligationsschnittstelle wurde Cys36 ausgewählt.^[199] Dies führt zu dem glycosylierten 1-35 Thioester **40** sowie dem 36-82 Fragment **42** mit N-terminalem Cystein. Die Cysteine beider Fragmente sollten durch gemischte Disulfide geschützt werden, um die Bildung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken während der Synthese zu verhindern.

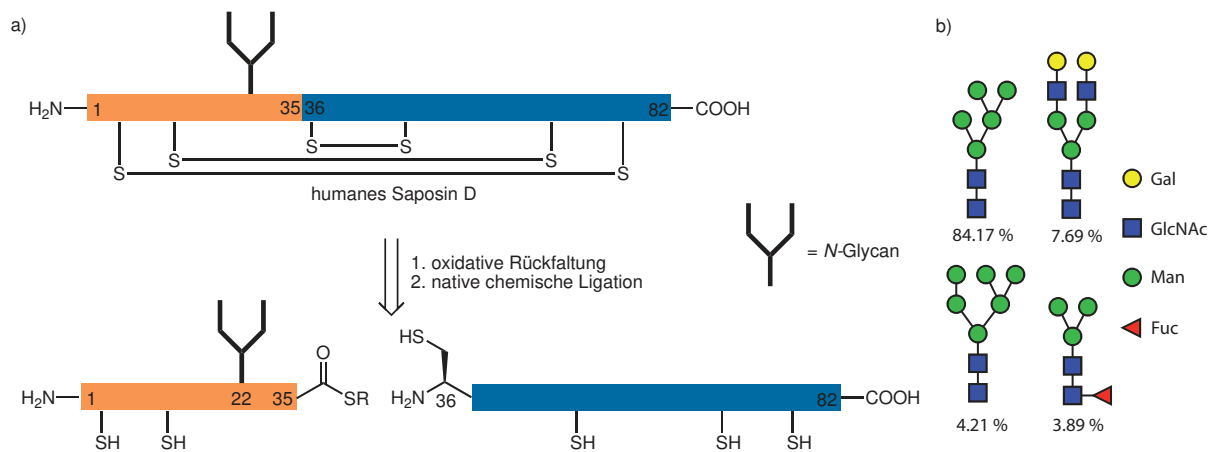


Abbildung 51: a) Retrosynthese von *N*-glycosyliertem humanem Saposin D, b) bei GAUCHER-Patienten gefundene *N*-Glycane von Saposin D.^[167]

6.1 Synthese von glycosylierten Saposin D 1-35 Thioestern

In ersten Versuchen zur Festphasensynthese von Saposin D 1-35 nach der Fmoc-Strategie an einem Polystyrol-Harz konnte das Zielpeptid auf manuellem Weg nicht erhalten werden. Dies wurde auf unvollständige Fmoc-Abspaltungen und Aminosäurekupplungen des hydrophoben Fragments zurückgeführt.^[200] Danach wurde die Synthese von Saposin D 1-35 durch racemisierungsfreie Festphasensegmentkondensation an den hydrophileren Trägerharzen ChemMatrix^[47] und PEGA versucht.^[123,201] Hiermit konnten die ersten Syntheseerfolge erzielt werden und daraufhin eine lineare Synthese von Saposin D 1-35 an ChemMatrix-Harz etabliert werden.^[202] Um die Synthese des Thioesters Saposin D 1-35 weiter zu verbessern, sollte die

Fmoc-SPPS mit anderen Schutzgruppen, sowie die konvergente Glycopeptidsynthese in Lösung untersucht werden.

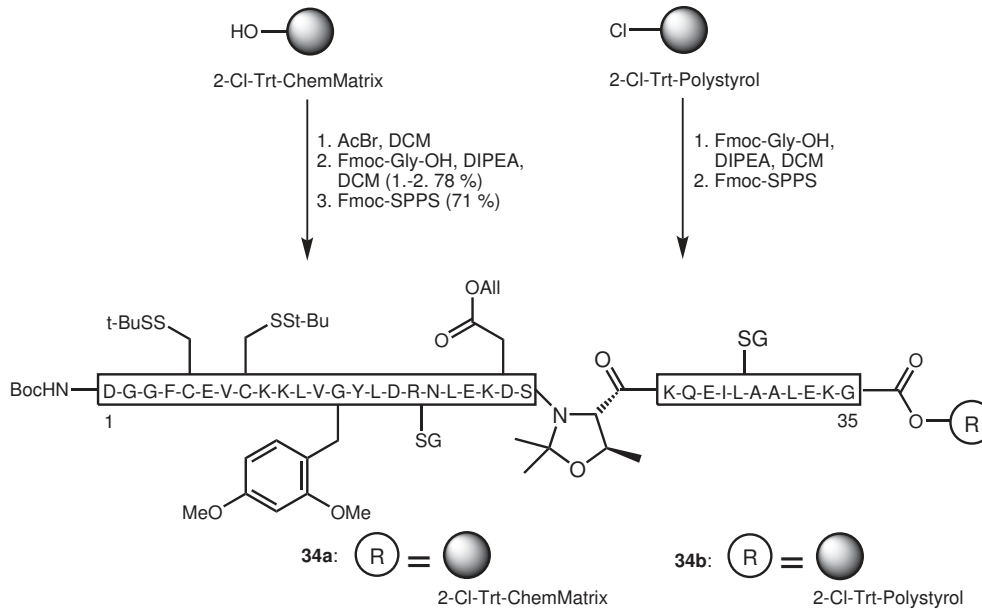


Abbildung 52: Fmoc-SPPS der Saposin D 1-35 Peptidylharze **34a** und **34b**.

2-Chlor-Trityl-ChemMatrix-Harz wurde hierfür mit Fmoc-Gly-OH beladen (78 %). In der Fmoc-SPPS wurde neben dem als Pseudoprolin geschützten Thr24^[66] eine 2,4-Dimethoxybenzylgruppe (Dmb) bei Gly13 verwendet. Beide verringern Aggregationen der Peptidkette.^[53,54] Um nach der Entschützung die Bildung unerwünschter Disulfide zu vermeiden, wurden Cys5 und Cys8 als gemischtes Disulfid verwendet. Mit dieser Strategie (Abbildung 52) gelang die Synthese des Peptidylharzes **34a** in guter Qualität, da neben der entschützten Peptidylsäure **34e** nur wenig Nebenprodukte detektiert wurden (Abbildung 53a). Bei dem Nebenprodukt **34***, wurde bei Asp22 ein Aspartimid gebildet. Im Fall von **34**** trat dies bei Asp1 oder Asp16 auf. Der Versuch dieses Nebenprodukt durch eine Dmb-Schutzgruppe an Gly2 zu vermeiden schlug fehl, da diese Schutzgruppe selbst nach mehrstündiger Behandlung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) nicht vollständig entfernt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Um einen Vergleich zwischen dem amphiphilen 2-Chlor-Trityl-ChemMatrix-Harz und dem hydrophoben 2-Chlor-Trityl-Polystyrol-Harz ziehen zu können, wurde die Festphasensynthese von Saposin D 1-35 mit den gleichen Bausteinen am Polystyrol-Harz durchgeführt. Überraschenderweise gelang die Synthese relativ gut, jedoch wurde eine geringere Qualität des Peptids erhalten (Abbildung 53b). Bei einem geringeren Anfangsbeladungsgrad (0.34 mmol/g bezogen auf Fmoc-Gly-2Cl-Trt-PS), der auch am ChemMatrix-Harz verwendet wurde, ist in

Kombination mit den optimierten Bausteinen die Synthese des schwierigen 1-35 Peptids auch am PS-Harz möglich

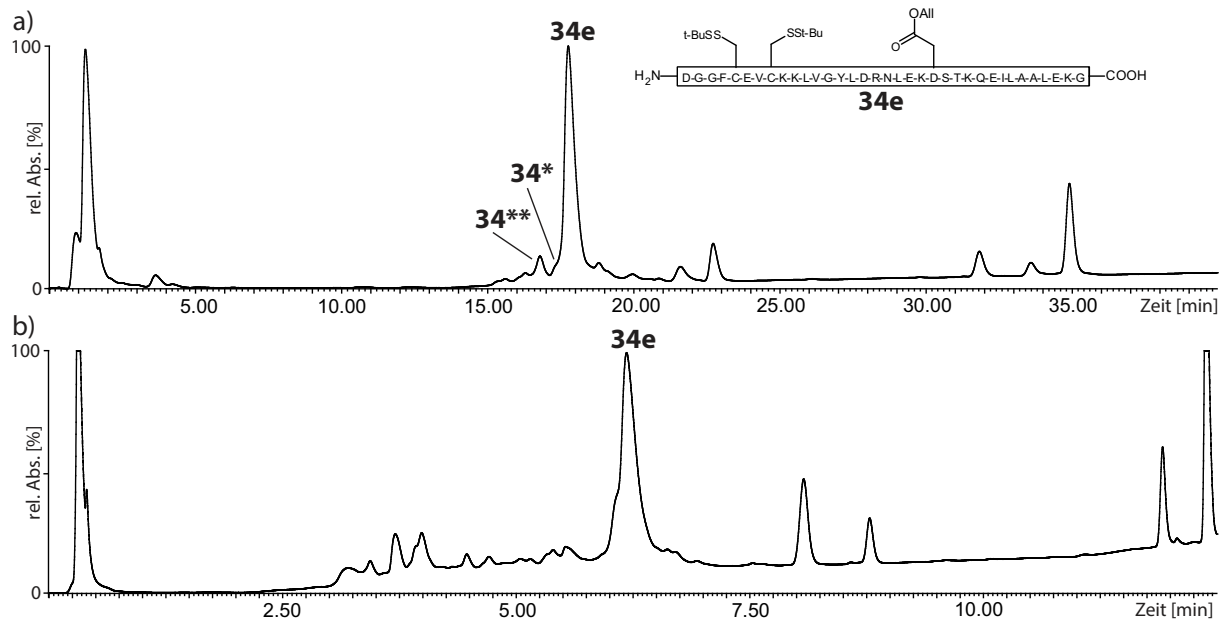


Abbildung 53: a) HPLC-Chromatogramm der Synthese des Peptidylharzes **34a** (\rightarrow **34e**), b) des Peptidylharzes **34b** (\rightarrow **34e**).

Da die Pseudoprolin-vermittelte LANSBURG-Aspartylierung von Saposin D 1-35 mit größeren *N*-Glycanen an der Festphase (2-Chlor-Trityl-ChemMatrix) nur zu geringen Ausbeuten führte,^[123] wurde die konvergente Glycopeptidsynthese in Lösung versucht. Dadurch ist eine Retention des Glycopeptids am Harz ausgeschlossen. Hierfür wurde von Harz **34a** die Peptidylsäure durch milde Acidolyse (TFA/TES/DCM 1.5:2:96.5) abgespalten. Das Peptid

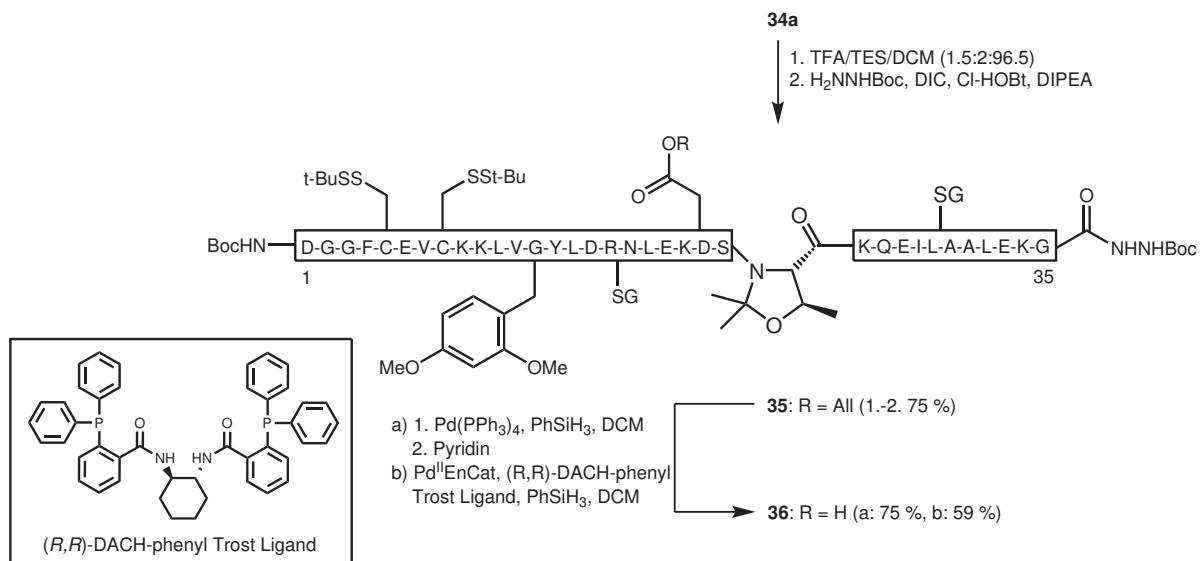


Abbildung 54: Synthese des Saposin D 1-35 Hydrazids **36**.

wurde *in situ* mit DIC, Cl-HOBt und H₂NNHBoc zum Saposin D 1-35 Hydrazid **35** umgesetzt (Abbildung 54). Nach Reinigung durch Flashchromatographie konnte **35** in einer Ausbeute von 75 % und in guter Qualität gewonnen werden (Abbildung 55).

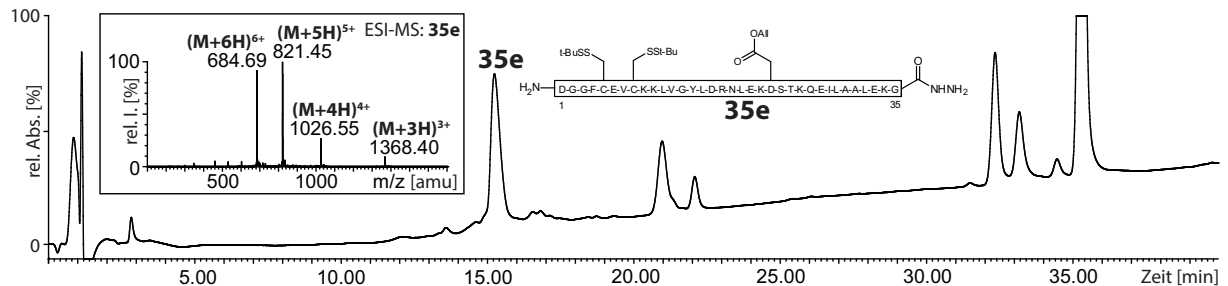


Abbildung 55: HPLC-MS des entschützten Saposin D 1-35 Hydrazids **35e**.

Das Hydrazid **35** wurde anschließend mit Pd(PPh₃)₄ und PhSiH₃ in DCM zum Hydrazid **36** desallyliert. Da das Peptid in DCM nur eine mäßige Löslichkeit aufweist, waren 0.5 eq Pd(PPh₃)₄ sowie eine Reaktionszeit von 5.5 h nötig. Versuche durch Zugabe von DMF die Löslichkeit zu verbessern, führten zu einer starken Nebenproduktbildung (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe von Pyridin nach beendeter Reaktion war nötig, da ansonsten verstärkt Oxidationsnebenprodukte gebildet wurden. Nach Reinigung durch Flashchromatographie wurde **36** in 83 % Ausbeute erhalten (Abbildung 56a). Die Desallylierung konnte ebenfalls mit festphasengebundenem Palladium (Pd^{II}EnCat), (*R,R*)-DACH-phenyl Trost Ligand und PhSiH₃

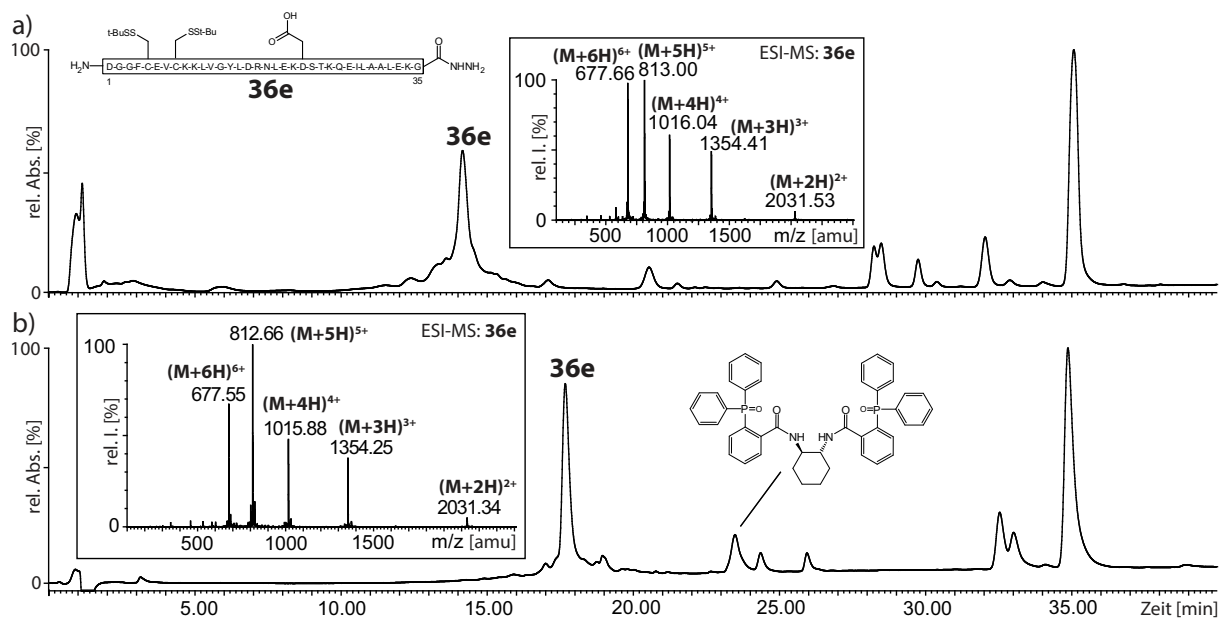
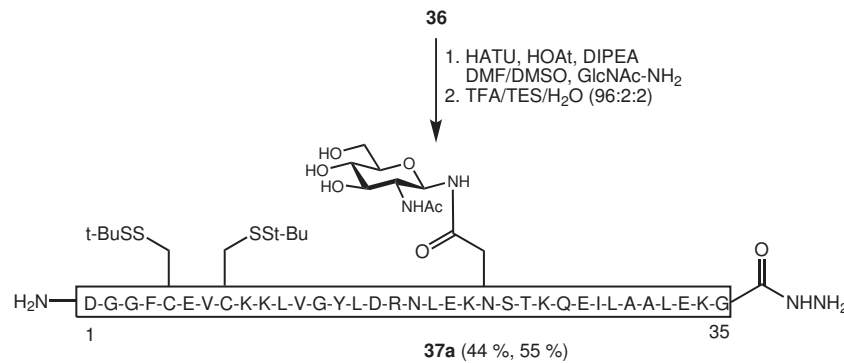


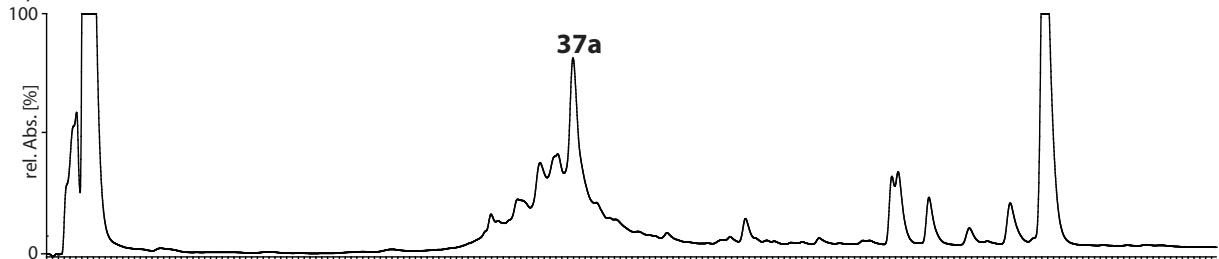
Abbildung 56: HPLC-MS des entschützten Saposin D 1-35 Hydrazids **36e**: a) Synthese mit Pd(PPh₃)₄, b) Synthese mit Pd^{II}EnCat.

in DCM durchgeführt werden.^[203] Pd^{II} wird *in situ* durch den Phosphin-Liganden zu Pd⁰ reduziert und bildet mit dem Liganden den reaktiven katalytischen Komplex.^[204] Eine Zugabe von Pyridin war hierbei nicht nötig. Nach Reinigung durch Flashchromatographie wurde **36** in lediglich 59 % Ausbeute erhalten, da das Hydrazid **36** und das Phosphinoxid des (*R,R*)-DACH-phenyl Trost Liganden nur schwer zu trennen waren. Daher blieb eine geringfügige Verunreinigung durch das Phosphinoxid zurück (Abbildung 56b).

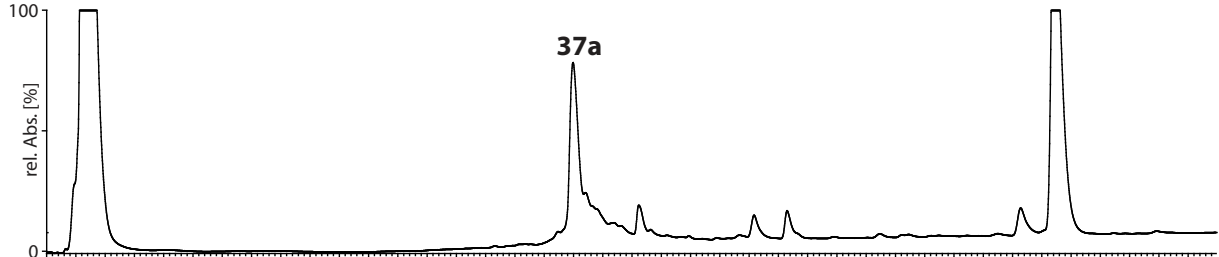
a)



b)



c)



d)

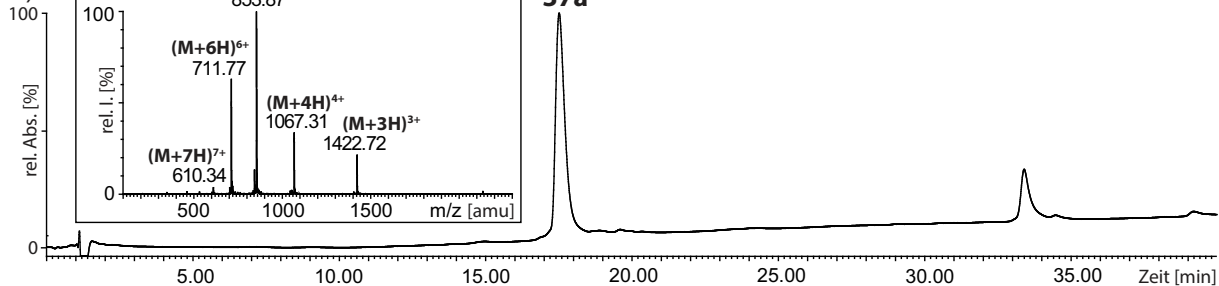


Abbildung 57: a) Synthese des Glycopeptidhydrazids Saposin D 1-35 **37a**, b) HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **37a** ausgehend von Hydrazid **36** (desallyliert mit Pd(PPh₃)₄), c) ausgehend von Hydrazid **36** (desallyliert mit Pd^{II}EnCat). d) HPLC-MS von dem HPLC-gereinigten Glycopeptidhydrazid **37a**.

Mit dem Hydrazid **36** wurden konvergente Glycopeptidsynthesen mit unterschiedlichen Zuckern durchgeführt. Zunächst wurde die Darstellung des Glycopeptids **37a** getestet (Abbildung 57a). Für die Kupplung von GlcNAc-NH₂ (2.5 eq) wurde **36** mit HATU, HOAt und DIPEA in DMF/DMSO (1:1) aktiviert. Nach der Reaktion wurde das Glycopeptidhydrazid mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) entschützt und durch RP-HPLC gereinigt. Die Glycopeptidsynthese wurde mit beiden Chargen des Hydrazids **36** (desallyliert mit Pd(PPh₃)₄ oder Pd^{II}EnCat) durchgeführt. In beiden Fällen konnte **37a** in vergleichbarer Qualität (Abbildung 57) erhalten werden, wobei Erstere eine Ausbeute von 44 % und letztere von 55 % ergab.

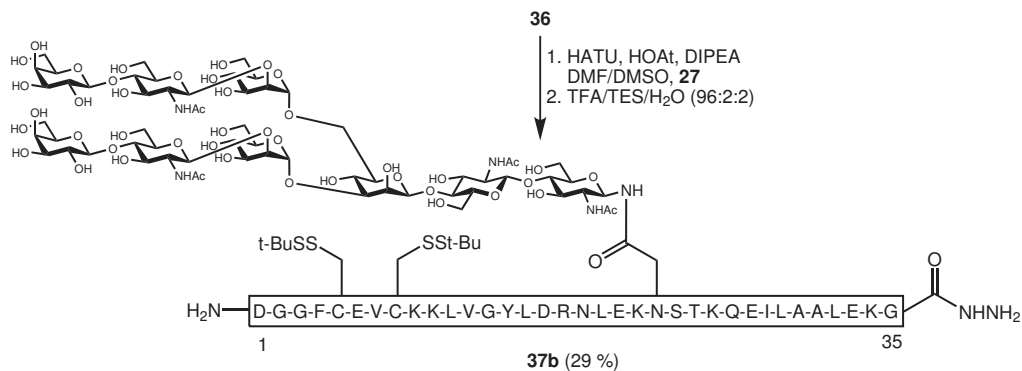


Abbildung 58: Synthese des Glycopeptidhydrazids Saposin D 1-35 **37b**.

Anschließend wurde die Kupplung des biantennären Nonasaccharidamins **27** an das Hydrazid **36** (desallyliert mit Pd(PPh₃)₄) unter analogen Bedingungen durchgeführt (Abbildung 58). Trotz Einsatz von 2.5 eq Nonasaccharidamin **27** konnte kein vollständiger Umsatz des

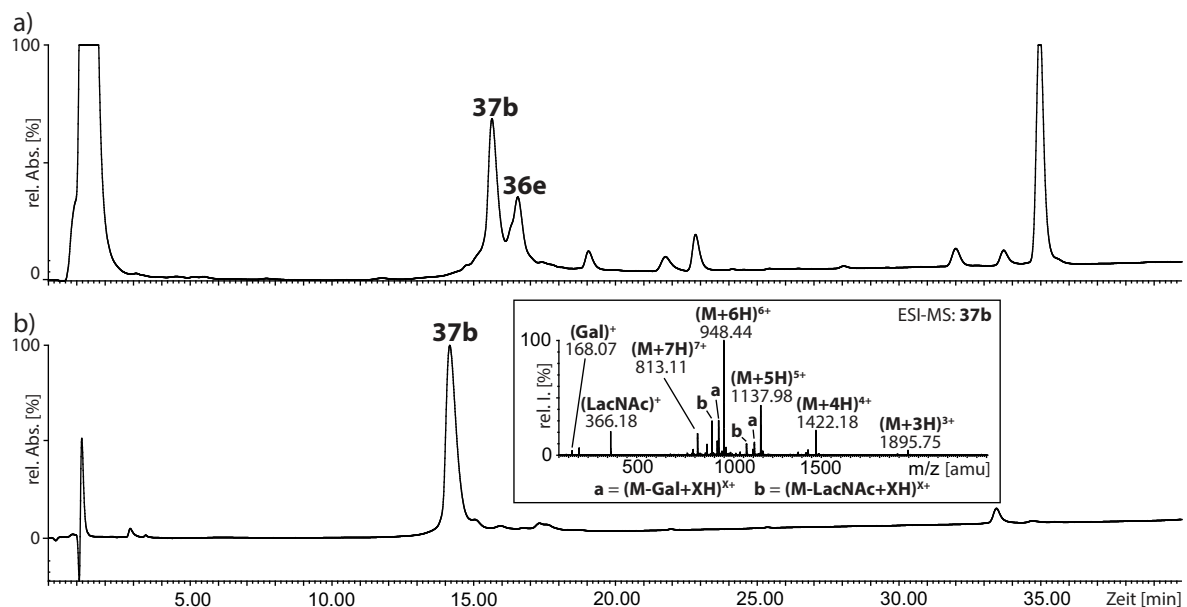


Abbildung 59: a) HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **37b** ausgehend von Hydrazid **36** (desallyliert mit Pd(PPh₃)₄), b) HPLC-MS von HPLC-gereinigtem **37b**.

Hydrazids **36** erreicht werden (Abbildung 59a). Das Glycopeptidhydrazid **37b** konnte nach Reinigung durch RP-HPLC in 29 % Ausbeute gewonnen werden (Abbildung 59b). Durch die verbesserte Reinheit des Peptids **36** konnte die Ausbeute von 15 % auf 29 % und die Reinheit in Bezug auf eine vorherige Synthese verbessert werden.^[123]

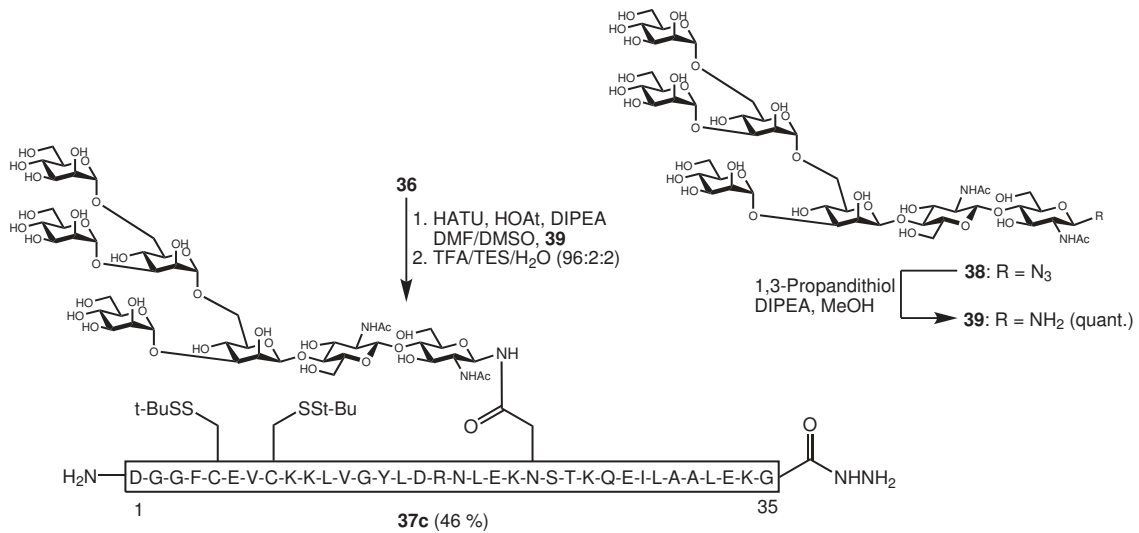


Abbildung 60: Synthese des Glycopeptidhydrazids Saposin D 1-35 **37c**.

Das dritte Glycopeptidhydrazid Saposin D 1-35 **37c** sollte das bei diesem Glycoprotein am häufigsten vorkommende Oligosaccharid tragen. Das hierfür benötigte Man₅ N-Glycanazid **38**

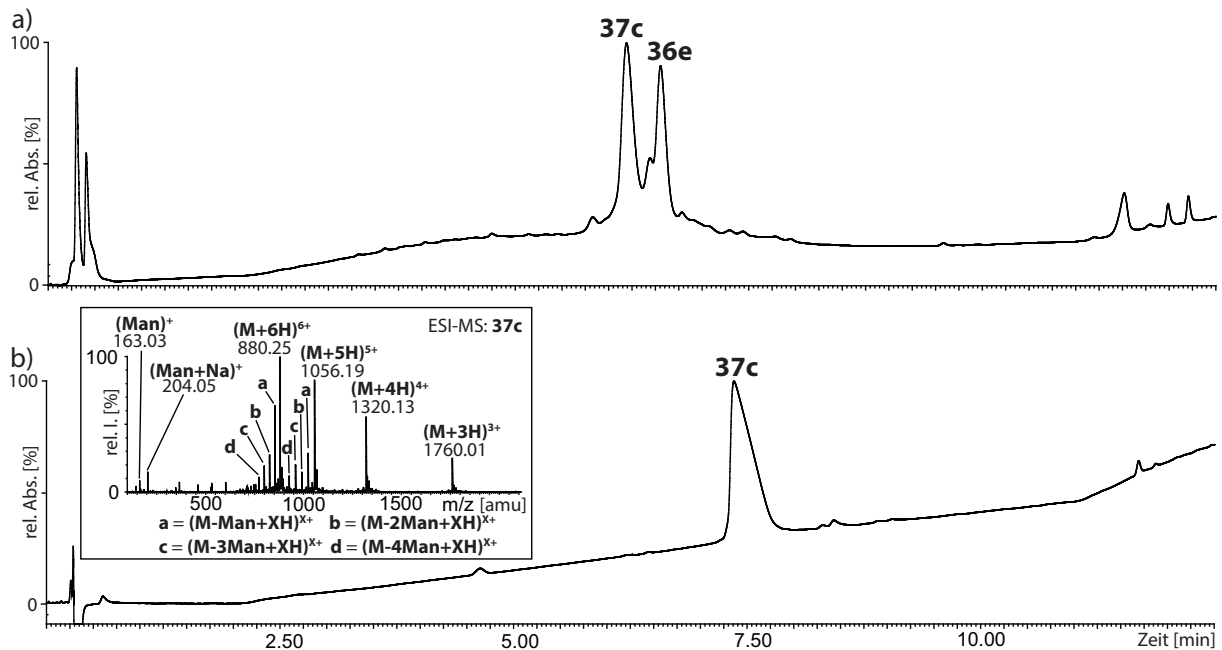


Abbildung 61: a) HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **37c** ausgehend von Hydrazid **36** (desallyliert mit Pd^{II}EnCat), b) HPLC-MS von HPLC-gereinigtem **37c**.

wurde durch chemische Synthese von MANUEL MÖNNICH dargestellt^[198,205] und mit 1,3-Propandithiol zum Amin **39** reduziert.^[192]

Das Hydrazid **36** (desallyliert mit Pd^{II}EnCat) wurde analog zu den vorherigen Glycopeptidsynthesen mit HATU und HOAt aktiviert (Abbildung 60). Abweichend wurde hier nicht das Heptasaccharidamin **39** im Überschuss eingesetzt, sondern das Hydrazid **36** (1.5 eq bezogen auf **39**). Dadurch konnte laut HPLC eine vollständige Umsetzung des Glycosylamins erreicht werden (Abbildung 61a), weshalb nach Reinigung durch RP-HPLC eine hohe Ausbeute von 46 % erhalten wurde (Abbildung 61b).

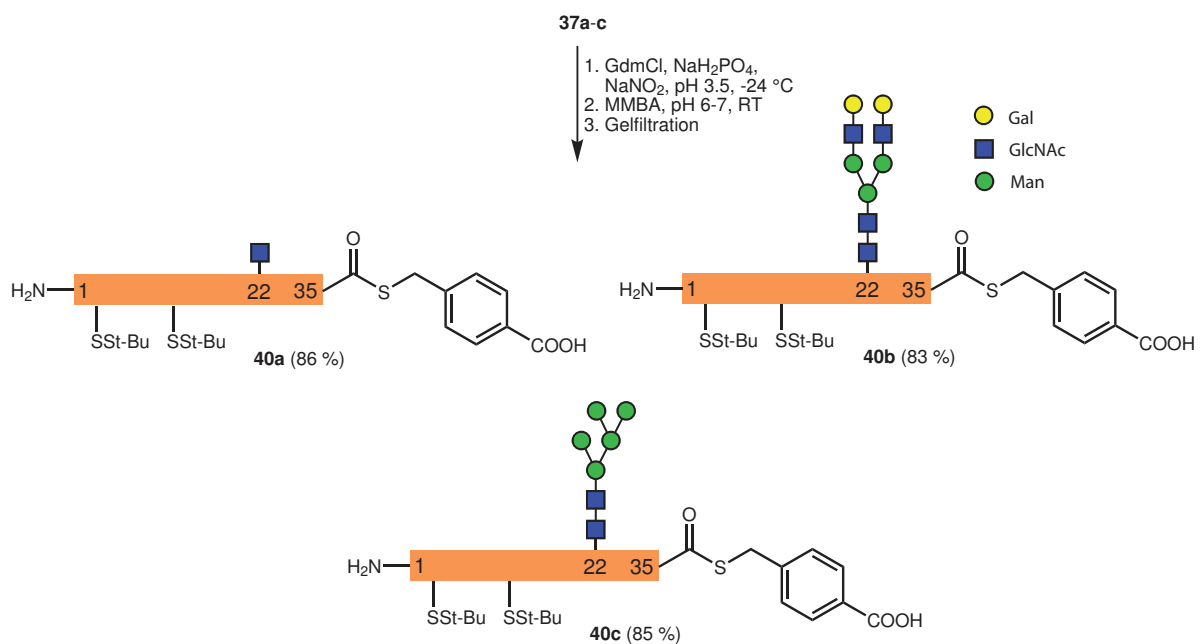


Abbildung 62: Synthese der Saposin D 1-35 Glycopeptidthioester **40a-c**.

Die Glycopeptidhydrazide Saposin D 1-35 **37a-c** wurden anschließend zu den entsprechenden Glycopeptidthioestern **40a-c** umgesetzt (Abbildung 62). Hierfür wurden die Glycopeptidhydrazide mit NaNO₂ in einer Lösung aus GdmCl und NaH₂PO₄ bei pH 3.5 und -24 °C zum Acylazid umgesetzt. Durch Zugabe von 4-(Mercaptomethyl)benzoesäure (MMBA) wurden bei pH 6-7 und RT die Thioester **40a-c** gebildet^[195] und durch Gelfiltration (Superdex Peptide GL 10/300) isoliert. Die Glycopeptidthioester **40a-c** konnten in guten Ausbeuten erhalten werden und enthielten geringe Mengen des Edukts. Die Disulfidschutzgruppen der Cysteine waren auf Grund des im Überschuss eingesetzten Thiols MMBA nicht mehr vollständig vorhanden (Abbildung 63).

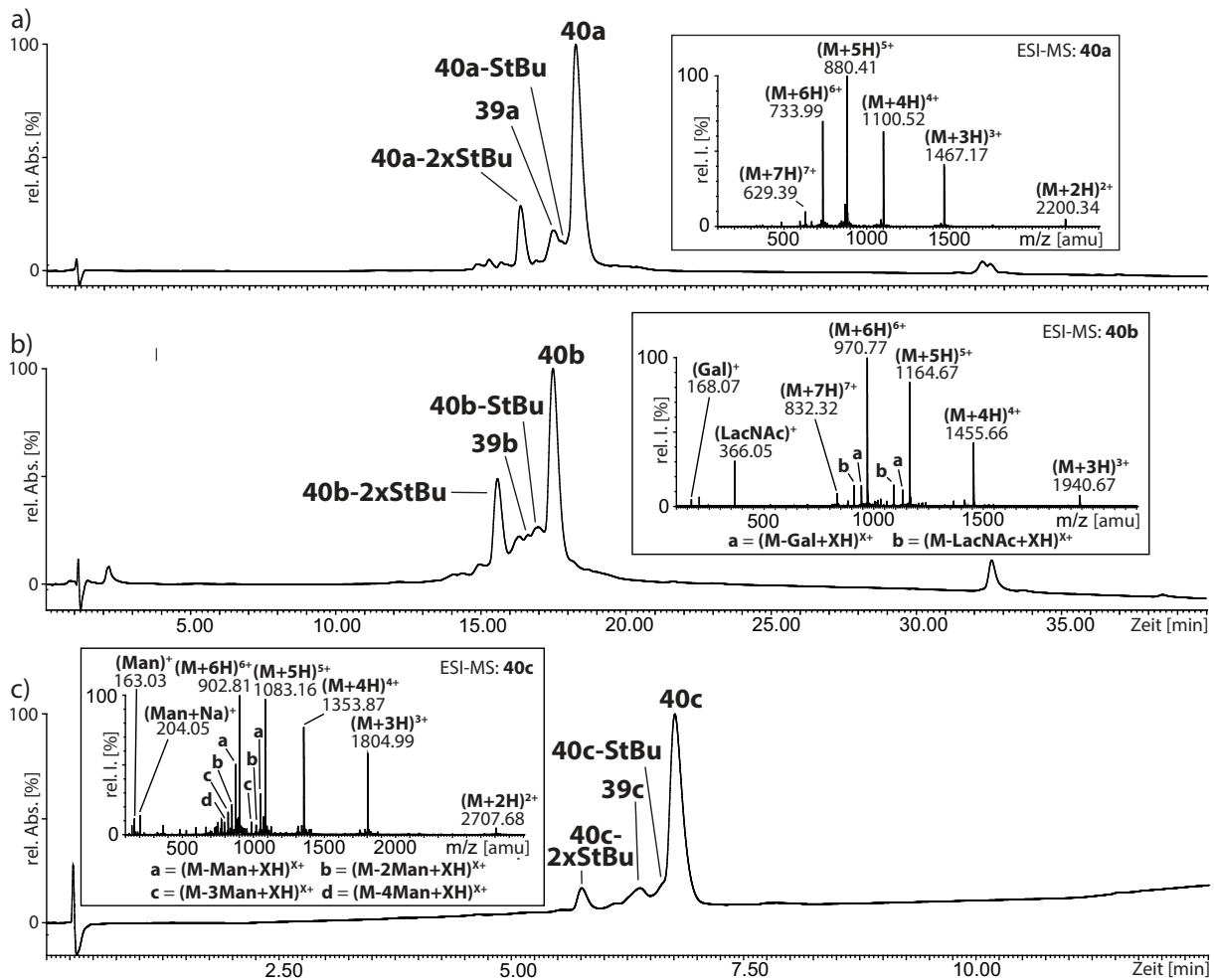


Abbildung 63: HPLC-MS der durch Gelfiltration isolierten Glycopeptidthioester Saposin D 1-35 (GlcNAc) **40a** (a), Saposin D 1-35 (Nona) **40b** (b) und Saposin D 1-35 (Man5) **40c** (c).

6.2 Synthese von Saposin D 36-82

Erste Ansätze zur Gewinnung von Saposin D 36-82 wurden auf rekombinantem Weg in *Escherichia coli* unternommen. Dabei konnte das gewünschte Peptid jedoch nicht isoliert werden.^[200] Dagegen konnte das Peptid auf synthetischem Weg durch Fmoc-SPPS aufgebaut und gereinigt werden. Problematisch hierbei waren jedoch inter- und intramolekulare Disulfide, die zu Problemen bei der Reinigung führten.^[202] Daher wurde versucht die Synthese und Reinigung von Saposin D 36-82 zu verbessern. Da dieses Peptid viele hydrophobe Aminosäuren enthält, wurde die Synthese am amphiphilen 2-Chlor-Trityl-ChemMatrix-Harz durchgeführt.^[47] Um während der Festphasensynthese Aggregationen zu verringern wurde an Gly76 eine 2,4-Dimethoxybenzylgruppe (Dmb) verwendet. Darüber hinaus wurden sämtliche Cysteine als gemischtes Disulfid eingebaut, um bei der Reinigung die Bildung von unerwünschten Disulfiden zu vermeiden. Met66 wurde durch Norleucin (Nle) substituiert, um

Oxidationsprodukte auszuschließen. Diese Substitution beeinträchtigt im Regelfall nicht die Proteinstruktur.^[206] Die automatische Fmoc-SPPS wurde mit Überwachung der Fmoc-Abspaltungen durch UV-Absorption durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die Fmoc-Abspaltungen ab der Mitte der Sequenz verlangsamt oder unvollständig waren, speziell zwischen Leu62 und Glu55. Dies deutete auf eine hohe Aggregation des Peptids hin. Um die Abspaltungen zu verbessern, wurden die Entschützungen zwischen His82 und Leu73 mit 20 % Piperidin/ DMF, von Cys72-Glu60 mit 20 % Piperidin/DMF + 2 % DBU^[207] und von Ile59-Ser37 mit 35 % Piperidin/DMF + 2 % DBU durchgeführt. Mit diesen Bedingungen konnte das Peptidylharz **41** erhalten werden, wengleich verschiedene Nebenprodukte durch unvollständige Fmoc-Abspaltungen und Aminosäurekupplungen vorhanden waren (Abbildung 65a). Eine Verlängerung der Reaktionszeit der Fmoc-Abspaltungen führte zu einer geringeren Qualität des Peptids (Daten nicht gezeigt).

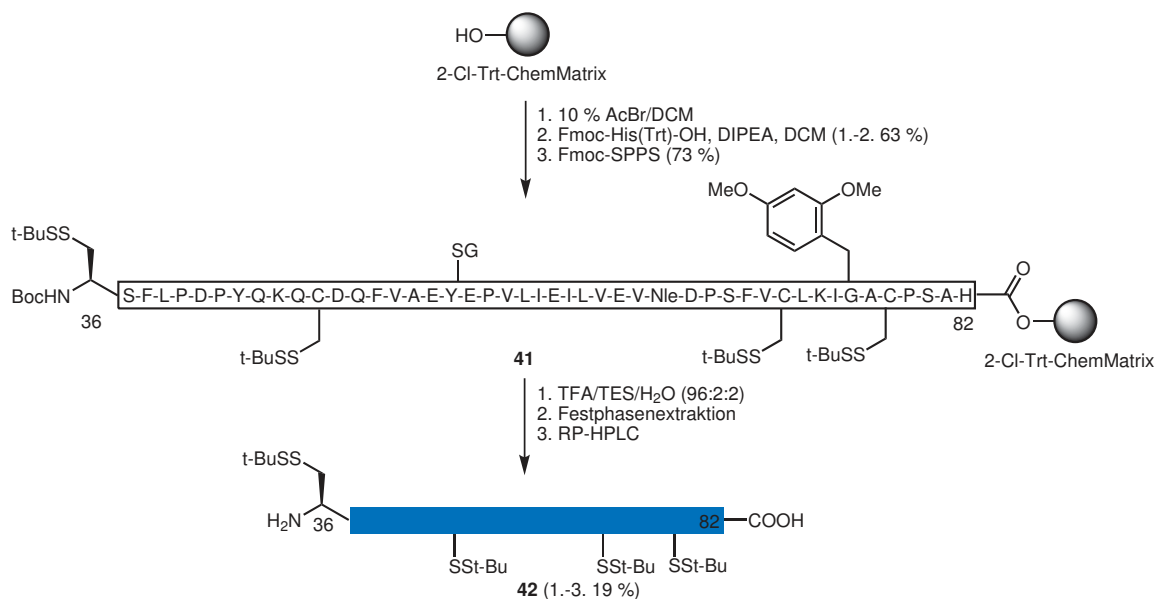


Abbildung 64: Synthese von Saposin D 36-82 **42**.

Um das Peptid Saposin D 36-82 **42** freizusetzen, wurde **41** mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) behandelt. Durch Zugabe von Diethylether (TFA/Et₂O 1:10) wurde das Peptid nur unvollständig gefällt und das Präzipitat besaß eine geringe Löslichkeit in MeCN/H₂O + 0.1 % TFA. Anschließend wurde nur eine geringe Trennschärfe bei der präparativen Reinigung durch HPLC erzielt. Daher wurde die Reinigung des Peptids ohne Ether-Fällung untersucht. Allerdings konnte der durch Einengen der peptidhaltigen TFA-Lösung erhaltene Rückstand ebenfalls nicht vollständig in MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst werden und die HPLC-Reinigung der löslichen Bestandteile war ebenfalls problematisch. Der Versuch die niedermolekularen

Produkte zuvor durch Gelfiltration (Superdex Peptide GL 10/300) zu entfernen, blieb erfolglos, da das Peptid eine verzögerte Elution zeigte (Daten nicht gezeigt).

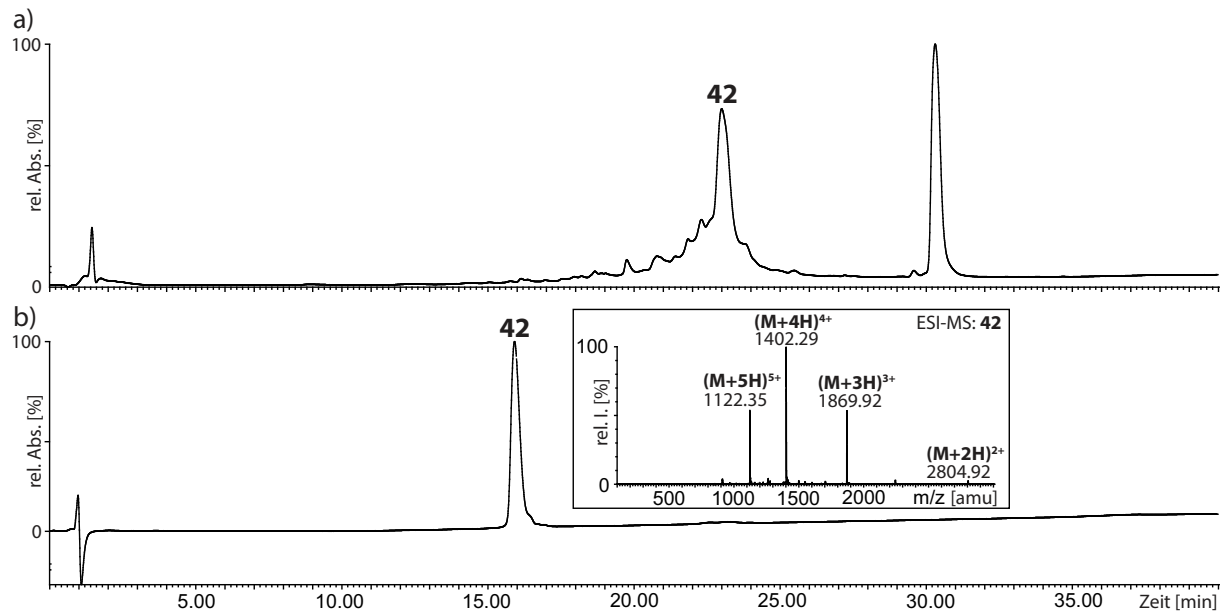


Abbildung 65: a) Rohprodukt **42** der Fmoc-SPPS nach Entschüttung mit TFA, b) durch Festphasenextraktion, Waschen mit 10 % MeCN/H₂O und durch RP-HPLC gereinigtes Saposin D 36-82 **42**.

Eine Vorreinigung des Rohpeptids gelang schließlich durch Festphasenextraktion (SepPak C18) und anschließendem Waschen des lyophilisierten Rohpeptids mit 10 % MeCN/H₂O. Das vorgereinigte Peptid besaß eine sehr gute Löslichkeit in 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA und konnte durch RP-HPLC gereinigt werden (Abbildung 65b). Durch dieses Reinigungsprotokoll und die Verwendung von Disulfidschutzgruppen konnte die Qualität von Saposin D 36-82 **42** erheblich verbessert und die Ausbeute mehr als verdoppelt werden.^[202]

6.3 NCL und oxidative Rückfaltung zu homogenen Glycoformen von Saposin D

Mit den Fragmenten **40a-c** und **42** wurde versucht eine Synthesemethode für die entsprechenden drei Glycoformen von Saposin D zu entwickeln (Abbildung 66). Hierfür wurden die Ligationen in einem anaeroben Stickstoffzelt durchgeführt, um frühzeitig Oxidationen durch Luftsauerstoff auszuschließen. Die Glycopeptidthioester **40a-c** (1.5 eq) wurden unter denaturierenden Bedingungen mit dem Fragment **42** (1.0 eq) unter Zusatz von MPAA und TCEP zu **43a-c** ligiert (Abbildung 67). Zur vollständigen Reduktion der

Disulfidschutzgruppen war eine TCEP-Konzentration von 30 mM notwendig. Die Ligationen verliefen laut HPLC-MS innerhalb von 1 d mit vollständigem Umsatz (Abbildung 68a und Abbildung 69). Bei der Ligation sollte das Thioesterfragment Saposin D 1-35 im Überschuss eingesetzt werden, da nicht umgesetztes **42** bei den weiteren Schritten nur schwer abzutrennen ist.

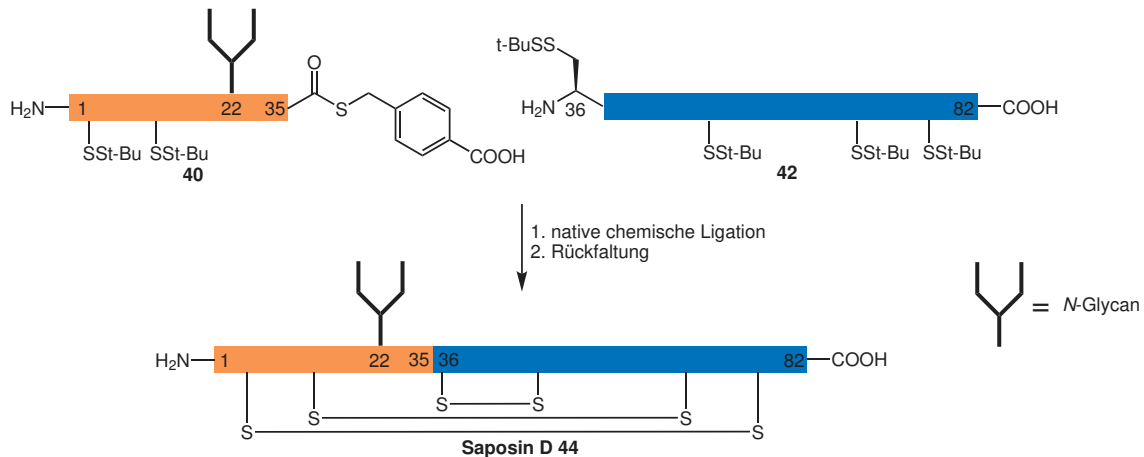


Abbildung 66: Synthese von glycosylierten Saposin D **44** durch NCL und anschließende oxidative Rückfaltung.

Es wurden verschiedene Möglichkeiten für eine Rückfaltung exemplarisch an **43a** untersucht. Das Ligationsprodukt **43a** durch Gelfiltration (Superdex Peptide GL 10/300) zu isolieren, wie dies für murines Saposin C beschrieben ist,^[199] war nicht möglich. Grund war eine stark verzögerte Elution, die durch den hydrophoben Charakter des Glycoproteins bedingt sein könnte. Eine Rückfaltung und Oxidation durch Verdünnung des Ligationsansatzes und anschließende Luftexposition führte zu einem unlöslichen Präzipitat, das wahrscheinlich aus fehlgefalteten oligomeren Strukturen bestand. Daher wurde versucht, durch anaerobe Dialyse des Ligationsansatzes die Reagenzien abzutrennen und das Protein ohne Ausbildung der Disulfidbrücken zurückzufalten. Hierfür wurde der Ansatz mit 6 M GdmCl, 50 mM Tris, pH 8.5 verdünnt und zuerst gegen 0.5 M Arg, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.5 sowie anschließend gegen H₂O dialysiert. Arginin wurde als Faltungshelfer verwendet.^[208] Es konnte jedoch im Falle von **43a** eine vermutlich durch die hohe Argininkonzentration bedingte Präzipitation (Aussalzeffekt) beobachtet werden. Diese war reversibel, da bei Dialyse gegen H₂O das Präzipitat wieder gelöst wurde. Die Präzipitation war nur bei **43a** zu beobachten, welches ein Monosaccharid trägt. Im Fall von **43b** und **43c** blieben die Glycoproteine vermutlich durch die höhere Hydrophilie der Oligosaccharidreste in Lösung.

Durch die anaerobe Dialyse konnte eine salzfreie wässrige Lösung erhalten werden, die das gefaltete reduzierte Protein enthielt. Hiermit wurden Versuche zur Ausbildung der

Disulfidbrücken unternommen. Anfänglich wurde im analytischen Maßstab die Disulfidbildung durch Luftexposition der wässrigen Lösung untersucht. Dies wurde mit und ohne Zusatz von 10 % DMSO durchgeführt.^[209] Beide Ansätze führten laut HPLC-MS nach 4 d zu einem einheitlichen Produkt, das unter denaturierenden Bedingungen (6 M GdmCl, pH 8.5) nicht mit dem thiolmodifizierenden Reagens MMTS^[210] reagierte (Daten nicht gezeigt). Hieraus wurde eine vollständige Bildung der Disulfidbrücken gefolgert. Eine Wiederholung dieser Versuche im präparativen Maßstab gelang jedoch nicht, da laut HPLC-MS kein einheitliches Produkt und laut SDS-PAGE hauptsächlich Oligomere vorhanden waren (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das reduzierte Protein in einer wässrigen ungepufferten Lösung zu unspezifischen Wechselwirkungen neigt. Dies führte in Verbindung mit einer langsamen Oxidation bei neutralem pH zur Bildung fehlgefalteter Oligomere. Die Oxidation im präparativen Maßstab gelang schließlich, indem die

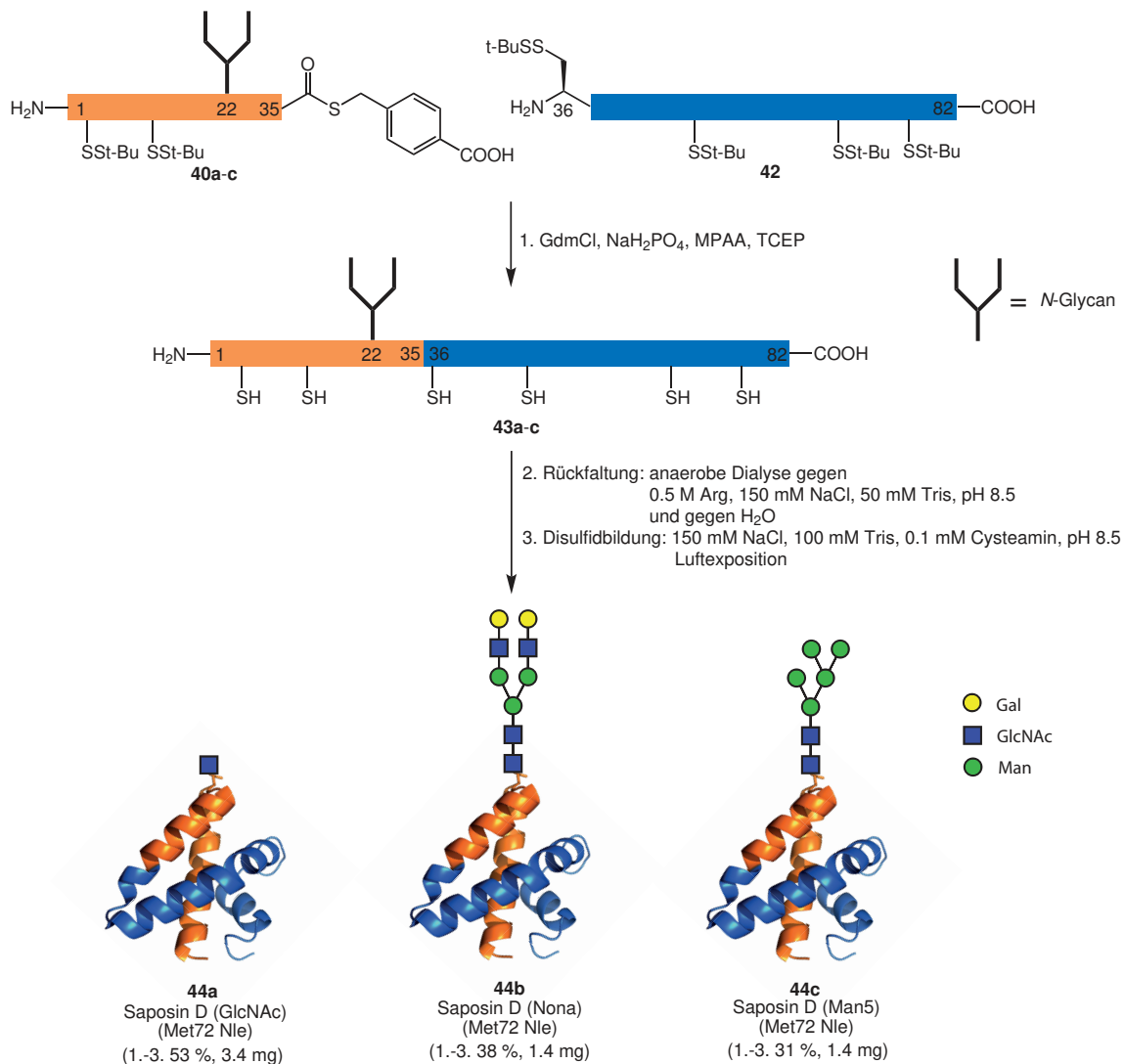


Abbildung 67: Synthese von drei Saposin D Glycoformen **44a-c** über NCL, Rückfaltung durch anaerobe Dialyse und abschließende Disulfidbildung.

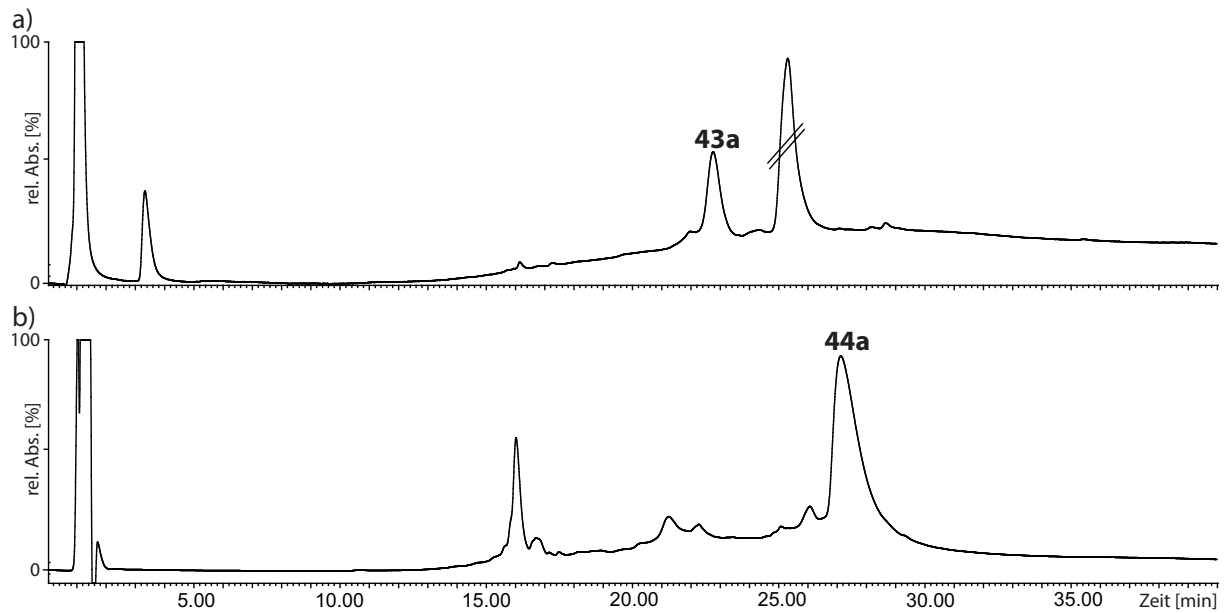


Abbildung 68: a) HPLC-Chromatogramm der Ligation zu reduziertem Saposin D (GlcNAc) **43a**, b) von rückgefaltetem und oxidiertem Saposin D (GlcNAc) **44a**.

Proteinlösung mit einem Puffer auf eine Endkonzentration von 15 μ M Protein, 150 mM NaCl, 100 mM Tris, 0.1 mM Cysteamin bei pH 8.5 verdünnt wurde. Nach 4 d Luftexposition konnte auf diese Weise das Rohprodukt **44a** erhalten werden (Abbildung 68b). Eine Behandlung von **44a** mit MMTS zeigte, dass keine freien Thiole vorhanden waren. Durch die Erhöhung der Ionenkonzentration konnten die unspezifischen Wechselwirkungen verringert werden.

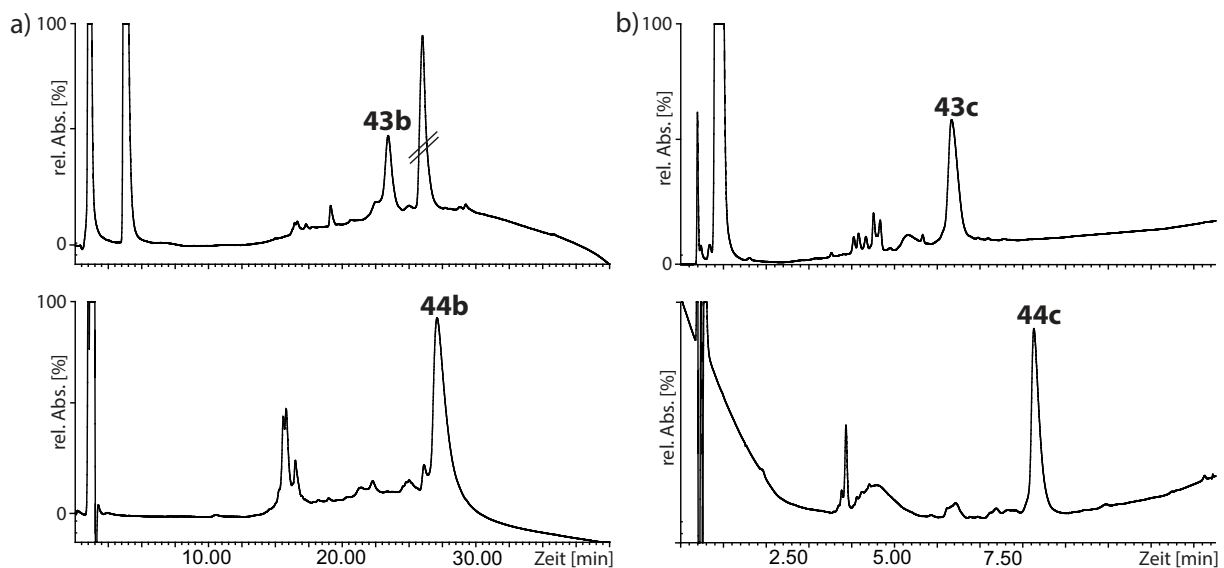


Abbildung 69: a) HPLC-Chromatogramm der Ligation zu reduziertem Saposin D (Nona) **43b** (oben) und des rückgefaltetem und oxidierten Saposins D (Nona) **44b** (unten). b) HPLC-Chromatogramm der Ligation zu reduziertem Saposin D (Man5) **43c** (oben) und des rückgefaltetem und oxidierten Saposins D (Man5) **44c** (unten).

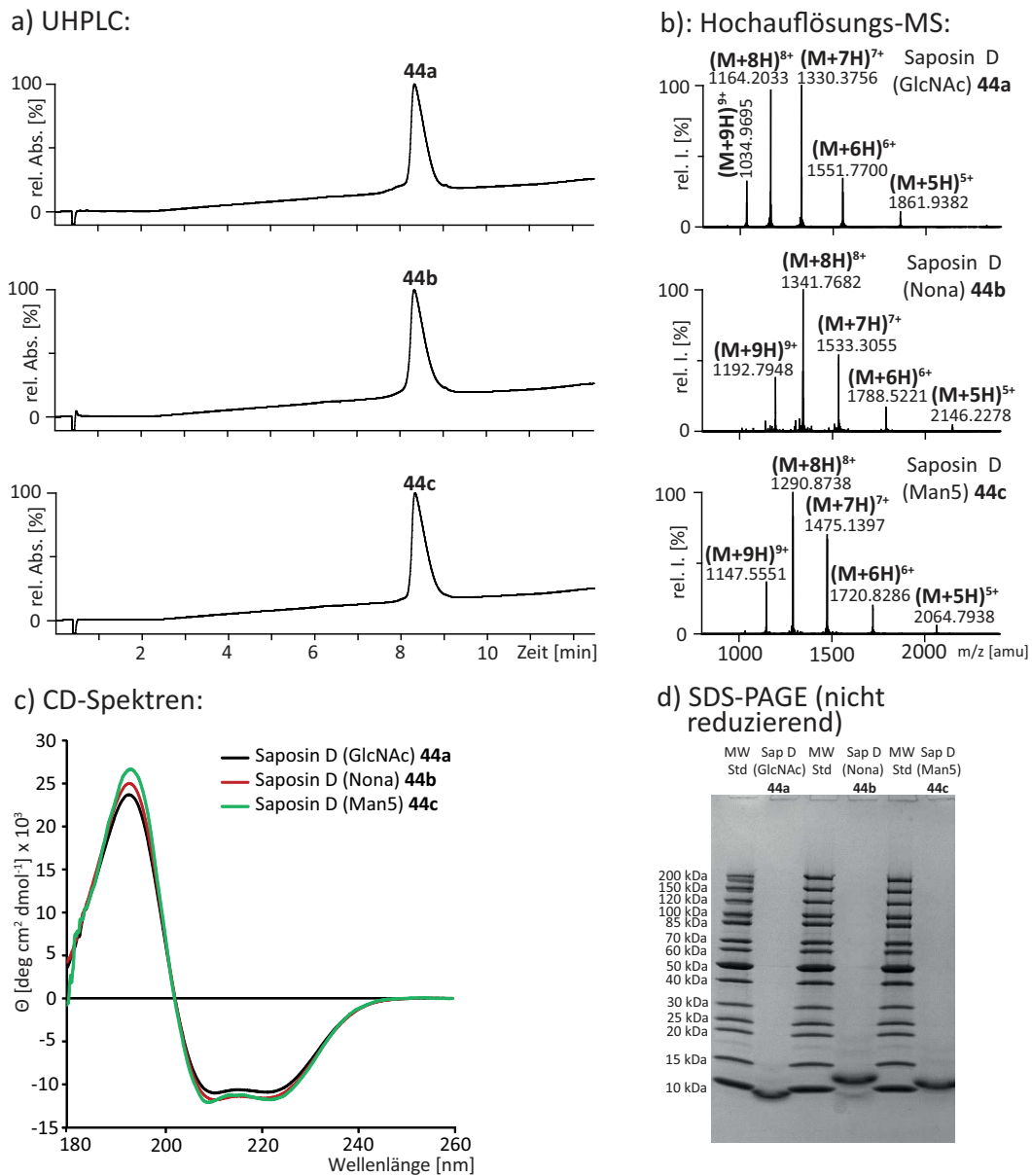


Abbildung 70: Charakterisierung der synthetischen Saposin D Glycoformen **44a-c**: a) UHPLC Chromatogramme, b) Hochauflösungs-Massenspektrometrie. c) CD-Spektren, d) SDS-PAGE Analyse (nicht reduzierend).

In Verbindung mit dem erhöhten pH und 0.1 mM Cysteamin führte dies zu einer definierten Disulfidbildung, sodass die Menge an fehlgefalteten Oligomeren gering blieb. Diese Methode zur oxidativen Rückfaltung konnte analog auf die beiden weiteren Glycoformen **43b** und **43c** angewendet werden und ergab die Rohprodukte **44b** und **44c** (Abbildung 69). Bemerkenswert ist, dass alle gefalteten Formen laut RP-HPLC-Retention hydrophobere Eigenschaften besitzen als die entsprechenden denaturierten Formen, was auch beim murinen Saposin C der Fall ist.^[199] Die Rohprodukte wurden durch RP-HPLC gereinigt und durch UHPLC, HR-MS, nicht reduzierende SDS-PAGE und CD-Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 70). Die

Glycoformen **44a-c** konnten in Ausbeuten von 31 % bis 53 % über drei Stufen und in Mengen von 1.4 mg bis 3.4 mg in guter Reinheit erhalten werden. Die CD-Spektren waren nahezu identisch zu einer Referenz von Saposin D, das aus einer natürlichen Quelle isoliert wurde.^[163] Die Glycoformen zeigen alle ein ähnliches Spektrum mit einem typischen α -helicalen Charakter. Daher wurde angenommen, dass die vier α -Helices der Tertiärstruktur ausgebildet wurden und dass das korrekte Disulfidmuster vorlag. Durch eine Röntgenstrukturanalyse von **44a** konnte die korrekte Tertiärstruktur endgültig belegt werden (vgl. Kapitel 6.4).

6.4 Kristallstrukturanalyse von glycosyliertem Saposin D

In Zusammenarbeit mit Dr. MICHAEL WEYAND und Prof. Dr. CLEMENS STEEGBORN wurde das synthetische Saposin D (GlcNAc) **44a** kristallisiert.^[198] Hierfür wurden anfangs Kristallisationsscreenings mit den kommerziellen Qiagen JCSG+ und Qiagen AmSO₄ Suites bei 20 °C und 4 °C durchgeführt. Nach mehreren Tagen konnten Kristalle bei 20 °C in Gegenwart von (NH₄)₂SO₄ als Fällungsmittel erhalten werden, was den bekannten Kristallisationsbedingungen von unglycosyliertem und rekombinantem Saposin D entspricht.^[161] Es wurde ein Optimierungsscreening mit jeweils 0.2 M NH₄OAc, (NH₄)₂HPO₄ und NaOAc mit unterschiedlichen Konzentrationen (NH₄)₂SO₄ (2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8 M) bei 20 °C nach der *sitting drop vapor diffusion* Methode durchgeführt. Hierbei konnte nach mehreren Tagen aus 0.2 M NH₄OAc und 2.4 M (NH₄)₂SO₄ der Proteinkristall für die Röntgenstrukturanalyse gewonnen werden. Als Gefrierschutz wurde die Reservoir-Lösung versetzt mit 20 % Glycerin (v/v) verwendet.

Die kristallographische Analyse wurde von MICHAEL WEYAND durchgeführt. Die Struktur des an Asn22 glycosyliertem Saposin D (GlcNAc) Models zeigt eine identische Faltung und

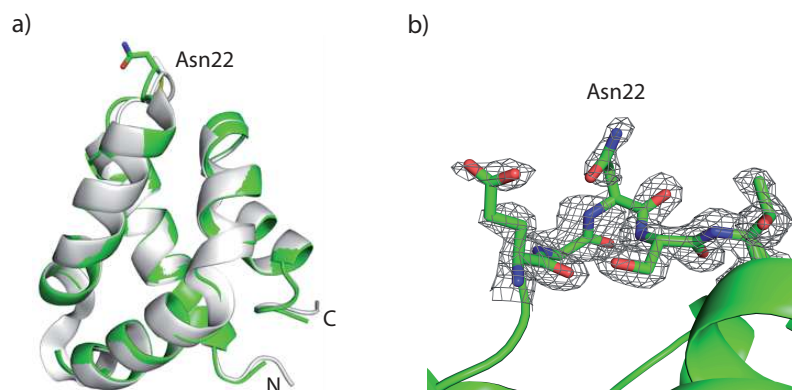


Abbildung 71: a) Struktur-Overlay durch C α -Überlagerung von glycosyliertem Saposin D (GlcNAc) **44a** (grün) und nicht glycosyliertem Saposin D (grau, PDB: 3BQP),^[161] b) Elektronendichtemodell der Asn22 Glycosylierungsstelle von Saposin D (GlcNAc) **44a**.

Strukturtopologie zur nicht glycosylierten Form (Abbildung 71). Der C_{α} RMSD für die 76 gemeinsamen Paare beträgt 0.038 Å. Mit 1.29 Å besteht bei Lys21 die größte Abweichung, welches der Glycosylierungsstelle vorausgeht.

Auch wenn keine Elektronendichte für den Zucker gefunden wurde, nehmen die Aminosäuren des glycosylierten Loops von **44a** eine geringfügig andere Konformation als im nicht glycosylierten Protein ein. Der glycosylierte Loop weist eine eindeutige Elektronendichte auf, sodass das Endmodell eine eindeutige Definition in der 2Fo-Fc Elektronendichtekarte bei 0.8σ zeigt. Für den Monosaccharidanteil war dies auch bei 0.5σ nicht möglich.

6.5 Biologische Aktivitätstests der synthetischen Saposin D Glycoformen

Die biologische Aktivität der synthetischen Saposin D Glycoformen **44a-c** wurde von Dr. BERNADETTE BREIDEN unter der Leitung von Prof. Dr. KONRAD SANDHOFF am LIMES Institut der Universität Bonn untersucht.^[198] Saposine spielen eine wichtige Rolle bei dem Sphingolipidabbau und dem damit verbundenen Transport dieser Membranlipide. Daher wurden die synthetischen Glycoformen **44a-c** mit eigens dafür entwickelten Assays auf ihre biologische Aktivität getestet (Abbildung 72). Es ist bekannt, dass glycosyliertes Saposin D von GAUCHER-Patienten die Hydrolyse von Ceramid durch die saure Ceramidase stimuliert. Bei dem Assay wurde ein erhöhter Abbau des Ceramids festgestellt, allerdings mit geringen Unterschieden zwischen den einzelnen Glycoformen.^[211] Im Gegensatz dazu wurden bei Experimenten zur Bindungsaffinität gegenüber immobilisierten Liposomen^[211] sowie zur Liposomenfusionsaktivität^[212] von dem Kohlenhydratanteil abhängige Aktivitäten gefunden. Saposin D (GlcNAc) **44a** zeigte die höchste Bindung an immobilisierte Liposomen und ebenfalls die höchste Liposomenfusionsaktivität, gefolgt von Saposin D (Man5) **44c** und wiederum gefolgt von Saposin D (Nona) **44b**. Mit den oben aufgeführten Methoden lässt sich allerdings nicht die Bildung von löslichen Saposin-Lipid-Komplexen messen. Daher wurde ein neuer Assay etabliert, der Fluoreszenz-markiertes Ceramid verwendet, das in Liposomen mit nicht extrahierbaren membranständigen Lipiden (Quencher) eingebettet ist.^[212,213] Hierbei zeigte die komplexe biantennäre Glycoform **44b** den größten Löslichkeitserhöhenden Effekt, gefolgt von der oligomannosidischen Form **44c**. Die monosaccharidtragenden Variante **44a** zeigte nur einen Bruchteil (ca. 25 %) der Löslichkeitsfördernden Wirkung von **44c**.

Die unterschiedlichen Glycoformen von Saposin D stimulierten die saure Ceramidase in einem ähnlichen Ausmaß. Jedoch wurden die membranbezogenen Saposin D Aktivitäten stark von der Art des *N*-Glycans beeinflusst. Diese Effekte korrelierten mit der Größe und

möglicherweise mit zusätzlichen Eigenschaften des entsprechenden *N*-Glycans. Gleichzeitig verringert sich die Bindung von Saposin D an Membranen, wenn dieses ein größeres *N*-Glycan trägt.

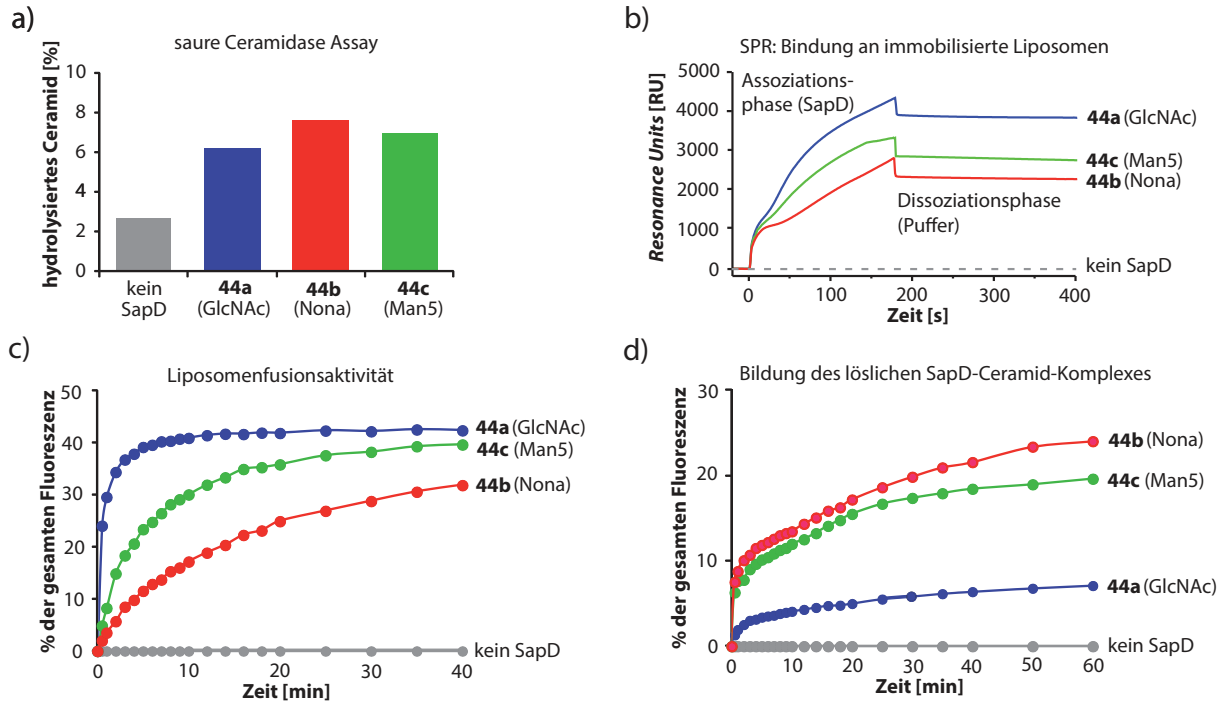


Abbildung 72: a) Steigerung der Aktivität der sauren Ceramidase durch Saposin D **44a-c**, b) Bindung an immobilisierte Liposomen, c) Förderung der Liposomenfusion, d) Bildung von löslichen SapD-Ceramid-Komplexen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit steigender Größe des Zuckerrestes die Löslichkeit des hydrophoben Saposin-Ceramid-Komplexes steigt und dass dessen Freisetzung von der Membran erleichtert wird. Dies deckt sich mit der irreversiblen Bindung von unglycosylierten Saposin A^[214] und B^[215] an Membranen. Folglich scheint eine angemessene Größe des Zuckeranteils unverzichtbar für eine dynamische und reversible Wechselwirkung zwischen Saposin D und den geladenen intralysosomalen Membranen. Systematische Variationen der Saposin D Glycoformen in Verbindung mit Wechselwirkungsstudien, die den Einfluss des Zuckers auf den Saposin-Lipid-Komplex zeigen, sollten helfen die molekulare Basis dieser Phänomene zu verstehen.

7 Synthese von Fragmenten des Glycoproteins Saposin B

Ein Zugang zu homogenen Glycoformen von Saposin B ist für Untersuchungen von Struktur-Wirkungs-Beziehungen ebenso von Interesse wie bei Saposin D. Im Vergleich ist die Glycosylierung von Saposin B weitaus heterogener und man findet in diesem Fall auch kleinere Saccharidanteile bis hin zu einer Monosaccharid-tragenden Glycoform. Wesentlich größere Zucker wurden bei Patienten mit GM1 Gangliosidose Typ1 gefunden.^[14] Inwiefern hierbei signifikante Zusammenhänge bestehen, konnte bis jetzt auf Grund von fehlenden homogen glycosylierten Saposin B Referenzen nicht geklärt werden. Es sollte eine Ligationstrategie für homogen glycosyliertes Saposin B getestet werden, die durch Verwendung der Schnittstelle Cys36 im Wesentlichen der von Saposin D entspricht (Abbildung 73).

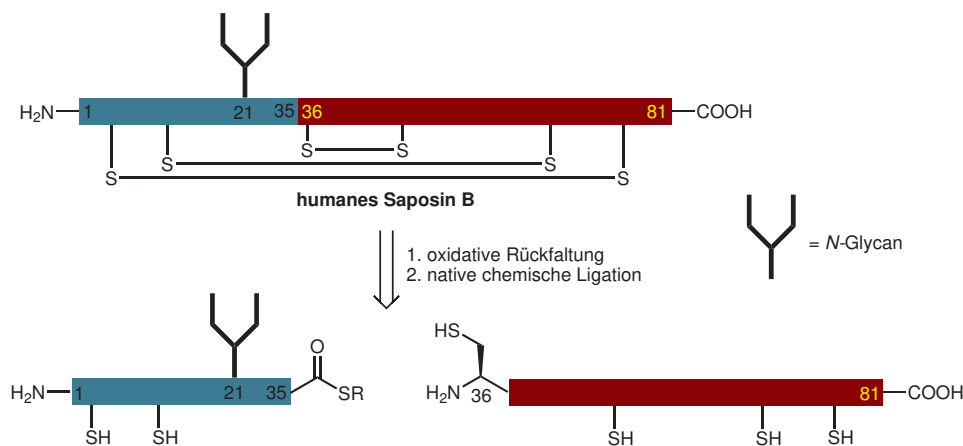


Abbildung 73: Retrosynthese von N-glycosyliertem nativem Saposin B.

7.1 Synthese von glycosylierten Saposin B 1-35 Thioestern

Die Festphasensynthese des Saposin B Fragments 1-35 wurde an Trityl-ChemMatrix-Harz **20** versucht (Abbildung 74a). In der Fmoc-SPPS wurden Thr12 und Thr23 als Pseudoprolin eingebaut.^[53] Um im späteren Syntheseverlauf die Bildung inter- und intramolekularer Disulfide zu vermeiden, wurden Cys4 und Cys7 als gemischte Disulfide eingebaut. Mit dieser Strategie gelang die Synthese des Peptidylharzes **45** (Abbildung 74b). Nach einer analytischen Entschützung zeigte das Rohprodukt **45e** nur wenige Nebenprodukte. Allerdings besitzt das Peptid **45e** eine geringe Löslichkeit in MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH oder + 0.1 % TFA, was eine genaue qualitative Aussage erschwert.

Mit Harz **45** wurde die Abspaltung des geschützten 1-35 Peptids und die *in situ* Umsetzung zum Hydrazid **46** untersucht (Abbildung 75). Die Abspaltung wurde mit TFA/TES/DCM

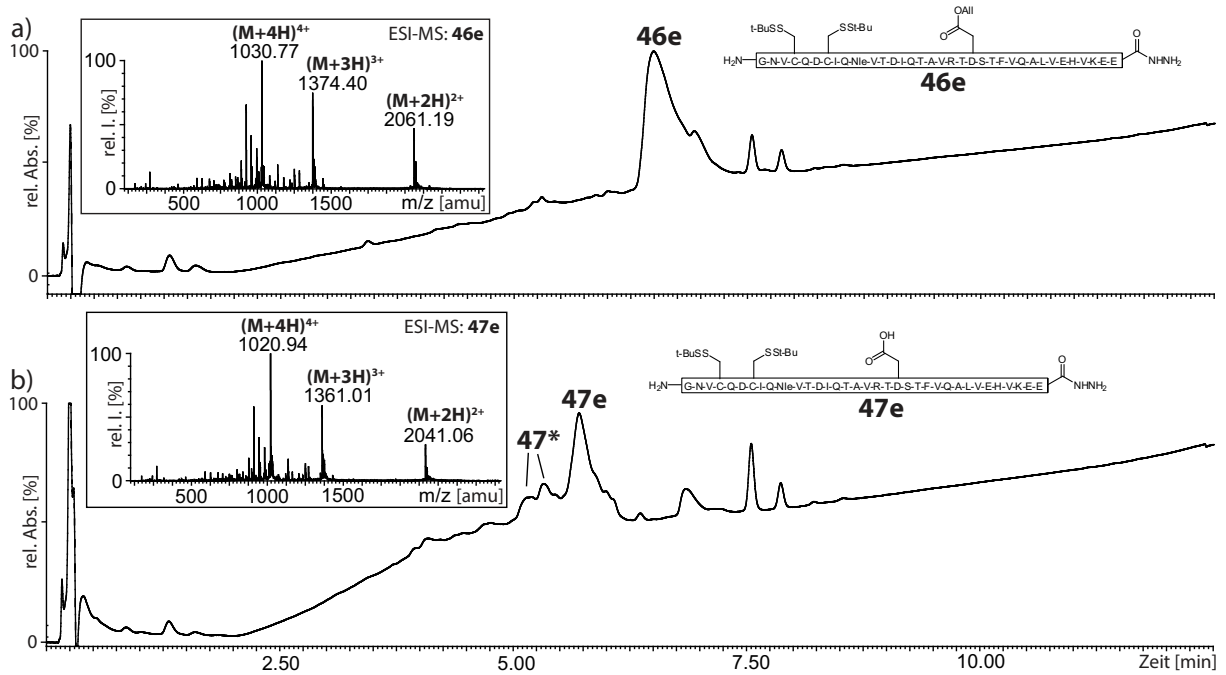


Abbildung 76: a) HPLC-MS des entschützten Hydrazids Saposin B 1-35 **46e**, b) des entschützten Hydrazids Saposin B 1-35 **47e**.

Anschließend wurde **47** mit GlcNAc-NH₂ durch HATU, HOAt und DIPEA in DMF/DMSO (1:1) gekuppelt (Abbildung 77). Nach 20 h war **47** vollständig umgesetzt. Das Glycopeptidhydrazid wurde mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) entschützt. Die geringe Löslichkeit in sauren MeCN/H₂O-Gemischen setzte sich bei dem entschützten Glycopeptidhydrazid **48a** fort und führte zu einer schwierigen Reinigung durch RP-HPLC. Das Rohprodukt (Abbildung 78a) konnte nur stark verdünnt in 45 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst werden, um unterschiedliche RP-HPLC Methoden zu testen. Es wurden mehrere RP-Säulen (Supelco Ascentis C18 250 x 10, Supelco Bio Wide Pore C5 4.6 x 150, YMC Protein-RP 10 x 150) sowie MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH und MeCN/H₂O + 0.1 % TFA als Eluent getestet. In allen Fällen konnte keine ausreichende Trennschärfe erreicht werden, da **48a** eine starke Retention auf den Säulen zeigte. Die Verwendung von 10 mM NH₄OAc in MeCN/H₂O als Eluent ergab zwar eine

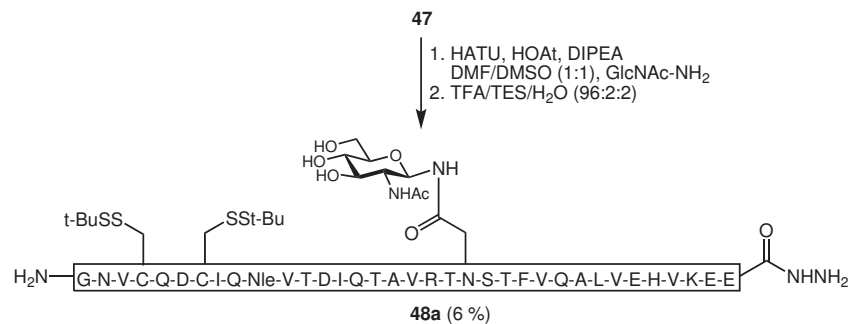


Abbildung 77: Synthese des Glycopeptidhydrazids Saposin B 1-35 (GlcNAc) **48a**.

gute Löslichkeit und Elution, eine chromatographische Trennung der Substanzen war aber nicht möglich. Eine Verbesserung konnte erzielt werden, indem das Rohprodukt in wässrigen 8 M GdmCl bei pH 7-8 gelöst wurde und durch RP-HPLC (Säule: Supelco Ascentis C18 250 x 10, Eluent: MeCN/H₂O + 0.1 % TFA) gereinigt wurde. Die Trennschärfe konnte dadurch verbessert werden, ergab aber nur eine geringe Ausbeute (6 %) und suboptimale Reinheit des Glycopeptidhydrazids **48a** (Abbildung 78b).

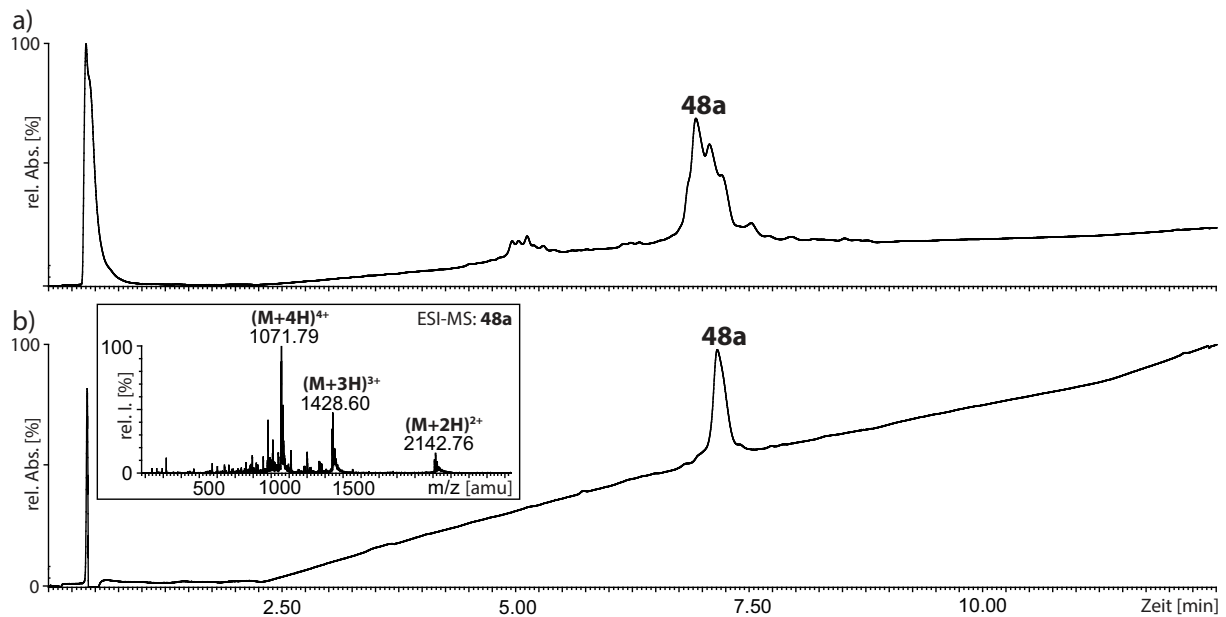


Abbildung 78: a) HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **48a**, b) HPLC-MS Analyse von **48a** nach RP-HPLC Reinigung (Probe gelöst in 8 M GdmCl pH 7-8, Säule: Supelco Ascentis C18 250 x 10, Eluent: MeCN/H₂O + 0.1 % TFA).

Daraufhin wurde getestet, ob der Einbau eines größeren Glycans zu einer Verbesserung der Löslichkeit und der chromatographischen Eigenschaften führt. Das Nonasaccharidamin **27** wurde an das Hydrazid Saposin B 1-35 **47** mit HATU, HOAt und DIPEA in DMF/DMSO (1:1) gekuppelt. Nach 20 h war **47** vollständig umgesetzt und das Glycopeptidhydrazid wurde mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) entschützt (Abbildung 79).

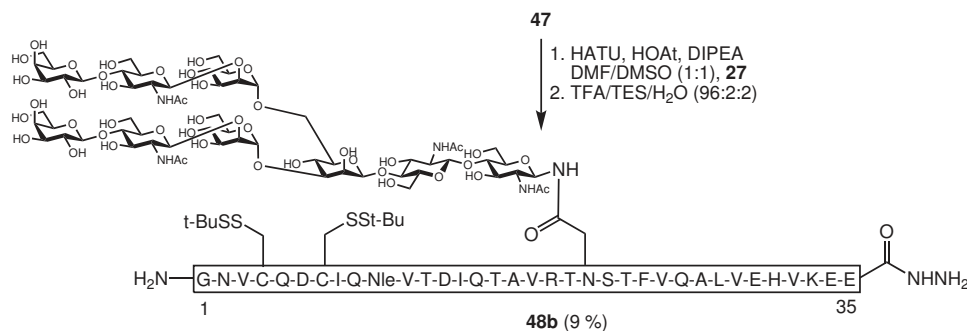


Abbildung 79: Synthese des Glycopeptidhydrazids Saposin B 1-35 (Nona) **48b**.

Das Rohprodukt (Abbildung 80a) wurde in 8 M GdmCl pH 7-8 gelöst und durch RP-HPLC (Säule: Supelco Ascentis C18 250 x 10, Eluent: MeCN/H₂O + 0.1 % TFA) gereinigt. Zwar zeigte **48b** eine geringfügig bessere Löslichkeit als **48a** sowie eine leicht erhöhte Ausbeute (9 %), eine bessere chromatographische Trennung war aber trotz des größeren Zuckers nicht möglich (Abbildung 80b).

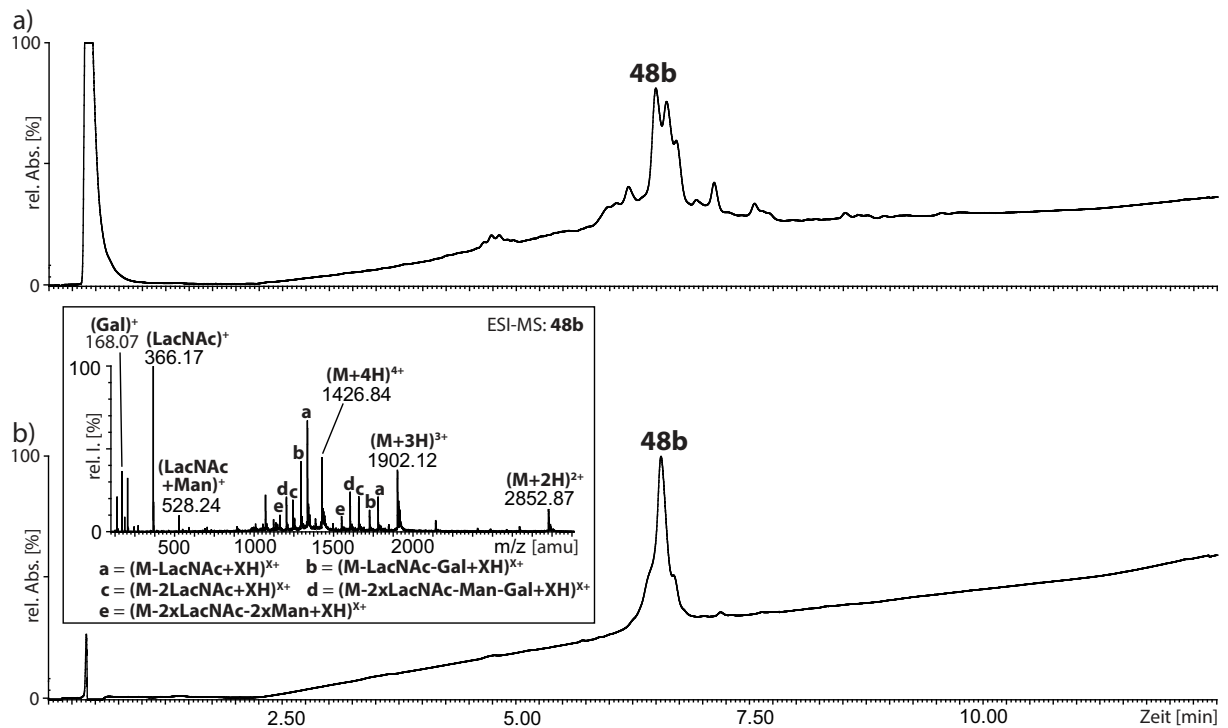


Abbildung 80: a) HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **48b**, b) HPLC-MS Analyse von **48b** nach RP-HPLC Reinigung.

Mit den Sapsin B 1-35 Glycopeptidhydraziden **48a,b** wurde die Umsetzung zu den entsprechenden Glycopeptidthioestern **49a,b** untersucht (Abbildung 81). Hierfür wurden die Glycopeptidhydrazide jeweils mit NaNO₂ in 6 M GdmCl bei pH 3.5 für 50 min bei -24 °C

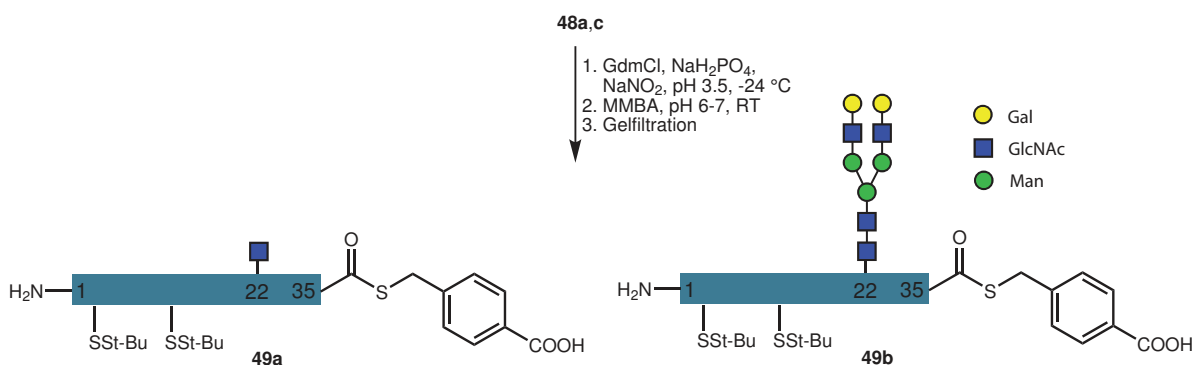


Abbildung 81: Synthese der Sapsin B 1-35 Glycopeptidthioester **49a,b**.

inkubiert. Nach Zugabe von 4-(Mercaptomethyl)benzoesäure (MMBA) wurde bei RT und bei pH 6-7 inkubiert.^[195] Die Produkte wurden durch Gelfiltration (Superdex Peptide GL 10/300) isoliert und durch HPLC-MS charakterisiert (Abbildung 82). In beiden Fällen wurde nur wenig Thioester gebildet. Hauptsächlich waren noch die beiden Edukte **48a,b** und deren Derivate mit entschützten Cysteinen vorhanden. Da kein Peptid mit der freien C-terminalen Säure zu finden war, kann davon ausgegangen werden, dass bereits die Umsetzung des Hydrazids zum Acylazid nicht gelang.

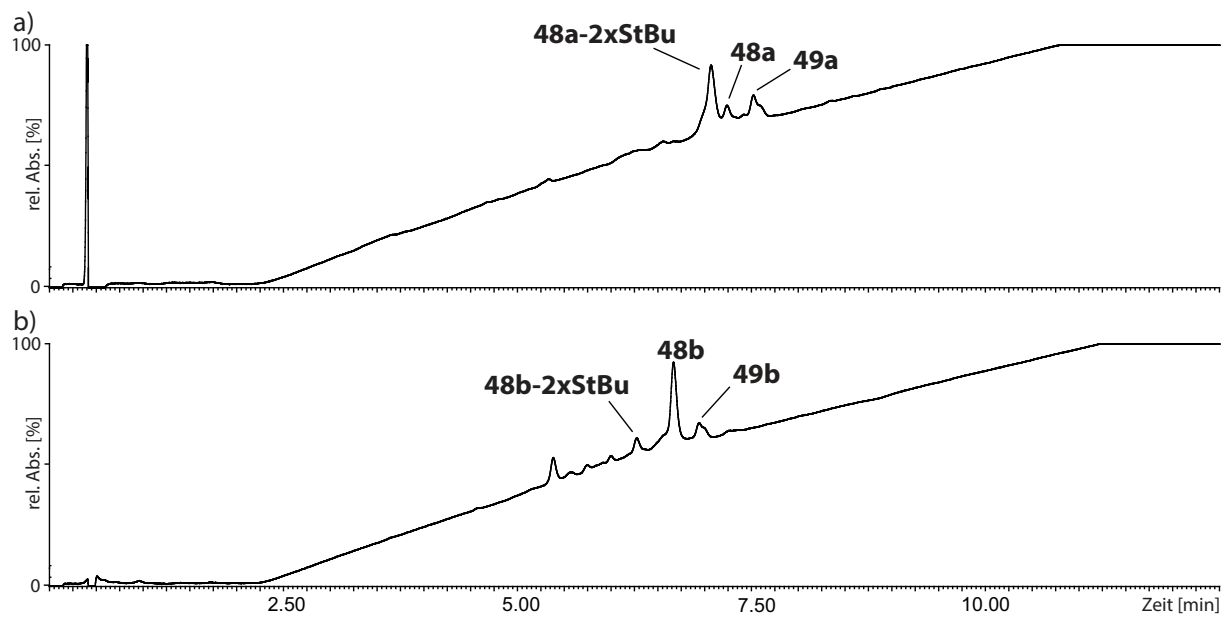


Abbildung 82: HPLC Chromatogramme der Produkte nach Umsetzung mit NaNO_2 bei pH 3.5 und MMBA bei pH 6-7 a) von Saposin B 1-35 (GlcNAc) **48a**, b) von Saposin B 1-35 (Nona) **48b**.

Dies ist möglicherweise auf eine geringe Löslichkeit des Peptids bei sauren pH zurückzuführen. Auf Grund eines Überschusses an sauren Seitenkettenfunktionen könnte die Einbringung zusätzlicher positiver Ladungen Abhilfe schaffen. Dies wäre beispielsweise durch eine Modifizierung der Cysteinschutzgruppen möglich, wie dies in Abbildung 83 dargestellt ist.

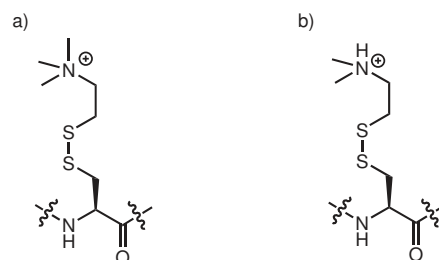


Abbildung 83: Mögliche löslichkeitsverbessernde Schutzgruppenstrategie für Cys4 und Cys7 von Saposin B 1-35, durch ein Tetraalkylammoniumsalz (a) oder durch ein protoniertes tertiäres Amin (b).

7.2 Synthese von Saposin B 36-81

Da das Peptid Saposin B 36-81 homolog zu Saposin D 36-82 ist, wurde dessen Synthese mit einer analogen Strategie versucht (vgl. Kapitel 6.2). Bei der Festphasensynthese an

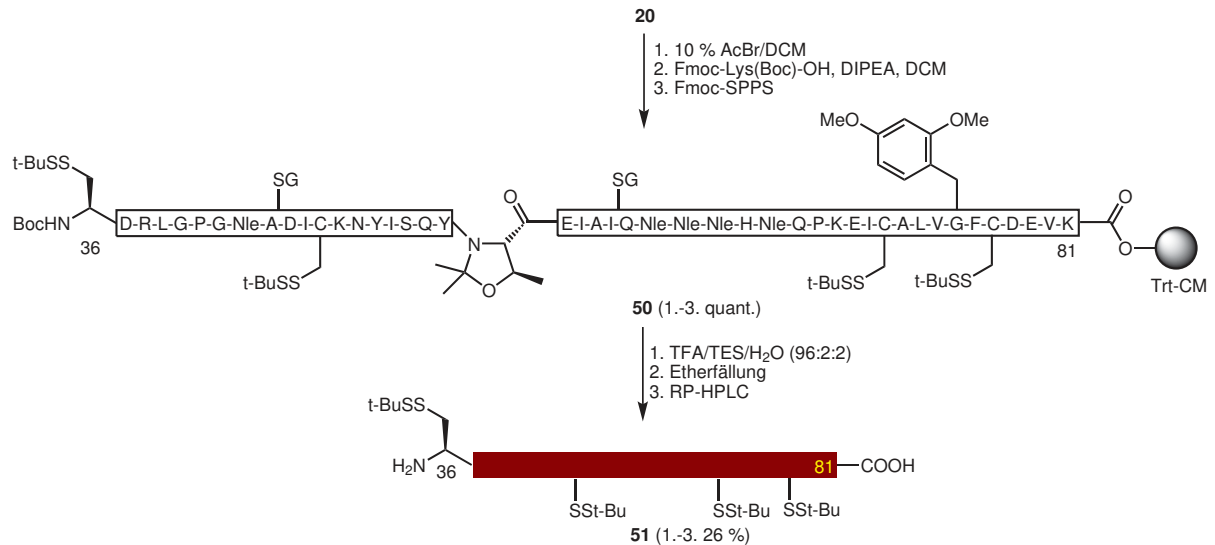


Abbildung 84: Synthese des Fragments Saposin B 36-81 51.

Trytil-ChemMatrix-Harz **20** (Abbildung 84) wurde Ser55 als Pseudoprolin eingebaut und Gly75 mit einer Dimethoxybenzylgruppe (Dmb) verwendet.^[53,54] Darüber hinaus wurden die vier Cysteinreste als Disulfid eingebaut und sämtliche Methionine wurden durch Norleucin (Nle) substituiert.^[206] Die automatisierte Fmoc-SPPS wurde unter Überwachung der

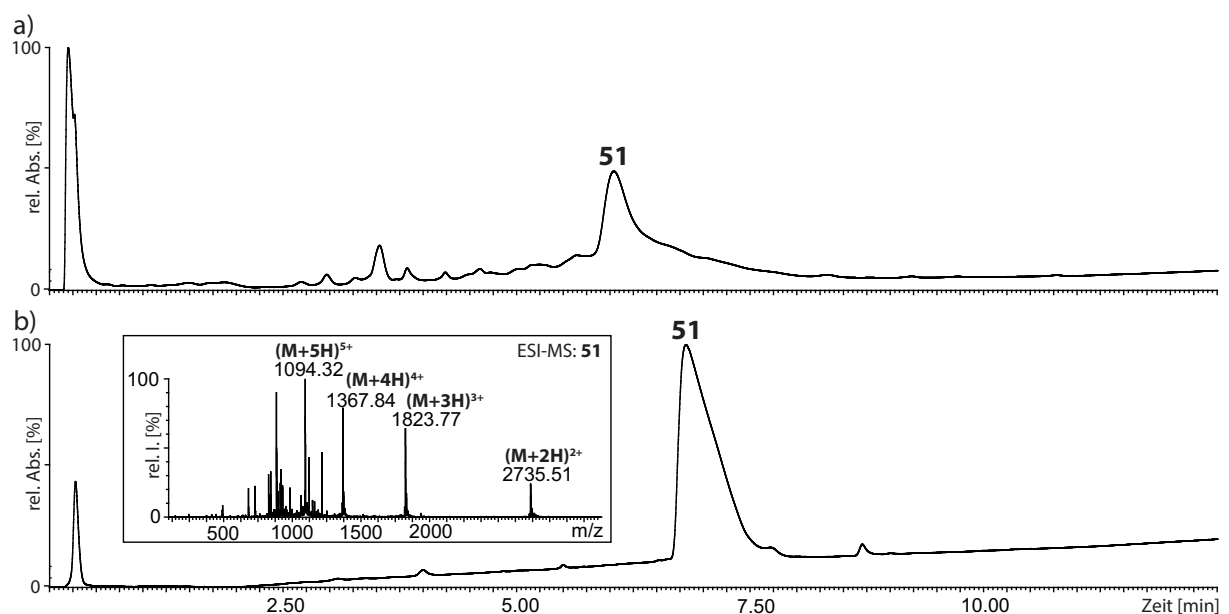


Abbildung 85: a) HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts Saposin B 36-81 51, b) HPLC-MS des HPLC-gereinigten Saposin B 36-81 51.

Fmoc-Abspaltung durch UV-Absorptionsmessung durchgeführt. Hierbei konnten in der gesamten Sequenz keine erschwerten Fmoc-Abspaltungen festgestellt werden. Nach Behandlung des Peptidylharzes **50** mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) wurde das Rohpeptid **51** (Abbildung 85a) mit Diethylether gefällt und in MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst. Eine Reinigung durch RP-HPLC (Supelco Ascentis C18 250 x 10) gelang mit 26 % Ausbeute und guter Reinheit des Peptids **51** (Abbildung 85b).

8 Synthese von Saposin C

Saposin C zeigt im Gegensatz zu Saposin D bei GAUCHER-Patienten eine heterogene Glycosylierung und im Vergleich zu Saposin B trägt es tendenziell größere Glycane.^[14,167] Ob die Glycoformen unterschiedliche Aktivitäten haben, konnte bisher nicht geklärt werden, da keine homogenen Glycoformen des humanen Saposins C in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen. Zwar ist eine chemoenzymatische Synthesemethode zweier Glycoformen des murinen Saposins C bekannt, diese wurde jedoch nur in einem 113 µg- bzw. 13 nmol-Maßstab durchgeführt.^[199] Da es die Synthesestrategie des humanen Saposins D ermöglichte, drei Glycoformen in guten Ausbeuten und in einem 1-3 mg-Maßstab darzustellen (vgl. Kapitel 6), wurde diese Strategie auf Saposin C übertragen (Abbildung 86). Die folgenden Ergebnisse wurden teils in Zusammenarbeit mit IMKE LEMMER erhalten.^[216]

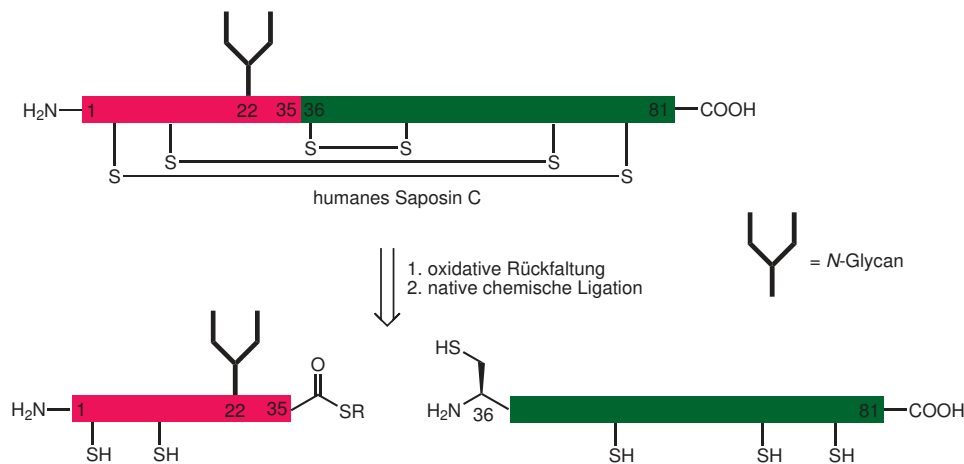


Abbildung 86: Retrosynthese von N-glycosyliertem nativem Saposin C.

8.1 Synthese von glycosylierten Saposin C 1-35 Thioestern

Die Festphasensynthese des Fragments Saposin C 1-35 erfolgte an Trityl-ChemMatrix-Harz **20** (Abbildung 87a). In der Fmoc-SPPS wurden Thr16 und Thr24 als Pseudoprolin,^[66] Cys5 und Cys8 wurden als Disulfid eingebaut. Die Synthese des Peptidylharzes **52** gelang auf diese Weise mit guter Qualität (Abbildung 87b).

Die geschützte Peptidylsäure wurde mit TFA/TES/DCM (1.5:2:96.5) von der Festphase abgespalten und *in situ* unter Verwendung von DIC, Cl-HOBt und H₂NNHBoc zum geschützten Hydrazid Saposin C 1-35 **53** umgesetzt (Abbildung 88). Nach Reinigung durch Flashchromatographie konnte **53** in einer Ausbeute von 70 % und in guter Reinheit erhalten werden (Abbildung 89).

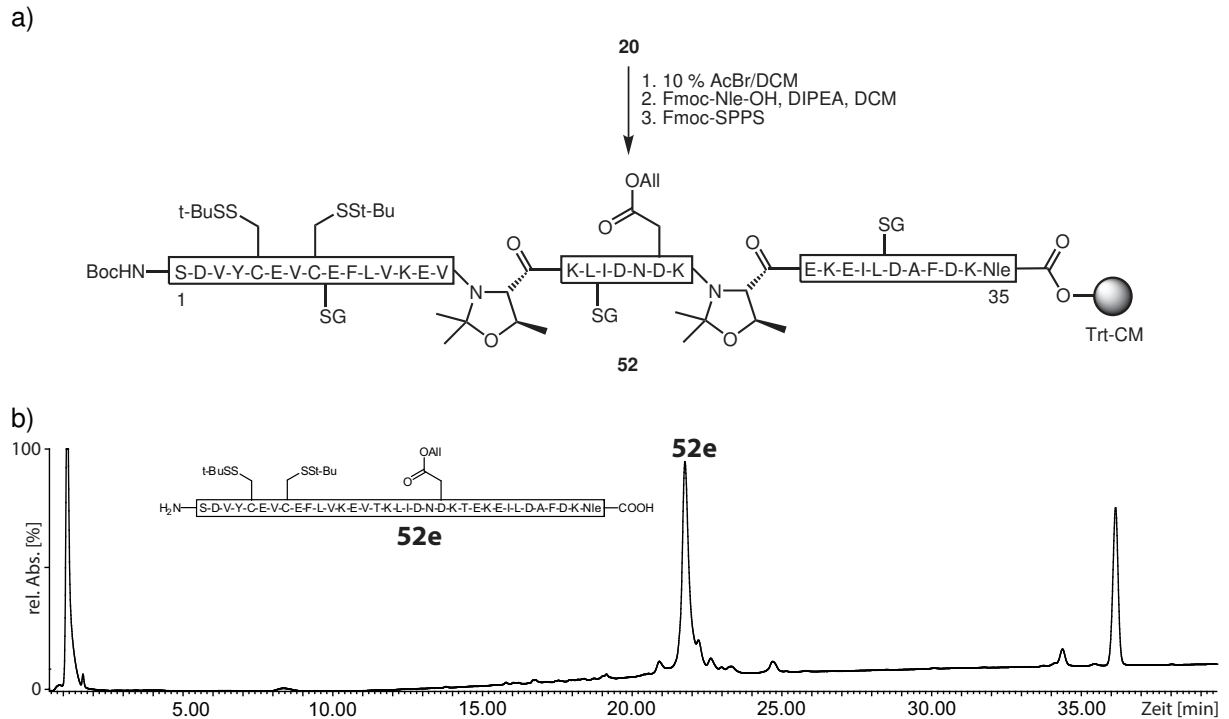


Abbildung 87: a) Synthese des Peptidylharzes Saposin C 1-35 Trt-CM **52**, b) HPLC Chromatogramm von **52e**.

Eine Desallylierung von Saposin C 1-35 **53** zum Hydrazid **54** (Abbildung 88) wurde zunächst unter Anwendung der Methoden (Tabelle 4: Ansatz 1 und 2) versucht, die für Saposin D 1-35 **35** verwendet wurden. Unter Verwendung von Pd(PPh₃)₄ kam es zu der Bildung diverser Nebenprodukte (Abbildung 90a). Mit dem festphasengebundenen Pd^{II}EnCat und dem *R,R*-DACH-phenyl-Trost Liganden kam es zu keinen Nebenreaktionen am Peptid, allerdings konnte das Phosphinoxid des Liganden nicht durch Flashchromatographie abgetrennt werden (Abbildung 90b). Dies war auch nach der Glycopeptidsynthese durch RP-HPLC nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurden verschiedene Liganden und Lösungsmittel in

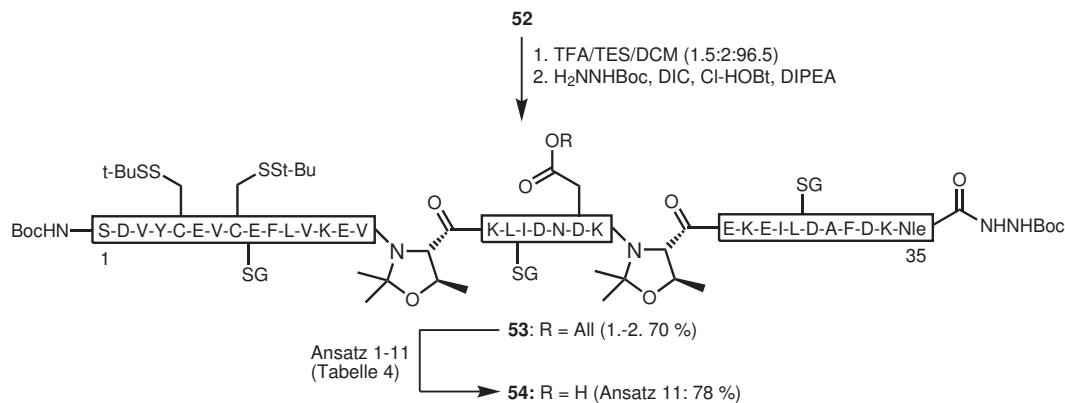


Abbildung 88: Synthese des Saposin C Hydrazids 1-35 **54**.

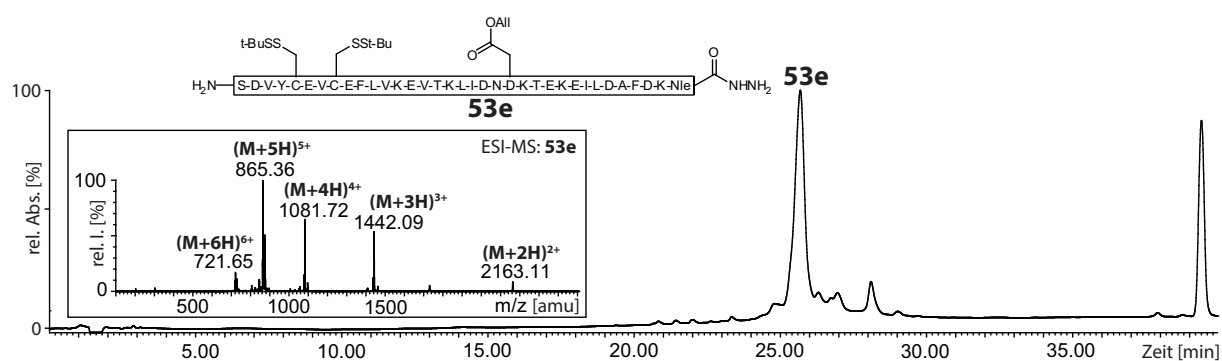


Abbildung 89: HPLC-MS von dem entschützten Saposin C 1-35 Peptidhydrazid **53e**.

Verbindung mit dem Festphasenkatalysator Pd^{II}EnCat getestet (Tabelle 4). Bei Ansatz 3 und 4 kam es zu erheblichen Nebenreaktionen und bei Ansatz 4 konnte das entstandene Triphenylphosphinoxid nicht entfernt werden. Im Fall von Ansatz 5 wurde eine starke Nebenproduktbildung beobachtet. Bei Ansatz 6 wurden kaum Nebenprodukte gebildet und alle Reagenzien konnten abgetrennt werden. Wegen der geringen Löslichkeit des Liganden in DCM war jedoch selbst nach 20 h die Reaktion nicht vollständig. Deshalb wurden weitere Lösungsmittel getestet. In CHCl₃ (Ansatz 7) zeigten sowohl das Peptid als auch der Ligand eine verbesserte Löslichkeit, allerdings war der Palladiumkatalysator in diesem Lösungsmittel gänzlich inaktiv. Ein identisches Ergebnis wurde mit dem sauren Lösungsmittelgemisch

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen (Ansatz 1-11) zur Desallylierung des Hydrazids Saposin C 1-35 **53**.

Ansatz	Katalysator	Ligand	Äquivalente		Lösungs- mittel	t [h]
			Kat.	Ligand		
1	Pd(PPh ₃) ₄	-	0.5	-	DCM	5
2	Pd ^{II} EnCat	<i>R,R</i> -DACH-phenyl-Trost Ligand	0.5	1.5	DCM	5
3	Pd ^{II} EnCat	Phenanthrolin	0.5	1.5	DCM/DMF	5
4	Pd ^{II} EnCat	Triphenylphosphin	0.5	1.5	DCM/DMF	5
5	Pd ^{II} EnCat	2-(Diphenylphosphino)ethylamin	0.7	2.1	DCM	20
6	Pd ^{II} EnCat	[2-(Dicyclohexylphosphino)-ethyl]trimethylammoniumchlorid	0.7	2.1	DCM	20
7	Pd ^{II} EnCat	[2-(Dicyclohexylphosphino)-ethyl]trimethylammoniumchlorid	1	3	CHCl ₃	20
8	Pd ^{II} EnCat	[2-(Dicyclohexylphosphino)-ethyl]trimethylammoniumchlorid	1	3	Pyridin/CHCl ₃	20
9	Pd ^{II} EnCat	[2-(Dicyclohexylphosphino)-ethyl]trimethylammoniumchlorid	1	3	Pyridin/H ₂ O	20
10	Pd ^{II} EnCat	[2-(Dicyclohexylphosphino)-ethyl]trimethylammoniumchlorid	0.7	2.1	HFIP/DCM	20
11	Pd ^{II} EnCat	[2-(Dicyclohexylphosphino)-ethyl]trimethylammoniumchlorid	1	6	MeOH/DCM	7

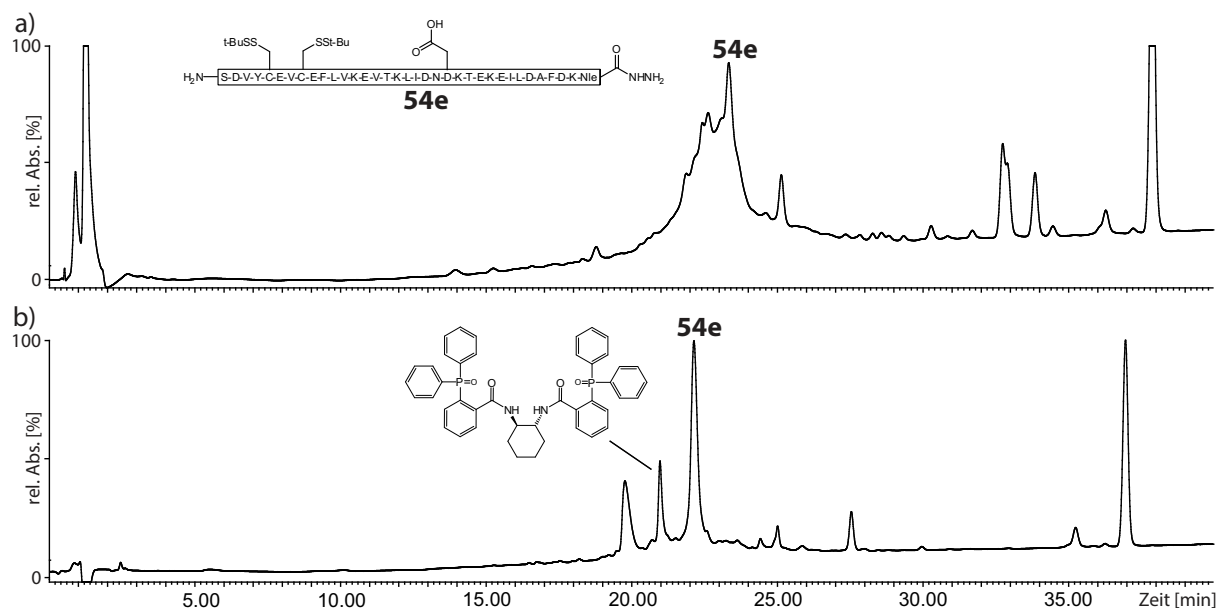


Abbildung 90: HPLC Chromatogramme des nach Ansatz 1 (a) und nach Ansatz 2 (b) erhaltenen Saposin C 1-35 Hydrazids **54e**.

HFIP/DCM (Ansatz 10) erzielt. Im Falle der basischen Lösungsmittelgemische Pyridin/ CHCl_3 (Ansatz 8) und Pyridin/ H_2O (Ansatz 9) konnte das Edukt partiell desallyliert werden, jedoch kam es auch zur Bildung von Nebenprodukten.

Das beste Ergebnis konnte mit dem Lösungsmittelgemisch MeOH/DCM (Ansatz 11) erzielt werden. Der Ligand und das Peptid besaßen in diesem Gemisch eine gute Löslichkeit. Eine ausreichende Reaktivität mit einer geringen Nebenproduktbildung ist ebenfalls gegeben. Nach Reinigung durch Flashchromatographie konnte das desallylierte Saposin C 1-35 Hydrazid **54** in 78 % Ausbeute erhalten werden (Abbildung 91).

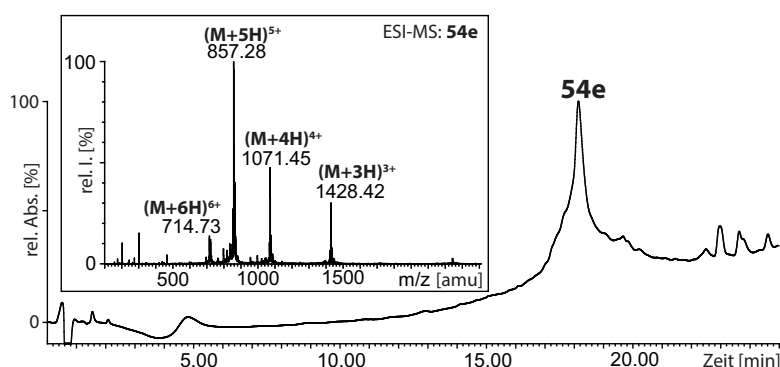


Abbildung 91: HPLC-MS des nach Ansatz 11 desallylierten und entschützten Hydrazids **54e**.

Das Hydrazid **54** wurde daraufhin zu den Glycopeptiden **55a,b** umgesetzt (Abbildung 92 und Abbildung 94). Für die Kupplung von GlcNAc- NH_2 (5.0 eq, bezogen auf das Peptid) wurde **54**

mit HATU, HOAt und DIPEA in DMF/DMSO (1:1) aktiviert. Nach beendeter Reaktion wurde entschützt und mit RP-HPLC gereinigt. Die Umsetzung verlief vollständig (Abbildung 93a) und das Glycopeptidhydrazid Saposin C 1-35 (GlcNAc) **55a** konnte in 23 % Ausbeute erhalten werden (Abbildung 93b).

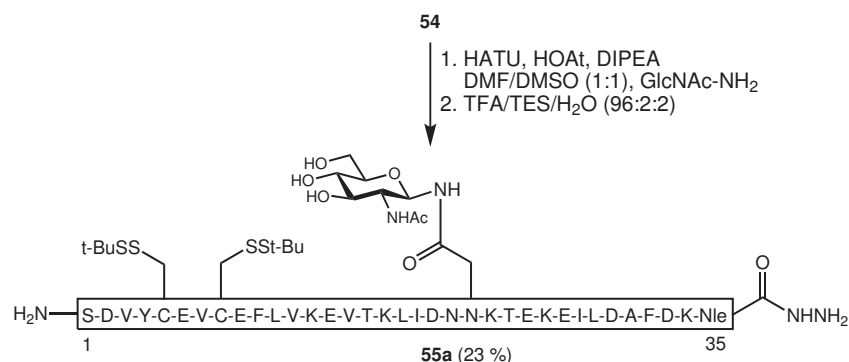


Abbildung 92: Synthese des Glycopeptidhydrazids Saposin C 1-35 (GlcNAc) **55a**.

Anschließend wurde die Kupplung des komplexen biantennären Nonasaccharidamins **27** untersucht, allerdings wurden lediglich 1.2 eq Glycosylamin **27** (bezogen auf das Peptid **54**) verwendet (Abbildung 94). Nach 20 h war kein Edukt **54** mehr vorhanden (Abbildung 95a) und

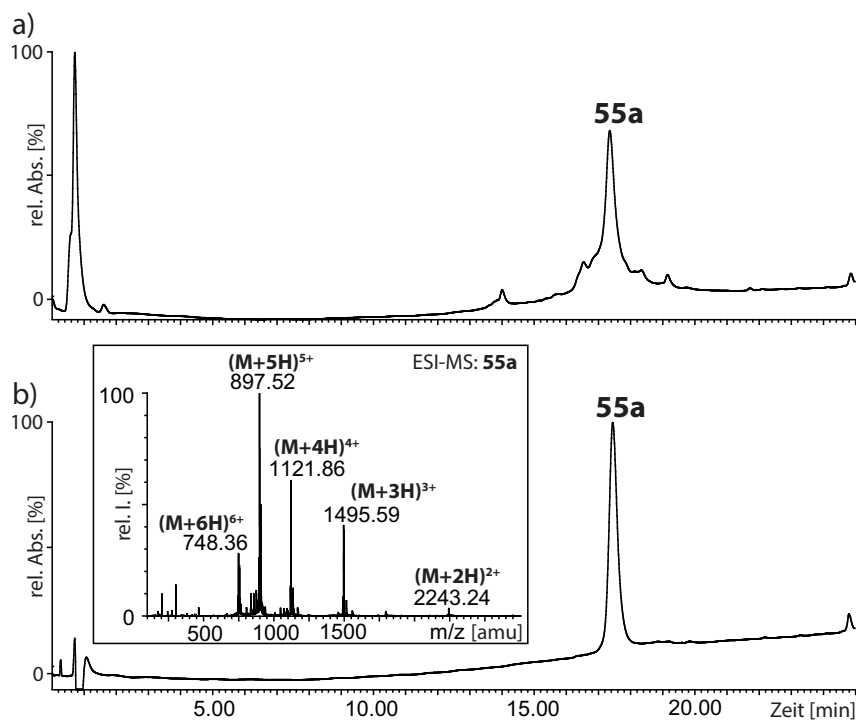


Abbildung 93: a) HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **55a**, b) HPLC-MS von **55a** nach HPLC Reinigung.

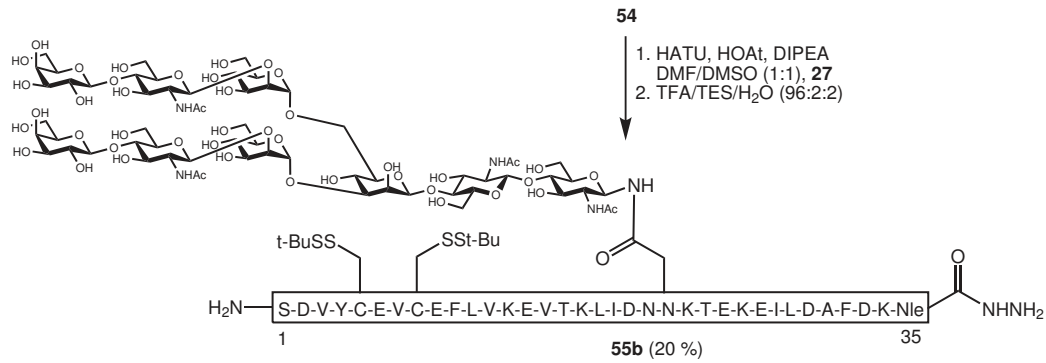


Abbildung 94: Synthese des Sapsin C 1-35 (Nona) Hydrazids **55b**.

das Glycopeptidhydrazid **55b** wurde nach Entschützung und Reinigung durch RP-HPLC in 20 % Ausbeute erhalten (Abbildung 95b). Die Glycopeptidhydrazide Sapsin C 1-35 **55a,b** wurden anschließend zu den entsprechenden Glycopeptidthioestern **56a,b** umgesetzt (Abbildung 96). Hierfür wurden die Glycopeptidhydrazide mit NaNO₂ in 6 M GdmCl (pH 3.5) bei -24 °C zum Acylazid umgesetzt und mit 4-(Mercaptomethyl)benzoesäure (MMBA) bei pH 6-7 und RT in die entsprechenden Thioester **56a,b** überführt.^[195] Die Thioester wurden durch Gelfiltration (Superdex Peptide GL 10/300) isoliert.

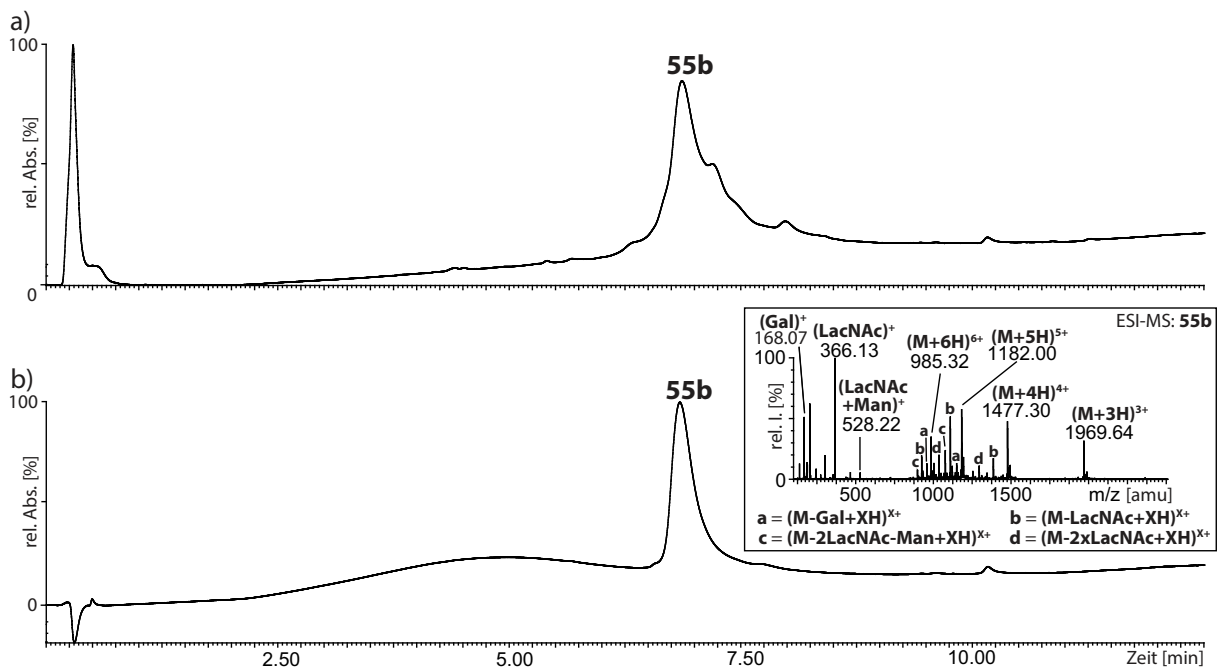


Abbildung 95: a) HPLC-Chromatogramm der Synthese des Sapsin C 1-35 (Nona) Hydrazids **55b**, b) HPLC-MS Analyse von **55b** nach HPLC Reinigung.

Wenn bei diesen Peptiden im Rahmen der Thioestersynthese MMBA als Feststoff zugegeben wird und die Lösung anschließend durch Zugabe von wässriger 1 M NaOH auf pH 6-7

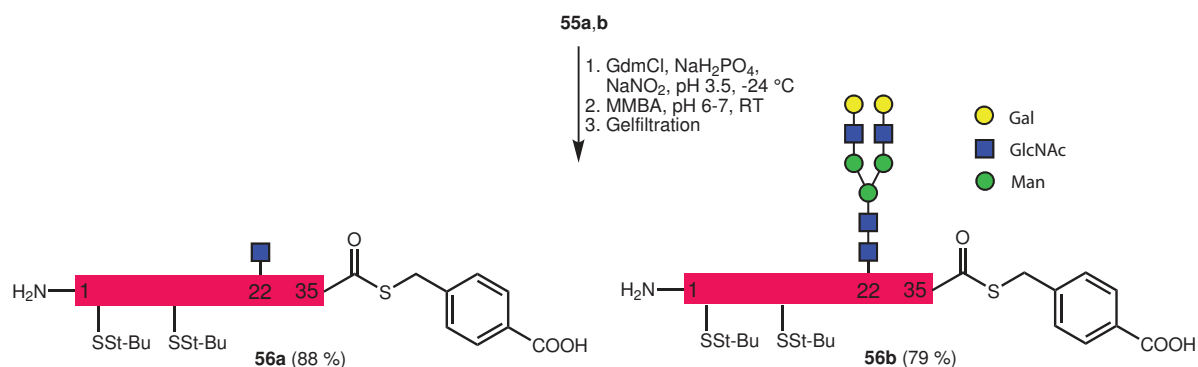


Abbildung 96: Synthese der Saposin C 1-35 Glycopeptidthioester **56a,b**.

eingestellt wird, kommt es in der Peptidsequenz zu einer Aspartimidbildung (Daten nicht gezeigt). Um lokale pH-Erhöhungen und damit die Bildung des Succinimids gering zu halten, wurde MMBA gelöst in wässriger 1 M NaOH zugegeben (pH 6-7).

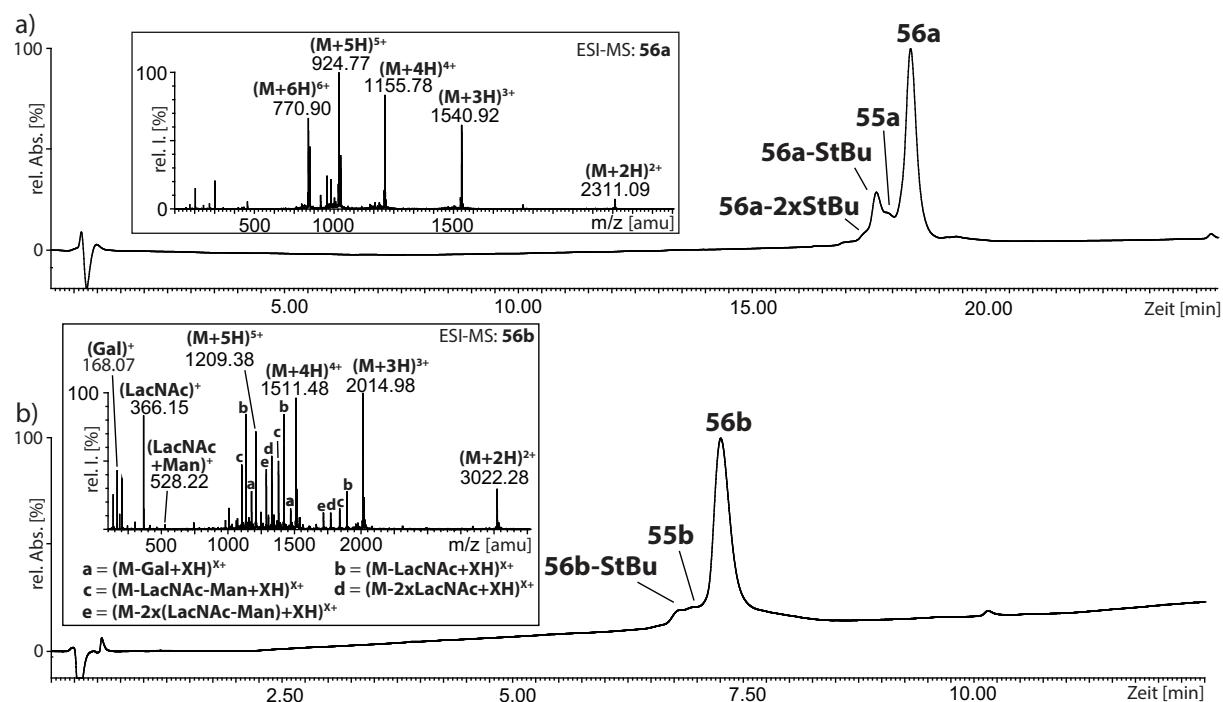


Abbildung 97: HPLC-MS Analyse der durch Gelfiltration isolierten Glycopeptidthioester Saposin C 1-35 (GlcNAc) **56a** (a) und Saposin C 1-35 (Nona) **56b** (b).

Die Glycopeptidthioester **56a,b** konnten in guter Ausbeute erhalten werden. Geringfügige Mengen des Edukts **55a,b** waren noch vorhanden. Die Disulfidschutzgruppen der Cysteine sind gegenüber dem in starken Überschuss eingesetzten Thiol MMBA in geringem Maß labil (Abbildung 97).

8.2 Synthese von Saposin C 36-81

Die Festphasensynthese von Saposin C 36-81 wurde an Trityl-ChemMatrix-Harz **20** durchgeführt (Abbildung 98), es wurden Ser57 und Ser44 als Pseudoprolin verwendet^[53] und sämtliche Cysteine als Disulfid eingesetzt. Met74 wurde durch Norleucin (Nle) substituiert.^[206]

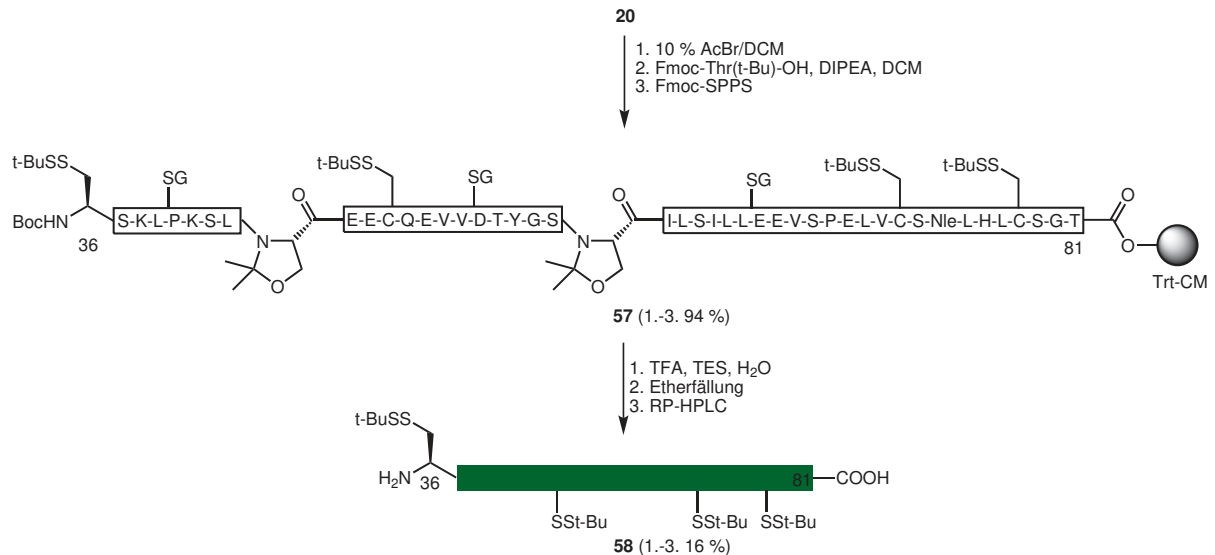


Abbildung 98: Synthese von Saposin C 36-81 **58**.

Die automatische Fmoc-SPPS von Peptidylharz **57** wurde unter Überwachung der Fmoc-Abspaltung durch UV-Absorptionsmessung durchgeführt. Es konnten keine erschwerten Fmoc-Abspaltungen gefunden werden. Nach Abspaltung und Entschützung wurde das

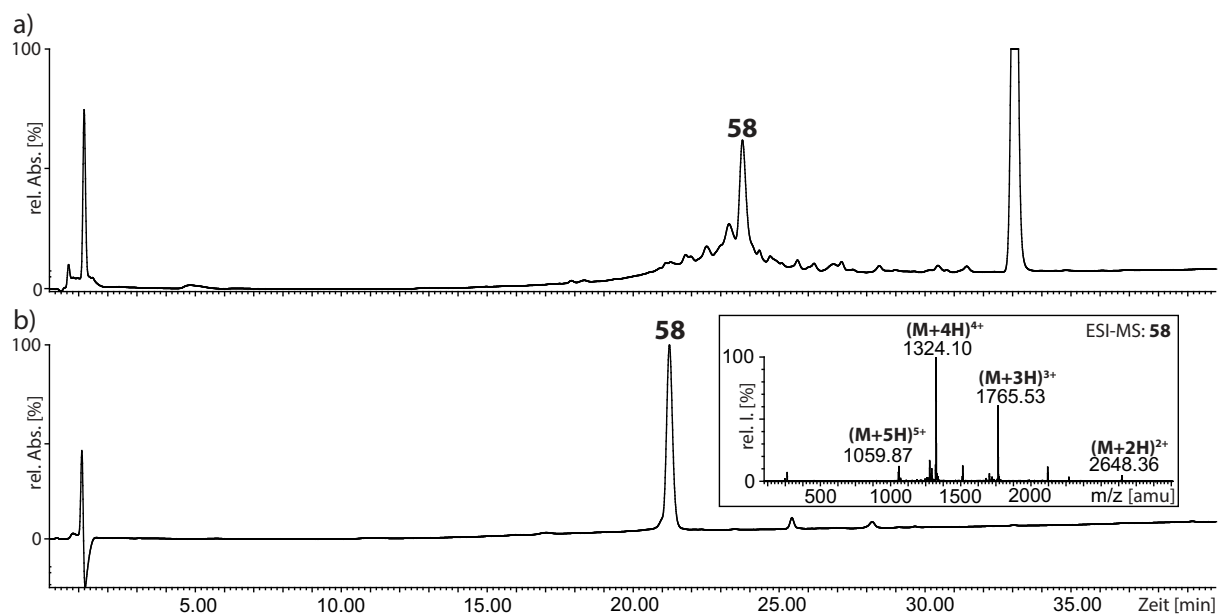


Abbildung 99: a) HPLC Chromatogramm des Rohprodukts **58**, b) HPLC-MS des durch HPLC-gereinigten Saposin C 36-81 **58**.

Rohpeptid **58** (Abbildung 99a) mit Diethylether gefällt und in MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst. Die Reinigung durch RP-HPLC (Supelco Ascentis C18 250 x 10) gelang problemlos und lieferte das Peptid **58** in 16 % Ausbeute und guter Reinheit (Abbildung 99b).

8.3 NCL und oxidative Rückfaltung von Saposin C

Mit den Saposin C 1-35 Glycopeptidthioestern **56a,b** und Saposin C 36-81 **58** wurde die Ligation zu dem Volllängenglycoprotein versucht (Abbildung 100). Die Reduktion der Cysteine gelang mit 30 mM TCEP problemlos. Mit den eingesetzten Überschüssen der Glycopeptidthioester **56a,b** (je 1.5 eq) verliefen die Ligationen innerhalb von 1 d laut HPLC-MS vollständig (Abbildung 101).

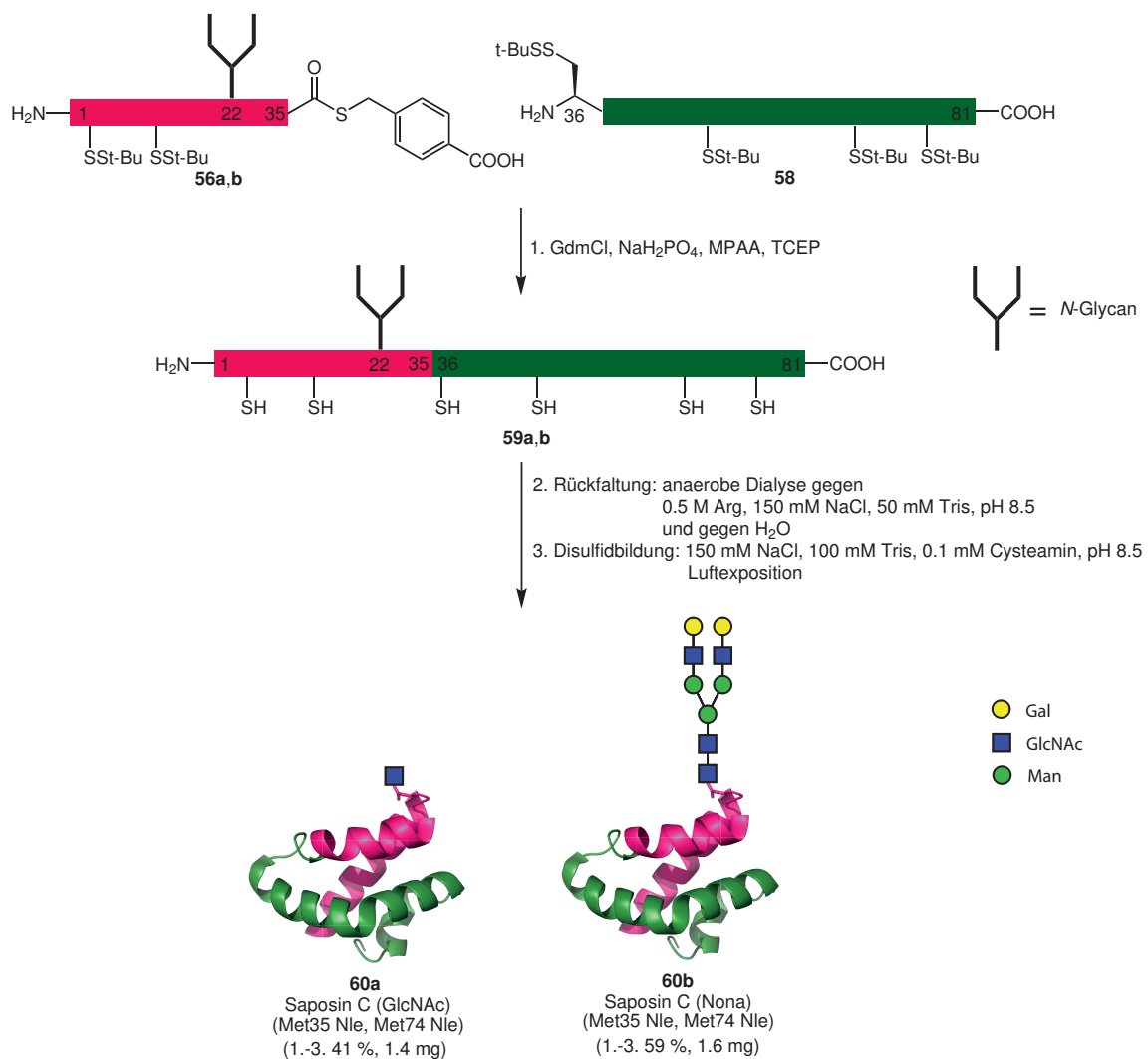


Abbildung 100: Synthese der zwei Saposin C Glycoformen **60a,b** durch NCL und oxidative Rückfaltung durch anaerobe Dialyse und anschließende Disulfidbildung.

Nach beendeter Ligation wurden die denaturierten Glycoproteine **59a,b** analog zu Saposin D rückgefaltet. Dies gelang durch anaerobe Dialyse und anschließende oxidative Disulfidbildung. (Abbildung 101). Die Tendenz des murinen Saposin C (GlcNAc) zur Ausbildung von Dimeren konnte im Fall des humanen Saposins C (GlcNAc) **60a** nicht beobachtet werden.^[199]

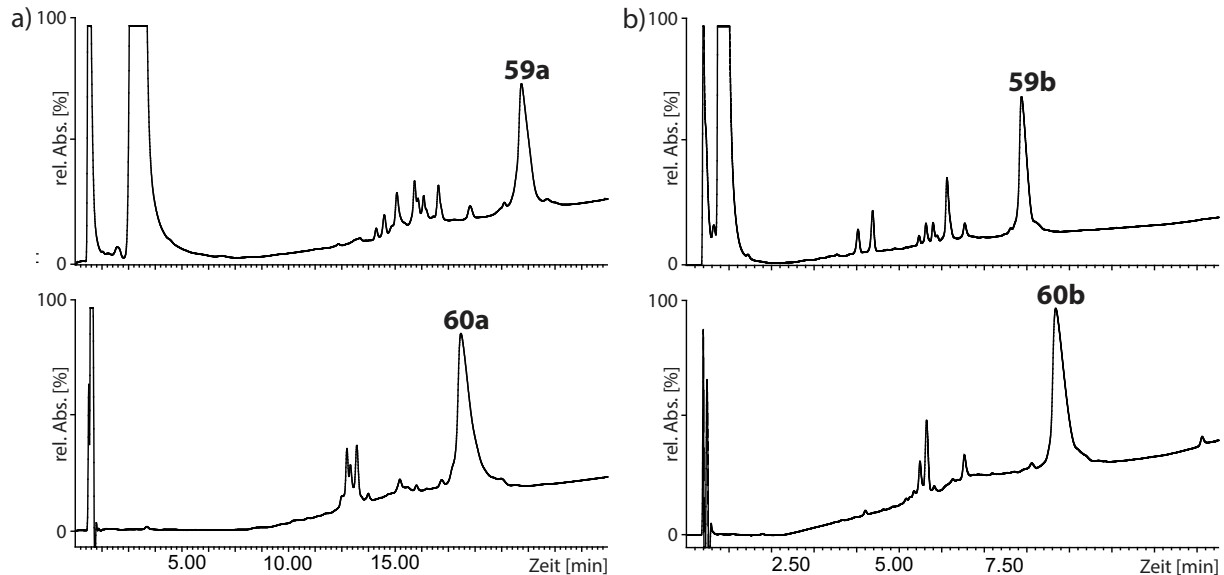
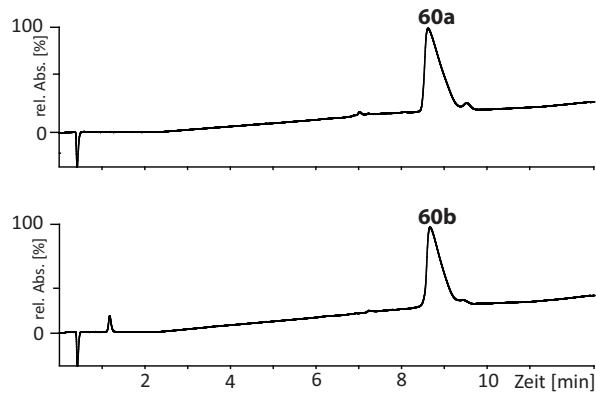


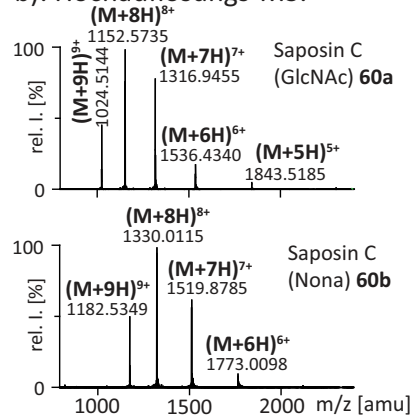
Abbildung 101: a) HPLC-Chromatogramm der Ligation zu Saposin C (GlcNAc) **59a** (oben) und des rückgefalteten und oxidierten Saposins C (GlcNAc) **60a** (unten). b) HPLC-Chromatogramm der Ligation zu Saposin C (Nona) **59b** (oben) und des rückgefalteten und oxidierten Saposins C (Nona) **60b** (unten).

Die beiden Glycoformen wurden durch RP-HPLC gereinigt. Die Glycoproteine Saposin C (GlcNAc/Nona) **60a,b** wurden durch UHPLC, HR-MS, nicht reduzierende SDS-PAGE und CD-Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 102). Die CD-Spektren waren nahezu identisch zu einer Referenz von Saposin C, das aus einer natürlichen Quelle isoliert wurde.^[163] Die beiden Glycoformen zeigen ein ähnliches Spektrum mit einem typischen α -helicalen Charakter. Daher kann angenommen werden, dass die vier α -Helices der Tertiärstruktur ausgebildet wurden. Mit den durch konvergente Synthese erhaltenen Glycopeptidthioestern **56a** sowie **56b** und dem Cysteinfragment **58** konnte die für Saposin D entwickelte Synthesemethode auf Saposin C übertragen werden. Hierdurch konnten zwei Glycoformen in Mengen dargestellt werden, welche für die Untersuchungen der Struktur-Wirkungs-Beziehungen in Bezug auf den Kohlenhydratanteil benötigt werden. Die Übertragbarkeit der Synthesemethode auf Saposin C legt nahe, dass Saposin A ebenfalls durch diese Methode zugänglich sein sollten.

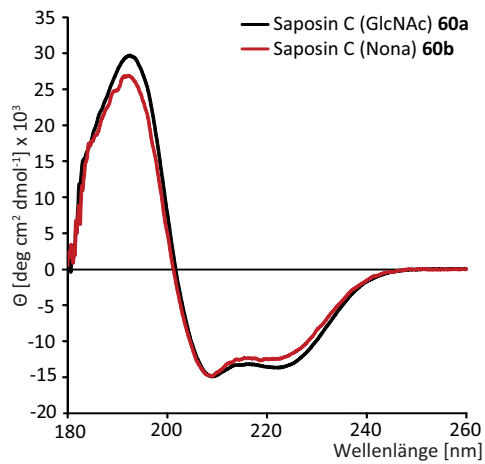
a) UHPLC:



b): Hochauflösungs-MS:



c) CD-Spektren:



d) SDS-PAGE (nicht
reduzierend)

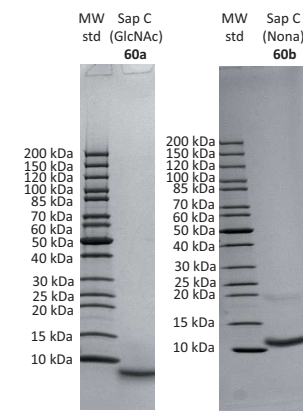
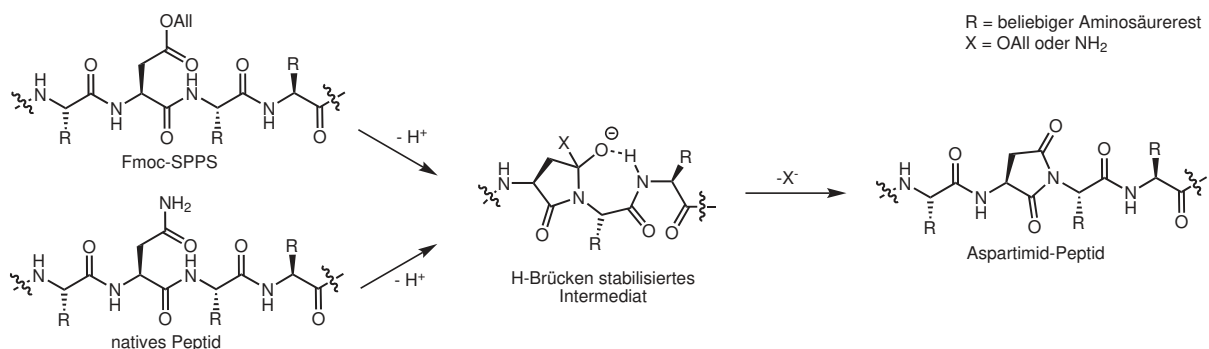


Abbildung 102: Charakterisierung der synthetischen Saposin C Glycoformen **60a,b**: a) UHPLC Chromatogramm, b) HR-MS, c) CD-Spektren, d) SDS-PAGE Analyse (nicht reduzierend).

9 Zusammenfassung

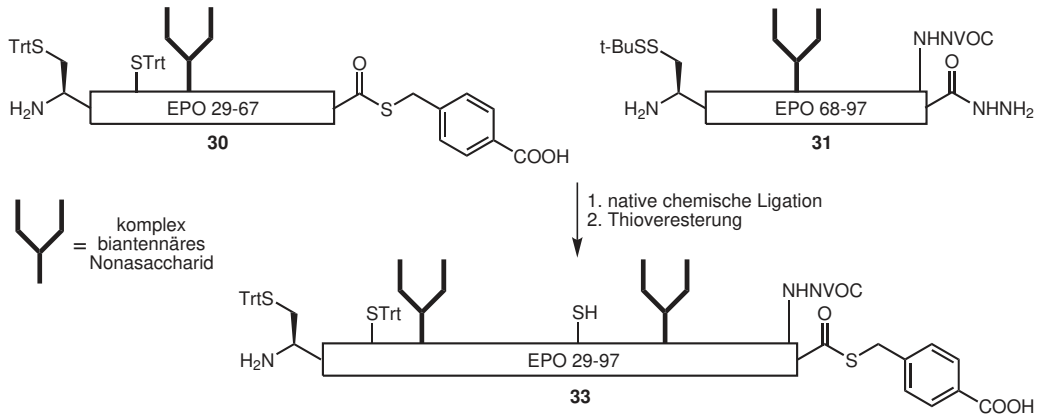
Die Glycosylierung von Proteinen stellt eine wichtige Modifikation mit vielen resultierenden Funktionen dar. Die Isolierung einheitlicher Glycoformen ist jedoch bisher nicht möglich. Solch homogene Referenzen sind allerdings nötig, um Glycoproteine in Bezug auf die unterschiedlichen Saccharidanteile zu erforschen. Deshalb wurden in dieser Arbeit Synthesemethoden zur Gewinnung einheitlicher Glycoproteine entwickelt.

Eine effiziente Methode zur Synthese von Glycopeptiden ist die konvergente LANSBURY-Aspartylierung, bei der das Peptid nachträglich mit dem Glycan verknüpft wird. Nachteilig hierbei ist, dass es häufig zur Bildung eines Aspartimidnebenprodukts kommt. Der genaue Einfluss der Peptidstruktur auf die Aspartimidbildung konnte bisher nicht geklärt werden. Daher wurde durch die Synthese verschiedener peptidischer Testsysteme versucht, weitere Erkenntnisse über den Mechanismus zu gewinnen. Es konnte gezeigt werden, dass für die basenkatalysierte Cyclisierung die Anwesenheit eines Amidprotons in Position n+2 zum Aspartat essentiell ist. Auf den Ergebnissen beruhend wurde ein H-Brücken-stabilisiertes bicyclisches Intermediat postuliert. Weiterhin konnten die für geschützte Peptide gewonnenen Erkenntnisse über die Aspartimidbildung auch bei nativen Peptiden gezeigt werden. Hierfür wurden modifizierte Peptide aus der Sequenz des Peptidhormons ACTH verwendet. Die mechanistischen Erkenntnisse sollten zum Verständnis der Stabilität von Peptiden und Proteinen beitragen.



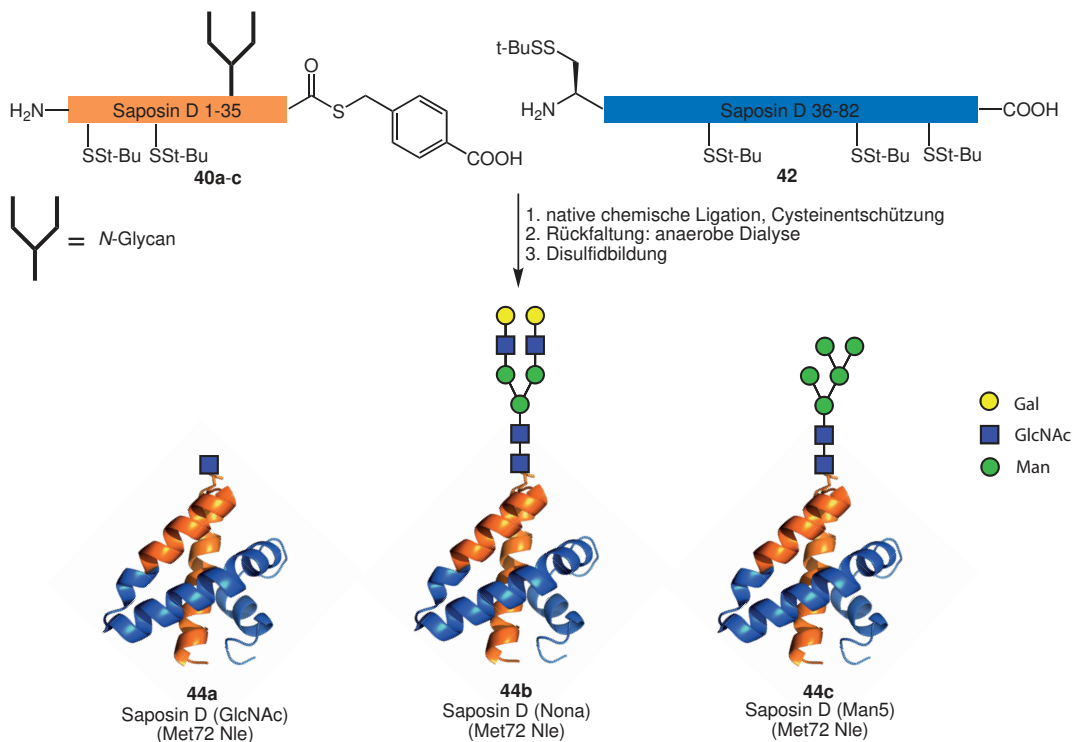
Für die Synthese der glycosylierten Fc-Domäne des Immunglobulins G1 wurde der Peptidthioester IgG1 Fc 223-260 **19** aufgebaut. Durch die verbesserte Abspaltung des Peptids vom Harz konnte der Peptidthioester **19** in höherer Gesamtausbeute erhalten werden.

Zur Synthese von 3-fach glycosyliertem humanem EPO beruhend auf Alanin-Ligationen wurden zwei Schutzgruppenstrategien für die nativen Cysteine 29 und 33 getestet. Dazu wurde das EPO 29-67 Hydrazid **21e** synthetisiert, bei dem beide Cysteine mit einer Phacm-Gruppe



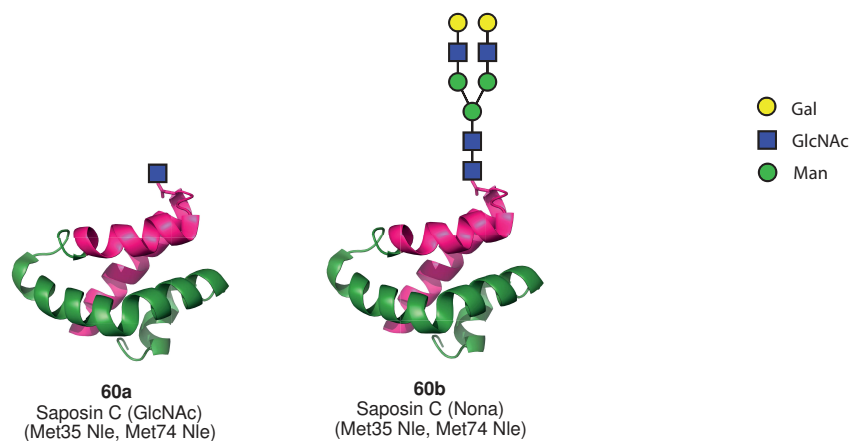
geschützt waren. Eine vollständige Abspaltung beider Phacm-Gruppen durch Ag^{I} - und Hg^{II} -Salze konnte nicht erreicht werden. Als alternative Schutzgruppen für beide Cysteine wurden Tritylthioether eingesetzt. Diese konnten chemoselektiv an den Cysteinen des vollständig entschützten Glycopeptidhydrazids EPO 29-67 **28** angebracht werden. Die Ligation des S-tritylierten Glycopeptids zum biglycosylierten EPO 29-97 Hydrazid **32** gelang mit guter Ausbeute. Auf Grund der geringen Löslichkeit des doppelt tritylierten Ligationsprodukts **32** konnte die Synthese jedoch nicht beliebig skaliert werden. Die Darstellung des biglycosylierten EPO 29-97 Peptidthioesters **33** war durch die hydrophoben Tritylgruppen erschwert.

Für Saposin D konnte eine effiziente Synthesemethode durch NCL und anschließender oxidativer Rückfaltung etabliert werden. Hierfür wurden drei Saposin D 1-35 Glycopeptidthioester **40a-c** durch konvergente Glycopeptidsynthese dargestellt. Das hydrophobe



Cysteinfragment Saposin D 36-82 **42** wurde durch optimierte Fmoc-SPPS, Festphasenextraktion und RP-HPLC gewonnen. Nach NCL mit den Glycopeptidthioestern **40a-c** zu den Vollängenproteinen konnte eine Rückfaltung durch anaerobe Dialyse und anschließende Luftoxidation etabliert werden. Diese Methode lieferte die drei Glycoformen **44a-c** des Saposins D in guten Ausbeuten. Die Kristallisation von Saposin D (GlcNAc) **44a** und eine röntgenkristallographische Analyse zeigten die native Struktur des synthetischen Saposins D. Durch Struktur-Aktivitäts-Tests von **44a-c** konnte zum ersten Mal eine Kohlenhydrat-abhängige Bioaktivität von Saposin D nachgewiesen werden.

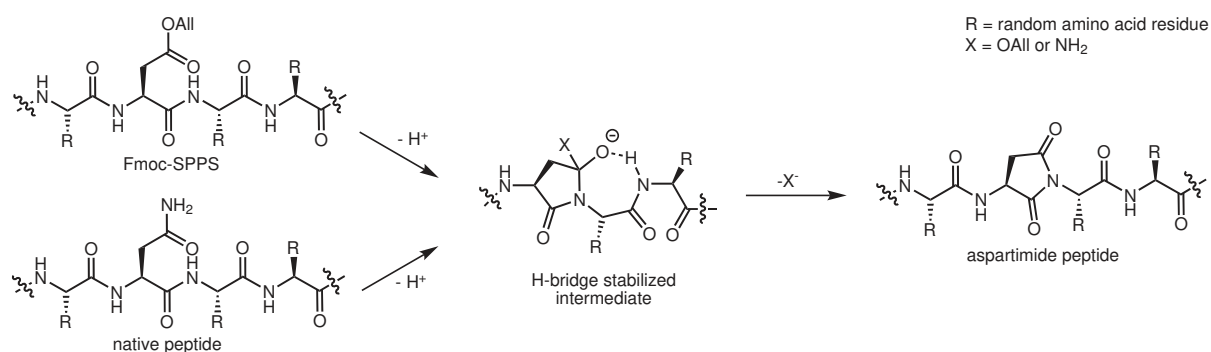
Die für Saposin D entwickelte Synthesestrategie wurde auf Saposin B und C übertragen. Die Fragmente Saposin B 36-81 **51** und Saposin C 36-81 **58** konnten durch Fmoc-SPPS gewonnen werden. Die Synthese der Saposin B 1-35 (GlcNAc/Nona) Glycopeptidhydrazide **48a,b** gelang jedoch nur in niedrigen Ausbeuten, was auf einer starken Aggregation der Glycopeptide bei sauren Bedingungen beruht. Eine Thioveresterung der Hydrazide **48a,b** war nicht möglich. Die Saposin C 1-35 (GlcNAc/Nona) Glycopeptidthioester **56a,b** waren gut zugänglich. Hierfür war die Entwicklung von speziellen Desallylierungsbedingungen notwendig. Die Ligation und die oxidative Rückfaltung beider Glycoformen konnten mit guten Ausbeuten durchgeführt werden. Dadurch konnte eine effiziente Synthesemethode für Saposin C etabliert werden, welche die homogenen Glycoformen **60a,b** lieferte.



10 Summary

Glycosylation is an important protein modification with many resulting functions. However the isolation of homogeneous glycoforms is not possible so far. Certainly such uniform samples are necessary to explore glycoproteins in relation to their different saccharide moiety. Therefore synthesis methods for homogeneous glycoproteins have been developed in this thesis.

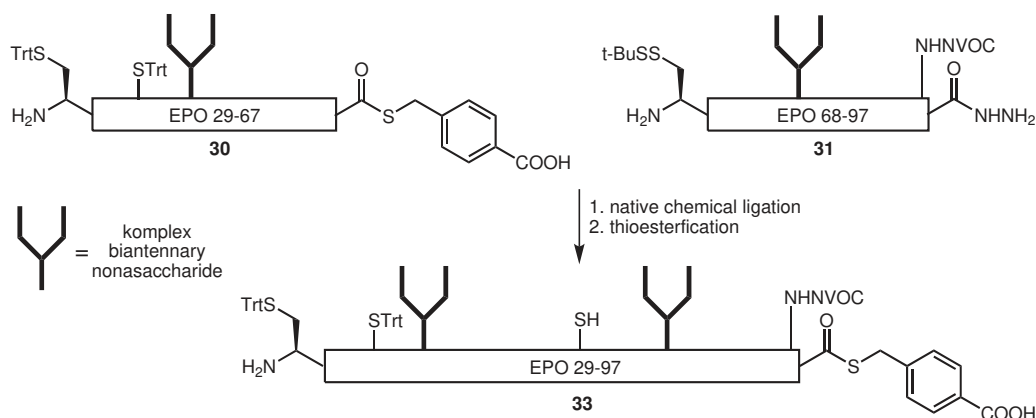
An efficient technique for the synthesis of glycopeptides is the convergent LANSBURY-Aspartylation, in which the glycan is linked to the peptide subsequently. Adversely in this case, an aspartimide side product is formed often. The exact influence on the aspartimide formation of the peptide structure could not be explained so far. Therefore the attempt was to gain further knowledge of the mechanism by the synthesis of different peptide test systems. It has been shown that the presence of the amide proton in position $n+2$ to the aspartate is essential for the base catalyzed cyclisation. Based on the results an H-bridge stabilized bicyclic intermediate was postulated. Furthermore the perceptions of the aspartamide formation for protected peptides could also be shown for native peptides. Therefore modified peptides from the sequence of the peptide hormone ACTH were used. The mechanistic awareness should contribute to the understanding of peptide and protein stability.



For the synthesis of the glycosylated Fc-domain of the immunoglobulin G1 the peptide thioester IgG1 Fc 223-260 **19** was synthesized. The peptide thioester **19** was obtained in higher overall yield by an improved peptide cleavage from resin.

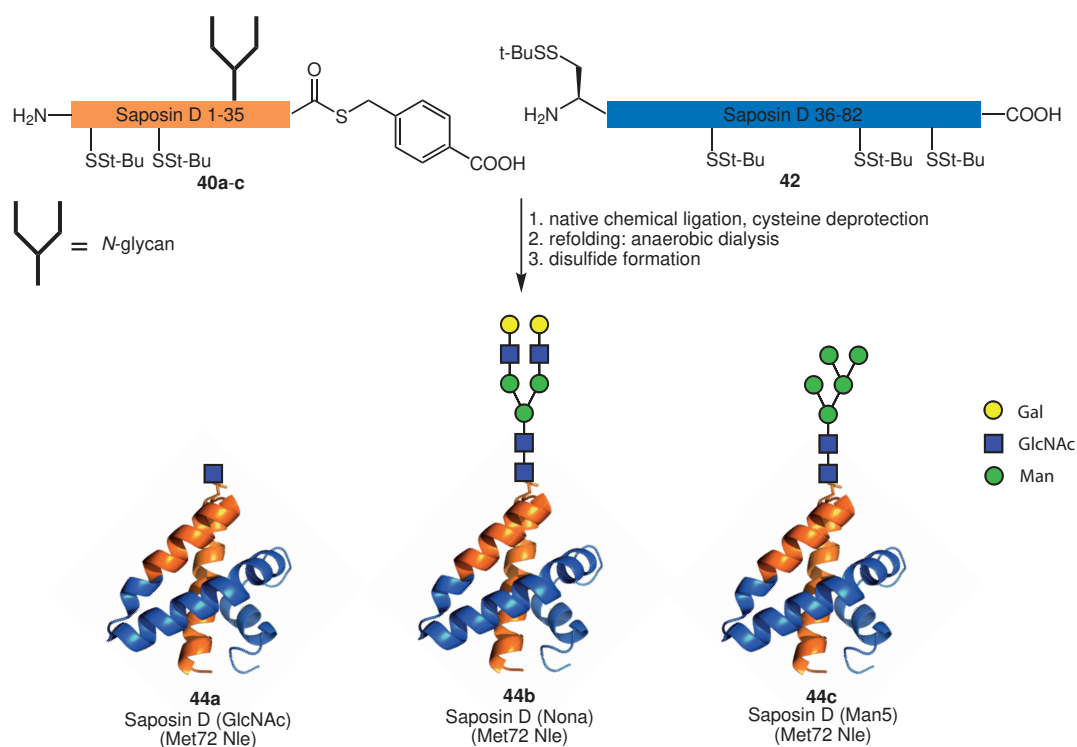
For the synthesis of 3-fold glycosylated human EPO based on alanine ligations two protecting group strategies have been examined for the native cysteine 29 and 33. Therefore the EPO 29-67 hydrazide **21e** was synthesized, in which both cysteines were protected by a Phacm group. Complete cleavage of both Phacm groups could not be achieved by Ag^I and Hg^{II} salts. Trityl thioethers were applied as alternative protecting groups for both cysteines. Those could be attached to the cysteines of the completely deprotected glycopeptide hydrazide **28**

Summary



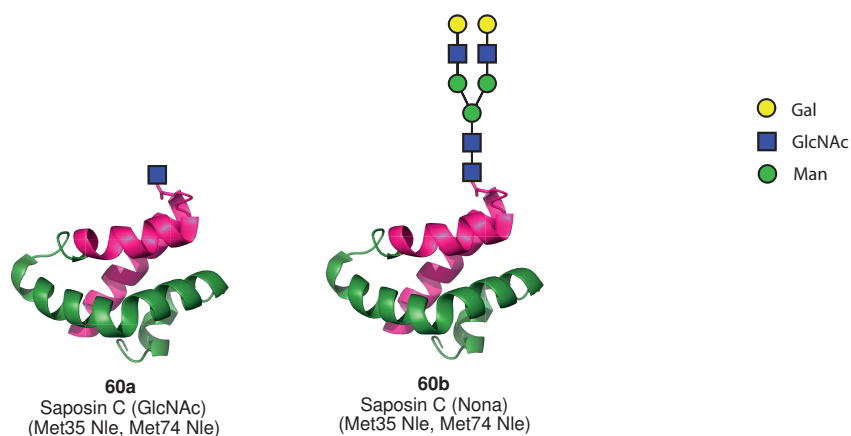
chemoselectively. The ligation of the *S*-tritylated glycopeptide to the biglycosylated EPO 29-97 hydrazide **32** succeeded with good yield. However the synthesis could not be scaled randomly, because of the low solubility of the bitritylated ligation product **32**. Synthesis of the biglycosylated EPO 29-97 peptide thioester **33** was difficult due to the hydrophobic trityl groups.

For Saposin D an efficient synthesis method by NCL and subsequent oxidative refolding was established. Therefore three Saposin D 1-35 glycopeptide thioesters **40a-c** were produced by convergent glycopeptide synthesis. The hydrophobic cysteine fragment Saposin D 36-82 **42** was obtained by an optimized Fmoc-SPPS, solid phase extraction and RP-HPLC. After NCL with the glycopeptide thioesters **40a-c** yielding the full-length proteins refolding by anaerobic



dialysis and subsequent air oxidation was established. This method provided the three Glycoforms **44a-c** of Saposin D in good yields. Crystallisation of Saposin D (GlcNAc) **44a** and X-ray analysis showed the native structure of the synthetic Saposin D. For the first time structure-activity relationship studies of **44a-c** revealed carbohydrate depending bioactivity of Saposin D.

The synthesis strategy developed for Saposin D was applied to Saposin B and C. The fragments Saposin B 36-81 **51** and Saposin C 36-81 **58** were obtained by Fmoc-SPPS. The synthesis of the Saposin B 1-35 (GlcNAc/Nona) glycopeptide hydrazides **48a,b** succeeded, but merely with low yields, resulting from a strong aggregation of the glycopeptides under acidic conditions. Thioesterification of the Hydrazids **48a,b** was not possible. Saposin C 1-35 (GlcNAc/Nona) glycopeptide thioesters **56a,b** were readily accessible. Therefore the development of special deallylation conditions was necessary. The ligation and oxidative refolding of both glycoforms could be performed with good yields. Thus an efficient synthesis method was established for Saposin C, which provided the homogeneous glycoforms **60a,b**.



11 Experimenteller Teil

11.1 Allgemeines

Geräte und Materialien

Zur quantitativen UV-Bestimmung des Beladungsgrads wurde das Spektralphotometer Specord 2000 von Analytik Jena verwendet. Hochauflösende Massenspektren wurden mit einem Thermo Q Exactive Orbitrap Massenspektrometer aufgenommen. Die LC-MS Analytik erfolgte an einem LCT ESI-TOF-Massenspektrometer mit HPLC-Kupplung. Dazu wurden eine Agilent HP 1100 Anlage mit Photodiodendetektor von 200 bis 300 nm oder ein Waters ACQUITY UPLC H-Class System mit Photodiodenarray-Detektor (PDA) verwendet. Die LC-Trennung erfolgte über die RP-Säulen YMC-Pack Hydrosphere C18 (120 Å, S-3 µm, 50 × 2.1 mm) (A I), YMC-Pack Pro C8 (120 Å, S-3 µm 50 × 2.1 mm) (A II), YMC-Triart C8 (120 Å, S-3 µm, 50 × 2.1 mm) (A III), Discovery Bio Wide Pore C5 (300 Å, 5 µm, 50 x 2.1 mm) (A IV), YMC-Pack Protein RP (120 Å, S-5 µm, 50 × 2.1 mm) (A V), YMC-UltraHT Hydrosphere C18 (120 Å, S-2 µm, 30 x 2.0 mm) (B I), YMC-Triart C8 (120 Å, S-1.9 µm, 30 x 2.0 mm) (B II) und YMC Protein-RP (120 Å, S-5 µm, 2.0 x 30 mm) (B III). Als Lösungsmittelsystem wurde H₂O + 0.1 % HCOOH (Eluent A) und MeCN + 0.1 % HCOOH (Eluent B) verwendet.

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden 4-20 %-ige Tris/Glycin Gradientengele (Anamed) verwendet. Es wurden je 7 µg Protein in einem Probenpuffer (0.4 g SDS, 4 mL Glycerin, 0.1 mL 0.1 %-iges Bromphenolblau, 2.5 mL 0.5 M Tris-Hydrochlorid, 10 mL H₂O) verwendet. Als Laufpuffer diente eine Lösung aus 29 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS und 10 L H₂O. Als Fixierlösung wurde eine 20 %-ige Trichloressigsäure-Lösung und als Färbelösung wurde PageBlue™ Protein Staining Solution verwendet. Die Entfärbung wurde mit einer 3.3 %-igen NaCl-Lösung vorgenommen.

Die CD-Spektren der Proteine wurden in reinem H₂O (23 µM, pH 6) in einer Hellma 165 QWS Küvette (1 mm, 160 µL) an einem J-600 Spektropolarimeter (Jasco, Deutschland) aufgenommen.

Für präparative Reinigungen durch RP-HPLC oder Gelpermeationschromatographie wurde eine Pharmacia Äkta Basic HPLC-Anlage mit einer Pharmacia Biotech P-900 Gradientenpumpe und einem Pharmacia Biotech UV-900 Detektor verwendet. Die UV-Absorption wurde bei 214, 254 und 280 nm detektiert.

Festphasenextraktionen erfolgten über SepPak Classic C18 Silica-Säulen, 330 mg, 55-105 µm der Firma Waters. Zur Flashchromatographie wurde ein GRACE Reveleris® iES-Flash-System mit einem ELS-Detektor und UV-Absorptionsmessung bei 254 nm und 280 nm verwendet.

Dünnschichtchromatographische Analysen wurden auf „Alugram Sil G/UV254“-Kieselgelplatten (Schichtdicke 0.2 mm) der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Die Detektion erfolgte entweder durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm oder durch Eintauchen der DC-Platte in eine Reagenzlösung und anschließendem Erhitzen im Heißluftstrom. Als Reagenzlösung zur Detektion von Verbindungen mit Kohlenhydraten wurde eine Lösung mit 0.25 mL Resorcinmonomethylether in 250 mL Ethanol und 6.6 mL konzentrierter Schwefelsäure verwendet. Zum Anfärben von Verbindungen mit freien Aminogruppen wurde ein Ninhydrinreagenz aus 1.8 g Ninhydrin in 485 mL Methanol und 15 mL Eisessig verwendet. Aromatische Verbindungen wurden mit einer Lösung aus 2.5 g Phosphormolybdänsäure $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$ und 1.0 g Cerdisulfat $Ce(SO_4)_2 \times 4 H_2O$ in 94 mL Wasser und 6 mL konzentrierter Schwefelsäure angefärbt.

Die Lösungsmittel DCM und MeOH waren von technischer Qualität und wurden vor Verwendung durch Destillation gereinigt. DCM wurde mit Phosphorpentoxid und MeOH mit Magnesium absolutiert. Es wurde doppelt destilliertes und über eine Millipore-Anlage filtriertes Wasser verwendet.

Das Aminomethyl-ChemMatrix- und Trityl-ChemMatrix-Harz wurde von pcas BioMatrix Inc. (Quebec, Canada) bezogen. Das Chlor-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol-Harz wurde von Iris Biotech (Marktredwitz, Deutschland) erworben. Alle verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wurden von Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz), Iris Biotech (Marktredwitz, Deutschland), Sigma Aldrich (Steinheim Deutschland), Bachem (Bubendorf, Schweiz), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Acros (Geel, Belgien) Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland), Carbolution (Saarbrücken, Deutschland) oder TCI (Eschborn, Deutschland) erworben.

Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Die Festphasenpeptidsynthese wurde maschinell nach automatischen Standard-Fmoc-Protokollen an einem Tribute Peptidsynthesizer mit UV-Detektion von Protein Technologies, Inc. durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten unter Stickstoffatmosphäre und wurden während den Kupplungen geschüttelt. Nach jeder Kupplung oder Fmoc-Entschützung wurde das Harz 5x für je 0.5 min mit der angegebenen Menge DMF gewaschen. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 20 % Piperidin in DMF durchgeführt. Die Dauer der einzelnen Entschützungsschritte sowie die Anzahl der Wiederholungen wurde durch das IntelliSynthTM UV-Monitoring and Feedback Control System überwacht, wobei die Absorptionsmessung der Entschützungslösung bei 301 nm erfolgt. Je nach Bedarf wurde die Dauer der

Entschützungs-schritte verlängert oder die Schritte wurden bis zu 10x wiederholt. Abweichende Vorgehensweisen werden im Syntheseprotokoll angeführt.

Aminosäurekupplungen

Mit Ausnahme von Cystein werden die geschützten Aminosäuren mit einer äquimolaren Menge HCTU oder PyBOP gekuppelt. Hierzu werden die Aminosäuren und das entsprechende Aktivierungsreagenz für 2 min in der angegebenen Menge DIPEA-haltigen DMF gelöst und anschließend zum Harz gegeben. Nach Ablauf der Kupplungszeit wird das Harz mit DMF gewaschen. Die genauen Kupplungsbedingungen sind im jeweiligen Syntheseprotokoll angeführt.

Cystein-Kupplungen als symmetrisches Anhydrid

Cysteinderivate werden manuell als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Die allgemeinen Darstellungen dieser Anhydride werden wie folgt durchgeführt.

Boc/Fmoc-Cys(Phacm)-OH bzw. *Boc/Fmoc-Cys(Trt)-OH* (10 eq, 0.21 M) wird in DMF/DCM (1:3) gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt, es wird unter Rühren DIC (5 eq) zugegeben und es wird weitere 20 min bei 0 °C gerührt. Der entstandene Feststoff wird abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeeengt. Das Anhydrid wird in dem angegebenen Volumen DMF aufgenommen und zum Harz gegeben. Nach beendeter Kupplung wird das Harz mit DMF (5x) gewaschen.

Boc/Fmoc-Cys(St-Bu)-OH (10 eq, 0.15 M) wird in DCM gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt, es wird unter Rühren DIC (5 eq) zugegeben und es wird für weitere 20 min bei 0 °C gerührt. Der entstandene Feststoff wird abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingeeengt. Das Anhydrid wird in dem angegebenen Volumen DMF aufgenommen und zum Harz gegeben. Nach beendeter Kupplung wird das Harz mit DMF (5x) gewaschen.

Bestimmung der Beladung des Harzes (Fmoc-Bestimmung)

Für eine Bestimmung des Beladungsgrades werden 1-2 mg des Harzes mit 1.5 mL 20 % Piperidin in DMF (v/v) versetzt. Es wird 15 min geschüttelt, danach wird das Harz abzentrifugiert und es wird die Absorption der 1:1 Verdünnung aus Überstand und 20 % Piperidin in DMF bei 290 nm bestimmt. Als Referenz dient hierbei die Lösung aus 20 % Piperidin in DMF. Anschließend wird der Beladungsgrad B_H durch den gemessenen Absorptionswert A_{290} (Differenz aus der Absorption der Probe und der Absorption der

Referenz) für die eingewogene Menge an Harz m_{Harz} unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 5253 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ mit Gleichung 1 berechnet.

$$B_H[\text{mmol/g}] = \frac{A_{290}}{m_{\text{Harz}}[\text{mg}] \cdot 1.75} \quad (1)$$

Der theoretische Beladungsgrad B_H kann durch den zuletzt bestimmten Beladungsgrad B_H und dem Molekulargewicht M der gekuppelten Aminosäure bzw. des Peptids berechnet werden. Dabei ist darauf zu achten, das Molekulargewicht X der Komponente abzuziehen, welche bei der Kupplung eliminiert wird. Die Berechnung erfolgt mittels Gleichung 2.

$$B_H[\text{mmol/g}] = \frac{1000 \cdot B_H[\text{mmol/g}]}{1000 + [B_H \cdot (M[\text{g/mol}] - X[\text{g/mol}])]} \quad (2)$$

Analytische Entschützung mit TFA

Für die LC-MS Analytik wurden geschützte Peptide bzw. Peptidylharze entschützt. Hierfür werden ca. 0.5 mg des Peptidylharzes bzw. 0.2 mg des geschützten Peptids mit 100 μL TFA/TES/ H_2O (96:2:2) versetzt und für 1 h geschüttelt. Die Lösung wird im Hochvakuum eingengt. Der Rückstand wird in $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ + 0.1 % HCOOH gelöst und durch HPLC-MS analysiert.

11.2 Versuche zu Kapitel 3.1

Fmoc-Gly-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol

390.0 mg Chlor-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol (0.62 mmol, $B_H = 1.6 \text{ mmol/g}$) werden 30 min in DCM_{abs} vorgequollen. Danach werden 69.6 mg Fmoc-Gly-OH (0.23 mmol, 1 eq) und 160.2 μL DIPEA (0.92 mmol, 4 eq) in 1.7 mL DCM_{abs} zum Harz gegeben und 16 h geschüttelt. Das Harz wird mit DCM (5x), mit insgesamt 20 mL $\text{DCM}/\text{MeOH}/\text{DIPEA}$ (17:2:1) 3x 2 min und nochmals mit DCM (3x) gewaschen. Das Harz wird im Hochvakuum getrocknet und besitzt einen Beladungsgrad von 0.52 mmol/g.

Fmoc-SPPS der Hexapeptide 1-7

77.5 mg Fmoc-Gly-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol (40.3 μmol , $B_H = 0.52 \text{ mmol/g}$) werden in ein 10 mL Reaktionsgefäß eingewogen und es wird eine automatische Fmoc-SPPS durchgeführt. Für die Fmoc-Entschützungsschritte werden je 2 mL 20 % Piperidin in DMF und für die Waschschrte je 2 mL DMF verwendet. Die Aminosäuren und deren Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 5 bis Tabelle 11 aufgeführt. Nach beendeter Synthese wird das jeweilige

Peptidylharz mit DCM (5x) gewaschen und einer analytischen Abspaltung mit HFIP unterzogen.

Analytische Abspaltung der Peptide 1-7 mit HFIP

0.5 mg des entsprechenden Peptidylharzes werden mit 100 µL 20 % HFIP in DCM für 10 min geschüttelt. Der Ansatz wird im Hochvakuum getrocknet und der Rückstand in MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH aufgenommen. Nach Zentrifugation wird der Überstand per HPLC-MS analysiert.

Boc-Ala-Asp(OAll)-Gly-Ser(t-Bu)-Thr(t-Bu)-Gly-OH 1

Hexapeptid **1**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₃₄H₅₈N₆O₁₃ (758.41); berechnet: (M+H)⁺ 759.41; gefunden: 759.70

Aspartimidnebenprodukt **1ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₃₁H₅₂N₆O₁₂ (700.37); berechnet: (M+H)⁺ 701.37; gefunden: 701.64.

Tabelle 5: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hexapeptids **1**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL] 0.4 M DIPEA in DMF	Kupplungsdauer [min]
Thr5	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH ^[a]	80.1	1.0	45
Ser4	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH ^[a]	77.3	1.0	45
Gly3	Fmoc-Gly-OH ^[a]	59.9	1.0	45
Asp2	Fmoc-Asp(OAll)-OH ^[b]	47.8	1.0	60
Ala1	Boc-Ala-OH ^[a]	38.1	1.0	45

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.20 mmol) und 83.4 mg HCTU (0.20 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplung werden 3 eq Aminosäure (0.12 mmol) und 62.9 mg PyBOP (0.12 mmol, 3 eq) verwendet.

Boc-Ala-Asp(OAll)-Gly-Ser($\psi^{Me,Me}pro$)-Thr(t-Bu)-Gly-OH 2

Hexapeptid **2**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₃₃H₅₄N₆O₁₃ (742.37); berechnet: (M+H)⁺ 743.37; gefunden: 743.70

Aspartimidnebenprodukt **2ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₃₀H₄₈N₆O₁₂ (684.33); berechnet: (M+H)⁺ 685.33; gefunden: 685.65.

Tabelle 6: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hexapeptids 2.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		Kupplungsdauer [min]
			0.4 M DIPEA in DMF		
Thr5	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH ^[a]	80.1	1.0		45
Ser4,Gly3	Fmoc-Gly-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH ^[b]	51.3	1.0		60
Asp2	Fmoc-Asp(OAll)-OH ^[b]	47.8	1.0		60
Ala1	Boc-Ala-OH ^[a]	38.1	1.0		45

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.20 mmol) und 83.4 mg HCTU (0.20 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplungen werden je 3 eq Aminosäure (0.12 mmol) und 62.9 mg PyBOP (0.12 mmol, 3 eq) verwendet.

Boc-Ala-Asp(OAll)-Gly-Pro-Thr(t-Bu)-Gly-OH 3

Hexapeptid **3**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₃₂H₅₂N₆O₁₂ (712.36); berechnet: (M+H)⁺ 713.36; gefunden: 713.66

Aspartimidnebenprodukt **3ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₉H₄₆N₆O₁₁ (654.32); berechnet: (M+H)⁺ 655.32; gefunden: 655.62.

Tabelle 7: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hexapeptids 3.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		Kupplungsdauer [min]
			0.4 M DIPEA in DMF		
Thr5	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH ^[a]	80.1	1.0		45
Pro4	Fmoc-Pro-OH ^[a]	68.0	1.0		45
Gly3	Fmoc-Gly-OH ^[a]	59.9	1.0		45
Asp2	Fmoc-Asp(OAll)-OH ^[b]	47.8	1.0		60
Ala1	Boc-Ala-OH ^[a]	38.1	1.0		45

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.20 mmol) und 83.4 mg HCTU (0.20 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplung werden 3 eq Aminosäure (0.12 mmol) und 62.9 mg PyBOP (0.12 mmol, 3 eq) verwendet.

Boc-Ala-Asp(OAll)-Gly-pro-Thr(t-Bu)-Gly-OH 4

Hexapeptid **4**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₃₂H₅₂N₆O₁₂ (712.36); berechnet: (M+H)⁺ 713.36; gefunden: 713.29

Aspartimidnebenprodukt **4ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₉H₄₆N₆O₁₁ (654.32); berechnet: (M+H)⁺ 655.32; gefunden: 655.27.

Tabelle 8: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hexapeptids 4.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		Kupplungsdauer [min]
			0.4 M DIPEA in DMF		
Thr5	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH ^[a]	80.1	1.0		45
pro4	Fmoc-pro-OH ^[a]	68.0	1.0		45
Gly3	Fmoc-Gly-OH ^[a]	59.9	1.0		45
Asp2	Fmoc-Asp(OAll)-OH ^[b]	47.8	1.0		60
Ala1	Boc-Ala-OH ^[a]	38.1	1.0		45

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.20 mmol) und 83.4 mg HCTU (0.20 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplung werden 3 eq Aminosäure (0.12 mmol) und 62.9 mg PyBOP (0.12 mmol, 3 eq) verwendet.

Boc-Ala-Asp(OAll)-Gly-(Dmb)Gly-Thr(t-Bu)-Gly-OH 5

Hexapeptid **5**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₃₈H₅₈N₆O₁₄ (822.40); berechnet: (M+H)⁺ 823.40; gefunden: 823.67

Aspartimidnebenprodukt **5ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₃₅H₅₂N₆O₁₃ (764.36); berechnet: (M+H)⁺ 765.36; gefunden: 765.63

Piperididnebenprodukt **5pi**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₄₀H₆₃N₇O₁₃ (849.45); berechnet: (M+H)⁺ 850.45; gefunden: 850.78.

Tabelle 9: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hexapeptids 5.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		Kupplungsdauer [min]
			0.4 M DIPEA in DMF		
Thr5	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH ^[a]	80.1	1.0		45
Gly4	Fmoc-(Dmb)Gly-OH ^[b]	54.1	1.0		60
Gly3	Fmoc-Gly-OH ^[a]	59.9	1.0		45
Asp2	Fmoc-Asp(OAll)-OH ^[b]	47.8	1.0		60
Ala1	Boc-Ala-OH ^[a]	38.1	1.0		45

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.20 mmol) und 83.4 mg HCTU (0.20 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplungen werden je 3 eq Aminosäure (0.12 mmol) und 62.9 mg PyBOP (0.12 mmol, 3 eq) verwendet.

Boc-Ala-Asp(OAll)-Gly-Sar-Thr(t-Bu)-Gly-OH 6

Hexapeptid **6**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₃₀H₅₀N₆O₁₂ (686.35); berechnet: (M+H)⁺ 687.35; gefunden: 687.26

Aspartimidnebenprodukt **6ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₇H₄₄N₆O₁₁ (628.31); berechnet: (M+H)⁺ 629.31; gefunden: 629.22.

Tabelle 10: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hexapeptids 6.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		Kupplungsdauer [min]
			0.4 M DIPEA in DMF		
Thr5	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH ^[a]	80.1	1.0		45
Sar4	Fmoc-Sar-OH ^[a]	62.7	1.0		45
Gly3	Fmoc-Gly-OH ^[a]	59.9	1.0		45
Asp2	Fmoc-Asp(OAll)-OH ^[b]	47.8	1.0		60
Ala1	Boc-Ala-OH ^[a]	38.1	1.0		45

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.20 mmol) und 83.4 mg HCTU (0.20 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplung werden 3 eq Aminosäure (0.12 mmol) und 62.9 mg PyBOP (0.12 mmol, 3 eq) verwendet.

Boc-Ala-Asp(OAll)-βAla-Ser(t-Bu)-Thr(t-Bu)-Gly-OH 7

Hexapeptid **7**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₃₅H₆₀N₆O₁₃ (772.42); berechnet: (M+H)⁺ 773.43; gefunden: 773.24

Aspartimidnebenprodukt **7ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₃₂H₅₄N₆O₁₂ (714.38); berechnet: (M+H)⁺ 715.38; gefunden: 715.32.

Tabelle 11: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hexapeptids 7.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		Kupplungsdauer [min]
			0.4 M DIPEA in DMF		
Thr5	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH ^[a]	80.1	1.0		45
Ser4	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH ^[a]	77.3	1.0		45
B-Ala3	Fmoc-β-Ala-OH ^[a]	62.7	1.0		45
Asp2	Fmoc-Asp(OAll)-OH ^[b]	47.8	1.0		60
Ala1	Boc-Ala-OH ^[a]	38.1	1.0		45

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.20 mmol) und 83.4 mg HCTU (0.20 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplung werden 3 eq Aminosäure (0.12 mmol) und 62.9 mg PyBOP (0.12 mmol, 3 eq) verwendet.

11.3 Versuche zu Kapitel 3.2

Fmoc-SPPS der Peptide 8-17

Das jeweilige Fmoc-Xaa-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol-Harz wird in ein 10 mL Reaktionsgefäß gegeben und es wird eine automatische Fmoc-SPPS durchgeführt. Die entsprechenden Mengenangaben, Aminosäuren und Kupplungsbedingungen sind Tabelle 12 bis Tabelle 21 und den entsprechenden Abschnitten (siehe unten) zu entnehmen. Für die Fmoc-Entschützungs-schritte werden je 3 mL 20 % Piperidin in DMF und für die Waschschr

werden je 2 mL DMF verwendet. Nach beendeter Synthese wird das Peptidylharz mit DCM (5x) gewaschen, im Hochvakuum getrocknet und einer präparativen Abspaltung mit TFA unterzogen.

Präparative Abspaltung der Peptide 8-17 mit TFA

Es werden 3 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) zum entsprechenden Peptidylharz gegeben und für 2 h geschüttelt. Das Harz wird weitere 2x mit je 1 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) für 10 min geschüttelt. Die Abspalllösungen werden filtriert, vereinigt und auf ein Volumen von 1 ml im Hochvakuum eingengt. Es werden 10 mL kalten Diethylethers (−10 °C) zugegeben und das Peptid 10 min bei −10 °C gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 10 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand wird abdekantiert. Der Rückstand wird bei Normaldruck und im Hochvakuum getrocknet und per HPLC-MS charakterisiert.

H-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-OH 8

194.5 mg Chlor-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol (0.31 mmol, B_H = 1.6 mmol/g) werden 30 min in DCM_{abs} vorgequollen. Danach werden 36.4 mg Fmoc-Ala-OH (0.12 mmol, 1 eq) und 80.1 µL DIPEA (0.48 mmol, 4 eq) in 1.0 mL DCM_{abs} zum Harz gegeben und 16 h geschüttelt. Das Harz wird mit DCM (5x), mit insgesamt 20 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) 3x je 2 min und nochmals mit DCM (3x) gewaschen. Das Harz wird im Hochvakuum getrocknet.

Mit 114.7 mg dieses Harzes Fmoc-Ala-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol-Harz (58.5 µmol, B_H = 0.51 mmol/g) wird eine automatische Fmoc-SPPS durchgeführt. Nach beendeter SPPS wird das gesamte Peptidylharz (58.5 µmol) einer präparativen Abspaltung mit TFA unterzogen und das Produkt durch HPLC-MS charakterisiert (Säule: A I, 0 → 40 % B, 25 min, 0.2 mL/min)

Ausbeute an **8** C₂₈H₄₁N₇O₉ (619.67): 30.5 mg (49.1 µmol, 84 %), weißer Feststoff, ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₈H₄₁N₇O₉ (619.30); berechnet: (M+H)⁺ 620.30; gefunden: 620.23.

Tabelle 12: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hexapeptids **8**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL] 0.4 M DIPEA in DMF	Kupplungsdauer [min]
Gly26	Fmoc-Gly-OH ^[#]	90.0	1.5	45
Asn25	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[#]	174.5	1.5	45
Pro24	Fmoc-Pro-OH ^[#]	98.7	1.5	45

Experimenteller Teil

Tyr23	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[#]	134.4	1.5	45
Val22	Boc-Val-OH ^[#]	63.6	1.5	45

^[#]Für die Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.29 mmol) und 121.0 mg HCTU (0.29 mmol, 5 eq) verwendet.

H-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Pro-OH 9

103.3 mg Chlor-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol-Harz (0.17 mmol, B_H = 1.6 mmol/g) werden 30 min in DCM_{abs} vorgequollen. Danach werden 20.9 mg Fmoc-Pro-OH (62.0 μmol, 1 eq) und 42.4 μL DIPEA (0.25 mmol, 4 eq) in 1.0 mL DCM_{abs} zum Harz gegeben und 17 h geschüttelt. Das Harz wird mit DCM (5x), mit insgesamt 20 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) 3x je 2 min und nochmals mit DCM (3x) gewaschen. Das Harz wird im Hochvakuum getrocknet.

Mit dem Fmoc-Pro-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol-Harz (62.0 μmol, B_H = 0.51 mmol/g) wird eine automatische Fmoc-SPPS durchgeführt. Nach beendeter SPPS werden 81.9 mg des Harzes (31.9 μmol, B_H = 0.39 mmol/g) einer präparativen Abspaltung mit TFA unterzogen und das Produkt durch HPLC-MS charakterisiert (Säule: A I, 0 → 30 % B, 25 min, 0.2 mL/min)

Ausbeute an **9** C₃₀H₄₃N₇O₉ (645.70): 20.0 mg (31.0 μmol, 97 %), weißer Feststoff, ESI-MS m/z (exakte Masse): C₃₀H₄₃N₇O₉ (645.31); berechnet: (M+H)⁺ 646.31; gefunden: 646.36.

Tabelle 13: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hexapeptids **9**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		Kupplungsdauer [min]
			0.4 M DIPEA in DMF		
Gly26	Fmoc-Gly-OH ^[#]	92.2	1.5		45
Asn25	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[#]	185.0	1.5		45
Pro24	Fmoc-Pro-OH ^[#]	104.6	1.5		45
Tyr23	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[#]	142.5	1.5		45
Val22	Boc-Val-OH ^[#]	63.0	1.5		45

^[#]Für die Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.31 mmol) und 128.2 mg HCTU (0.31 mmol, 5 eq) verwendet.

H-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Sar-OH 10

100.6 mg Chlor-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol (0.16 mmol, B_H = 1.6 mmol/g) werden 30 min in DCM_{abs} vorgequollen. Danach werden 18.7 mg Fmoc-Sar-OH (60.0 μmol, 1 eq) und 41.1 μL DIPEA (0.24 mmol, 4 eq) in 1.0 mL DCM_{abs} zum Harz gegeben und 17 h geschüttelt. Das Harz wird mit DCM (5x), mit insgesamt 20 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) 3x je 2 min und nochmals mit DCM (3x) gewaschen. Das Harz wird im Hochvakuum getrocknet.

Mit dem gesamten Fmoc-Sar-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol-Harz (60.0 μmol , $B_H = 0.51 \text{ mmol/g}$) wird eine automatische Fmoc-SPPS durchgeführt. Nach beendeter SPPS werden 70.5 mg jenes Harzes (26.7 μmol , $B_H = 0.38 \text{ mmol/g}$) einer präparativen Abspaltung mit TFA unterzogen und das Produkt durch HPLC-MS charakterisiert (Säule: A I, 0 \rightarrow 30 % B, 25 min, 0.2 mL/min)

Ausbeute an **10** $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_7\text{O}_9$ (619.67): 13.6 mg (21.9 μmol , 82 %), weißer Feststoff, ESI-MS m/z (exakte Masse): $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_7\text{O}_9$ (619.30); berechnet: $(M+H)^+$ 620.30; gefunden: 620.22.

Tabelle 14: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hexapeptids **10**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		Kupplungsdauer [min]
			0.4 M DIPEA in DMF		
Gly26	Fmoc-Gly-OH ^[#]	89.2	1.5		45
Asn25	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[#]	179.0	1.5		45
Pro24	Fmoc-Pro-OH ^[#]	101.2	1.5		45
Tyr23	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[#]	137.9	1.5		45
Val22	Boc-Val-OH ^[#]	65.2	1.5		45

^[#]Für die Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.30 mmol) und 124.1 mg HCTU (0.30 mmol, 5 eq) verwendet.

H-Val-Tyr-Pro-Asn- β Ala-Ala-OH 11

Mit 114.7 mg Fmoc-Ala-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol-Harz (vgl. Darstellung von **8**) (58.5 μmol , $B_H = 0.51 \text{ mmol/g}$) wird eine automatische Fmoc-SPPS durchgeführt. Nach beendeter SPPS werden 59.7 mg des Harzes (23.3 μmol , $B_H = 0.39 \text{ mmol/g}$) einer präparativen Abspaltung mit TFA unterzogen und das Produkt durch HPLC-MS charakterisiert (Säule: A I, 0 \rightarrow 30 % B, 25 min, 0.2 mL/min).

Ausbeute an **11** $\text{C}_{29}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_9$ (633.69): 13.8 mg (21.8 μmol , 94 %), weißer Feststoff, ESI-MS m/z (exakte Masse): $\text{C}_{29}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_9$ (633.31); berechnet: $(M+H)^+$ 634.31; gefunden: 634.41

Tabelle 15: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hexapeptids **11**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		Kupplungsdauer [min]
			0.4 M DIPEA in DMF		
β -Ala26	Fmoc- β -Ala-OH ^[#]	91.0	1.5		45
Asn25	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[#]	174.5	1.5		45
Pro24	Fmoc-Pro-OH ^[#]	98.7	1.5		45

Experimenteller Teil

Tyr23	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[#]	134.4	1.5	45
Val22	Boc-Val-OH ^[#]	63.6	1.5	45

^[#]Für die Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.29 mmol) und 121.0 mg HCTU (0.29 mmol, 5 eq) verwendet.

H-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-OH 12

Mit 117.7 mg Fmoc-Ala-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol-Harz (vgl. Synthese von **8**) (60.0 μ mol, $B_H = 0.51$ mmol/g) wird eine automatische Fmoc-SPPS durchgeführt. Nach beendeter SPPS werden 98.5 mg des Harzes (29.6 μ mol, $B_H = 0.30$ mmol/g) einer präparativen Abspaltung mit TFA unterzogen und das Produkt durch HPLC-MS charakterisiert (Säule: A I, 0 \rightarrow 40 % B, 25 min, 0.2 mL/min).

Ausbeute an **12** C₅₁H₇₆N₁₂O₂₀ (1177.22): 32.9 mg (27.9 μ mol, 94 %), weißer Feststoff, ESI-MS m/z (exakte Masse): C₅₁H₇₆N₁₂O₂₀ (1176.53); berechnet: (M+H)⁺ 1177.53; gefunden: 1177.52.

Tabelle 16: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Undecapeptids **12**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL] 0.4 M DIPEA in DMF	Kupplungsdauer [min]
Leu31	Fmoc-Leu-OH ^[#]	106.0	1.5	45
Glu30	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[#]	127.7	1.5	45
Asp29	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[#]	123.5	1.5	45
Glu28	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[#]	127.7	1.5	45
Ala27	Fmoc-Ala-OH ^[#]	93.4	1.5	45
Gly26	Fmoc-Gly-OH ^[#]	89.2	1.5	45
Asn25	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[#]	179.0	1.5	45
Pro24	Fmoc-Pro-OH ^[#]	101.2	1.5	45
Tyr23	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[#]	137.9	1.5	45
Val22	Boc-Val-OH ^[#]	65.2	1.5	45

^[#]Für die Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.30 mmol) und 124.1 mg HCTU (0.30 mmol, 5 eq) verwendet.

H-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Pro-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-OH 13

Mit 114.1 mg Fmoc-Ala-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol-Harz (vgl. Synthese von **8**) (58.2 μ mol, $B_H = 0.51$ mmol/g) wird eine automatische Fmoc-SPPS durchgeführt. Nach beendeter SPPS werden 89.3 mg des Harzes (25.8 μ mol, $B_H = 0.29$ mmol/g) einer präparativen Abspaltung mit

TFA unterzogen und das Produkt durch HPLC-MS charakterisiert (Säule: A I, 0 → 40 % B, 25 min, 0.2 mL/min).

Ausbeute an **13** C₅₃H₇₈N₁₂O₂₀ (1203.25): 28.2 mg (23.4 μmol, 91 %), weißer Feststoff, ESI-MS m/z (exakte Masse): C₅₃H₇₈N₁₂O₂₀ (1202.55); berechnet: (M+H)⁺ 1203.55; gefunden: 1203.85

Tabelle 17: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Undecapeptids **13**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL] 0.4 M DIPEA in DMF	Kupplungsdauer [min]
Leu31	Fmoc-Leu-OH ^[#]	102.8	1.5	45
Glu30	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[#]	123.8	1.5	45
Asp29	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[#]	119.7	1.5	45
Glu28	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[#]	123.8	1.5	45
Pro27	Fmoc-Pro-OH ^[#]	98.1	1.5	45
Gly26	Fmoc-Gly-OH ^[#]	86.5	1.5	45
Asn25	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[#]	173.6	1.5	45
Pro24	Fmoc-Pro-OH ^[#]	98.1	1.5	45
Tyr23	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[#]	133.7	1.5	45
Val22	Boc-Val-OH ^[#]	63.2	1.5	45

^[#]Für die Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.29 mmol) und 120.3 mg HCTU (0.29 mmol, 5 eq) verwendet.

H-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Sar-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-OH **14**

Mit 117.7 mg Fmoc-Ala-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol-Harz (vgl. Synthese von **8**) (60.0 μmol, B_H = 0.51 mmol/g) wird eine automatische Fmoc-SPPS durchgeführt. Nach beendeter SPPS werden 109.0 mg des Harzes (32.7 μmol, B_H = 0.30 mmol/g) einer präparativen Abspaltung mit TFA unterzogen und das Produkt durch HPLC-MS charakterisiert (Säule: A I, 0 → 40 % B, 25 min, 0.2 mL/min).

Ausbeute an **14** C₅₁H₇₆N₁₂O₂₀ (1177.22): 35.4 mg (30.1 μmol, 92 %), weißer Feststoff, ESI-MS m/z (exakte Masse): C₅₁H₇₆N₁₂O₂₀ (1176.53); berechnet: (M+H)⁺ 1177.53; gefunden: 1177.71

Tabelle 18: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Undecapeptids **14**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL] 0.4 M DIPEA in DMF	Kupplungsdauer [min]
Leu31	Fmoc-Leu-OH ^[#]	106.0	1.5	45

Experimenteller Teil

Glu30	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[#]	127.7	1.5	45
Asp29	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[#]	123.5	1.5	45
Glu28	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[#]	127.7	1.5	45
Sar27	Fmoc-Sar-OH ^[#]	93.4	1.5	45
Gly26	Fmoc-Gly-OH ^[#]	89.2	1.5	45
Asn25	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[#]	179.0	1.5	45
Pro24	Fmoc-Pro-OH ^[#]	101.2	1.5	45
Tyr23	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[#]	137.9	1.5	45
Val22	Boc-Val-OH ^[#]	65.2	1.5	45

^[#]Für die Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.30 mmol) und 124.1 mg HCTU (0.30 mmol, 5 eq) verwendet.

H-Val-Tyr-Pro-Asn-βAla-Gly-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-OH 15

Mit 114.1 mg Fmoc-Ala-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol-Harz (vgl. Darstellung von **8**) (58.2 μmol, B_H = 0.51 mmol/g) wird eine automatische Fmoc-SPPS durchgeführt. Nach beendeter SPPS werden 87.7 mg des Harzes (26.3 μmol, B_H = 0.30 mmol/g) einer präparativen Abspaltung mit TFA unterzogen und das Produkt durch HPLC-MS charakterisiert (Säule: A I, 0 → 40 % B, 25 min, 0.2 mL/min).

Ausbeute an **15** C₅₂H₇₈N₁₂O₂₀ (1191.24): 30.1 mg (25.2 μmol, 96 %), weißer Feststoff, ESI-MS m/z (exakte Masse): C₅₂H₇₈N₁₂O₂₀ (1190.55); berechnet: (M+H)⁺ 1191.55; gefunden: 1191.85

Tabelle 19: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Undecapeptids **15**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL] 0.4 M DIPEA in DMF	Kupplungsdauer [min]
Leu31	Fmoc-Leu-OH ^[#]	102.8	1.5	45
Glu30	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[#]	123.8	1.5	45
Asp29	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[#]	119.7	1.5	45
Glu28	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[#]	123.8	1.5	45
Ala27	Fmoc-Ala-OH ^[#]	90.5	1.5	45
β-Ala26	Fmoc-β-Ala-OH ^[#]	90.5	1.5	45
Asn25	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[#]	173.6	1.5	45
Pro24	Fmoc-Pro-OH ^[#]	98.1	1.5	45
Tyr23	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[#]	133.7	1.5	45
Val22	Boc-Val-OH ^[#]	63.2	1.5	45

^[#]Für die Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.29 mmol) und 120.3 mg HCTU (0.29 mmol, 5 eq) verwendet.

H-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Gly-Asp-Glu-Leu-Ala-OH 16.

Mit 117.7 mg Fmoc-Ala-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol-Harz (vgl. Synthese von **8**) (60.0 μmol , $B_{\text{H}} = 0.51 \text{ mmol/g}$) wird eine automatische Fmoc-SPPS durchgeführt. Nach beendeter SPPS werden 101.2 mg des Harzes (31.0 μmol , $B_{\text{H}} = 0.31 \text{ mmol/g}$) einer präparativen Abspaltung mit TFA unterzogen und das Produkt durch HPLC-MS charakterisiert (Säule: A I, 0 \rightarrow 40 % B, 25 min, 0.2 mL/min).

Ausbeute an **16** $\text{C}_{48}\text{H}_{72}\text{N}_{12}\text{O}_{18}$ (1105.15): 34.5 mg (31.0 μmol , quant.), weißer Feststoff, ESI-MS m/z (exakte Masse): $\text{C}_{48}\text{H}_{72}\text{N}_{12}\text{O}_{18}$ (1104.51); berechnet: $(\text{M}+\text{H})^+$ 1105.51; gefunden: 1105.87

Tabelle 20: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Undecapeptids **16**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		Kupplungsdauer [min]
			0.4 M DIPEA in DMF		
Leu31	Fmoc-Leu-OH ^[#]	106.0	1.5		45
Glu30	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[#]	127.7	1.5		45
Asp29	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[#]	123.5	1.5		45
Gly28	Fmoc-Gly-OH ^[#]	89.2	1.5		45
Ala27	Fmoc-Ala-OH ^[#]	93.4	1.5		45
Gly26	Fmoc-Gly-OH ^[#]	89.2	1.5		45
Asn25	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[#]	179.0	1.5		45
Pro24	Fmoc-Pro-OH ^[#]	101.2	1.5		45
Tyr23	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[#]	137.9	1.5		45
Val22	Boc-Val-OH ^[#]	65.2	1.5		45

^[#]Für die Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.30 mmol) und 124.1 mg HCTU (0.30 mmol, 5 eq) verwendet.

H-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Sar-Gly-Asp-Glu-Leu-Ala-OH 17

Mit 117.7 mg Fmoc-Ala-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol-Harz (vgl. Synthese von **8**) (60.0 μmol , $B_{\text{H}} = 0.51 \text{ mmol/g}$) wird eine automatische Fmoc-SPPS durchgeführt. Nach beendeter SPPS werden 91.7 mg des Harzes (28.4 μmol , $B_{\text{H}} = 0.31 \text{ mmol/g}$) einer präparativen Abspaltung mit TFA unterzogen und das Produkt durch HPLC-MS charakterisiert (Säule: A I, 0 \rightarrow 40 % B, 25 min, 0.2 mL/min).

Ausbeute an **17** $\text{C}_{48}\text{H}_{72}\text{N}_{12}\text{O}_{18}$ (1105.15): 28.0 mg (25.3 μmol , 89 %), weißer Feststoff, ESI-MS m/z (exakte Masse): $\text{C}_{48}\text{H}_{72}\text{N}_{12}\text{O}_{18}$ (1104.51); berechnet: $(\text{M}+\text{H})^+$ 1105.51; gefunden: 1105.90

Tabelle 21: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Undecapeptids **17**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		Kupplungsdauer [min]
			0.4 M DIPEA in DMF		
Leu31	Fmoc-Leu-OH ^[#]	106.0	1.5		45
Glu30	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[#]	127.7	1.5		45
Asp29	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[#]	123.5	1.5		45
Gly28	Fmoc-Gly-OH ^[#]	89.2	1.5		45
Sar27	Fmoc-Sar-OH ^[#]	93.4	1.5		45
Gly26	Fmoc-Gly-OH ^[#]	89.2	1.5		45
Asn25	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[#]	179.0	1.5		45
Pro24	Fmoc-Pro-OH ^[#]	101.2	1.5		45
Tyr23	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[#]	137.9	1.5		45
Val22	Boc-Val-OH ^[#]	65.2	1.5		45

^[#]Für die Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.30 mmol) und 124.1 mg HCTU (0.30 mmol, 5 eq) verwendet.

Inkubation der Peptide 8-17 bei unterschiedlicher Temperatur und Inkubationsmedium

Es werden Lösungen (c = 5 mM) der Peptide **8-17** in H₂O hergestellt. Es werden je 30 µL (150 nmol) der jeweiligen Peptidlösung in ein Glasröhrchen gegeben und mit 270 µL Phosphatpuffer (0.11 M, pH 7.4), Wasser (pH 4) oder NaCl-Lösung (0.11 M, pH = 7.4) vermischt. Danach wird der pH-Wert nochmals kontrolliert. Im Fall der NaCl-Lösung wird dieser mittels wässriger 1 M NaOH auf 7.4 nachjustiert. Die Lösungen werden 90 min bei 70 °C oder 55 °C inkubiert. Anschließend werden die Lösungen zentrifugiert und per HPLC-MS analysiert. Es werden stets auch Proben bei t = 0 min analysiert (Vergleichskontrolle).

HPLC-MS (**8-11**): Säule: A I, 0 → 30 % B, 25 min, 0.2 mL/min

HPLC-MS (**12-17**): Säule: A I, 0 → 40 % B, 25 min, 0.2 mL/min

Tests zu Peptid **8** in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)

Peptid **8**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₈H₄₁N₇O₉ (619.30); berechnet: (M+H)⁺ 620.30; gefunden (70 °C): 620.36; gefunden (55 °C): 620.36

Aspartimidnebenprodukt **8ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₈H₃₈N₆O₉ (602.27); berechnet: (M+H)⁺ 603.27; gefunden (70 °C): 603.34; gefunden (55 °C): 603.30

Desaminierungs-/Isomerisierungsnebenprodukt **8da/8iso**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₈H₄₀N₆O₁₀ (620.28); berechnet: (M+H)⁺ 621.28; gefunden (70 °C): 621.32; gefunden (55 °C): 621.33.

Test zu Peptid 8 in H₂O (pH 4)

Peptid **8**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₈H₄₁N₇O₉ (619.30); berechnet: (M+H)⁺ 620.30; gefunden (70 °C): 620.30

Aspartimidnebenprodukt **8ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₈H₃₈N₆O₉ (602.27); berechnet: (M+H)⁺ 603.27; gefunden (70 °C): 603.31.

Test zu Peptid 8 in 0.1 M NaCl (pH 7.4)

Peptid **8**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₈H₄₁N₇O₉ (619.30); berechnet: (M+H)⁺ 620.30; gefunden (70 °C): 620.31

Aspartimidnebenprodukt **8ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₈H₃₈N₆O₉ (602.27); berechnet: (M+H)⁺ 603.27; gefunden (70 °C): 603.23

Desaminierungs-/Isomerisierungsnebenprodukt **8da/8iso**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₈H₄₀N₆O₁₀ (620.28); berechnet: (M+H)⁺ 621.28; gefunden (70 °C): 621.26.

Tests zu Peptid 9 in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)

Peptid **9**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₈H₄₁N₇O₉ (645.31); berechnet: (M+H)⁺ 646.31; gefunden (70 °C): 646.35; gefunden (55 °C): 646.32

Aspartimidnebenprodukt **9ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₃₀H₄₀N₆O₉ (628.29); berechnet: (M+H)⁺ 629.29; gefunden (70 °C): 629.33; gefunden (55 °C): 629.34

Desaminierungs-/Isomerisierungsnebenprodukt **9da/9iso**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₃₀H₄₂N₆O₁₀ (646.30); berechnet: (M+H)⁺ 647.30; gefunden (70 °C): 647.35; gefunden (55 °C): 647.37.

Tests zu Peptid 10 in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)

Peptid **10**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₈H₄₁N₇O₉ (619.30); berechnet: (M+H)⁺ 620.30; gefunden (70 °C): 620.41; gefunden (55 °C): 620.22

Aspartimidnebenprodukt **10ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₈H₃₈N₆O₉ (602.27); berechnet: (M+H)⁺ 603.27; gefunden (70 °C): 603.42; gefunden (55 °C): 603.26

Desaminierungs-/Isomerisierungsnebenprodukt **10da/10iso**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₈H₄₀N₆O₁₀ (620.28); berechnet: (M+H)⁺ 621.28; gefunden (70 °C): 621.41; gefunden (55 °C): 621.28.

Tests zu Peptid 11 in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)

Peptid **11**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₂₉H₄₃N₇O₉ (633.31); berechnet: (M+H)⁺ 634.31; gefunden (70 °C): 634.40; gefunden (55 °C): 634.55

Aspartimidnebenprodukt **11ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): $C_{29}H_{40}N_6O_9$ (616.29); berechnet: $(M+H)^+$ 617.29; gefunden (70 °C): 617.38; gefunden (55 °C): 617.53

Desaminierungs-/Isomerisierungsnebenprodukt **11da/11iso**: ESI-MS m/z (exakte Masse): $C_{29}H_{42}N_6O_{10}$ (634.30); berechnet: $(M+H)^+$ 635.30; gefunden (70 °C): 635.43; gefunden (55 °C): 635.59

Tests zu Peptid **12** in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)

Peptid **12**: ESI-MS m/z (exakte Masse): $C_{51}H_{76}N_{12}O_{20}$ (1176.53); berechnet: $(M+H)^+$ 1177.53; gefunden (70 °C): 1177.62; gefunden (55 °C): 1177.48

Aspartimidnebenprodukt **12ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): $C_{51}H_{73}N_{11}O_{20}$ (1159.50); berechnet: $(M+H)^+$ 1160.50; gefunden (70 °C): 1160.72; gefunden (55 °C): 1160.59

Desaminierungs-/Isomerisierungsnebenprodukt **12da/13iso**: ESI-MS m/z (exakte Masse): $C_{51}H_{75}N_{11}O_{21}$ (1177.51); berechnet: $(M+H)^+$ 1178.51; gefunden (70 °C): 1178.64; gefunden (55 °C): 1178.50

Tests zu Peptid **13** in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)

Peptid **13**: ESI-MS m/z (exakte Masse): $C_{53}H_{78}N_{12}O_{20}$ (1202.55); berechnet: $(M+H)^+$ 1203.55; gefunden (70 °C): 1203.75; gefunden (55 °C): 1203.75

Aspartimidnebenprodukt **13ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): $C_{53}H_{75}N_{11}O_{20}$ (1185.52); berechnet: $(M+H)^+$ 1186.52; gefunden (70 °C): 1186.85; gefunden (55 °C): 1186.85

Desaminierungs-/Isomerisierungsnebenprodukt **13da/13iso**: ESI-MS m/z (exakte Masse): $C_{53}H_{77}N_{11}O_{21}$ (1203.53); berechnet: $(M+H)^+$ 1204.53; gefunden (70 °C): 1204.83; gefunden (55 °C): 1204.92

Tests zu Peptid **14** in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)

Peptid **14**: ESI-MS m/z (exakte Masse): $C_{51}H_{76}N_{12}O_{20}$ (1176.53); berechnet: $(M+H)^+$ 1177.53; gefunden (70 °C): 1177.36; gefunden (55 °C): 1177.98

Aspartimidnebenprodukt **14ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): $C_{51}H_{73}N_{11}O_{20}$ (1159.50); berechnet: $(M+H)^+$ 1160.50; gefunden (70 °C): 1160.40; gefunden (55 °C): 1161.10

Desaminierungs-/Isomerisierungsnebenprodukt **14da/14iso**: ESI-MS m/z (exakte Masse): $C_{51}H_{75}N_{11}O_{21}$ (1177.51); berechnet: $(M+H)^+$ 1178.51; gefunden (70 °C): 1178.40; gefunden (55 °C): 1179.16

Tests zu Peptid **15** in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)

Peptid **15**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₅₂H₇₈N₁₂O₂₀ (1190.55); berechnet: (M+H)⁺ 1191.55; gefunden (70 °C): 1192.01; gefunden (55 °C): 1191.64

Aspartimidnebenprodukt **15ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₅₂H₇₅N₁₁O₂₀ (1173.52); berechnet: (M+H)⁺ 1174.52; gefunden (70 °C): 1175.06; gefunden (55 °C): 1174.77

Desaminierungs-/Isomerisierungsnebenprodukt **15da/15iso**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₅₂H₇₇N₁₁O₂₁ (1191.53); berechnet: (M+H)⁺ 1192.53; gefunden (70 °C): 1193.13; gefunden (55 °C): 1192.81

Tests zu Peptid **16** in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)

Peptid **16**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₄₈H₇₂N₁₂O₁₈ (1104.51); berechnet: (M+H)⁺ 1105.51; gefunden (70 °C): 1105.42; gefunden (55 °C): 1105.58

Aspartimidnebenprodukt **16ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₄₈H₆₉N₁₁O₁₈ (1087.48); berechnet: (M+H)⁺ 1088.48; gefunden (70 °C): 1088.42; gefunden (55 °C): 1088.94

Desaminierungs-/Isomerisierungsnebenprodukt **16da/16iso**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₄₈H₇₁N₁₁O₁₉ (1105.49); berechnet: (M+H)⁺ 1106.49; gefunden (70 °C): 1106.42; gefunden (55 °C): 1106.78

Tests zu Peptid **17** in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)

Peptid **17**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₄₈H₇₂N₁₂O₁₈ (1104.51); berechnet: (M+H)⁺ 1105.51; gefunden (70 °C): 1105.83 gefunden; (55 °C): 1105.86

Aspartimidnebenprodukt **17ai**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₄₈H₆₉N₁₁O₁₈ (1087.48); berechnet: (M+H)⁺ 1088.48; gefunden (70 °C): 1088.88; gefunden (55 °C): 1088.98

Desaminierungs-/Isomerisierungsnebenprodukt **17da/17iso**: ESI-MS m/z (exakte Masse): C₄₈H₇₁N₁₁O₁₉ (1105.49); berechnet: (M+H)⁺ 1106.97; gefunden (70 °C): 1106.42; gefunden (55 °C): 1106.93

11.4 Versuche zu Kapitel 4

H-Thr-His-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Nle-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-S(CH₂)₂COO(C₂H₂)₃CH₃ **19**

(IgG1 Fc 223-260 n-Bu-3-McP)

Methode a): Eintopfreaktion

101.1 mg des Peptidylharzes **18**^[174] (12.1 μmol , $B_H = 0.12 \text{ mmol/g}$) werden in DCM vorgequollen und anschließend mit je 2 mL einer Lösung aus TFA/TES/DCM (1.5:2:96.5) geschüttelt (10 x 2 min). Die einzelnen Abspatlösungen werden bei guter Durchmischung je mit DIPEA neutralisiert (10 x 1.05 eq bezogen auf TFA). Nach jeder Neutralisation wird der pH-Wert kontrolliert (pH 8). Das Harz wird 5x mit DCM gewaschen. Die vereinigten Abspaltungs- und Waschlösungen werden im Vakuum auf 2.7 mL eingengt ($c_{\text{Peptid}} = 4.4 \text{ mM}$). Es werden 59.0 μL *n*-Butyl-3-mercaptopropionat (0.36 mmol, 30 eq) und 41.0 mg Cl-HOBt (0.24 mmol, 20 eq) zugegeben. Nach 5 min Rühren werden 37.5 μL DIC (0.24 mmol, 20 eq) zugegeben. Der pH-Wert wird mit DIPEA auf pH 8 gebracht und die Reaktion wird 17 h gerührt. Die Reaktionsmischung wird im Vakuum eingengt und der Rückstand in 12 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) gelöst. Nach 2 h Schütteln wird im Hochvakuum auf 1 mL eingengt. Es werden 10 mL kalter Diethylether ($-10 \text{ }^\circ\text{C}$) zugegeben und das Peptid 10 min bei $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 10 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet und per HPLC-MS (Säule: B I, 10 \rightarrow 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

IgG1 Fc 223-260 *n*-Bu-3-McP **19**: ESI-MS m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₉₃H₃₀₇N₄₅O₅₃S₃ (4201.97); berechnet: (M+4H)⁴⁺ 1051.50, (M+3H)³⁺ 1401.67, (M+2H)²⁺ 2102.00; gefunden: 1051.77, 1402.04, 2102.67

Aspartimid-Nebenprodukt **19ai**: ESI-MS m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₉₃H₃₀₅N₄₅O₅₂S₃ (4183.95); berechnet: (M+4H)⁴⁺ 1047.00, (M+3H)³⁺ 1395.66, (M+2H)²⁺ 2092.99; gefunden: 1047.72, 1396.46, 2094.07

Nebenprodukt **19a**: ESI-MS m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₂₀₀H₃₁₉N₄₅O₅₄S₄ (4346.20); berechnet: (M+4H)⁴⁺ 1087.56, (M+3H)³⁺ 1449.74, (M+2H)²⁺ 2174.11; gefunden: 1087.80, 1450.05, 2174.60

Methode b): milde Acidolyse (TFA/TES/DCM), Thioveresterung (PyBOP, DIPEA, DMF)

249.3 mg des Peptidylharzes **18**^[174] (29.0 μmol , $B_H = 0.12 \text{ mmol/g}$) werden in DCM vorgequollen, mit je 6 mL einer Lösung aus TFA/TES/DCM (1.5:2:96.5) geschüttelt (10 x 2 min) und 5x mit je 5 mL DCM gewaschen. Die Abspaltungs- und Waschlösungen werden zu einer Vorlage von 100 mL DCM gegeben. Die Lösung wird mit 65 mL DCM auf ein

Gesamtvolumen von 250 mL verdünnt und 5x mit je 250 mL einer wässrigen gesättigten NaCl Lösung gewaschen. Gegebenenfalls wird bei einem sauren pH-Wert der organischen oder wässrigen Phase nochmals mit 250 mL wässriger gesättigter NaCl Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert, im Vakuum eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 158.7 mg Rohpeptid (27.7 μmol) erhalten, was einer Abspaltungseffizienz von 95 % entspricht.

Davon werden 187.2 mg (aus zwei identisch durchgeführten Abspaltungen, 32.6 μmol, 1 eq) in 1.5 ml DMF gelöst. Es werden 159.0 μL *n*-Butyl-3-mercaptopropionat (0.98 mmol, 30 eq) zugegeben und die Lösung wird unter Rühren auf –20 °C gekühlt. Eine auf –20 °C gekühlte Lösung aus 84.9 mg PyBOP (0.16 mmol, 5 eq) und 27.9 μL DIPEA (0.16 mmol, 5 eq) in 625 μL DMF wird zugegeben und die Reaktion wird 4 h bei –20 °C gerührt. Nach Reaktionsende (DC: DCM/MeOH 10:1) wird der pH-Wert geprüft (pH 7-8) und durch Zugabe von 4 μL TFA auf pH 5-6 eingestellt. Die Reaktion wird im Hochvakuum eingeeengt, der Rückstand in 35 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) gelöst und für 2 h bei RT inkubiert. Die Lösung wird im Vakuum auf 6 mL eingeeengt, es werden 44 mL kalter Diethylether (–10 °C) zugegeben und das Peptid 10 min bei –10 °C gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 25 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet, per HPLC-MS (Säule: B I, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert, in 7 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und in 7 Portionen per RP-HPLC gereinigt (Säule: Supelco Ascentis C18 (250 mm x 10 mm); 25 → 39 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA; 55 min; 4 mL/min). Die Produktfraktionen werden gefriergetrocknet, vereinigt und per HPLC-MS (Säule: B I, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert.

Ausbeute an **19** C₁₉₃H₃₀₇N₄₅O₅₃S₃ (4201.97): 29.8 mg (7.1 μmol, 21 % bezogen auf Peptidylharz **18**), weißer Feststoff, ESI-MS *m/z* (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₉₃H₃₀₇N₄₅O₅₃S₃ (4201.97); berechnet: (M+4H)⁴⁺ 1051.50, (M+3H)³⁺ 1401.67, (M+2H)²⁺ 2102.00; gefunden: 1050.46, 1400.54, 2100.36

11.5 Versuche zu Kapitel 5.1

Fmoc-Leu-Trt-Aminomethyl-ChemMatrix Harz

Es werden 401.0 mg des Harzes **20** (0.17 mmol, B_H = 0.42 mmol/g) in einen 10 mL Langhalskolben gegeben. Das Harz wird unter Schutzgas mit 3 mL DCM_{abs} vorgequollen.

Danach wird eine Lösung aus 1 mL Acetylbromid und 6 mL DCM_{abs} zugegeben. Die Reaktion wird 2 h bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz mit DCM_{abs} (6 x 8 mL) gewaschen. Unter Schutzgas wird eine Lösung aus 296.9 mg Fmoc-Leu-OH (0.84 mmol, 5.0 eq) und 288.0 µL DIPEA (1.68 mmol, 10 eq) in 2.5 mL DCM_{abs} zum Harz gegeben. Dies wird für 17 h geschüttelt, die Lösung abfiltriert und das Harz mit DMF (3x), DCM (3x), mit insgesamt 20 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) 3 x 2 min und zuletzt mit DCM (5x) gewaschen. Man erhält Fmoc-Leu-Trt-CM Harz mit B_H = 0.37 mmol/g, was einer quantitativen Kupplungsausbeute entspricht.

Boc-Cys(Phacm)-Ala-Glu(OtBu)-His(Trt)-Cys(Phacm)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Asp(OAll)-Ile-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Val-Pro-Asp(OtBu)-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Lys(Boc)-Val-Asn(Trt)-Phe-Tyr(tBu)-Ala-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Nle-Glu(OtBu)-Val-(Dmb)Gly-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Ala-Val-Glu(OtBu)-Val-Trp(Boc)-Gln(Trt)-Gly-Leu-NHNHBoc 21
(EPO 29-67 (SPhacm,SPhacm) (OAll) NHNHBoc)

457.6 mg Fmoc-Leu-Trt-CM Harz (0.17 mmol, B_H = 0.37 mmol/g, siehe S. 113) werden in ein 45 mL Reaktionsgefäß gegeben und es wird eine automatische Fmoc-SPPS durchgeführt. Cys33 und Cys29 werden als symmetrisches Anhydrid von Fmoc-Cys(Phacm)-OH bzw. Boc-Cys(Phacm)-OH gekuppelt. Für die Fmoc-Abspaltungsschritte werden 5 mL 20 % Piperidin in DMF und für die Waschschrte 4 mL DMF verwendet. Die Aminosäuren und deren Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 22 und Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 22: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hydrazids 21 von Gly66 bis Ser34.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		t [min]
			0.4 M DIPEA in DMF	DMF	
Gly66	Fmoc-Gly-OH ^[a]	250.3	4.5	-	45
Gln65	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	514.2	4.5	-	45
Trp64	Fmoc-Trp(Boc)-OH ^[a]	443.4	4.5	-	45
Val63	Fmoc-Val-OH ^[a]	285.8	4.5	-	45
Glu62	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	358.3	4.5	-	45
Val61	Fmoc-Val-OH ^[a]	285.8	4.5	-	45
Ala60	Fmoc-Ala-OH ^[a]	261.1	4.5	-	45
Gln59	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	514.2	4.5	-	45
Gln58	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	514.2	4.5	-	45
Gly57	Fmoc-(Dmb)Gly-OH ^[a]	376.8	4.5	-	45

Experimenteller Teil

Val56	Fmoc-Val-OH ^[b]	571.5	8.5	-	90
Glu55	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	358.3	4.5	-	45
Nle54	Fmoc-Nle-OH ^[a]	297.6	4.5	-	45
Arg53	Fmoc-Arg(Pbf)-OH ^[a]	546.3	4.5	-	45
Lys52	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	394.5	4.5	-	45
Trp51	Fmoc-Trp(Boc)-OH ^[a]	443.4	4.5	-	45
Ala50	Fmoc-Ala-OH ^[a]	262.1	4.5	-	45
Tyr49	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[a]	387.0	4.5	-	45
Phe48	Fmoc-Phe-OH ^[a]	326.2	4.5	-	45
Asn47	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[a]	502.4	4.5	-	45
Val46	Fmoc-Val-OH ^[a]	285.8	4.5	-	45
Lys45	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	394.5	4.5	-	45
Thr44, Asp43	Fmoc-Asp(Ot-Bu) Thr($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH ^[a]	465.0	4.5	-	45
Pro42	Fmoc-Pro-OH ^[a]	284.1	4.5	-	45
Val41	Fmoc-Val-OH ^[a]	285.8	4.5	-	45
Thr40, Ile39	Fmoc-Ile Thr($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH ^[a]	416.5	4.5	-	45
Asp38	Fmoc-Asp(OAll)-OH ^[a]	332.9	4.5	-	45
Glu37	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	358.3	4.5	-	45
Asn36	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[a]	502.4	4.5	-	45
Leu35	Fmoc-Leu-OH ^[a]	297.6	4.5	-	45
Ser34	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH ^[a]	322.8	4.5	-	45

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.84 mmol) und 348.3 mg HCTU (0.84 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplung werden je 10 eq Aminosäure (1.68 mmol) und 696.6 mg HCTU (1.68 mmol, 5 eq) verwendet.

Die Festphasensynthese wird nach Kupplung und Fmoc-Abspaltung von Ser34 mit der Hälfte des Harzes (84.0 μmol) weitergeführt. Die Fmoc-Abspaltungen werden dazu mit 2.5 mL 20 % Piperidin in DMF und die Waschschrirte mit 2 mL DMF durchgeführt.

Tabelle 23: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hydrazids **21** von Cys33 bis Cys29.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		<i>t</i> [min]
			0.4 M DIPEA in DMF	DMF	
Cys33	Fmoc-Cys(Phacm)-OH ^[b]	413.1	-	2.3	240
His32	Fmoc-His(Trt)-OH ^[a]	260.9	2.5	-	45
Glu31	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	179.1	2.5	-	45
Ala30	Fmoc-Ala-OH ^[a]	131.1	2.5	-	45
Cys29	Boc-Cys(Phacm)-OH ^[b]	310.2	-	2.3	240

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.42 mmol) und 174.2 mg HCTU (0.42 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Diese Aminosäuren werden als symmetrisches Anhydrid gekuppelt, hergestellt aus 10 eq Aminosäure (0.82 mmol) und 65.2 μ L DIC (0.42 mmol, 5 eq).

Nach beendeter Festphasensynthese wird das Peptidylharz mit DCM (5x) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Dieses besitzt einen Beladungsgrad von 77.0 μ mol/g (bezogen auf Ala30) was einer Gesamtkupplungsausbeute von 77 % entspricht.

400.0 mg des Peptidylharzes (30.8 μ mol, $B_H = 77.0$ mmol/g) werden in DCM vorgequollen. Danach wird das Harz 10x mit je 10 mL einer Lösung aus TFA/TES/DCM (1.5:2:96.5) für je 2 min geschüttelt. Das Harz wird mit DCM (5x) gewaschen. Die filtrierten Abspaltungs- und Waschlösungen werden in einem Kolben mit 3.33 mL DIPEA (1.0 eq bezogen auf die TFA-Menge) gesammelt. Die neutralisierte Lösung wird im Vakuum auf 7.2 mL eingengt. Es werden 126.1 mg *t*-Butylcarbazat (0.95 mmol, 31 eq) und 107.8 mg Cl-HOBt (0.64 mmol, 20.6 eq) zugegeben und 5 min gerührt. Durch Zugabe von 54.0 μ L DIPEA (0.31 mmol, 10 eq) wird die Lösung auf pH 8-9 eingestellt. Im Anschluss werden 126.5 μ L DIC (0.64 mmol, 20.6 eq) zugegeben, der pH-Wert wird auf pH 8-9 eingestellt und es wird 3 d gerührt. Nach Reaktionsende (DC: DCM/MeOH 7:1) wird mit 150 mL DCM verdünnt, zweimal mit 75 mL wässrigen 2 M KHCO_3 und zweimal mit 75 mL H_2O gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie gereinigt (GRACE Reveleris® iES, GraceResolve™ Silica 2 x 12 g, DCM/MeOH, 0 \rightarrow 20 %, 50 min, 28 mL/min). Das Hydrazid **21** wird durch eine Entschützung mit TFA und anschließender HPLC-MS Analyse (Säule: A II, 10 \rightarrow 60 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **21** $\text{C}_{420}\text{H}_{549}\text{N}_{57}\text{O}_{79}\text{S}_3$ (7756.38): 177.9 mg (23.0 μ mol, 75 % über Acidolyse und Hydrazid darstellung), weißer Feststoff, $R_f = 0.58$ (DCM/MeOH 7:1), ESI-MS von **21e**: siehe Darstellung von **21e**.

H-Cys(Phacm)-Ala-Glu-His-Cys(Phacm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asp(OAll)-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-NHNH₂ **21e**

(EPO 29-67 (SPhacm, SPhacm)(OAll) NHNH₂)

30.0 mg Hydrazid **21** (3.87 μ mol) werden in 6 mL TFA/TES/ H_2O (96/2/2) gelöst und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird im Vakuum auf ein Volumen von 1 mL eingengt. Es werden

10 mL kalter Diethylether ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) zugegeben und das Peptid für 10 min bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 10 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet, in 1.5 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und durch RP-HPLC gereinigt (Säule: Supelco Ascentis C18 (250 mm x 10 mm); 20 → 37 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA; 55 min; 4 mL/min). Die Produktfraktion wird lyophilisiert und das Produkt durch HPLC-MS Analyse (Säule: A I, 10 → 60 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **21e** C₂₂₀H₃₂₇N₅₇O₆₂S₂ (4826.43): 6.5 mg (1.35 μmol, 35 %), weißer Feststoff, m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₂₂₀H₃₂₇N₅₇O₆₂S₂ (4826.43); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 805.42, (M+5H)⁵⁺ 966.30, (M+4H)⁴⁺ 1207.62, (M+3H)³⁺ 1609.82, gefunden: 805.36, 966.06, 1207.43, 1609.91.

Ag^I- und Hg^{II}-vermittelte Phacm-Entschützung des Hydrazids 21e

Das EPO 29-67 (SPhacm,SPhacm) (OAll) Hydrazid **21e** wird unter der in Tabelle 3 angegebenen Konzentration und Lösungsmittel gelöst und mit der entsprechenden Menge AgOAc bzw. Hg(OAc)₂ versetzt. Das Gemisch wird unter Lichtausschluss für die aufgeführte Zeit und bei der angegebenen Temperatur geschüttelt. Am Ende der Reaktionszeit wird im Fall von AgOAc der 5-fache molare Überschuss an Dithiothreitol (bezogen auf AgOAc), im Fall von Hg(OAc)₂ der 4-fache molare Überschuss an Dithiothreitol (bezogen auf Hg(OAc)₂) zugegeben. Nach 4 h wird das Präzipitat durch Zentrifugation sedimentiert und verworfen. Der Überstand wird durch Gelfiltration gereinigt (Superdex Peptide 10/300 GL, 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 1 mL/min oder PD MiniTrap G-25 (9.7 x 28 mm), 20 % MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH). Das Eluat wird lyophilisiert in 20 % MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH aufgenommen und durch HPLC-MS Analyse charakterisiert (Säule: A I oder A II, 10 → 60 % B, 25 min, 0.2 mL/min).

11.6 Versuche zu Kapitel 5.2

Boc-Cys(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-His(Trt)-Cys(Phacm)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Asp(OAll)-Ile-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Val-Pro-Asp(OtBu)-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Lys(Boc)-Val-Asn(Trt)-Phe-Tyr(tBu)-Ala-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Nle-Glu(OtBu)-Val-(Dmb)Gly-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Ala-Val-Glu(OtBu)-Val-Trp(Boc)-Gln(Trt)-Gly-Leu-NHNHBoc 23

(EPO 29-67 (STrt,STrt) (OAll) NHNH₂Boc)

Das EPO 34-67 (OAll) Trt-ChemMatrix Peptidylharz (84.0 μ mol, siehe Darstellung von **21** sowie Tabelle 22) wird mit den in Tabelle 24 angegebenen Aminosäuren und Kupplungsbedingungen zu dem EPO 29-67 (STrt,STrt) (OAll) Trt-ChemMatrix-Harz elongiert. Cys29 und Cys33 werden manuell als symmetrisches Anhydrid von Boc-Cys(Trt)-OH bzw. Fmoc-Cys(Trt)-OH gekuppelt. Für die Fmoc-Abspaltungen werden 2.5 mL 20 % Piperidin und für Waschritte 2 mL DMF verwendet.

Tabelle 24: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hydrazids **23** von Cys33 bis Cys29.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		<i>t</i> [min]
			0.4 M DIPEA in DMF	DMF	
Cys33	Fmoc-Cys(Trt)-OH ^[b]	493.2	-	2.3	240
His32	Fmoc-His(Trt)-OH ^[a]	260.9	2.5	-	45
Glu31	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	179.1	2.5	-	45
Ala30	Fmoc-Ala-OH ^[a]	131.1	2.5	-	45
Cys29	Boc-Cys(Trt)-OH ^[b]	390.4	-	2.3	240

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.42 mmol) und 174.2 mg HCTU (0.42 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Diese Aminosäuren werden als symmetrisches Anhydrid gekuppelt, hergestellt aus 10 eq Aminosäure (0.82 mmol) und 65.2 μ L DIC (0.42 mmol, 5 eq).

Nach beendeter Festphasensynthese wird das Harz mit DCM (5x) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Das Harz besitzt einen Beladungsgrad von 72.0 μ mol/g (bezogen auf Ala30) was einer Gesamtkupplungsausbeute von 75 % entspricht.

210.5 mg des Peptidylharzes (30.8 μ mol, $B_H = 72.0$ mmol/g) werden in DCM vorgequollen. Danach wird das Harz 10x mit je 10 mL einer Lösung aus TFA/TES/DCM (1.5:2:96.5) für je 2 min geschüttelt. Das Harz wird mit DCM (5x) gewaschen. Die filtrierte Abspaltungs- und Waschlösungen werden in einem Kolben mit 3.33 mL DIPEA (1.0 eq bezogen auf die TFA-Menge) gesammelt. Die neutralisierte Lösung wird im Vakuum auf 4.0 mL eingengt. Es werden 58.4 mg *t*-Butylcarbazat (0.47 mmol, 31 eq) und 53.7 mg Cl-HOBt (0.32 mmol, 20.8 eq) zugegeben. Nach 5 min Rühren werden 49.0 μ L DIC (0.32 mmol, 20.8 eq) zugegeben, der pH-Wert kontrolliert (pH 8-9) und die Reaktion 3 d gerührt. Nach Reaktionsende (DC: DCM/MeOH 7:1) wird mit 150 mL DCM verdünnt, zweimal mit 75 mL wässrigen 2 M KHCO₃ und zweimal mit 75 mL H₂O gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie gereinigt

(GRACE Reveleris® iES, GraceResolve™ Silica 2 x 12 g, DCM/MeOH, 0 → 20 %, 50 min, 28 mL/min). Das Hydrazid **23** wird durch eine analytische Entschützung mit TFA und anschließender HPLC-MS Analyse charakterisiert (Säule: A II, 10 → 60 % B, 25 min, 0.2 mL/min).

Ausbeute an **23** C₄₄₀H₅₅₉N₅₅O₇₇S₃ (7946.66): 119.6 mg (15.1 μmol, 99 % über Acidolyse und Hydraziddarstellung), weißer Feststoff, R_f = 0.66 (DCM/MeOH 7:1), ESI-MS von **23e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₂₀₂H₃₀₉N₅₅O₆₀S₂ (4532.08); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 756.36, (M+5H)⁵⁺ 907.43, (M+4H)⁴⁺ 1134.03, (M+3H)³⁺ 1511.70, gefunden: 756.04, 906.95, 1133.55, 1511.10.

*Boc-Cys(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-His(Trt)-Cys(Phacm)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Asp(OH)-Ile-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Val-Pro-Asp(OtBu)-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Lys(Boc)-Val-Asn(Trt)-Phe-Tyr(tBu)-Ala-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Nle-Glu(OtBu)-Val-(Dmb)Gly-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Ala-Val-Glu(OtBu)-Val-Trp(Boc)-Gln(Trt)-Gly-Leu-NHNHBoc **24***

(EPO 29-67 (STrt,STrt) (OH) NHNHBoc) erhalten durch Desallylierung

Die folgenden Reaktionschritte werden unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. 75.0 mg des Hydrazids **23** (9.47 μmol, 1 eq) werden in 1.6 mL DCM_{abs} gelöst. Danach werden 2.2 mg Pd(PPh₃)₄ (1.91 μmol, 0.2 eq) und 14.1 μL PhSiH₃ (0.11 mmol, 12 eq) gelöst in 312 μL DCM_{abs} zugegeben und 2 h unter Lichtausschluss gerührt. Anschließend werden 77.2 μL Pyridin (0.64 mmol, 100 eq) zugegeben und es wird 1 h unter Lichtausschluss gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Reaktionsgemisch im Vakuum eingengt und das Rohprodukt durch Flashchromatographie gereinigt (GRACE Reveleris® iES, GraceResolve™ Silica 2 x 12 g, DCM/MeOH, 0 → 15 %, 50 min, 28 mL/min). Das Hydrazid **24** wird durch eine analytische TFA-Entschützung und anschließender HPLC-MS Analyse (Säule: A II, 20 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **24** C₄₃₇H₅₅₅N₅₅O₇₇S₃ (7906.60): 59.7 mg (7.55 μmol, 80 %), hellbeiger Feststoff, R_f = 0.47 (DCM/MeOH 10:1), ESI-MS von **24e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₉₉H₃₀₅N₅₅O₆₀S₂ (4492.01); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 749.68, (M+5H)⁵⁺ 899.41, (M+4H)⁴⁺ 1124.01, (M+3H)³⁺ 1498.35, gefunden: 749.67, 899.34, 1124.03, 1498.33.

*Boc-Cys(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-His(Trt)-Cys(Phacm)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Asp(OPhipr)-Ile-Thr($\psi^{Me,Me}$ pro)-Val-Pro-Asp(OtBu)-Thr($\psi^{Me,Me}$ pro)-Lys(Boc)-Val-Asn(Trt)-Phe-Tyr(tBu)-Ala-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Nle-Glu(OtBu)-Val-(Dmb)Gly-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Ala-Val-Glu(OtBu)-Val-Trp(Boc)-Gln(Trt)-Gly-Leu-NHNHBoc **25***
(EPO 29-67 (STrt,STrt) (OPhipr) NHNHBoc)

Fmoc-SPPS und Abspaltung vom Harz

457.1 mg Fmoc-Leu-Trt-ChemMarix-Harz (0.16 mmol, $B_H = 0.35$ mmol/g, siehe S. 113) werden in ein 45 mL Reaktionsgefäß gegeben und es wird eine maschinelle Fmoc-SPPS durchgeführt. Cys33 und Cys29 werden als symmetrisches Anhydrid von Fmoc-Cys(Trt)-OH bzw. Boc-Cys(Trt)-OH gekuppelt. Für die Fmoc-Abspaltungsschritte werden 4 mL 20 % Piperidin in DMF und für die Waschschrte werden 4 mL DMF verwendet. Die Aminosäuren und deren Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Hydrazids 25.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		<i>t</i> [min]
			0.4 M DIPEA in DMF	DMF	
Gly66	Fmoc-Gly-OH ^[a]	237.3	4.0	-	45
Gln65	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	487.3	4.0	-	45
Trp64	Fmoc-Trp(Boc)-OH ^[a]	420.2	4.0	-	45
Val63	Fmoc-Val-OH ^[a]	270.8	4.0	-	45
Glu62	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	339.5	4.0	-	45
Val61	Fmoc-Val-OH ^[a]	270.8	4.0	-	45
Ala60	Fmoc-Ala-OH ^[a]	248.4	4.0	-	45
Gln59	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	487.3	4.0	-	45
Gln58	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	487.3	4.0	-	45
Gly57	Fmoc-(Dmb)Gly-OH ^[a]	357.1	4.0	-	45
Val56	Fmoc-Val-OH ^[b]	541.7	8.0	-	90
Glu55	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	339.5	4.0	-	45
Nle54	Fmoc-Nle-OH ^[a]	282.0	4.0	-	45
Arg53	Fmoc-Arg(Pbf)-OH ^[a]	517.7	4.0	-	45
Lys52	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	373.9	4.0	-	45
Trp51	Fmoc-Trp(Boc)-OH ^[a]	420.2	4.0	-	45
Ala50	Fmoc-Ala-OH ^[a]	248.4	4.0	-	45
Tyr49	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[a]	366.7	4.0	-	45
Phe48	Fmoc-Phe-OH ^[a]	309.2	4.0	-	45
Asn47	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[a]	476.1	4.0	-	45
Val46	Fmoc-Val-OH ^[a]	270.8	4.0	-	45

Experimenteller Teil

Lys45	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	373.9	4.0	-	45
Thr44, Asp43	Fmoc-Asp(Ot-Bu) Thr(^ψ Me,Me _{pro})-OH ^[a]	441.0	4.0	-	45
Pro42	Fmoc-Pro-OH ^[a]	269.2	4.0	-	45
Val41	Fmoc-Val-OH ^[a]	270.8	4.0	-	45
Thr40, Ile39	Fmoc-Ile Thr(^ψ Me,Me _{pro})-OH ^[a]	394.7	4.0	-	45
Asp38	Fmoc-Asp(OPhipr)-OH ^[c]	226.7	2.5	1.5	60
Glu37	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	339.5	4.0	-	45
Asn36	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[a]	476.1	4.0	-	45
Leu35	Fmoc-Leu-OH ^[a]	282.0	4.0	-	45
Ser34	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH ^[a]	306.0	4.0	-	45
Cys33	Fmoc-Cys(Trt)-OH ^[d]	934.8	4.0	4.5	180
His32	Fmoc-His(Trt)-OH ^[a]	494.5	4.0	-	45
Glu31	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	339.5	4.0	-	45
Ala30	Fmoc-Ala-OH ^[a]	248.4	4.0	-	45
Cys29	Boc-Cys(Trt)-OH ^[d]	739.9	-	4.5	180

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.80 mmol) und 330.1 mg HCTU (0.80 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplung werden 10 eq Aminosäure (1.60 mmol) und 660.2 mg HCTU (1.60 mmol, 10 eq) verwendet.

^[c]Für diese Kupplung werden 3 eq Aminosäure (0.48 mmol) und 249.2 mg PyBOP (0.48 mmol, 3 eq) verwendet.

^[d]Diese Aminosäure wird als symmetrisches Anhydrid gekuppelt, hergestellt aus 10 eq Aminosäure (1.60 mmol) und 124.0 µL DIC (0.80 mmol, 5 eq).

Nach beendeter Festphasensynthese wird das Peptidylharz mit DCM (5x) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Das Harz besitzt einen Beladungsgrad von 92.5 µmol/g (bezogen auf Ala30), was einer Gesamtkupplungsausbeute von 95 % entspricht.

400.0 mg des Peptidylharzes (37.0 µmol, B_H = 92.5 µmol/g) werden in DCM vorgequollen. Anschließend werden 10 mL 20 % HFIP/DCM zum Harz gegeben und 30 min geschüttelt. Das Harz wird weitere 5x mit je 6.5 mL 20 % HFIP/DCM für je 2 min geschüttelt und mit je 2 mL DCM (5x) gewaschen. Sämtliche Abspaltungs- und Waschlösungen werden zu einer auf 0 °C gekühlten Vorlage von 250 mL DCM gegeben. Die Lösung wird bei 5 °C im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in so wenig DCM wie möglich gelöst und erneut bei 5 °C im Vakuum eingengt (dies wird insgesamt 5x durchgeführt). Der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet, in 1,4-Dioxan gelöst und lyophilisiert. Es werden 260.5 mg der Peptidylsäure (32.9 µmol) erhalten, was einer Abspaltungseffizienz von 89 % entspricht.

Methode a): H₂NNHBoc, DIC, Cl-HOBt, DIPEA, DCM, 0 °C → RT

80.9 mg der geschützten Peptidylsäure (10.2 µmol, 1 eq) werden in 353 µL DCM zusammen mit 8.9 mg *t*-Butylcarbazat (61.2 µmol, 6 eq), 6.9 mg (40.8 µmol, 4 eq) und 7.0 µL DIPEA (40.8 µmol, 4 eq) gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt, 6.4 µL DIC (40.8 µmol, 4 eq) werden zugegeben und die Mischung wird unter Rühren langsam auf RT erwärmt. Nach 18 h wird Reaktionslösung (DC: DCM/MeOH 10:1) im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie gereinigt (GRACE Reveleris® iES, Reveleris Silica 40 µm 12 g, DCM/MeOH, 0 → 10 %, 27 min, 36 mL/min). Das Hydrazid **25** wird durch eine analytische Entschützung mit TFA zum Peptid **25e** umgesetzt und durch HPLC-MS Analyse (Säule: B II, 20 → 70 % B, 15 min, 0.3 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **25** C₄₄₆H₅₆₅N₅₅O₇₇S₃ (8024.78): 60.0 mg (7.47 µmol, 73 %), weißer Feststoff, R_f = 0.61 (DCM/MeOH 10:1), ESI-MS von **25e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₉₉H₃₀₅N₅₅O₆₀S₂ (4492.01); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 749.68, (M+5H)⁵⁺ 899.41, (M+4H)⁴⁺ 1124.01, (M+3H)³⁺ 1498.35, (M+2H)²⁺ 2247.03 gefunden: 749.82, 899.12, 1123.62, 1497.97, 2246.51.

Methode b): H₂NHBoc, PyBOP, DIPEA, DMF, -20 °C

40.0 mg der geschützten Peptidylsäure (5.06 µmol, 1 eq) werden in 253 µL DMF zusammen mit 4.0 mg *t*-Butylcarbazat (30.0 µmol, 6 eq) und 4.4 µL DIPEA (25.7 µmol, 5 eq) gelöst. Die Lösung wird auf -20 °C gekühlt, es werden 13.2 mg PyBOP (25.7 µmol, 5 eq) zugeben und das Reaktionsgemisch wird 5.5 h bei -20 °C gerührt. Nach Reaktionsende (DC: DCM/MeOH 10:1) wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in 20 mL DCM gelöst. Die organische Phase wird mit 10 mL wässrigen 2 M KHCO₃ (2x) und 10 mL H₂O (2x) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie gereinigt (GRACE Reveleris® iES, Reveleris Silica 40 µm 12 g, DCM/MeOH, 0 → 10 %, 27 min, 18 mL/min). Das Hydrazid **25** wird durch eine analytische Entschützung mit TFA zum entschützten Peptid **25e** umgesetzt und durch HPLC-MS Analyse (Säule: B I, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **25** C₄₄₆H₅₆₅N₅₅O₇₇S₃ (8024.78): 31.9 mg (3.98 µmol, 79 %), weißer Feststoff, R_f = 0.61 (DCM/MeOH 10:1), ESI-MS von **25e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung):

$C_{199}H_{305}N_{55}O_{60}S_2$ (4492.01); berechnet: $(M+4H)^{4+}$ 1124.01, $(M+3H)^{3+}$ 1498.35, $(M+2H)^{2+}$ 2247.03 gefunden: 1123.82, 1498.21, 2246.82.

*Boc-Cys(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-His(Trt)-Cys(Phacm)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Asp(OH)-Ile-Thr($\psi^{Me,Me}$ pro)-Val-Pro-Asp(OtBu)-Thr($\psi^{Me,Me}$ pro)-Lys(Boc)-Val-Asn(Trt)-Phe-Tyr(tBu)-Ala-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Nle-Glu(OtBu)-Val-(Dmb)Gly-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Ala-Val-Glu(OtBu)-Val-Trp(Boc)-Gln(Trt)-Gly-Leu-NHNHBoc **24***

(EPO 29-67 (STrt,STrt) (OH) NHNHBoc) erhalten durch Esteracidolyse

40.0 mg Hydrazid **25** (4.98 μ mol, 1 eq, erhalten durch Methode a) vgl. S. 122) werden in 6 mL 1 % TFA/DCM gelöst und 30 min geschüttelt. Nach Reaktionsende (DC: DCM/MeOH 10:1) wird die Lösung mit 100 mL DCM verdünnt und mit 100 mL wässriger 2 M $KHCO_3$ (3x) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden dreimal mit 100 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in 1,4-Dioxan gelöst und lyophilisiert.

Ausbeute an **24** $C_{437}H_{555}N_{55}O_{77}S_3$ (7906.60): 34.2 mg (4.33 μ mol, 87 %), weißer Feststoff, $R_f = 0.47$ (DCM/MeOH 10:1).

*H-Cys-Ala-Glu-His-Cys-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-NHNH₂ **28***

(EPO 29-67 (Nona) NHNH₂)

13.5 mg Nonasaccharidazid **26** (8.08 μ mol, 1.0 eq) werden in 898 μ L $MeOH_{abs}$ gelöst. Danach werden 27.7 μ L DIPEA (0.16 mmol, 20 eq) und 97.4 μ L 1,3-Propanedithiol (0.97 mmol, 120 eq) zugegeben und die Reaktion für 2.5 h geschüttelt. Nach Reaktionsende (DC: *i*-Propanol/wässriges 1 M Ammoniumacetat (2:1), $R_f(\mathbf{26}) = 0.45$, $R_f(\mathbf{27}) = 0.12$) wird mit 718 μ L $MeOH_{abs}$ verdünnt und das Produkt mit kaltem Diethylether (-10 °C) ausgefällt. Nach Zentrifugation wird der Überstand abdekantiert. Das Präzipitat wird zweimal in 1.6 ml $MeOH_{abs}$ aufgenommen, mit 4.8 mL kalten Diethylether gefällt, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Präzipitat wird im Hochvakuum getrocknet, und ergibt das Nonasacchardamin **27** in quantitativer Ausbeute.

42.6 mg Hydrazid **24** (5.39 μmol , 1 eq) werden in 140 μL DMSO/DMF (1:1) zusammen mit 4.1 mg HATU (10.8 μmol , 2 eq), 1.5 mg HOAt (10.8 μmol , 2 eq) und 3.7 μL DIPEA (21.6 μmol , 4 eq) gelöst und 15 min gerührt. Danach wird das frisch dargestellte Nonasaccharidamin **27** (8.08 μmol , 1.5 eq) hinzugefügt und die Reaktion wird 18 h gerührt. Es werden nochmals 2.1 mg HATU (5.39 μmol , 1 eq), 0.8 mg HOAt (5.39 μmol , 1 eq) und 1.9 μL DIPEA (0.11 mol, 2 eq) zugegeben und für weitere 24 h gerührt. Nach Reaktionsende wird das Gemisch im Hochvakuum eingengt. Der Rückstand wird in einer Lösung aus 32.7 mg Cystein (0.27 mmol, 50 eq) und 8 mL TFA/TES/ H_2O (96:2:2) gelöst und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird auf 1 mL im Vakuum eingengt. Es werden 10 mL kalter Diethylether ($-10\text{ }^\circ\text{C}$) zugegeben und das Peptid 10 min bei $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 10 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet, in 4.5 mL 30 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA gelöst und in drei Portionen durch RP-HPLC gereinigt (Säule: Supelco Ascentis C18 (250 mm x 10 mm); 20 \rightarrow 37 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA; 55 min; 4 mL/min). Die Produktfraktion wird lyophilisiert und das Produkt durch HPLC-MS Analyse (Säule: A I, 10 \rightarrow 60 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **28** $\text{C}_{261}\text{H}_{408}\text{N}_{60}\text{O}_{104}\text{S}_2$ (6114.50): 8.7 mg (1.35 μmol , 25 %), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): $\text{C}_{261}\text{H}_{408}\text{N}_{60}\text{O}_{104}\text{S}_2$ (6114.50): berechnet: $(\text{M}+6\text{H})^{6+}$ 1020.09, $(\text{M}+5\text{H})^{5+}$ 1223.91, $(\text{M}+4\text{H})^{4+}$ 1529.64, $(\text{M}+3\text{H})^{3+}$ 2039.18, gefunden: 1019.44, 1223.15, 1528.77, 2038.12.

H-Cys(Trt)-Ala-Glu-His-Cys(Trt)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-NHNH₂ **29**
(EPO 29-67 (STrt,STrt) (Nona) NHNH₂)

Zu 3.6 mg des Hydrazids **28** (0.59 μmol , 1 eq) werden 48.5 μL einer Lösung aus Triphenylmethanol in AcOH/HFIP (1:1) + 2 % TFA (1.77 μmol , 43 mM, 3.5 eq) gegeben. Anschließend werden weitere 10 μL AcOH/HFIP (1:1) + 2 % TFA hinzugefügt. Die Lösung wird 2.5 h geschüttelt und nach Reaktionsende mit 2.1 mL 30 % MeCN/ H_2O schnell bei guter Durchmischung verdünnt. Die Rohproduktlösung wird durch RP-HPLC gereinigt (Säule: YMC-Pack Protein RP (150 mm x 10 mm); 20 \rightarrow 45 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA; 37 min; 2 mL/min). Die Produktfraktion wird lyophilisiert und das Produkt durch HPLC-MS Analyse (Säule: B I, 10 \rightarrow 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **29** C₂₉₉H₄₃₆N₆₀O₁₀₄S₂ (6599.13): 1.9 mg (0.29 µmol, 49 %), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₂₉₉H₄₃₆N₆₀O₁₀₄S₂ (6599.13) berechnet: (M+5H)⁵⁺ 1320.84, (M+4H)⁴⁺ 1650.79, (M+3H)³⁺ 2200.72 gefunden: 1320.24, 1650.02, 2199.71.

H-Cys(Trt)-Ala-Glu-His-Cys(Trt)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu- SCH₂C₆H₄COOH **30**
(EPO 29-67 (STrt,STrt) (Nona) MMBA)

Methode a): Umsetzung zum Thioester und Isolierung durch Gelfiltration

1.7 mg Hydrazid **29** (0.26 µmol, 1 eq) werden bei -24 °C in 83.9 µL Puffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM NaNO₂, pH 4) gelöst und die Reaktion wird 50 min bei -24 °C inkubiert. Anschließend werden 2.8 mg 4-(Mercaptomethyl)benzoesäure (16.9 µmol, 65 eq) zugegeben und es wird mit wässriger 1 M NaOH ein pH-Wert von 6-7 eingestellt (Universalindikatorpapier). Die Reaktion wird 60 min bei RT inkubiert. Nach Reaktionsende wird die leicht trübe Lösung bei guter Durchmischung mit 490 µL 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA verdünnt. Es bildet sich ein Niederschlag. Nach Zentrifugation wird der Überstand durch Gelfiltration gereinigt (Säule: Superdex Peptide GL 10/300, 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 0.6 mL/min). Das Präzipitat wird in 3 mL 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und in zwei Portionen unter identischen Gelfiltrationsbedingungen gereinigt. Die Produktfraktionen der Gelfiltrationen werden lyophilisiert, vereinigt und durch HPLC-MS (Säule: A III, 20 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **30** C₃₀₇H₄₄₀N₅₈O₁₀₆S₃ (6735.30): 1.1 mg (0.16 µmol, 62 %), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₃₀₇H₄₄₀N₅₈O₁₀₆S₃ (6735.30) berechnet: (M+5H)⁵⁺ 1348.07, (M+4H)⁴⁺ 1684.84, (M+3H)³⁺ 2246.11 gefunden: 1347.51, 1623.90, 2245.93.

Methode b): Umsetzung zum Thioester und Isolierung durch Fällung

2.9 mg Hydrazid **29** (0.44 µmol, 1 eq) werden bei -24 °C in 144 µL Puffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM NaNO₂, pH 4) gelöst und die Reaktion wird 70 min bei -24 °C inkubiert. Anschließend werden 4.8 mg 4-(Mercaptomethyl)benzoesäure (29.0 µmol, 65 eq) zugegeben

und es wird mit wässriger 1 M NaOH ein pH-Wert von 6-7 eingestellt (Universalindikatorpapier). Die Reaktion wird 60 min bei RT inkubiert. Nach Reaktionsende wird das Produkt durch Zugabe von 1 mL Phosphatpuffer (0.2 M NaH₂PO₄, pH 6.5) ausgefällt. Nach Zentrifugation wird der Überstand abdekantiert und das Präzipitat zweimal mit je 1 mL Phosphatpuffer (0.2 M NaH₂PO₄, pH 6.5) gewaschen. Hiernach wird das Präzipitat dreimal mit je 1 mL H₂O + 0.1 % HCOOH gewaschen. Das Produkt wird in 70 % MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH suspendiert, lyophilisiert und durch HPLC-MS (Säule: B I, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **30** C₃₀₇H₄₄₀N₅₈O₁₀₆S₃ (6735.30): 3.0 mg (0.44 μmol, quant.), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₃₀₇H₄₄₀N₅₈O₁₀₆S₃ (6735.30) berechnet: (M+5H)⁵⁺ 1348.07, (M+4H)⁴⁺ 1684.84, (M+3H)³⁺ 2246.11 gefunden: 1348.17, 1685.02, 2246.42.

*H-Cys(Trt)-Ala-Glu-His-Cys(Trt)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Cys-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(Nvoc)-NHNH₂ **32***
(EPO 29-97 (STrt,STrt) (Nona,Nona) NHNH₂)

Methode a): Ligation und Reinigung durch Gelfiltration

Die folgenden Schritte werden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. 0.52 mg Thioester **30** (75.8 nmol, 1.2 eq) werden in 17.3 μL Puffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 5 mM TCEP, pH 6.9) gelöst und zu 0.32 mg Hydrazid **31** (63.1 nmol, 1 eq) gegeben. Die Lösung wird 3 d bei RT inkubiert. Es werden 0.32 mg DTT (0.17 μmol, Endkonzentration_{DTT} = 0.1 M) als Feststoff zugegeben. Nach 2 h wird mit 120 μL 50 % MeCN/H₂O bei guter Durchmischung verdünnt. Die Rohproduktlösung wird durch Gelfiltration (Säule: Superdex Peptide GL 10/300, 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 0.6 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion wird lyophilisiert und das Produkt durch UHPLC-MS Analyse (Säule: A IV, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **32** C₅₂₀H₇₈₈N₁₀₆O₁₉₈S₃ (11788.61): 0.73 mg (61.9 μmol, 98 % mit 85 % Reinheit, Verunreinigungen durch EPO 29-67 Fragmente), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z

(durchschnittliche Isotopenverteilung): $C_{520}H_{788}N_{106}O_{198}S_3$ (11788.61) berechnet: $(M+8H)^{8+}$ 1474.59, $(M+7H)^{7+}$ 1685.10, $(M+6H)^{6+}$ 1965.78 gefunden: 1473.61, 1683.94, 1964.39.

Methode b): Ligation und Reinigung durch RP-HPLC

Die folgenden Schritte werden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. 0.52 mg Thioester **30** (75.8 nmol, 1.1 eq) werden in 17.3 μ L Puffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH_2PO_4 , 5mM TCEP, pH 6.9) gelöst und zu 0.37 mg Hydrazid **31** (68.9 nmol, 1 eq) gegeben. Die Lösung wird 24 h bei RT inkubiert. Es werden 0.32 mg DTT (0.17 μ mol, 0.1 M) als Feststoff zugegeben und 2 h bei RT inkubiert. Es wird mit 400 μ L 35 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA bei guter Durchmischung verdünnt. Hierbei bildet sich ein Niederschlag. Nach Zentrifugation wird der Überstand durch RP-HPLC (Säule: Supelco Discovery Bio Wide Pore C5 5 μ m (150 mm x 4.6 mm); 25 \rightarrow 45 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA; 30 min; 1 mL/min) gereinigt. Das Präzipitat wird in 0.55 mL 55 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA gelöst und bei guter Durchmischung mit 140 μ L H_2O verdünnt. Die erhaltene Rohproduktlösung wird durch RP-HPLC (Säule: Supelco Discovery Bio Wide Pore C5 5 μ m (150 mm x 4.6 mm); 35 \rightarrow 55 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA; 30 min; 1 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen beider Chromatographien werden lyophilisiert, vereinigt und das Produkt durch HPLC-MS (Säule: A IV, 20 \rightarrow 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **32** $C_{520}H_{788}N_{106}O_{198}S_3$ (11788.61): 0.70 mg (59.4 μ mol, 86 %), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): $C_{520}H_{788}N_{106}O_{198}S_3$ (11788.61) berechnet: $(M+8H)^{8+}$ 1474.59, $(M+7H)^{7+}$ 1685.10, $(M+6H)^{6+}$ 1965.78 gefunden: 1473.91, 1684.48, 1965.18.

*H-Cys(Trt)-Ala-Glu-His-Cys(Trt)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Cys-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(Nvoc)-SCH₂C₆H₄COOH **33***
(EPO 29-97 (S_{Trt},S_{Trt}) (Nona,Nona) (NH_Nvoc) MMBA)

0.68 mg Hydrazid **32** (57.7 μ mol, 1 eq, erhalten durch Methode a) vgl. S. 126) werden bei -24 °C in 18.9 μ L Puffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH_2PO_4 , 20 mM $NaNO_2$, pH 4) gelöst und 60 min bei -24 °C inkubiert. Anschließend werden 0.63 mg Mercaptomethylbenzoesäure

(16.9 μmol , 65 eq) zugegeben und es wird mit wässriger 1 M NaOH ein pH-Wert von 6-7 eingestellt (Universalindikatorpapier). Die Reaktion wird für weitere 60 min bei RT inkubiert. Nach Reaktionsende wird die Lösung mit 230 μL Phosphatpuffer (0.2 M NaH_2PO_4 pH 6.5) und anschließend mit 500 μL 50 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA verdünnt. Die Rohproduktlösung wird durch Gelfiltration (Säule: Superdex Peptide GL 10/300, 50 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA, 0.6 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion wird lyophilisiert und durch HPLC-MS Analyse (Säule: A IV, 20 \rightarrow 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **33** $\text{C}_{529}\text{H}_{794}\text{N}_{104}\text{O}_{200}\text{S}_3$ (11906.74): 0.28 mg (23.5 μmol , 41 %, Verunreinigungen durch EPO 29-67 Fragmente), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): $\text{C}_{529}\text{H}_{794}\text{N}_{104}\text{O}_{200}\text{S}_3$ (11906.74) berechnet: $(\text{M}+7\text{H})^{7+}$ 1704.55, $(\text{M}+6\text{H})^{6+}$ 1988.47 gefunden: 1709.74, 1990.77

11.7 Versuche zu Kapitel 6.1

*Boc-Asp(Ot-Bu)-Gly-Gly-Phe-Cys(St-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Val-Cys(St-Bu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Val-(Dmb)Gly-Tyr-Leu-Asp(Ot-Bu)-Arg(Pbf)-Asn(Trt)-Leu-Glu(Ot-Bu)-Lys(Boc)-Asp(OAll)-Ser(Ot-Bu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Glu(Ot-Bu)-Ile-Leu-Ala-Ala-Leu-Glu(Ot-Bu)-Lys(Boc)-Gly-(2'-Chlor)-trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix **41a***
(Saposin D 1-35 2-Cl-Trt-CM)

Es werden 512.0 mg HO-(2'-Chlor)trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz^[47] (0.27 mmol, $B_{\text{H}} = 0.49$ mmol/g) in einen 10 mL Langhalskolben gegeben. Es werden unter Schutzgas 10 mL einer 10 %igen Acetylbromid Lösung in DCM_{abs} zugegeben. Die Reaktion wird 3.5 h bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz mit DCM_{abs} (6 x 7 mL) gewaschen. Unter Schutzgas wird eine Lösung aus 405.8 mg Fmoc-Gly-OH (1.35 mmol, 5.0 eq) und 467.4 μL DIPEA (2.5 mmol, 10 eq) in 3 mL DCM_{abs} zum Harz gegeben. Dies wird 17 h geschüttelt, die Lösung wird abfiltriert und das Harz mit NMP (2x), DCM (5x), mit insgesamt 20 mL $\text{DCM}/\text{MeOH}/\text{DIPEA}$ (17:2:1) 3 x 2 min und zuletzt mit DCM (5x) gewaschen. Man erhält das Fmoc-Gly-2-Cl-Trt-ChemMatrix-Harz mit $B_{\text{H}} = 0.34$ mmol/g, was einer Kupplungsausbeute von 78 % entspricht.

Experimenteller Teil

Tabelle 26: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Peptidylharzes **34a**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		<i>t</i> [min]
			0.2 M DIPEA in DMF	DMF	
Lys34	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	191.2	4	-	30
Glu33	Fmoc-Glu(OtBu)-OH ^[a]	173.6	4	-	30
Leu32	Fmoc-Leu-OH ^[a]	144.2	4	-	30
Ala31	Fmoc-Ala-OH ^[a]	127.0	4	-	30
Ala30	Fmoc-Ala-OH ^[a]	127.0	4	-	30
Leu29	Fmoc-Leu-OH ^[a]	144.2	4	-	30
Ile28	Fmoc-Ile-OH ^[a]	144.2	4	-	30
Glu27	Fmoc-Glu(OtBu)-OH ^[a]	173.6	4	-	30
Gln26	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	249.2	4	-	30
Lys25	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	191.2	4	-	30
Thr24, Ser23	Fmoc-Ser(tBu)-Thr(ψ ^{Me,Me} pro)-OH ^[b]	128.4	3	1	45
Asp22	Fmoc-Asp(OAll)-OH ^[b]	111.1	3	1	45
Lys21	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	191.2	4	-	30
Glu20	Fmoc-Glu(OtBu)-OH ^[a]	173.6	4	-	30
Leu19	Fmoc-Leu-OH ^[a]	144.2	4	-	30
Asn18	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[a]	243.4	4	-	30
Arg17	Fmoc-Arg(Pbf)-OH ^[a]	264.7	4	-	30
Asp16	Fmoc-Asp(OtBu)-OH ^[a]	167.9	4	-	30
Leu15	Fmoc-Leu-OH	144.2	4	-	30
Tyr14	Fmoc-Tyr(tBu)-OH ^[a]	187.5	4	-	30
Gly13, Val12	Fmoc-Val-(Dmb)Gly-OH ^[b]	133.8	3	1	45
Leu11	Fmoc-Leu-OH ^[a]	144.2	4	-	30
Lys10	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	191.2	4	-	30
Lys9	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	191.2	4	-	30
Cys8	Fmoc-Cys(StBu)-OH ^[c]	352.2	-	3.5	210
Val7	Fmoc-Val-OH ^[a]	138.5	4	-	30
Glu6	Fmoc-Glu(OtBu)-OH ^[a]	173.6	4	-	30
Cys5	Fmoc-Cys(StBu)-OH ^[c]	352.2	-	3.5	210
Phe4	Fmoc-Phe-OH ^[a]	158.1	4	-	30
Gly3	Fmoc-Gly-OH ^[a]	121.3	4	-	30
Gly2	Fmoc-Gly-OH ^[a]	121.3	4	-	30
Asp1	Boc-Asp(OtBu)-OH ^[a]	118.1	4	-	60

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.41 mmol) und 168.8 mg HCTU (0.41 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplungen werden je 3 eq Aminosäure (0.25 mmol) und 160.8 mg PyBOP (0.25 mmol, 3 eq) verwendet.

^[c]Diese Aminosäuren werden als symmetrisches Anhydrid gekuppelt, hergestellt aus 10 eq Aminosäure (0.82 mmol) und 65.2 μL DIC (0.41 mmol, 5 eq).

241.7 mg Fmoc-Gly-2-Cl-Trt-ChemMatrix-Harz (82.2 μmol , $B_H = 0.34 \text{ mmol/g}$) werden in ein 45 mL Reaktionsgefäß überführt und es wird eine maschinelle Fmoc-SPPS durchgeführt. Cys8 und Cys5 werden als symmetrisches Anhydrid von Fmoc-Cys(St-Bu)-OH gekuppelt. Für die Fmoc-Entschützungs-schritte werden je 4 mL 20 % Piperidin in DMF und für die Waschschrirte werden je 3 mL DMF verwendet. Die Aminosäuren und deren Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 26 aufgeführt. Nach beendeter Festphasensynthese wird das Peptidylharz mit DCM (5x) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Dieses besitzt einen Beladungsgrad von 73.6 $\mu\text{mol/g}$ (bezogen auf Gly2), was einer Gesamtkupplungsausbeute von 71 % entspricht. Es wird eine analytische Entschützung mit TFA durchgeführt und das entschützte Peptid **34e** durch HPLC-MS (Säule: A I, 20 \rightarrow 60 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

ESI-MS von **34e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): $\text{C}_{179}\text{H}_{297}\text{N}_{45}\text{O}_{55}\text{S}_4$ (4085.07); berechnet: $(M+7H)^{7+}$ 584.98, $(M+6H)^{6+}$ 682.31, $(M+5H)^{5+}$ 818.57, $(M+4H)^{4+}$ 1022.96, $(M+3H)^{3+}$ 1363.61, $(M+2H)^{2+}$ 2044.91, gefunden: 584.71, 681.91, 817.87, 1022.34, 1362.90, 2044.01.

*Boc-Asp(Ot-Bu)-Gly-Gly-Phe-Cys(St-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Val-Cys(St-Bu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Val-(Dmb)Gly-Tyr-Leu-Asp(Ot-Bu)-Arg(Pbf)-Asn(Trt)-Leu-Glu(Ot-Bu)-Lys(Boc)-Asp(OAll)-Ser(Ot-Bu)-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Glu(Ot-Bu)-Ile-Leu-Ala-Ala-Leu-Glu(Ot-Bu)-Lys(Boc)-Gly-(2'-Chlor)-trityl-Polystyrol **34b***
(Saposin D 1-35 2-Cl-Trt-PS)

217.3 mg Chlor-(2'-Chlor)trityl-Polystyrol (0.35 mmol, $B_H = 1.6 \text{ mmol/g}$) werden 30 min in DCM_{abs} vorgequollen. Danach werden 24.4 mg Fmoc-Gly-OH (82.2 μmol , 1 eq) und 70.4 μL DIPEA (0.41 mmol, 5 eq) in 1.3 mL DCM_{abs} zum Harz gegeben. Nach 16 h Schütteln wird mit DCM (5x), mit insgesamt 20 mL $\text{DCM}/\text{MeOH}/\text{DIPEA}$ (17:2:1) 3x für je 2 min und nochmals mit DCM (3x) gewaschen. Das Fmoc-Gly-2-Cl-Trt-PS Harz wird im Hochvakuum getrocknet und besitzt einen Beladungsgrad von 0.34 mmol/g. Das gesamte Harz wird in ein 45 mL Reaktionsgefäß überführt und die Festphasensynthese wird analog zu Saposin D 1-35 2-Cl-Trt-CM **34a** mit identischen Mengen und Bedingungen (Tabelle 26) durchgeführt. Nach beendeter Festphasensynthese wird das Peptidylharz mit DCM (5x) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es wird eine analytische Entschützung mit TFA durchgeführt und das entschützte Peptid **34e** durch HPLC-MS (Säule: B I, 10 \rightarrow 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

ESI-MS von **34e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₇₉H₂₉₇N₄₅O₅₅S₄ (4085.07); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 682.31, (M+NH₄+4H)⁵⁺ 821.96, (M+NH₄+3H)⁴⁺ 1027.20, (M+NH₄+2H)³⁺ 1369.23, (M+NH₄+H)²⁺ 2053.40, gefunden: 681.80, 821.22, 1026.49, 1368.29, 2052.08.

*Boc-Asp(Ot-Bu)-Gly-Gly-Phe-Cys(St-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Val-Cys(St-Bu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Val-(Dmb)Gly-Tyr-Leu-Asp(Ot-Bu)-Arg(Pbf)-Asn(Trt)-Leu-Glu(Ot-Bu)-Lys(Boc)-Asp(OAll)-Ser(Ot-Bu)-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Glu(Ot-Bu)-Ile-Leu-Ala-Ala-Leu-Glu(Ot-Bu)-Lys(Boc)-Gly-NHNHBoc **35***

(Sapoin D 1-35 (OAll) NHNHBoc)

593.2 mg des Peptidylharzes **34a** (43.7 μ mol, 1 eq, B_H = 73.6 μ mol/g) werden in DCM vorgequollen. Danach wird das Harz 10x mit je 10 mL einer Lösung aus TFA/TES/DCM (1.5:2:96.5) je 2 min geschüttelt. Das Harz wird mit DCM (5x) gewaschen. Die filtrierten Abspaltungs- und Waschlösungen werden in einem Kolben mit 3.33 mL DIPEA (1.0 eq bezogen auf die TFA-Menge) gesammelt. Die neutralisierte Lösung wird im Vakuum auf 9.5 mL eingengt (c_{Peptid} = 4.4 mM). Es werden 173.1 mg *t*-Butylcarbazat (1.30 mmol, 30 eq), 146.6 mg Cl-HOBt (0.87 mmol, 20 eq) und 148 μ L DIPEA (0.87 mmol, 20 eq) zugegeben. Nach 5 min Rühren wird der pH-Wert überprüft und falls dieser nicht im Bereich 8-9 liegt wird zusätzliches DIPEA hinzugegeben. Im Anschluss werden 135.0 μ L DIC (0.87 mmol, 20 eq) zugegeben und die Lösung wird für 20 h gerührt. Nach Reaktionsende (DC: DCM/MeOH 7:1 + 0.1 % AcOH) wird mit 150 mL DCM verdünnt, zweimal mit 75 mL wässrigen 2 M KHCO₃ und zweimal mit 75 mL H₂O gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie gereinigt (GRACE Reveleris® iES, Reveleris™ Grace Silica 40 μ m 2 x 12 g, DCM/MeOH, 0 \rightarrow 17 %, 40 min, 36 mL/min). Das Hydrazid **35** wird durch eine analytische TFA-Entschützung und HPLC-MS des entschützten Peptids **35e** (Säule: A I, 30 \rightarrow 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **35** C₃₀₉H₄₇₇N₄₇O₇₃S₅ (6178.69): 202.5 mg (32.7 μ mol, 75 %), R_f = 0.53 (DCM/MeOH 7:1), ESI-MS von **35e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₇₉H₂₉₉N₄₇O₅₄S₄ (4101.83); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 684.65, (M+5H)⁵⁺ 821.38, (M+4H)⁴⁺ 1026.47, (M+3H)³⁺ 1368.29, gefunden: 684.69, 821.45, 1026.55, 1368.40.

Boc-Asp(Ot-Bu)-Gly-Gly-Phe-Cys(St-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Val-Cys(St-Bu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Val-(Dmb)Gly-Tyr-Leu-Asp(Ot-Bu)-Arg(Pbf)-Asn(Trt)-Leu-Glu(Ot-Bu)-Lys(Boc)-Asp-Ser(Ot-Bu)-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Glu(Ot-Bu)-Ile-Leu-Ala-Ala-Leu-Glu(Ot-Bu)-Lys(Boc)-Gly-NHNHBoc **36**

(*Saposin D 1-35 (OH) NHNHBoc*)

Methode a): Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, DCM

Die folgenden Reaktionsschritte werden unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Zu 246.0 mg Peptidhydrazid **35** (39.8 μmol , 1 eq) werden 3 mL DCM_{abs} gegeben und die Suspension wird 1 h gerührt. Es wird eine Lösung aus 23.0 mg Pd(PPh₃)₄ (19.9 μmol , 0.5 eq) und 73.4 μL PhSiH₃ (0.60 mmol, 15 eq) in 1 mL DCM_{abs} hinzugefügt und die Suspension 5.5 h unter Lichtausschluss gerührt. 161 μL Pyridin (100 eq auf Pd(PPh₃)₄ bezogen) werden zugegeben und es wird 60 min unter Lichtausschluss gerührt. Danach wird die Reaktionsmischung im Vakuum eingeeengt und der Rückstand wird durch Flashchromatographie gereinigt (Reveleris®iES, Grace Silica 40 μm 2 x 12 g, DCM/MeOH 0 \rightarrow 20 %, 40 min, 36 mL/min). Das Hydrazid **36** wird durch eine analytische Entschützung mit TFA und HPLC-MS des entschützten Peptids **36e** (Säule: A I, 30 \rightarrow 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **36** C₃₀₆H₄₇₃N₄₇O₇₃S₅ (6138.63): 202.5 mg (32.7 μmol , 75 %), beiger Feststoff, $R_f = 0.50$ (DCM/MeOH 7:1), ESI-MS von **36e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₇₆H₂₉₅N₄₇O₅₄S₄ (4061.77); berechnet: (M+7H)⁷⁺ 581.26, (M+6H)⁶⁺ 677.97, (M+5H)⁵⁺ 813.36, (M+4H)⁴⁺ 1016.45, (M+3H)³⁺ 1354.93, (M+2H)²⁺ 2031.90 gefunden: 581.08, 677.66, 813.00, 1016.04, 1354.41, 2031.53.

Methode b): Pd^{II}EnCat, (R,R)-DACH-phenyl Trost ligand, PhSiH₃, DCM

Die folgenden Reaktionsschritte werden unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Zu 101.3 mg Peptidhydrazid **35** (16.4 μmol , 1 eq) wird 1 mL DCM_{abs} gegeben und die Suspension wird 1 h gerührt. 20.5 mg Pd^{II}EnCat (Beladung = 0.4 mmol/g, 8.2 μmol , 0.5 eq), 17.0 mg (R,R)-DACH-phenyl Trost Ligand (24.6 μmol , 1.5 eq), 29.3 μL PhSiH₃ (0.33 mmol, 20 eq) und zusätzliche 640 μL DCM_{abs} werden zugegeben und die Suspension wird 5 h unter Lichtausschluss gerührt. Danach wird die Suspension filtriert und der Feststoff mit 80 mL DCM gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand wird durch Flashchromatographie (Reveleris®iES, Grace Silica 40 μm 12 g, DCM/MeOH 0 \rightarrow 15 %, 40 min, 36 mL/min) gereinigt.

30 min, 28 mL/min) gereinigt. Das Hydrazid **36** wird durch eine analytische Entschützung mit TFA und HPLC-MS des entschützten Peptids **36e** (Säule: A I, 30 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **36** C₃₀₆H₄₇₃N₄₇O₇₃S₅ (6138.63): 59.0 mg (9.6 μmol, 59 %), weißer Feststoff, R_f = 0.50 (DCM/MeOH 7:1), ESI-MS von **36e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₇₆H₂₉₅N₄₇O₅₄S₄ (4061.77); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 677.97, (M+5H)⁵⁺ 813.36, (M+4H)⁴⁺ 1016.45, (M+3H)³⁺ 1354.93, (M+2H)²⁺ 2031.90 gefunden: 677.55, 812.66, 1015.88, 1354.25, 2031.34.

H-Asp-Gly-Gly-Phe-Cys(St-Bu)-Glu-Val-Cys(St-Bu)-Lys-Lys-Leu-Val-Gly-Tyr-Leu-Asp-Arg-Asn-Leu-Glu-Lys-Asn[GlcNAc]-Ser-Thr-Lys-Gln-Glu-Ile-Leu-Ala-Ala-Leu-Glu-Lys-Gly-NHNH₂ 37a

(Sapoin D 1-35 (GlcNAc) NHNH₂)

Ansatz a): unter Verwendung des Edukts **36** (erhalten durch selektive Desallylierung mit Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, DCM)

Zu 5.1 mg Hydrazid **36** (0.83 μmol, 1 eq) werden 0.8 mg HATU (2.1 μmol, 2.5 eq), 0.3 mg HOAt (2.1 μmol, 2.5 eq) und 0.6 μL DIPEA (3.3 μmol, 4 eq) gelöst in 13.8 μL DMSO/DMF (1:1) gegeben und die Mischung wird 20 min gerührt. 0.5 mg GlcNAc-NH₂ (2.1 μmol, 2.5 eq) gelöst in 13.8 μL DMSO/DMF (1:1) werden hinzugefügt und die Reaktion wird 5 d gerührt. Die Reaktionsmischung wird im Hochvakuum eingeeengt, der Rückstand in 2.5 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) gelöst und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird im Vakuum auf ein Volumen von 0.5 mL eingeeengt und das Peptid wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether (-10 °C) 10 min bei -10 °C gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 10 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet, durch HPLC-MS (Säule: A II, 20 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) analysiert, in 1 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und durch RP-HPLC gereinigt (Säule: Supelco Ascentis C18 (250 mm x 10 mm); 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA; 55 min; 4 mL/min). Die Produktfraktion lyophilisiert und das Produkt durch HPLC-MS (Säule: A II, 20 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **37a** C₁₈₄H₃₀₉N₄₉O₅₈S₄ (4261.16): 1.5 mg (0.36 μmol, 44 %), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₈₄H₃₀₉N₄₉O₅₈S₄ (4261.16); berechnet: (M+7H)⁷⁺ 610.15, (M+6H)⁶⁺ 711.67, (M+5H)⁵⁺ 853.81, (M+4H)⁴⁺ 1067.01, (M+3H)³⁺ 1422.34, gefunden: 610.34, 711.77, 853.87, 1067.31, 1422.72.

Ansatz b): unter Verwendung des Edukts **36** (erhalten durch selektive Desallylierung mit Pd^{II}EnCat, (R,R)-DACH-phenyl Trost ligand, PhSiH₃, DCM)

Zu 5.2 mg Hydrazid **36** (0.85 μmol, 1 eq) werden 0.8 mg HATU (2.1 μmol, 2.5 eq), 0.3 mg HOAt (2.1 μmol, 2.5 eq) und 0.6 μL DIPEA (3.3 μmol, 4 eq) gelöst in 14.1 μL DMSO/DMF (1:1) gegeben und die Reaktion wird 20 min gerührt. 0.5 mg GlcNAc-NH₂ (2.1 μmol, 2.5 eq) gelöst in 14.1 μL DMSO/DMF (1:1) werden hinzugefügt und die Reaktion wird 5 d gerührt. Die Reaktionsmischung wird im Hochvakuum eingeeengt, der Rückstand in 2.5 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) gelöst und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird im Vakuum auf ein Volumen von 0.5 mL eingeeengt und das Peptid wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether (-10 °C) 10 min bei -10 °C gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 10 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird bei Normaldruck und im Hochvakuum getrocknet, durch HPLC-MS (Säule: A II, 20 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) analysiert, in 1 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und durch RP-HPLC gereinigt (Säule: Supelco Ascentis C18 (250 mm x 10 mm); 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA; 55 min; 4 mL/min). Die Produktfraktion wird lyophilisiert und durch HPLC-MS (Säule: A II, 20 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **37a**: 2.0 mg (0.45 μmol, 55 %), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₈₄H₃₀₉N₄₉O₅₈S₄ (4261.16); berechnet: (M+7H)⁷⁺ 610.15, (M+6H)⁶⁺ 711.67, (M+5H)⁵⁺ 853.81, (M+4H)⁴⁺ 1067.01, (M+3H)³⁺ 1422.34, gefunden: 610.38, 711.60, 853.66, 1067.13, 1422.63.

*H-Asp-Gly-Gly-Phe-Cys(St-Bu)-Glu-Val-Cys(St-Bu)-Lys-Lys-Leu-Val-Gly-Tyr-Leu-Asp-Arg-Asn-Leu-Glu-Lys-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Thr-Lys-Gln-Glu-Ile-Leu-Ala-Ala-Leu-Glu-Lys-Gly-NHNH₂ **37b**
(Saposin D 1-35 (Nona) NHNH₂)*

3.4 mg Nonasaccharidazid **26** (2.0 μmol , 1 eq) werden in 226 μL MeOH_{abs} gelöst. Danach werden 7.0 μL DIPEA (40.0 μmol , 20 eq) und 25.5 μL 1,3-Propandithiol (0.24 mmol, 120 eq) zugegeben und die Reaktion für 4 h geschüttelt. Nach Reaktionsende (DC: *i*-Propanol/wässriges 1 M Ammoniumacetat (2:1), $R_f(\mathbf{26}) = 0.45$, $R_f(\mathbf{27}) = 0.12$) wird das Produkt durch Zugabe von 1.2 mL kalten Diethylether ausgefällt. Nach Zentrifugation wird der Überstand abdekantiert. Das Präzipitat wird 2x mit 1.2 mL kalten Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Feststoff wird im Hochvakuum getrocknet. Das Nonasaccharidamin **27** wird in quantitativer Ausbeute erhalten.

Zu 5.0 mg Hydrazid **36** (0.81 μmol , 1 eq) werden 0.8 mg HATU (2.0 μmol , 2.5 eq), 0.3 mg HOAt (2.1 μmol , 2.5 eq) und 0.6 μL DIPEA (3.2 μmol , 4 eq) gelöst in 18.7 μL DMSO/DMF (1:1) gegeben und die Mischung wird 15 min gerührt. Das frisch dargestellte Nonasaccharidamin **27** (2.0 μmol , 2.5 eq) und zusätzliche 8.5 μL DMSO/DMF (1:1) werden zugegeben und die Reaktion wird 5 d gerührt. Die Reaktionsmischung wird im Hochvakuum eingeeengt, der Rückstand wird in 2.5 mL TFA/TES/ H_2O (96:2:2) gelöst und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird im Vakuum auf ein Volumen von 0.5 mL eingeeengt und das Peptid wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether ($-10\text{ }^\circ\text{C}$) 10 min bei $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 10 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet, durch HPLC-MS (Säule: A I, 30 \rightarrow 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) analysiert, in 1.5 mL 30 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA gelöst und durch RP-HPLC gereinigt (Säule: Supelco Ascentis C18 (250 mm x 10 mm); 20 \rightarrow 55 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA; 55 min; 4 mL/min). Die Produktfraktion wird lyophilisiert und das Produkt durch HPLC-MS (Säule: A II, 30 \rightarrow 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **37b** $\text{C}_{238}\text{H}_{398}\text{N}_{52}\text{O}_{98}\text{S}_4$ (5684.26): 1.4 mg (0.24 μmol , 29 %), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): $\text{C}_{238}\text{H}_{398}\text{N}_{52}\text{O}_{98}\text{S}_4$ (5684.26); berechnet: $(\text{M}+7\text{H})^{7+}$ 813.05, $(\text{M}+6\text{H})^{6+}$ 948.39, $(\text{M}+5\text{H})^{5+}$ 1137.86, $(\text{M}+4\text{H})^{4+}$ 1422.08, $(\text{M}+3\text{H})^{3+}$ 1895.76 gefunden: 813.11, 948.44, 1137.98, 1422.16, 1895.75.

H-Asp-Gly-Gly-Phe-Cys(*St*-Bu)-Glu-Val-Cys(*St*-Bu)-Lys-Lys-Leu-Val-Gly-Tyr-Leu-Asp-Arg-Asn-Leu-Glu-Lys-Asn[(*Man*)₂(*Man*)₂(*Man*)(*GlcNAc*)₂]-Ser-Thr-Lys-Gln-Glu-Ile-Leu-Ala-Ala-Leu-Glu-Lys-Gly-NHNH₂ **37c**
(*Saposin D* 1-35 (*Man*₅) NHNH₂)

2.8 mg Heptasaccharidazid **38** (2.2 μmol , 1 eq) werden in 245 μL MeOH_{abs} gelöst. Danach werden 11.4 μL DIPEA (66.0 μmol , 30 eq) und 39.9 μL 1,3-Propandithiol (0.40 mmol, 180 eq) zugegeben und die Reaktion für 1.5 h geschüttelt. Nach Reaktionsende (DC: *i*-Propanol/wässriges 1 M Ammoniumacetat (2:1)) wird das Produkt durch Zugabe von 1.4 mL kalten Diethylether ausgefällt. Nach Zentrifugation wird der Überstand abdekantiert. Das Präzipitat wird 2x mit je 1.4 mL kalten Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Feststoff wird im Hochvakuum getrocknet. Das Heptasaccharidamin **39** wird in quantitativer Ausbeute erhalten.

Zu 20.3 mg Hydrazid **36** (3.3 μmol , 1.5 eq) werden 2.5 mg HATU (6.6 μmol , 3 eq), 0.9 mg HOAt (6.6 μmol , 3 eq) und 2.3 μL DIPEA (13.2 μmol , 6 eq) gelöst in 45.0 μL DMSO/DMF (1:1) gegeben und die Mischung wird 15 min gerührt. Das frisch dargestellte Heptasaccharidamin **39** (2.2 μmol , 1.0 eq) und zusätzliche 21.7 μL DMSO/DMF (1:1) werden zugegeben und die Reaktion wird für 29 h gerührt. Während den ersten 2 h wird der pH-Wert überwacht und mit DIPEA auf pH 8-9 eingestellt. Die Reaktionsmischung wird im Hochvakuum eingengt, der Rückstand wird in 7 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) gelöst und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird im Vakuum auf ein Volumen von 1 mL eingengt und das Peptid wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether (–10 °C) für 10 min bei –10 °C gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 10 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet, durch HPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert, in 1.5 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und durch RP-HPLC gereinigt (Säule: Supelco Ascentis C18 (250 mm x 10 mm); 22 → 47 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA; 55 min; 4 mL/min). Die Produktfraktion wird lyophilisiert und das Produkt durch HPLC-MS (Säule: B II, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **37c**: 5.4 mg (1.0 μmol , 46 %), weißer Feststoff, ESI-MS: *m/z* (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₂₂₂H₃₇₂N₅₀O₈₈S₄ (5277.87); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 880.66, (M+5H)⁵⁺ 1056.58, (M+4H)⁴⁺ 1320.48, (M+3H)³⁺ 1760.30, gefunden: 880.25, 1056.19, 1320.13, 1760.01.

Allgemeine Vorgehensweise für die Darstellung der Glycopeptidthioester **40a-c**:

Das Glycopeptidhydrazid **37a**, **37b** bzw. **37c** (1 eq, c = 3.1 mM) wird in einem frisch hergestellten Diazotierungspuffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM NaNO₂, pH 3.5) bei –24 °C gelöst und 50 min bei –24 °C inkubiert. Es wird 4-(Mercaptomethyl)-benzoesäure

(65 eq) als Feststoff zugegeben und der pH-Wert wird mit wässriger 1 M NaOH auf pH 6-7 eingestellt (Universalindikatorpapier). Die Lösung wird 1 h bei RT inkubiert. Die Reaktion wird mit 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA verdünnt und der Glycopeptidthioester durch Gelfiltration (Superdex Peptide 10/300 GL, 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, Fluss 0.6 mL/min) isoliert. Die Produktfraktion wird gefriergetrocknet und durch HPLC-MS charakterisiert.

H-Asp-Gly-Gly-Phe-Cys(St-Bu)-Glu-Val-Cys(St-Bu)-Lys-Lys-Leu-Val-Gly-Tyr-Leu-Asp-Arg-Asn-Leu-Glu-Lys-Asn[GlcNAc]-Ser-Thr-Lys-Gln-Glu-Ile-Leu-Ala-Ala-Leu-Glu-Lys-Gly-SCH₂C₆H₄COOH **40a**

(*Saposin D 1-35 (GlcNAc) MMBA*)

4.8 mg Glycopeptidhydrazid **37a** (1.19 μmol) werden nach der allgemeinen Vorgehensweise (siehe S. 136) zum Glycopeptidthioester **40a** umgesetzt. Das Produkt wird durch HPLC-MS (Säule: A II, 20 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **40a** C₁₉₂H₃₁₃N₄₇O₆₀S₅ (4397.15): 4.5 mg (1.02 μmol, 86 %, beinhaltet Anteile von **40a-StBu** sowie **40a-2xStBu** und geringe Mengen Edukt **37a**), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₉₂H₃₁₃N₄₇O₆₀S₅ (4397.15); berechnet: (M+7H)⁷⁺ 629.60, (M+6H)⁶⁺ 734.37, (M+5H)⁵⁺ 881.04, (M+4H)⁴⁺ 1101.04, (M+3H)³⁺ 1467.72, (M+2H)²⁺ 2201.08, gefunden: 629.39, 733.99, 880.41, 1100.52, 1487.17, 2200.34.

H-Asp-Gly-Gly-Phe-Cys(St-Bu)-Glu-Val-Cys(St-Bu)-Lys-Lys-Leu-Val-Gly-Tyr-Leu-Asp-Arg-Asn-Leu-Glu-Lys-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Thr-Lys-Gln-Glu-Ile-Leu-Ala-Ala-Leu-Glu-Lys-Gly-SCH₂C₆H₄COOH **40b**

(*Saposin D 1-35 (Nona) MMBA*)

3.7 mg Glycopeptidhydrazid **37b** (0.64 μmol) werden nach der allgemeinen Vorgehensweise (siehe S. 136) zum Glycopeptidthioester **40b** umgesetzt. Das Produkt wird durch HPLC-MS (Säule: A I, 20 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **40b**: 3.1 mg (0.54 μmol, 86 %, beinhaltet Anteile von **40b-StBu** sowie **40b-2xStBu** und geringe Mengen Edukt **37b**), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₂₄₆H₄₀₂N₅₀O₁₀₀S₅ (5820.42); berechnet: (M+7H)⁷⁺ 832.50, (M+6H)⁶⁺ 971.08, (M+5H)⁵⁺ 1165.09, (M+4H)⁴⁺ 1456.12, (M+3H)³⁺ 1941.15, gefunden: 832.32, 970.77, 1164.67, 1455.68, 1940.67.

H-Asp-Gly-Gly-Phe-Cys(St-Bu)-Glu-Val-Cys(St-Bu)-Lys-Lys-Leu-Val-Gly-Tyr-Leu-Asp-Arg-Asn-Leu-Glu-Lys-Asn[(Man)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Thr-Lys-Gln-Glu-Ile-Leu-Ala-Ala-Leu-Glu-Lys-Gly- SCH₂C₆H₄COOH **40c**

(*Saposin D 1-35 (Man₅) MMBA*)

4.0 mg Glycopeptidhydrazid **37c** (0.76 μmol) werden nach der allgemeinen Vorgehensweise (siehe S. 136) zum Glycopeptidthioester **40c** umgesetzt. Das Produkt wird durch HPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **40c** C₂₃₀H₃₇₆N₄₈O₉₀S₅ (5414.04): 3.5 mg (0.65 μmol, 85 % beinhaltet Anteile von **40c-StBu** sowie **40c-2xStBu** und geringe Mengen Edukt **37c**), weißer Feststoff ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₂₃₀H₃₇₆N₄₈O₉₀S₅ (5414.04); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 903.35, (M+5H)⁵⁺ 1083.82, (M+4H)⁴⁺ 1354.52, (M+3H)³⁺ 1805.69, (M+2H)²⁺ 2708.03, gefunden: 902.81, 1083.16, 1353.87, 1604.99, 2707.68.

11.8 Versuche zu Kapitel 6.2

Boc-Cys(St-Bu)-Ser(t-Bu)-Phe-Leu-Pro-Asp(Ot-Bu)-Pro-Tyr(t-Bu)-Gln(Trt)-Cys(St-Bu)-Asp(Ot-Bu)-Gln(Trt)-Phe-Val-Ala-Glu(Ot-Bu)-Tyr(t-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Pro-Val-Leu-Ile-Glu(Ot-Bu)-Ile-Leu-Val-Glu(Ot-Bu)-Val-Nle-Asp(Ot-Bu)-Pro-Ser(t-Bu)-Phe-Val-Cys(St-Bu)-Leu-Lys(Boc)-Ile-Gly-Ala-Cys(St-Bu)-Pro-Ser(t-Bu)-Ala-His-(2'-Chlor)-trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix **41**

(*Saposin D 36-82 2-Cl-Trt-CM*)

Es werden 599.0 mg HO-(2'-Chlor)trityl-carboxamidomethyl-ChemMatrix-Harz^[47] (0.29 mmol, B_H = 0.49 mmol/g) in einen 10 mL Langhalskolben gegeben. Es werden unter Schutzgas 10 mL einer 10 %-igen Acetylbromid Lösung in DCM_{abs} zugegeben. Die Reaktion wird 3.5 h bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz mit DCM_{abs} (6 x 7 mL) gewaschen. Unter Schutzgas wird eine Lösung aus 909.4 mg Fmoc-His(Trt)-OH (1.45 mmol, 5.0 eq) und 502 μL DIPEA (2.9 mmol, 10 eq) in 3 mL DCM_{abs} zum Harz gegeben. Dies wird 17 h geschüttelt, die Lösung wird abfiltriert und das Harz mit NMP (2x), DCM (5x), mit insgesamt 20 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) 3 x 2 min und zuletzt mit DCM (5x) gewaschen. Man erhält das Fmoc-His(Trt)-2-Cl-Trt-ChemMatrix-Harz mit B_H = 0.24 mmol/g, was einer Kupplungsausbeute von 63 % entspricht.

Experimenteller Teil

Tabelle 27: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Peptidylharzes **41**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		<i>t</i> [min]
			0.2 M DIPEA in DMF	DMF	
Ala81	Fmoc-Ala-OH ^[a]	160.3	5.5	-	30
Ser80	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH ^[a]	197.5	5.5	-	30
Pro79	Fmoc-Pro-OH ^[a]	173.7	5.5	-	30
Cys78	Fmoc-Cys(St-Bu)-OH ^[c]	444.5	-	3.5	210
Ala77	Fmoc-Ala-OH ^[a]	160.3	5.5	-	30
Gly76, Ile75	Fmoc-Ile-(Dmb)Gly-OH ^[b]	173.2	3.5	2	45
Lys74	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	241.3	5.5	-	30
Leu73	Fmoc-Leu-OH ^[a]	182.0	5.5	-	30
Cys72	Fmoc-Cys(St-Bu)-OH ^[c]	444.5	-	3.5	210
Val71	Fmoc-Val-OH ^[a]	174.8	5.5	-	30
Phe70	Fmoc-Phe-OH ^[a]	199.5	5.5	-	45
Ser69	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH ^[a]	197.5	5.5	-	45
Pro78	Fmoc-Pro-OH ^[a]	173.7	5.5	-	30
Asp67	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[a]	211.9	5.5	-	30
Nle66	Fmoc-Nle-OH ^[a]	182.0	5.5	-	30
Val65	Fmoc-Val-OH ^[a]	174.8	5.5	-	30
Glu64	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	219.1	5.5	-	30
Val63	Fmoc-Val-OH ^[a]	174.8	5.5	-	30
Leu62	Fmoc-Leu-OH ^[a]	182.0	5.5	-	30
Ile61	Fmoc-Ile-OH ^[a]	182.0	5.5	-	30
Glu60	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	219.1	5.5	-	45
Ile59	Fmoc-Ile-OH ^[a]	182.0	5.5	-	30
Leu58	Fmoc-Leu-OH ^[a]	182.0	5.5	-	30
Val57	Fmoc-Val-OH ^[a]	174.8	5.5	-	30
Pro56	Fmoc-Pro-OH ^[a]	173.7	5.5	-	30
Glu55	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	219.1	5.5	-	30
Tyr54	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[a]	236.7	5.5	-	30
Glu53	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	219.1	5.5	-	30
Ala52	Fmoc-Ala-OH ^[a]	160.3	5.5	-	30
Val51	Fmoc-Val-OH ^[a]	174.8	5.5	-	30
Phe50	Fmoc-Phe-OH ^[a]	199.5	5.5	-	30
Gln49	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	314.5	5.5	-	30
Asp48	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[a]	211.9	5.5	-	30
Cys47	Fmoc-Cys(St-Bu)-OH ^[c]	444.5	-	3.5	210
Gln46	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	314.5	5.5	-	30
Lys45	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	241.3	5.5	-	30
Gln44	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	314.5	5.5	-	30

Experimenteller Teil

Tyr43	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[a]	236.7	5.5	-	30
Pro42	Fmoc-Pro-OH ^[a]	173.7	5.5	-	30
Asp41	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[a]	211.9	5.5	-	30
Pro40	Fmoc-Pro-OH ^[a]	173.7	5.5	-	30
Leu39	Fmoc-Leu-OH ^[a]	182.0	5.5	-	30
Phe38	Fmoc-Phe-OH ^[a]	199.5	5.5	-	30
Ser37	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH ^[a]	197.5	5.5	-	30
Cys36	Boc-Cys(St-Bu)-OH ^[c]	318.7	-	3.5	210

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.50 mmol) und 213.1 mg HCTU (0.50 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplungen werden je 3 eq Aminosäure (0.30 mmol) und 173.2 mg PyBOP (0.30 mmol, 3 eq) verwendet.

^[c]Diese Aminosäuren werden als symmetrisches Anhydrid gekuppelt, hergestellt aus 10 eq Aminosäure (1.0 mmol) und 80.2 μ L DIC (0.50 mmol, 5 eq).

430.0 mg Fmoc-His(Trt)-2-Cl-Trt-CM Harz (0.10 mmol, $B_H = 0.24$ mmol/g) werden in ein 45 mL Reaktionsgefäß überführt und es wird eine maschinelle Fmoc-SPPS durchgeführt. Cys78, Cys73, Cys47 und Cys36 werden als symmetrisches Anhydrid von Fmoc-Cys(St-Bu)-OH bzw. Boc-Cys(St-Bu)-OH gekuppelt. Für die Fmoc-Entschützungs-schritte werden zwischen His82 und Leu73 jeweils 4 mL 20 % Piperidin/DMF, zwischen Cys72 und Glu60 jeweils 4 mL 20 % Piperidin/DMF + 2 % DBU und zwischen Ile59 und Ser37 jeweils 4 mL 35 % Piperidin/DMF + 2 % DBU verwendet. Für die Waschschrirte werden je 3 mL DMF verwendet. Die Aminosäuren und deren Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 27 aufgeführt. Nach beendeter Festphasensynthese wird das Peptidylharz mit DCM (5x) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Dieses besitzt einen Beladungsgrad von 71.8 μ mol/g (bezogen auf Ser37), was einer Gesamtkupplungsausbeute von 72 % entspricht.

H-Cys(St-Bu)-Ser-Phe-Leu-Pro-Asp-Pro-Tyr-Gln-Cys(St-Bu)-Asp-Gln-Phe-Val-Ala-Glu-Tyr-Glu-Pro-Val-Leu-Ile-Glu-Ile-Leu-Val-Glu-Val-Nle-Asp-Pro-Ser-Phe-Val-Cys(St-Bu)-Leu-Lys-Ile-Gly-Ala-Cys(St-Bu)-Pro-Ser-Ala-His-OH **42**
(Sapoin D 36-82)

Zu 75.4 mg Peptidylharz **41** ($B_H = 71.8$ μ mol/g, 5.41 μ mol) werden 7 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) gegeben und 2 h geschüttelt. Das Harz wird weitere 3x mit je 1 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) für 10 min geschüttelt. Die Abspalllösungen werden filtriert, vereinigt, im Vakuum eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird durch HPLC-MS (Säule: A I, 30 \rightarrow 95 % B, 25 min, 0.2 mL/min) analysiert, in 10 mL MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH

suspendiert und durch Festphasenextraktion vorgereinigt (SepPak Classic C18 Silica 330 mg 55-105 μm , Stufengradient: je 10 mL 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % und 100 % MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH). Die Produkt beinhaltenen Fraktionen (30 % und 40 %) werden lyophilisiert und der Feststoff wird mit 10 mL 10 % MeCN/H₂O gewaschen. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Feststoff wird ein weiteres Mal mit 10 mL 10 % MeCN/H₂O gewaschen. Das vorgereinigte Peptid wird in 3 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und in 2 Portionen durch RP-HPLC gereinigt (Säule: Supelco Ascentis C18 (250 mm x 10 mm); 30 \rightarrow 70 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA; 55 min; 4 mL/min). Die Produktfraktionen werden gefriergetrocknet und durch HPLC-MS (Säule: A II, 40 \rightarrow 95 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **42**: 5.8 mg (1.03 μmol , 19 %), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₂₅₆H₃₉₈N₅₄O₇₀S₈ (5608.74); berechnet: (M+5H)⁵⁺ 1122.76, (M+4H)⁴⁺ 1403.20, (M+3H)³⁺ 1870.59, (M+2H)²⁺ 2805.38, gefunden: 1122.35, 1402.29, 1869.92, 2804.92.

11.9 Versuche zu Kapitel 6.3

Allgemeine Vorgehensweise für die Ligationen zu Saposin D **43a-c**

Die Experimente werden in einer anaeroben Stickstoffkammer durchgeführt. Peptid **42** (1 eq, c = 1.8 mM) wird in einem frisch hergestellten Ligationspuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.1 M MPAA, 30 mM TCEP, pH 6.9) gelöst. Nach 15 min wird die Lösung zu dem entsprechenden Glycopeptidthioester **40a**, **40b** bzw. **40c** (1.5 eq) gegeben. Die Reaktionen werden durch HPLC-MS (Säule: A V, 20 \rightarrow 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) oder UHPLC-MS (Säule: A IV, 20 \rightarrow 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min) verfolgt und zeigen nach 1 d einen vollständigen Umsatz.

Allgemeine Vorgehensweise für die Rückfaltung und Oxidation zu Saposin D **44a-c**

Die Dialyse wird in einer anaeroben Stickstoffkammer durchgeführt. DTT wird als Feststoff zu dem entsprechende Ligationansatz gegeben (Endkonzentration_{DTT} = 0.1 M) und für 30 min inkubiert. Danach wird die Ligation auf eine Proteinkonzentration von 35 μM (bezogen auf die in der Ligation verwendete Menge **42**) mit Puffer (6 M GdmCl, 50 mM Tris, pH 8.5) verdünnt. Die Lösung wird in einen Dialyseschlauch (Roth Zellotrans V Serie, MW cutoff: 5000, Breite:

40 mm) überführt und die Dialyse wird gegen das 35-fache Volumen (bezogen auf das Füllvolumen des Dialyseschlauchs) Dialysepuffers (0.5 M Arg, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.5) und im Anschluss gegen das 35-fache Volumen H₂O durchgeführt. Der Dialysepuffer wird nach 2 h und weiteren 4 h ausgetauscht. Nach zusätzlichen 12 h wird der Dialysepuffer gegen H₂O ersetzt. Dieses wird nach 2 h und weiteren 4 h gewechselt. Nach zusätzlichen 12 h wird die Dialyse beendet.

Das Dialysat wird in ein geeignetes Gefäß überführt und langsam unter leichten Rühren mit einem frisch hergestellten Puffer (NaCl, Tris, Cysteamin, pH 8.5) auf eine Endkonzentration von 15 µM Protein, 150 mM NaCl, 100 mM Tris und 0.1 mM Cysteamin verdünnt. Der Ansatz wird unter Luftexposition 4 d leicht gerührt. Eine vollständige Disulfidbildung wird durch Behandlung von 50 µL Proteinlösung in 6 M GdmCl (pH 8.5) mit *S*-Methylmethanthiosulfonat (7eq/Thiol) für 1 h und anschließender HPLC-MS Analyse überprüft. Es werden keine Derivate des Proteins gefunden. Die Mischung wird durch Gefriertrocknung eingengt und der Rückstand in H₂O + 0.1 % TFA gelöst. Das Rohprodukt wird durch RP-HPLC (YMC-Pack Protein RP 10 x 150 mm, 20 → 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA; 80 min; 2 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion wird lyophilisiert und das Produkt wird durch UHPLC (Säule: A IV, 20 → 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min), Hochauflösungs-Massenspektrometrie, CD-Spektroskopie und SDS-PAGE charakterisiert.

H-Asp-Gly-Gly-Phe-Cys-Glu-Val-Cys-Lys-Lys-Leu-Val-Gly-Tyr-Leu-Asp-Arg-Asn-Leu-Glu-Lys-Asn[GlcNAc]-Ser-Thr-Lys-Gln-Glu-Ile-Leu-Ala-Ala-Leu-Glu-Lys-Gly-Cys-Ser-Phe-Leu-Pro-Asp-Pro-Tyr-Gln-Cys(St-Bu)-Asp-Gln-Phe-Val-Ala-Glu-Tyr-Glu-Pro-Val-Leu-Ile-Glu-Ile-Leu-Val-Glu-Val-Nle-Asp-Pro-Ser-Phe-Val-Cys-Leu-Lys-Ile-Gly-Ala-Cys-Pro-Ser-Ala-His-OH **44a**

(*Saposin D (GlcNAc)*)

Mit 3.8 mg Saposin D 36-82 **42** (0.67 µmol, 1 eq) und 4.5 mg Glycopeptidthioester **40a** (1.01 µmol, 1.5 eq) wird nach der allgemeinen Vorgehensweise für die Ligation (siehe S. 141) und nach der allgemeinen Vorgehensweise für die Rückfaltung und Disulfidbrückenbildung (siehe S. 141) Saposin D (GlcNAc) **44a** dargestellt.

Ausbeute an **44a** C₄₁₆H₆₄₉N₁₀₁O₁₂₈S₆ (9305.59): 3.4 mg (0.36 µmol, 53 %), weißer Feststoff, HR-MS: m/z (exakte Masse): C₄₁₆H₆₄₉N₁₀₁O₁₂₈S₆ (9299.5704); berechnet: (M+9H)⁹⁺ 1034.2956, (M+8H)⁸⁺ 1163.4563, (M+7H)⁷⁺ 1329.5201, (M+6H)⁶⁺ 1550.9384, (M+5H)⁵⁺ 1860.9241, gefunden: 1034.2948, 1163.4558, 1329.5198, 1550.9360, 1860.9184.

H-Asp-Gly-Gly-Phe-Cys-Glu-Val-Cys-Lys-Lys-Leu-Val-Gly-Tyr-Leu-Asp-Arg-Asn-Leu-Glu-Lys-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Thr-Lys-Gln-Glu-Ile-Leu-Ala-Ala-Leu-Glu-Lys-Gly-Cys-Ser-Phe-Leu-Pro-Asp-Pro-Tyr-Gln-Cys(St-Bu)-Asp-Gln-Phe-Val-Ala-Glu-Tyr-Glu-Pro-Val-Leu-Ile-Glu-Ile-Leu-Val-Glu-Val-Nle-Asp-Pro-Ser-Phe-Val-Cys-Leu-Lys-Ile-Gly-Ala-Cys-Pro-Ser-Ala-His-OH **44b**

(Sapoin D (Nona))

Mit 1.9 mg Sapoin D 36-82 **42** (0.34 μmol , 1 eq) und 3.0 mg Glycopeptidthioester **40a** (0.51 μmol , 1.5 eq) wird nach der allgemeinen Vorgehensweise für die Ligation (siehe S. 141) und nach der allgemeinen Vorgehensweise für die Rückfaltung und Disulfidbrückenbildung (siehe S. 141) Sapoin D (Nona) **44b** dargestellt.

Ausbeute an **44b** C₄₇₀H₇₃₈N₁₀₄O₁₆₈S₆ (10725.27): 1.4 mg (0.13 μmol , 38 %), weißer Feststoff, HR-MS: m/z (exakte Masse): C₄₇₀H₇₃₈N₁₀₄O₁₆₈S₆ (10719.0727); berechnet: (M+9H)⁹⁺ 1192.0181, (M+8H)⁸⁺ 1340.8941, (M+7H)⁷⁺ 1532.3061, (M+6H)⁶⁺ 1787.5221, (M+5H)⁵⁺ 1860.9241, gefunden: 1192.0170, 1340.8926, 1532.3046, 1787.5181, 2144.8165.

H-Asp-Gly-Gly-Phe-Cys-Glu-Val-Cys-Lys-Lys-Leu-Val-Gly-Tyr-Leu-Asp-Arg-Asn-Leu-Glu-Lys-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Thr-Lys-Gln-Glu-Ile-Leu-Ala-Ala-Leu-Glu-Lys-Gly-Cys-Ser-Phe-Leu-Pro-Asp-Pro-Tyr-Gln-Cys(St-Bu)-Asp-Gln-Phe-Val-Ala-Glu-Tyr-Glu-Pro-Val-Leu-Ile-Glu-Ile-Leu-Val-Glu-Val-Nle-Asp-Pro-Ser-Phe-Val-Cys-Leu-Lys-Ile-Gly-Ala-Cys-Pro-Ser-Ala-His-OH **44c**

(Sapoin D (Man5))

Mit 2.4 mg Sapoin D 36-82 **42** (0.43 μmol , 1 eq) und 3.5 mg Glycopeptidthioester **40a** (0.65 μmol , 1.5 eq) wird nach der allgemeinen Vorgehensweise für die Ligation (siehe S. 141) und nach der allgemeinen Vorgehensweise für die Rückfaltung und Disulfidbrückenbildung (siehe S. 141) Sapoin D (Man5) **44c** dargestellt.

Ausbeute an **44c** C₄₅₄H₇₁₂N₁₀₂O₁₅₈S₆ (10319.49): 1.4 mg (0.13 μmol , 31 %), weißer Feststoff, HR-MS: m/z (exakte Masse): C₄₅₄H₇₁₂N₁₀₂O₁₅₈S₆ (10312.9139); berechnet: (M+9H)⁹⁺ 1146.8893, (M+8H)⁸⁺ 1290.1242, (M+7H)⁷⁺ 1474.2834, (M+6H)⁶⁺ 1719.8290, (M+5H)⁵⁺ 2063.5928, gefunden: 1146.8880, 1290.1258, 1474.2823, 1719.8284, 2063.5912.

11.10 Versuche zu Kapitel 6.4

Kristallisation:

Für die Kristallisation von Saposin D (GlcNAc) **44a** wird eine Proteinlösung (10 mg/mL) in einem Puffer (20 mM Tris, pH 7.5) hergestellt. Mit dieser Proteinlösung wird ein Screening mit den kommerziellen Qiagen JCSG+ und Qiagen AmSO₄ Suites bei 4 °C und 20 °C durchgeführt. Hierfür wird mit einer Tropfengröße von 0.2 µL (0.1 µL Proteinlösung + 0.1 µL Reservoir Lösung) und mit einem Phoenix nanodispenser (Art Robbins Instruments) gearbeitet. Erste Kristalle wurden nach mehreren Tagen gebildet, mit besseren Ergebnissen bei dem Qiagen AmSO₄ Suite bei 20 °C.

Eine optimierte Kristallisation wird durchgeführt unter Verwendung der *sitting drop vapor diffusion* Methode bei 20 °C. Hierfür wird die Proteinlösung und die Fällungslösung (2.4 M (NH₄)₂SO₄, 0.2 M NH₄OAc) zu gleichen Teilen (0.5 µL + 0.5 µL) vermischt und das Reservoir mit 200 µL Fällungslösung versehen.

Kristallographische Studien:

Als Gefrierschutz wird die Reservoirolösung versetzt mit 20 % (v/v) Glycerin verwendet. Alle Beugungsmessungen werden mit Kristallen bei 100 K durchgeführt. Saposin D (GlcNAc) **44a** Kristalle beugten bis jenseits 2 Å Auflösung an der *beamline* MX 14.1 am Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB) BESSY II electron-storage ring (Berlin-Adlershof, Germany; Mueller *et al.*, 2012).^[217] Die Indizierung zeigt eine monokline Punktgruppe auf und es wird ein Beugungsdatensatz, der 180° (1800 frames je 0.1°) abdeckt an der BESSY II *beamline* MX 14.1 (Mueller *et al.*, 2012)^[217] aufgenommen unter Verwendung eines 6M Pilatus Detektors. Die Raumgruppe wird als P2₁ identifiziert und die Beugungsdaten werden indiziert, integriert und zusammengefügt unter Verwendung von *XDS* (Kabsch, 2010).^[218] Die Festlegung der Struktur wird durch *molecular replacement* mit *Phaser* (McCoy *et al.*, 2007)^[219] durchgeführt unter Verwendung einer Kette des PDP Eintrags 3BQP als Startmodell. Eine Strukturverfeinerung wird mit *Refmac* (Murshudov *et al.*, 2011)^[220] vorgenommen. Alle Strukturabbildungen werden mit *Pymol* (Pymol, v1.7.6.4) erstellt. Die Datenerhebung- und Verfeinerungsstatistiken sind in Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 28: Datenerhebungs- und Verfeinerungsstatistiken.

Datenerhebung		Datenverfeinerung	
Completeness (h.r.)	95.0 (80.2)	no. of amino acids (aa range)	158 (406-484, 406-484)
Multiplicity (h.r.)	3.1 (2.1)	no. of protein atoms	1229
Wilson B-factor, [Å ²]	25.77	no. of peptide/intermediate atoms	0
R-meas (h.r.), [%]	8.0 (56.3)	no. of ligand atoms	0
I/sigma (h.r.)	12.8 (2.0)	no. of waters	166
CC1/2 (h.r.)	99.2 (77.9)	no. of solvent atoms	5
Processing program	XDS	no. of metals	0
Scaling program	XSCALE	Resolution (High res), [Å]	34.8-1.65 (1.693-1.65)
		R-work (High res) [%]	20.2 (32.9)
		R-free (High res) [%]	24.1 (36.4)
		B-factor protein atoms, [Å ²]	14.99
		B-factor water, [Å ²]	31.96
		B-factor solvent atoms, [Å ²]	41.08
		RMSD bond lengths / target [Å]	0.035 / 0.02
		RMSD angles / target [°]	2.884 / 2.01
		RMSD planes / target [Å]	0.016 / 0.021

11.11 Versuche zu Kapitel 7.1

Boc-Gly-Asn(Trt)-Val-Cys(St-Bu)-Ile-Gln(Trt)-Asp(Ot-Bu)-Cys(St-Bu)-Ile-Gln(Trt)-Nle-Val-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Asp(OAll)-Ile-Gln(Trt)-Thr(t-Bu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-Thr(t-Bu)-Asp-Ser(t-Bu)-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Phe-Val-Gln(Trt)-Ala-Leu-Val-Glu(Ot-Bu)-His(Trt)-Val-Lys(Boc)-Glu(Ot-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Trityl-carboxyamidomethyl-ChemMatrix 45
(Saposin B 1-35 (OAll) Trt-CM)

Es werden 404.0 mg des Harzes **20** (0.17 mmol, $B_H = 0.42$ mmol/g) in einen 10 mL Langhalskolben eingewogen. Das Harz wird unter Schutzgas mit 3 mL DCM_{abs} vorgequollen. Danach wird eine Lösung aus 1 mL Acetylbromid und 6 mL DCM_{abs} zugegeben. Die Reaktion wird 2 h bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz mit DCM_{abs} (6 x 8 mL) gewaschen. Unter Schutzgas wird eine Lösung aus 361.7 mg Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH (0.85 mmol, 5.0 eq) und 291.0 μ L DIPEA (1.70 mmol, 10 eq) in 2.5 mL DCM_{abs} zum Harz gegeben. Dies wird 17 h geschüttelt, die Lösung abfiltriert und das Harz mit DMF (3x), DCM (3x), mit insgesamt 20 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) 3 x 2 min und zuletzt mit DCM (5x) gewaschen. Man erhält das Fmoc-Glu(Ot-Bu)-Trt-ChemMatrix-Harz mit $B_H = 0.36$ mmol/g, was einer quantitativen Kupplungsausbeute entspricht.

200.0 mg Fmoc-Glu(Ot-Bu)-Trt-ChemMatrix-Harz (72.0 μmol , $B_H = 0.36 \text{ mmol/g}$) werden in ein 45 mL Reaktionsgefäß gegeben und es wird eine maschinelle Fmoc-SPPS durchgeführt. Cys4 und Cys7 werden als symmetrisches Anhydrid von Fmoc-Cys(St-Bu)-OH gekuppelt. Die Fmoc-Entschützungs-schritte werden je 3 x 2 min mit je 2 mL 20 % Piperidin/DMF durchgeführt. Für die Waschschrirte werden je 2 mL DMF verwendet. Die Aminosäuren und deren Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Peptidylharzes Saposin B 1-35 Trt-CM 45.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		<i>t</i> [min]
			0.4 M DIPEA in DMF	DMF	
Glu34	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	152.6	2.0	-	30
Lys33	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	168.0	2.0	-	30
Val32	Fmoc-Val-OH ^[a]	121.7	2.0	-	30
His31	Fmoc-His(Trt)-OH ^[a]	222.2	2.0	-	30
Glu30	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	152.6	2.0	-	30
Val29	Fmoc-Val-OH ^[a]	121.7	2.0	-	30
Leu28	Fmoc-Leu-OH ^[a]	126.7	2.0	-	30
Ala27	Fmoc-Ala-OH ^[a]	111.6	2.0	-	30
Gln26	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	219.0	2.0	-	30
Val25	Fmoc-Val-OH ^[a]	121.7	2.0	-	30
Phe24	Fmoc-Phe-OH ^[a]	138.9	2.0	-	30
Thr23, Ser22	Fmoc-Ser(t-Bu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH ^[b]	112.9	1.5	0.5	60
Asp21	Fmoc-Asp(OAll)-OH ^[a]	128.9	2.0	-	30
Thr20	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH ^[a]	142.5	2.0	-	30
Arg19	Fmoc-Arg(Pbf)-OH ^[a]	232.7	2.0	-	30
Val18	Fmoc-Val-OH ^[a]	121.7	2.0	-	30
Ala17	Fmoc-Ala-OH ^[a]	111.6	2.0	-	30
Thr16	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH ^[a]	142.5	2.0	-	30
Gln15	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	232.7	2.0	-	30
Ile14	Fmoc-Ile-OH ^[a]	121.7	2.0	-	30
Asp13	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[a]	147.6	2.0	-	30
Thr12, Val11	Fmoc-Val-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH ^[b]	103.4	1.5	0.5	60
Nle10	Fmoc-Nle-OH ^[a]	126.7	2.0	-	30
Gln9	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	219.0	2.0	-	30
Ile8	Fmoc-Ile-OH ^[a]	126.7	2.0	-	30
Cys7	Fmoc-Cys(St-Bu)-OH ^[c]	218.6	-	2.3	180
Asp6	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[a]	147.6	2.0	-	30
Gln5	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	219.0	2.0	-	30

Experimenteller Teil

Cys4	Fmoc-Cys(St-Bu)-OH ^[c]	218.6	-	2.3	180
Val3	Fmoc-Val-OH ^[a]	121.7	2.0	-	30
Asn2	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[a]	214.0	2.0	-	30
Gly1	Boc-Gly-OH ^[a]	175.2	2.0	-	30

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.36 mmol) und 148.40 mg HCTU (0.36 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplungen werden je 3 eq Aminosäure (0.22 mmol) und 110.30 mg HCTU (0.22 mmol, 3 eq) verwendet.

^[c]Für diese Kupplung werden je 10 eq Aminosäure (0.72 mmol) und 55.0 µL DIC (0.36 mmol, 5 eq) verwendet.

Nach beendeter Festphasensynthese wird das Peptidharz mit DCM (5x) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Dieses besitzt einen Beladungsgrad von 0.11 mmol/g was einer quantitativen Gesamtkupplungsausbeute entspricht. Es wird eine analytische Entschützung mit TFA durchgeführt und das entschützte Peptid **45e** durch HPLC-MS (Säule: B I, 20 → 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

ESI-MS von **45e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₇₆H₂₉₀N₄₆O₅₈S₄ (4106.72); berechnet: (M+4H)⁴⁺ 1027.69, (M+3H)³⁺ 1369.92, (M+2H)²⁺ 2054.37, gefunden: 1026.14, 1368.26, 2052.01.

Boc-Gly-Asn(Trt)-Val-Cys(St-Bu)-Ile-Gln(Trt)-Asp(Ot-Bu)-Cys(St-Bu)-Ile-Gln(Trt)-Nle-Val-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Asp(OAll)-Ile-Gln(Trt)-Thr(t-Bu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-Thr(t-Bu)-Asp-Ser(t-Bu)-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Phe-Val-Gln(Trt)-Ala-Leu-Val-Glu(Ot-Bu)-His(Trt)-Val-Lys(Boc)-Glu(Ot-Bu)-Glu(Ot-Bu)-NHNHBoc **46**

(Saposin B 1-35 (OAll) NHNHBoc)

Eintopfreaktion: TFA/TES/DCM (1.5:2:96.5), DIPEA, H₂NNHBoc, DIC, Cl-HOBt

150.0 mg des Peptidharzes **45** (16.6 µmol, 1 eq, B_H = 0.11 mmol/g) werden in DCM vorgequollen. Danach wird das Harz 10x mit je 3 mL einer Lösung aus TFA/TES/DCM (1.5:2:96.5) für 2 min geschüttelt. Das Harz wird mit DCM (5x) gewaschen. Die filtrierten Abspaltungs- und Waschlösungen werden in einem Kolben mit 1 mL DIPEA (1.0 eq bezogen auf die TFA-Menge) gesammelt. Die neutralisierte Lösung wird im Vakuum auf 3.7 mL eingengt (C_{Peptid} = 4.4 mM). Es werden 65.8 mg *t*-Butylcarbazat (0.50 mmol, 30 eq), 56.3 mg Cl-HOBt (0.33 mmol, 20 eq) und 56.8 µL DIPEA (0.33 mmol, 20 eq) zugegeben. Nach 5 min Rühren wird der pH überprüft und falls dieser nicht bei pH 8-9 liegt wird zusätzliches DIPEA hinzugegeben. Im Anschluss werden 51.7 µL DIC (0.33 mmol, 20 eq) zugegeben und die

Lösung wird 20 h gerührt. Nach Reaktionsende (DC: DCM/MeOH 10:1) wird mit 50 mL DCM verdünnt, zweimal mit 25 mL wässrigem 2 M KHCO_3 und zweimal mit 25 mL H_2O gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum und Hochvakuum bestmöglich eingengt. Das ölige Rohprodukt wird auf 2 g Kieselgel adsorbiert und im Hochvakuum getrocknet. Der ölig-feuchte Feststoff wird einer Säulenchromatographie unterzogen (GRACE Reveleris® iES, GraceResolve 2 x 12 g, DCM/MeOH, 0 → 15 %, 50 min, 28 mL/min). Die produktenthaltenden Fraktionen werden im Vakuum eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Es bleibt eine ölige und nahezu klare Flüssigkeit zurück. Eine Reinigung und Isolierung des Produkts ist nicht möglich.

Abspaltung vom Harz, Methode a): Acidolyse durch TFA/TES/DCM (1.5:2:96.5)

100.0 mg des Peptidylharzes **45** (11.0 μmol , $B_H = 0.11 \text{ mmol/g}$) werden in DCM vorgequollen, anschließend mit je 2 mL einer Lösung aus TFA/TES/DCM (1.5:2:96.5) geschüttelt (10 x 2 min) und 5x mit je 2 mL DCM gewaschen. Die filtrierten Abspaltungs- und Waschlösungen werden zu einer Vorlage von 50 mL DCM gegeben. Die Lösung wird mit zusätzlichen 20 mL DCM auf ein Gesamtvolumen von 100 mL verdünnt und 4x mit je 100 mL einer wässrigen gesättigten NaCl Lösung gewaschen. Gegebenenfalls wird bei saurem pH der organischen oder wässrigen Phase nochmals mit 100 mL gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert, im Vakuum eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 49.0 mg der Peptidylsäure (7.36 μmol , 6542.15 g/mol) erhalten, was einer Abspaltungseffizienz von 67 % entspricht.

Abspaltung vom Harz, Methode b): Acidolyse durch 20 % HFIP/DCM

126.4 mg des Peptidylharzes **45** (14.0 μmol , $B_H = 0.11 \text{ mmol/g}$) werden in DCM vorgequollen, anschließend mit 4 mL 20 % HFIP/DCM für 30 min, 3x mit je 1.5 mL 20 % HFIP/DCM je 2 min geschüttelt. Das Harz wird 5x mit DCM gewaschen und die filtrierten und vereinigten Abspaltungs- und Waschlösungen werden im Vakuum eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Es werden 82.2 mg der Peptidylsäure (12.6 μmol , 6542.15 g/mol) erhalten, was einer Abspaltungseffizienz von 90 % entspricht.

Umsetzung der Peptidylsäure zum Hydrazid **46**, Methode a): H_2NNHBoc , PyBOP, DIPEA, DMF, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, Flashchromatographie

49 mg der geschützten Peptidylsäure (7.48 μmol , 6657.23 g/mol, 1 eq) werden in 250 μL DMF zusammen mit 5.8 mg *t*-Butylcarbazat (44.2 μmol , 6 eq) gelöst und es wird unter Rühren auf

–20 °C gekühlt. Eine auf –20 °C gekühlte Lösung aus 19.2 mg PyBOP (36.8 µmol, 5 eq) und 6.3 µL DIPEA (36.8 µmol, 5 eq) in 118 µL DMF wird zugegeben und die Reaktion wird 2.5 h bei –20 °C gerührt. Nach Reaktionsende (DC: DCM/MeOH 10:1) wird mit 20 mL DCM verdünnt und die organische Phase wird 2x mit je 10 mL einer wässrigen 2 M KHCO₃-Lösung und 2x mit je 10 mL H₂O gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie gereinigt (Reveleris®iES, GraceResolve 12 g, DCM/MeOH 2 → 15 %, 32 min, 28 mL/min). Das Hydrazid **46** wird durch eine analytische Entschützung mit TFA und HPLC-MS des Peptids **46e** (Säule: B II, 20 → 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **46** C₃₅₆H₄₈₈N₄₈O₆₆S₅ (6652.29): 30.5 mg (4.58 µmol, 61 %), weißer Feststoff, ESI-MS von **46e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₇₆H₂₉₂N₄₈O₅₇S₄ (4120.75); berechnet: (M+4H)⁴⁺ 1031.20, (M+3H)³⁺ 1374.59, (M+2H)²⁺ 2061.39, gefunden: 1030.43, 1373.87, 2060.41.

Umsetzung der Peptidylsäure zum Hydrazid **46**, Methode b): H₂NNHBoc, PyBOP, DIPEA, DMF, –20 °C, Methanolfällung

82.2 mg der geschützten Peptidylsäure (12.6 µmol, 6657.23 g/mol, 1 eq) werden in 0.5 mL DMF zusammen mit 10.0 mg *t*-Butylcarbazat (75.6 µmol, 6 eq) gelöst und es wird unter Rühren auf –20 °C gekühlt. Eine auf –20 °C gekühlte Lösung aus 32.8 mg PyBOP (63.0 µmol, 5 eq) und 10.8 µL DIPEA (63.0 µmol, 5 eq) in 130 µL DMF wird zugegeben und die Reaktion wird bei –20 °C für 2.5 h gerührt. Nach Reaktionsende (DC: DCM/MeOH 10:1) wird das Peptid durch Zugabe von 3.2 mL kaltem MeOH (–10 °C) für 10 min bei –10 °C gefällt. Nach Zentrifugation wird der Überstand abdekantiert und das Präzipitat wird 2x mit je 1.6 mL kalten MeOH gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Feststoff wird im Hochvakuum getrocknet. Das Hydrazid **46** wird durch eine analytische Entschützung mit TFA und HPLC-MS des Peptids **46e** (Säule: B II, 30 → 80 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **46** C₃₅₆H₄₈₈N₄₈O₆₆S₅ (6652.29): 69.9 mg (10.6 µmol, 84 %), weißer Feststoff, ESI-MS von **46e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₇₆H₂₉₂N₄₈O₅₇S₄ (4120.75); berechnet: (M+4H)⁴⁺ 1031.20, (M+3H)³⁺ 1374.59, (M+2H)²⁺ 2061.39, gefunden: 1030.77, 1374.40, 2061.19.

Boc-Gly-Asn(Trt)-Val-Cys(St-Bu)-Ile-Gln(Trt)-Asp(Ot-Bu)-Cys(St-Bu)-Ile-Gln(Trt)-Nle-Val-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Asp-Ile-Gln(Trt)-Thr(t-Bu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-Thr(t-Bu)-Asp-Ser(t-Bu)-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Phe-Val-Gln(Trt)-Ala-Leu-Val-Glu(Ot-Bu)-His(Trt)-Val-Lys(Boc)-Glu(Ot-Bu)-Glu(Ot-Bu)-NHNHBoc **47**

(*Saposin B 1-35 (OH) NHNHBoc*)

Die folgenden Reaktionsschritte werden unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. 30.0 mg Peptidhydrazid **46** (4.51 μmol , 1 eq) werden in 226 μL MeOH_{abs}/DCM_{abs} (1:9) gelöst. Danach werden 5.6 mg Pd^{II}EnCat (Beladung = 0.4 mmol/g, 2.26 μmol , 0.5 eq), 4.3 mg [2-(Dicyclohexylphosphino)-ethyl]trimethylammoniumchlorid (13.5 μmol , 3 eq), 11.1 μL PhSiH₃ (90.2 μmol , 20 eq) hinzugefügt und 3 h unter Lichtausschluss gerührt. Die Suspension wird filtriert und der Filterkuchen mit MeOH_{abs}/DCM_{abs} (1:9) gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt und der Rückstand in 250 μL MeOH_{abs}/DCM_{abs} (1:9) aufgenommen. Das Peptid wird durch Zugabe von 1.25 mL kalten MeOH + 0.1 % HCOOH (–10 °C) für 10 min bei –10 °C gefällt. Nach Zentrifugation wird der Überstand abdekantiert und der Feststoff wird 2x mit je 1.25 mL MeOH gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Feststoff wird im Hochvakuum getrocknet. Das Hydrazid **47** wird durch eine analytische Entschützung mit TFA und HPLC-MS des Peptids **47e** (Säule: B II, 30 → 80 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **47** C₃₅₃H₄₈₄N₄₈O₆₆S₅ (6616.23): 25.0 mg (3.78 μmol , 84 %), ESI-MS von **47e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₇₃H₂₈₈N₄₈O₅₇S₄ (4080.69); berechnet: (M+4H)⁴⁺ 1021.18, (M+3H)³⁺ 1361.24, (M+2H)²⁺ 2041.36 gefunden: 1020.94, 1361.01, 2041.06.

H-Gly-Asn-Val-Cys(St-Bu)-Ile-Gln-Asp-Cys(St-Bu)-Ile-Gln-Nle-Val-Thr-Asn[GlcNAc]-Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Thr-Asp-Ser-Thr-Phe-Val-Gln-Ala-Leu-Val-Glu-His-Val-Lys-Glu-Glu-NHNH₂ **48a**

(*Saposin B 1-35 (GlcNAc) NHNH₂*)

Zu 16 mg Hydrazid **47** (2.42 μmol , 1 eq) werden 2.3 mg HATU (6.05 μmol , 2.5 eq), 0.8 mg HOAt (6.05 μmol , 2.5 eq) und 1.2 μL DIPEA (12.1 μmol , 5 eq) gelöst in 65 μL DMSO/DMF (1:1) zugegeben und die Mischung wird 15 min gerührt. Es werden 1.3 mg GlcNAc-NH₂ (6.05 μmol , 2.5 eq) gelöst in 15.6 μL DMSO/DMF (1:1) hinzugefügt und die Reaktion wird 20 h gerührt. Die Reaktionsmischung wird im Hochvakuum eingengt, der Rückstand wird in 6 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) gelöst und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird im Vakuum auf ein

Volumen von 1 mL eingengt und das Peptid wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) für 10 min bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 10 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet, durch UHPLC-MS (Säule: A IV, 20 \rightarrow 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert. Der Rückstand wird in 8 M GdmCl (pH 7-8) gelöst und durch RP-HPLC gereinigt (Säule: Supelco Ascentis C18 (250 mm x 10 mm); 37 \rightarrow 57 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA; 55 min; 4 mL/min). Die Produktfraktion wird lyophilisiert und durch HPLC-MS Analyse (Säule: A IV, 20 \rightarrow 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **48a**: 0.6 mg (0.14 μmol , 6 %), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₈₁H₃₀₂N₅₀O₆₁S₄ (4282.89); berechnet: (M+4H)⁴⁺ 1071.73, (M+3H)³⁺ 1428.64, (M+2H)²⁺ 2142.46, gefunden: 1071.79, 1428.60, 2142.76.

*H-Gly-Asn-Val-Cys(St-Bu)-Ile-Gln-Asp-Cys(St-Bu)-Ile-Gln-Nle-Val-Thr-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Thr-Asp-Ser-Thr-Phe-Val-Gln-Ala-Leu-Val-Glu-His-Val-Lys-Glu-Glu-NHNH₂ **48b***
(Saposin B 1-35 (Nona) NHNH₂)

4.2 mg Nonasaccharidazid **26** (2.47 μmol , 1 eq) werden in 279 μL MeOH_{abs} gelöst. Danach werden 8.6 μL DIPEA (49.4 μmol , 20 eq) und 31.5 μL 1,3-Propandithiol (0.30 mmol, 120 eq) zugegeben und die Reaktion wird 1.5 h geschüttelt. Nach Reaktionsende (DC: *i*-Propanol/wässriges 1 M Ammoniumacetate (2:1), R_f(**26**) = 0.45, R_f(**27**) = 0.12) wird das Produkt durch Zugabe von 1.4 mL kalten Diethylether ausgefällt. Nach Zentrifugation wird der Überstand abdekantiert. Das Präzipitat wird 2x mit 1.4 mL kalten Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Feststoff wird im Hochvakuum getrocknet. Das Nonasaccharidamin **27** wird in quantitativer Ausbeute erhalten.

Zu 13.7 mg Hydrazid **47** (2.08 μmol , 1 eq) werden 2.0 mg HATU (5.2 μmol , 2.5 eq), 0.7 mg HOAt (5.2 μmol , 2.5 eq) und 1.8 μL DIPEA (10.4 μmol , 5 eq) gelöst in 50 μL DMSO/DMF (1:1) zugegeben und die Mischung wird für 15 min gerührt. Das frisch dargestellte Nonasaccharidamin **27** (2.47 μmol , 1.2 eq) und zusätzliche 19 μL DMSO/DMF (1:1) werden zugegeben und die Reaktion wird 20 h gerührt. Die Reaktionsmischung wird im Hochvakuum eingengt, der Rückstand in 6 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) gelöst und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird im Vakuum auf ein Volumen von 1 mL eingengt und das Peptid durch Zugabe

von 10 mL kaltem Diethylether (−10 °C) für 10 min bei −10 °C gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 10 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet und durch UHPLC-MS (Säule: A IV, 20 → 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert. Der Rückstand wird in 0.55 mL 8 M GdmCl (pH 7-8) gelöst und durch RP-HPLC gereinigt (Säule: Supelco Ascentis C18 (250 mm x 10 mm); 35 → 55 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA; 55 min; 4 mL/min). Die Produktfraktion wird lyophilisiert und das Produkt durch UHPLC-MS Analyse (Säule: A IV, 20 → 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **48b**: 1.1 mg (0.19 µmol, 9 %), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₂₃₅H₃₉₁N₅₃O₁₀₁S₄ (5703.17); berechnet: (M+4H)⁴⁺ 1426.80, (M+3H)³⁺ 1902.07, (M+2H)²⁺ 2852.60, gefunden: 1426.84, 1902.12, 2852.87.

Allgemeine Vorgehensweise für die Darstellung der Glycopeptidthioester **49a,b**

Das Glycopeptidhydrazid **48a** bzw. **48b** (1 eq, c = 3.1 mM) wird in einem frisch hergestellten Diazotierungspuffer (8 M GdmCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM NaNO₂, pH 3.5) bei −24 °C gelöst und der Ansatz wird für 50 min bei −24 °C inkubiert. Danach wird 4-(Mercaptomethyl)-benzoesäure (65 eq) als Feststoff zugegeben und der pH wird mit wässriger 1 M NaOH auf pH 6-7 eingestellt (Universalindikatorpapier). Die homogene Lösung wird bei RT für 1 h inkubiert. Der Reaktionsansatz wird mit 50 % MeCN/ H₂O + 0.1 % TFA verdünnt und das Produkt wird durch Gelfiltration (Superdex Peptide 10/300 GL, 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 0.6 mL/min) isoliert. Die Fraktionen werden gefriergetrocknet und durch HPLC-MS charakterisiert.

*H-Gly-Asn-Val-Cys(St-Bu)-Ile-Gln-Asp-Cys(St-Bu)-Ile-Gln-Nle-Val-Thr-Asn[GlcNAc]-Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Thr-Asp-Ser-Thr-Phe-Val-Gln-Ala-Leu-Val-Glu-His-Val-Lys-Glu-Glu-SCH₂C₆H₄COOH **49a***

(Sapoin B 1-35 (GlcNAc) MMBA)

0.6 mg Glycopeptidhydrazid **48a** (0.14 µmol) werden nach der allgemeinen Vorgehensweise (siehe S. 152) umgesetzt. Das Produkt wird durch HPLC-MS Analyse (Säule: A IV, 20 → 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert. Das Zielprodukt kann nicht isoliert werden.

H-Gly-Asn-Val-Cys(St-Bu)-Ile-Gln-Asp-Cys(St-Bu)-Ile-Gln-Nle-Val-Thr-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Thr-Asp-Ser-Thr-Phe-Val-Gln-Ala-Leu-Val-Glu-His-Val-Lys-Glu-Glu- SCH₂C₆H₄COOH **49b**
(Sapoin B 1-35 (Nona) MMBA)

1.1 mg Glycopeptidhydrazid **48b** (0.19 µmol) werden nach der allgemeinen Vorgehensweise (siehe S. 152) umgesetzt. Das Produkt wird durch HPLC-MS Analyse (Säule: A IV, 20 → 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert. Das Zielprodukt kann nicht isoliert werden.

11.12 Versuche zu Kapitel 7.2

Boc-Cys(St-Bu)-Asp(Ot-Bu)-Arg(Pbf)-Leu-Gly-Pro-Gly-Nle-Ala-Asp(Ot-Bu)-Ile-Cys(St-Bu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Tyr(t-Bu)-Ile-Ser(t-Bu)-Gln(Trt)-Tyr(t-Bu)-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Glu(Ot-Bu)-Ile-Ala-Ile-Gln(Trt)-Nle-Nle-Nle-His(Trt)-Nle-Gln(Trt)-Pro-Lys(Boc)-Glu(Ot-Bu)-Ile-Cys(St-Bu)-Ala-Leu-Val-(Dmb)Gly-Phe-Cys(St-Bu)-Asp(Ot-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Val-Lys(Boc)-Trityl-carboxyamidomethyl-ChemMatrix **50**

(Sapoin B 36-81 Trt-CM)

Es werden 601.0 mg von Harz **20** (0.25 mmol, B_H = 0.42 mmol/g) in einen 10 mL Langhalskolben gegeben. Das Harz wird unter Schutzgas mit 3 mL DCM_{abs} vorgequollen. Danach wird eine Lösung aus 1 mL Acetylbromid und 6 mL DCM_{abs} zugegeben. Die Reaktion wird 2 h bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz mit DCM_{abs} (6 x 8 mL) gewaschen. Unter Schutzgas wird eine Lösung aus 590.3 mg Fmoc-Lys(Boc)-OH (1.26 mmol, 5.0 eq) und 431 µL DIPEA (2.52 mmol, 10 eq) in 2.5 mL DCM_{abs} zum Harz gegeben. Dies wird 17 h geschüttelt, die Lösung abfiltriert, das Harz mit DMF (3x), DCM (3x), mit insgesamt 20 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) 3 x 2 min und zuletzt mit DCM (5x) gewaschen. Man erhält das Fmoc-Lys(Boc)-Trt-CM Harz mit B_H = 0.36 mmol/g, was einer quantitativen Kupplungsausbeute entspricht.

200.0 mg Fmoc-Lys(Boc)-Trt-ChemMarix-Harz (72.0 µmol, B_H = 0.36 mmol/g) werden in ein 45 mL Reaktionsgefäß gegeben und es wird eine automatische Fmoc-SPPS durchgeführt. Cys36, Cys47, Cys71 und Cy77 werden als symmetrisches Anhydrid von Boc/Fmoc-Cys(St-Bu)-OH gekuppelt. Die Fmoc-Abspaltungsschritte werden je 3 x 2 min mit je 2 mL 20 % Piperidin/DMF durchgeführt. Für die Waschschrte werden je 2 mL DMF verwendet. Die Aminosäuren und deren Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 30 aufgeführt.

Experimenteller Teil

Tabelle 30: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Peptidylharzes Saposin B 36-81 Trt-CM 50.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		<i>t</i> [min]
			0.4 M DIPEA in DMF	DMF	
Val80	Fmoc-Val-OH ^[a]	119.9	2.0	-	30
Glu79	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	150.3	2.0	-	30
Asp78	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[a]	145.3	2.0	-	30
Cys77	Fmoc-Cys(St-Bu)-OH ^[c]	304.9	-	2.3	180
Phe76	Fmoc-Phe-OH ^[a]	136.8	2.0	-	30
Gly75, Val74	Fmoc-Val-(Dmb)Gly-OH ^[b]	115.8	1.5	0.5	60
Leu73	Fmoc-Leu-OH ^[a]	124.8	2.0	-	30
Ala72	Fmoc-Ala-OH ^[a]	110.0	2.0	-	30
Cys71	Fmoc-Cys(St-Bu)-OH ^[c]	304.9	-	2.3	180
Ile70	Fmoc-Ile-OH ^[a]	124.8	2.0	-	30
Glu69	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	150.3	2.0	-	30
Lys68	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	165.5	2.0	-	30
Pro67	Fmoc-Pro-OH ^[a]	119.2	2.0	-	30
Gln66	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	215.7	2.0	-	30
Nle65	Fmoc-Nle-OH ^[a]	124.8	2.0	-	30
His64	Fmoc-His(Trt)-OH ^[a]	218.9	2.0	-	30
Nle63	Fmoc-Nle-OH ^[a]	124.8	2.0	-	30
Nle62	Fmoc-Nle-OH ^[a]	124.8	2.0	-	30
Nle61	Fmoc-Nle-OH ^[a]	124.8	2.0	-	30
Gln60	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	215.7	2.0	-	30
Ile59	Fmoc-Ile-OH ^[a]	124.8	2.0	-	30
Ala58	Fmoc-Ala-OH ^[a]	110.0	2.0	-	30
Ile57	Fmoc-Ile-OH ^[a]	124.8	2.0	-	30
Glu56	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	150.3	2.0	-	30
Ser55, Tyr54	Fmoc-Tyr(t-Bu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH ^[b]	124.3	1.5	0.5	60
Gln53	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	215.7	2.0	-	30
Ser52	Fmoc-Ser(t-Bu)-H ^[a]	135.4	2.0	-	30
Ile51	Fmoc-Ile-OH ^[a]	124.8	2.0	-	30
Tyr50	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[a]	162.3	2.0	-	30
Asn49	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[a]	210.7	2.0	-	30
Lys48	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	165.5	2.0	-	30
Cys47	Fmoc-Cys(St-Bu)-OH ^[c]	304.9	-	2.3	180
Ile46	Fmoc-Ile-OH ^[a]	124.8	2.0	-	30
Asp45	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[a]	145.3	2.0	-	30
Ala44	Fmoc-Ala-OH ^[a]	110.0	2.0	-	30
Nle43	Fmoc-Nle-OH ^[a]	124.8	2.0	-	30

Experimenteller Teil

Gly42	Fmoc-Gly-OH ^[a]	105.0	2.0	-	30
Pro41	Fmoc-Pro-OH ^[a]	119.2	2.0	-	30
Gly40	Fmoc-Gly-OH ^[a]	105.0	2.0	-	30
Leu39	Fmoc-Leu-OH ^[a]	124.8	2.0	-	30
Arg38	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	229.1	2.0	-	30
Asp37	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[a]	145.3	2.0	-	30
Cys36	Boc-Cys(St-Bu)-OH ^[c]	218.6	-	2.3	180

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.36 mmol) und 146.20 mg HCTU (0.36 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplungen werden je 3 eq Aminosäure (0.21 mmol) und 110.20 mg HCTU (0.21 mmol, 3 eq) verwendet.

^[c]Für diese Kupplung werden je 10 eq Aminosäure (0.72 mmol) und 55.0 µL DIC (0.36 mmol, 5 eq) verwendet.

Nach beendeter Festphasensynthese wird das Peptidylharz mit DCM (5x) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Dieses besitzt einen Beladungsgrad von 97.9 µmol/g, was einer quantitativen Gesamtkupplungsausbeute entspricht.

H-Cys(St-Bu)-Asp-Arg-Leu-Gly-Pro-Gly-Nle-Ala-Asp-Ile-Cys(St-Bu)-Lys-Asn-Tyr-Ile-Ser-Gln-Tyr-Thr-Glu-Ile-Ala-Ile-Gln-Nle-Nle-Nle-His-Nle-Gln-Pro-Lys-Glu-Ile-Cys(St-Bu)-Ala-Leu-Val-Gly-Phe-Cys(St-Bu)-Asp-Glu-Val-OH 51
(Saposin B 36-81)

Zu 100.0 mg Peptidylharz **50** ($B_H = 97.9 \mu\text{mol/g}$, 9.79 µmol) werden 7 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) gegeben und es wird 2 h geschüttelt. Das Harz wird weitere 3x mit je 1 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) für 10 min geschüttelt. Die Abspalllösungen werden filtriert, vereinigt und im Vakuum auf 1 mL eingengt. Das Peptid wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether (-10 °C) 10 min bei -10 °C gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 10 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet, durch HPLC-MS (Säule: B I, 30 → 80 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert. Der Rückstand wird in 3 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und in 3 Portionen durch RP-HPLC gereinigt (Säule: Supelco Ascentis C18 (250 mm x 10 mm); 30 → 65 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA; 55 min; 4 mL/min). Die Produktfraktionen werden lyophilisiert, vereinigt und durch HPLC-MS Analyse (Säule: B II, 20 → 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **51** C₂₄₄H₃₉₉N₅₇O₆₈S₈ (5475.64): 13.7 mg (2.50 µmol, 26 %), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₂₄₄H₃₉₉N₅₇O₆₈S₈ (5475.64); berechnet:

(M+5H)⁵⁺ 1096.14, (M+4H)⁴⁺ 1369.92, (M+3H)³⁺ 1826.22, (M+2H)²⁺ 2738.83, gefunden: 1094.32, 1367.84, 1823.77, 2735.51.

11.13 Versuche zu Kapitel 8.1

Boc-Ser(t-Bu)-Asp(Ot-Bu)-Val-Tyr(tBu)-Cys(SSt-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Val-Cys(SSt-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Phe-Leu-Val-Lys(Boc)-Glu(Ot-Bu)-Val-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-Lys(Boc)-Leu-Ile-Asp(Ot-Bu)-Asn(Trt)-Asp(OAll)-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{Me,Me}$ pro)-Glu(Ot-Bu)-Lys(Boc)-Glu(Ot-Bu)-Ile-Leu-Asp(Ot-Bu)-Ala-Phe-Asp(Ot-Bu)-Lys(Boc)-Nle-Trityl-carboxyamidomethyl-ChemMatrix 52 (Saposin C 1-35 (OAll) Trt-CM)

Es werden 510.0 mg von Harz **20** (0.21 mmol, B_H = 0.42 mmol/g) in einen 10 mL Langhalskolben gegeben. Das Harz wird unter Schutzgas mit 3 mL DCM_{abs} vorgequollen. Danach wird eine Lösung aus 1 mL Acetylbromid und 6 mL DCM_{abs} zugegeben. Die Reaktion wird 2 h bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz mit DCM_{abs} (6 x 8 mL) gewaschen. Unter Schutzgas wird eine Lösung aus 378.0 mg Fmoc-Nle-OH (1.07 mmol, 5.0 eq) und 367.0 μ L DIPEA (2.14 mmol, 10 eq) in 3 mL DCM_{abs} zum Harz gegeben. Dies wird 20 h geschüttelt, die Lösung abfiltriert und das Harz mit DMF (3x), DCM (3x), mit insgesamt 20 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) 3 x 2 min und zuletzt mit DCM (5x) gewaschen. Man erhält das Fmoc-Nle-Trt-ChemMatrix-Harz mit B_H = 0.36 mmol/g, was einer quantitativen Kupplungsausbeute entspricht.

390.0 mg Fmoc-Nle-Trt-ChemMatrix-Harz (0.14 mmol, B_H = 0.36 mmol/g) werden in ein 45 mL Reaktionsgefäß gegeben und es wird eine maschinelle Fmoc-SPPS durchgeführt. Cys5 und Cys8 werden als symmetrisches Anhydrid von Fmoc-Cys(St-Bu)-OH gekuppelt. Die Fmoc-Abspaltungsschritte werden je mit 4 mL 20 % Piperidin/DMF durchgeführt. Für die Waschschrte werden je 4 mL DMF verwendet. Die Aminosäuren und deren Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 31 aufgeführt.

Tabelle 31: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Peptidylharzes Saposin C 1-35 Trt-CM 52.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		t [min]
			0.4 M DIPEA in DMF	DMF	
Lys34	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	326.8	4.0	-	30
Asp33	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[a]	287.1	4.0	-	30
Phe32	Fmoc-Phe-OH ^[a]	270.2	4.0	-	30

Experimenteller Teil

Ala31	Fmoc-Ala-OH ^[a]	217.2	4.0	-	30
Asp30	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[a]	287.1	4.0	-	30
Leu29	Fmoc-Leu-OH ^[a]	247.2	4.0	-	30
Ile28	Fmoc-Ile-OH ^[a]	247.2	4.0	-	30
Glu27	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	296.9	4.0	-	30
Lys26	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	326.9	4.0	-	30
Glu25	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	296.9	4.0	-	30
Thr24, Lys23	Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-OH ^[b]	255.2	3.0	1.0	45
Asp22	Fmoc-Asp(OAll)-OH ^[a]	275.8	4.0	-	30
Asn21	Fmoc-Asn(Trt)-OH ^[a]	416.2	4.0	-	30
Asp20	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[a]	287.1	4.0	-	30
Ile19	Fmoc-Ile-OH ^[a]	247.2	4.0	-	30
Leu18	Fmoc-Leu-OH ^[a]	247.2	4.0	-	30
Lys17	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	326.8	4.0	-	30
Thr16, Val15	Fmoc-Val-Thr($\Psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-OH ^[b]	201.1	3.0	1.0	45
Glu14	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	296.8	4.0	-	30
Lys13	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	326.8	4.0	-	30
Val12	Fmoc-Val-OH ^[a]	236.8	4.0	-	30
Leu11	Fmoc-Leu-OH ^[a]	247.2	4.0	-	30
Phe10	Fmoc-Phe-OH ^[a]	270.2	4.0	-	30
Glu9	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	296.8	4.0	-	30
Cys8	Fmoc-Cys(SSt-Bu)-OH ^[c]	602.1	-	4.0	180
Val7	Fmoc-Val-OH ^[a]	236.8	4.0	-	30
Glu6	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	296.8	4.0	-	30
Cys5	Fmoc-Cys(SSt-Bu)-OH ^[c]	602.1	-	4.0	180
Tyr4	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[a]	320.6	4.0	-	30
Val3	Fmoc-Val-OH ^[a]	236.8	4.0	-	30
Asp2	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[a]	287.1	4.0	-	30
Ser1	Boc-Ser(t-Bu)-OH DCHA ^[a]	308.7	4.0	-	30

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.70 mmol) und 245.6 mg HCTU (0.70 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplungen werden je 3 eq Aminosäure (0.42 mmol) und 218.5 mg PyBOP (0.42 mmol, 3 eq) verwendet.

^[c]Für diese Kupplung werden je 10 eq Aminosäure (1.40 mmol) und 110 μL DIC (0.70 mmol, 5 eq) verwendet.

Nach beendeter Festphasensynthese wird das Peptidylharz mit DCM (5x) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Dieses besitzt einen Beladungsgrad von 0.12 mmol/g was einer quantitativen Gesamtkupplungsausbeute entspricht. Es wird eine analytische Entschützung mit TFA durchgeführt und das entschützte Peptid **52e** durch HPLC-MS (Säule: A I, 20 \rightarrow 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

ESI-MS von **52e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₇₆H₂₉₀N₄₆O₅₈S₄ (4106.72); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 719.35, (M+5H)⁵⁺ 863.02, (M+4H)⁴⁺ 1078.52, (M+3H)³⁺ 1437.69, gefunden: 719.02, 862.42, 1077.86, 1436.92.

Boc-Ser(t-Bu)-Asp(Ot-Bu)-Val-Tyr(tBu)-Cys(SSt-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Val-Cys(SSt-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Phe-Leu-Val-Lys(Boc)-Glu(Ot-Bu)-Val-Thr($\Psi^{Me,Me}pro$)-Lys(Boc)-Leu-Ile-Asp(Ot-Bu)-Asn(Trt)-Asp(OAll)-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{Me,Me}pro$)-Glu(Ot-Bu)-Lys(Boc)-Glu(Ot-Bu)-Ile-Leu-Asp(Ot-Bu)-Ala-Phe-Asp(Ot-Bu)-Lys(Boc)-Nle-NHNHBoc **53**
(Saposin C 1-35 (OAll) NHNHBoc)

400.0 mg des Peptidylharzes **52** (48.9 μ mol, 1 eq, B_H = 0.12 mmol/g) werden in DCM vorgequollen. Danach wird das Harz 10x mit je 10 mL einer Lösung aus TFA/TES/DCM (1.5:2:96.5) je 2 min geschüttelt. Das Harz wird mit DCM (5x) gewaschen. Die filtrierten Abspaltungs- und Waschlösungen werden in einem Kolben mit 3.33 mL DIPEA (1.0 eq bezogen auf die TFA-Menge) gesammelt. Die neutralisierte Lösung wird im Vakuum auf 11.2 mL eingengt (c_{Peptid} = 4.4 mM). Es werden 193.5 *t*-Butylcarbazat (1.50 mmol, 30 eq), 165.5 mg Cl-HOBt (1.0 mmol, 20 eq) und 167 μ L DIPEA (1.0 mmol, 20 eq) zugegeben. Nach 5 min Rühren wird der pH-Wert überprüft und falls dieser nicht im Bereich 8-9 liegt, wird zusätzliches DIPEA hinzugegeben. Im Anschluss werden 152 μ L DIC (1.0 mmol, 20 eq) zugegeben und die homogene Lösung wird für 20 h gerührt. Nach Reaktionsende (DC: DCM/MeOH 10:1 + 0.1 % AcOH) wird mit 150 mL DCM verdünnt, zweimal mit 80 mL wässrigen 2 M KHCO₃ und zweimal mit 80 mL H₂O gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie gereinigt (GRACE Reveleris® iES, GraceResolve 2 x 12 g, DCM/MeOH, 0 \rightarrow 15 %, 57 min, 28 mL/min). Das Hydrazid **53** wird durch eine analytische TFA-Entschützung und HPLC-MS des entschützten Peptids **53e** (Säule: A I, 20 \rightarrow 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **53** C₂₉₆H₄₇₇N₄₃O₇₄S₄ (5950.46): 200.7 mg (34.0 μ mol, 70 %), R_f = 0.6 (DCM/MeOH 10:1 + 0.1 AcOH), ESI-MS von **53e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₉₃H₃₁₃N₄₃O₆₀S₄ (4324.06); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 721.69, (M+5H)⁵⁺ 865.82, (M+4H)⁴⁺ 1082.03, (M+3H)³⁺ 1442.36, (M+2H)²⁺ 2163.04, gefunden: 721.65, 865.36, 1081.72, 1442.09, 2163.11.

Boc-Ser(t-Bu)-Asp(Ot-Bu)-Val-Tyr(tBu)-Cys(SSt-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Val-Cys(SSt-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Phe-Leu-Val-Lys(Boc)-Glu(Ot-Bu)-Val-Thr($\Psi^{Me,Me}pro$)-Lys(Boc)-Leu-Ile-Asp(Ot-Bu)-Asn(Trt)-Asp-Lys(Boc)-Thr($\Psi^{Me,Me}pro$)-Glu(Ot-Bu)-Lys(Boc)-Glu(Ot-Bu)-Ile-Leu-Asp(Ot-Bu)-Ala-Phe-Asp(Ot-Bu)-Lys(Boc)-Nle-NHNHBoc **54**

(Saposin C 1-35 (OH) NHNHBoc)

Ansatz 1: Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, DCM

Die folgenden Reaktionsschritte werden unter Argonatmosphäre durchgeführt. Es werden 30.5 mg des Hydrazids Saposin C 1-35 **53** (1 eq, 5.13 μ mol) in 0.7 mL DCM_{abs} gelöst. Danach werden 3 mg des Pd(PPh₃)₄ (0.5 eq, 2.6 μ mol) gelöst in 200 μ L DCM_{abs}, 12.6 μ L PhSiH₃ (20 eq, 0.1 mmol) und zusätzliche 126 μ L DCM_{abs} zugegeben. Die Reaktion wird unter Lichtausschluss gerührt. Nach 4.5 h werden 20.7 μ L Pyridin (50 eq, 0.26 mmol) hinzugefügt. Nach 30 min Rühren wird im Vakuum eingengt und das Rohprodukt durch Flashchromatographie gereinigt (RevelerisTM Grace Silica 40 μ m, Kartuschengröße 2 x 4 g, DCM/MeOH, 0 \rightarrow 15 %, 35 min, 18 ml/min). Das Hydrazid **54** wird durch eine analytische TFA-Entschützung und HPLC-MS des entsprechenden entschützten Peptids **54e** (Säule: A I, 20 \rightarrow 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **54** C₂₉₃H₄₇₃N₄₃O₇₄S₄ (5910.39): 10.9 mg (1.85 μ mol, 35 %, mit starken Verunreinigungen), weißer Feststoff, R_f = 0.43 (DCM/MeOH 10:1 + 0.1 AcOH), ESI-MS von **54e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₉₀H₃₀₉N₄₃O₆₀S₄ (4284.00); berechnet: (M+5H)⁵⁺ 857.81, (M+4H)⁴⁺ 1072.01, (M+3H)³⁺ 1429.01, gefunden: 857.29, 1071.61, 1428.29.

Ansatz 2: Pd^{II}EnCat, (R,R)-DACH-Phenyl-Trost-Ligand, PhSiH₃, DCM

Die folgenden Reaktionsschritte werden unter Argonatmosphäre durchgeführt. 30.3 mg Hydrazid Saposin C 1-35 **53** (1 eq, 5.1 μ mol) werden in 918 μ L DCM_{abs} gelöst. Danach werden 6.3 mg Pd^{II}EnCat (0.5 eq, 2.5 μ mol, Beladung = 0.4 mmol/g), 5.2 mg (R,R)-DACH-Phenyl-Trost-Ligand (1.5 eq, 7.5 μ mol), 12.5 μ L Phenylsilan (20 eq, 0.1 mmol), sowie weitere 100 μ L DCM_{abs} zugegeben (c_{Peptid} = 5 mM). Die Reaktion wird unter Lichtausschluss gerührt. Nach 5 h wird die Suspension filtriert und der Filterkuchen mit DCM gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt und das Rohprodukt durch Flashchromatographie gereinigt (RevelerisTM Grace Silica 40 μ m, Kartuschengröße 4 g, DCM/MeOH, 0-12 %, 27 min, 18 ml/min). Das Hydrazid **54** wird durch eine analytische TFA-Entschützung und HPLC-MS Analyse des entschützten Peptids **54e** (Säule: A I, 20 \rightarrow 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **54** C₂₉₃H₄₇₃N₄₃O₇₄S₄ (5910.39): 14.7 mg (2.5 µmol; 49 %), mit Verunreinigungen durch den eingesetzten Liganden), weißer Feststoff, R_f = 0.43 (DCM/MeOH 10:1 + 0.1 % AcOH), ESI-MS von **54e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₉₀H₃₀₉N₄₃O₆₀S₄ (4284.00); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 715.01, (M+5H)⁵⁺ 857.81, (M+4H)⁴⁺ 1072.01, (M+3H)³⁺ 1429.01, (M+2H)²⁺ 2143.01, gefunden: 714.78, 857.21, 1071.55, 1428.39.

Ansatz 11: Pd^{II}EnCat, DETA, PhSiH₃, DCM

Die folgenden Reaktionsschritte werden unter Argonatmosphäre durchgeführt. Zu 83.1 mg Saposin C 1-35 Hydrazid **53** (1 eq, 14.0 µmol) werden 1.4 mL MeOH_{abs}/DCM_{abs} (1:9) gegeben und die Suspension wird 30 min gerührt. Danach werden 35 mg Pd^{II}EnCat (1 eq, 14.0 µmol, B_H = 0.4 mmol/g), 26.9 mg [2-(Dicyclohexylphosphino)-ethyl]trimethylammoniumchlorid (6 eq, 84.0 µmol), 68.9 µL Phenylsilan (40 eq, 0.56 mmol), sowie weitere 100 µL MeOH_{abs}/DCM_{abs} (1:9) zugegeben (c_{Peptid} = 10 mM). Die Reaktion wird unter Lichtausschluss gerührt. Nach 7 h wird die Suspension filtriert und der Filterkuchen mit 10 mL MeOH/DCM gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingedunstet und das Rohprodukt durch Flashchromatographie gereinigt (RevelerisTM Grace Silica 40 µm 12 g, DCM/MeOH, 0-15 %, 30 min, 36 ml/min). Das Hydrazid **54** wird durch eine analytische Entschützung mit TFA und durch HPLC-MS des entschützten Peptids **54e** (Säule: B I, 20 → 70 % B, 15 min, 0.3 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **54** C₂₉₃H₄₇₃N₄₃O₇₄S₄ (5910.39): 64.4 mg (10.9 µmol; 78 %), weißer Feststoff, R_f = 0.43 (DCM/MeOH 10:1 + 0.1 % AcOH), ESI-MS von **54e**: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₉₀H₃₀₉N₄₃O₆₀S₄ (4284.00); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 715.01, (M+5H)⁵⁺ 857.81, (M+4H)⁴⁺ 1072.01, (M+3H)³⁺ 1429.01, gefunden: 714.73, 857.28, 1071.45, 1428.42.

H-Ser-Asp-Val-Tyr-Cys(SSt-Bu)-Glu-Val-Cys(SSt-Bu)-Glu-Phe-Leu-Val-Lys-Glu-Val-Thr-Lys-Leu-Ile-Asp-Asn-Asn[GlcNAc]-Lys-Thr-Glu-Lys-Glu-Ile-Leu-Asp-Ala-Phe-Asp-Lys-Nle-NHNH₂ 55a

(Saposin C 1-35 (GlcNAc) NHNH₂)

Zu 25.0 mg Hydrazid **54** (4.23 µmol, 1 eq) werden 8.0 mg HATU (21.0 µmol, 5 eq), 2.9 mg HOAt (21.0 µmol, 5 eq) und 5.8 µL DIPEA (42.0 µmol, 10 eq) gelöst in 180 µL DMSO/DMF (1:1) zugegeben und die Mischung wird für 15 min gerührt. Der pH-Wert wird geprüft (pH 6)

und es werden nochmals 3 eq DIPEA zugegeben (pH 8). 4.7 mg GlcNAc-NH₂ (21.0 μmol, 5 eq) und zusätzliche 32 μL DMSO/DMF (1:1) werden hinzugefügt. Der pH-Wert wird die ersten 2 h Stunden überwacht und unter pH 7 mit DIPEA auf pH 8-9 justiert. Die Reaktion wird 23 h gerührt. Die Reaktionsmischung wird im Hochvakuum eingeengt, der Rückstand in 8 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) gelöst und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird im Vakuum auf ein Volumen von 1 mL eingeengt und das Peptid durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether (−10 °C) 10 min bei −10 °C gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 10 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet und durch HPLC-MS (Säule: B I, 20 → 70 % B, 15 min, 0.3 mL/min) analysiert. Der Rückstand wird in 2.5 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und in zwei Portionen durch RP-HPLC gereinigt (Säule: Supelco Ascentis C18 (250 mm x 10 mm); 35 → 55 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA; 55 min; 4 mL/min). Die Produktfraktionen werden lyophilisiert, vereinigt und das Produkt durch HPLC-MS (Säule: B I, 20 → 70 % B, 15 min, 0.3 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **55a** C₁₉₈H₃₂₃N₄₅O₆₄S₄ (4486.21): 4.3 mg (0.96 μmol, 23 %), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₁₉₈H₃₂₃N₄₅O₆₄S₄ (4486.21); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 748.71, (M+5H)⁵⁺ 898.25, (M+4H)⁴⁺ 1122.56, (M+3H)³⁺ 1496.41, (M+2H)²⁺ 2244.12, gefunden: 748.36, 897.52, 1121.86, 1495.59, 2243.24.

*H-Ser-Asp-Val-Tyr-Cys(SSt-Bu)-Glu-Val-Cys(SSt-Bu)-Glu-Phe-Leu-Val-Lys-Glu-Val-Thr-Lys-Leu-Ile-Asp-Asn-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-]-Lys-Thr-Glu-Lys-Glu-Ile-Leu-Asp-Ala-Phe-Asp-Lys-Nle-NHNH₂ **55b***

(Saposin C 1-35 (Nona) NHNH₂)

7.0 mg Nonasaccharidazid **26** (4.2 μmol, 1 eq) werden in 467 μL MeOH_{abs} gelöst. Danach werden 14.4 μL DIPEA (84.0 μmol, 20 eq) und 50.6 μL 1,3-Propanedithiol (0.50 mmol, 120 eq) zugegeben und die Reaktion wird 2 h geschüttelt. Nach Reaktionsende (DC: *i*-Propanol/wässriges 1 M Ammoniumacetat (2:1), R_f(**26**) = 0.45, R_f(**27**) = 0.12) wird das Produkt durch Zugabe von 1.5 mL kaltem Diethylether (−10 °C) ausgefällt. Nach Zentrifugation wird der Überstand abdekantiert. Das Präzipitat wird 2x mit 1.5 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Feststoff wird im Hochvakuum getrocknet. Das Nonasaccharidamin **27** wird in quantitativer Ausbeute erhalten.

Zu 20.7 mg Hydrazid **54** (3.5 μmol , 1 eq) werden 3.3 mg HATU (8.75 μmol , 2.5 eq), 1.19 mg HOAt (8.75 μmol , 2.5 eq) und 3.0 μL DIPEA (17.5 μmol , 5 eq) gelöst in 125 μL DMSO/DMF (1:1) zugegeben und die Mischung wird 15 min gerührt. Der pH-Wert wird geprüft (pH 8-9) und das frisch dargestellte Nonasaccharidamin **27** (4.2 μmol , 1.2 eq) sowie zusätzliche 25 μL DMSO/DMF (1:1) werden zugegeben. Die Reaktion wird gerührt, der pH-Wert wird die ersten 2 h überwacht und gegebenenfalls bei pH 6-7 mit DIPEA auf pH 8-9 rejustiert. Die Reaktion wird 23 h gerührt. Die Reaktionsmischung wird im Hochvakuum eingeeengt, der Rückstand in 6.5 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) gelöst und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird im Vakuum auf ein Volumen von 1 mL eingeeengt und das Peptid durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) für 10 min bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 10 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird bei Normaldruck und im Hochvakuum getrocknet, durch UHPLC-MS (Säule: B I, 10 \rightarrow 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert, in 2.5 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und in zwei Portionen durch RP-HPLC gereinigt (Säule: Supelco Ascentis C18 (250 mm x 10 mm); 20 \rightarrow 55 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA; 55 min; 4 mL/min). Die Produktfraktionen werden lyophilisiert, vereinigt und durch HPLC-MS (Säule: B I, 10 \rightarrow 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **55b** C₂₅₂H₄₁₂N₄₈O₁₀₄S₄ (5906.49): 4.9 mg (0.84 μmol , 20 %), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₂₅₂H₄₁₂N₄₈O₁₀₄S₄ (5906.49); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 985.43 (M+5H)⁵⁺ 1182.31, (M+4H)⁴⁺ 1477.63, (M+3H)³⁺ 1969.84, gefunden: 985.32, 1182.00, 1477.30, 1969.64.

Allgemeine Vorgehensweise für die Darstellung der Glycopeptidthioester **56a** und **56b**:

Das Glycopeptidhydrazid **56a** bzw. **56b** (1 eq, c = 3.1 mM) wird in einem frisch hergestellten Diazotierungspuffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM NaNO₂, pH 3.5) bei $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelöst und 50 min bei $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach wird 4-(Mercaptomethyl)-benzoesäure (65 eq) gelöst in einer äquimolaren Menge wässriger 1 M NaOH zugegeben und der pH-Wert wird mit wässriger 1 M NaOH auf pH 6-7 eingestellt (Universalindikatorpapier). Die homogene Mischung wird 1 h bei RT inkubiert. Die Reaktion wird mit 50 % MeCN/ H₂O + 0.1 % TFA verdünnt und der Glycopeptidthioester wird durch Gelfiltration (Superdex Peptide 10/300 GL, 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 0.6 mL/min) isoliert. Die Produktfraktion wird gefriergetrocknet und das Produkt durch HPLC-MS charakterisiert.

H-Ser-Asp-Val-Tyr-Cys(SSt-Bu)-Glu-Val-Cys(SSt-Bu)-Glu-Phe-Leu-Val-Lys-Glu-Val-Thr-Lys-Leu-Ile-Asp-Asn-Asn[GlcNAc]-Lys-Thr-Glu-Lys-Glu-Ile-Leu-Asp-Ala-Phe-Asp-Lys-Nle-SCH₂C₆H₄COOH **56a**

(Saposin C 1-35 (GlcNAc) MMBA)

2.0 mg Glycopeptidhydrazid **55a** (0.45 µmol) werden nach der allgemeinen Vorgehensweise (siehe S. 162) zum Glycopeptidthioester **56a** umgesetzt. Das Produkt wird durch HPLC-MS (Säule: B I, 20 → 70 % B, 15 min, 0.3 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **56a** C₂₀₆H₃₂₇N₄₃O₆₆S₅ (4622.37): 1.8 mg (0.39 µmol, 88 %, beinhaltet Anteile von **56a-StBu** sowie **56a-2xStBu** und geringe Mengen des Edukts **55a**), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₂₀₆H₃₂₇N₄₃O₆₆S₅ (4622.37); berechnet: (M+6H)⁶⁺ 771.41, (M+5H)⁵⁺ 925.48, (M+4H)⁴⁺ 1156.60, (M+3H)³⁺ 1541.80, (M+2H)²⁺ 2312.20, gefunden: 770.90, 924.77, 1155.78, 1540.92, 2311.09.

N-Ser-Asp-Val-Tyr-Cys(SSt-Bu)-Glu-Val-Cys(SSt-Bu)-Glu-Phe-Leu-Val-Lys-Glu-Val-Thr-Lys-Leu-Ile-Asp-Asn-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Lys-Thr-Glu-Lys-Glu-Ile-Leu-Asp-Ala-Phe-Asp-Lys-Nle-SCH₂C₆H₄COOH **56b**

(Saposin C 1-35 (Nona) MMBA)

3.1 mg Glycopeptidhydrazid **55b** (53.0 nmol) werden nach der allgemeinen Vorgehensweise (siehe S. 162) zum Glycopeptidthioester **56b** umgesetzt. Das Produkt wird durch UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **56b** C₂₆₀H₄₁₆N₄₆O₁₀₆S₅ (6042.65): 2.5 mg (41.4 nmol, 78 %, beinhaltet Anteile von **56b-StBu** und geringe Mengen des Edukts **55b**), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₂₆₀H₄₁₆N₄₆O₁₀₆S₅ (6042.65): berechnet: (M+5H)⁵⁺ 1209.54, (M+4H)⁴⁺ 1511.67, (M+3H)³⁺ 2015.23, (M+2H)²⁺ 3022.34, gefunden: 1209.38, 1511.48, 2014.98, 3022.28.

11.14 Versuche zu Kapitel 8.2

Boc-Cys(SSt-Bu)-Ser(t-Bu)-Lys(Boc)-Leu-Pro-Lys(Boc)-Ser(t-Bu)-Leu-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-Glu(Ot-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Cys(SSt-Bu)-Gln(Trt)-Glu(Ot-Bu)-Val-Val-Asp(Ot-Bu)-Thr(t-Bu)-Tyr(t-Bu)-Gly-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-Ile-Leu-Ser(t-Bu)-Ile-Leu-Leu-Glu(Ot-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Val-

Ser(t-Bu)-Pro-Glu(Ot-Bu)-Leu-Val-Cys(SSt-Bu)-Ser(t-Bu)-Nle-Leu-His(Trt)-Leu-Cys(SSt-Bu)-Ser(t-Bu)-Gly-Thr(Ot-Bu)-Trityl-carboxyamidomethyl-ChemMatrix 57
(Sapoin C 36-81 Trt-CM)

Es werden 496.0 mg Harz **20** (0.21 mmol, $B_H = 0.42$ mmol/g) in einen 10 mL Langhalskolben gegeben. Das Harz wird unter Schutzgas mit 3 mL DCM_{abs} vorgequollen. Danach wird eine Lösung aus 1 mL Acetylbromid und 6 mL DCM_{abs} zugegeben. Die Reaktion wird 2 h bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Lösung wird das Harz mit DCM_{abs} (6 x 8 mL) gewaschen. Unter Schutzgas wird eine Lösung aus 414.0 mg Fmoc-Thr(t-Bu)-OH (1.04 mmol, 5.0 eq) und 356 μ L DIPEA (2.08 mmol, 10 eq) in 3 mL DCM_{abs} zum Harz gegeben. Dies wird 17 h geschüttelt, die Lösung abfiltriert und das Harz mit DMF (3x), DCM (3x), mit insgesamt 20 mL $DCM/MeOH/DIPEA$ (17:2:1) 3 x 2 min und zuletzt mit DCM (5x) gewaschen. Man erhält das Fmoc-Thr(t-Bu)-Trt-CM Harz mit $B_H = 0.34$ mmol/g, was einer Kupplungsausbeute von 94 % entspricht.

203.8 mg Fmoc-Thr(t-Bu)-Trt-CM Harz (69.3 μ mol, $B_H = 0.34$ mmol/g) werden in ein 45 mL Reaktionsgefäß gegeben und es wird eine maschinelle Fmoc-SPPS durchgeführt. Cys36, Cys47, Cys72 und Cys78 werden als symmetrisches Anhydrid von Boc/Fmoc-Cys(St-Bu)-OH gekuppelt. Die Fmoc-Entschützungs-schritte werden mit 2 mL 20 % Piperidin/DMF durchgeführt. Für die Waschschrirte werden 2 mL DMF verwendet. Die Aminosäuren und deren Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32: Reagenzien und Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese des Peptidylharzes Sapoin C 36-81 Trt-CM **57**.

Aminosäure- position	Aminosäure	m(Xaa) [mg]	Lösungsmittel [mL]		<i>t</i> [min]
			0.4 M DIPEA in DMF	DMF	
Gly80	Fmoc-Gly-OH ^[a]	97.9	2.0	-	30
Ser79	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH ^[a]	126.2	2.0	-	30
Cys78	Fmoc-Cys(SSt-Bu)-OH ^[c]	284.2	-	2.5	180
Leu77	Fmoc-Leu-OH ^[a]	116.3	2.0	-	30
His76	Fmoc-His(Trt)-OH ^[a]	204.0	2.0	-	30
Leu75	Fmoc-Leu-OH ^[a]	116.3	2.0	-	30
Nle74	Fmoc-Nle-OH ^[a]	116.3	2.0	-	30
Ser73	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH ^[a]	126.2	2.0	-	30
Cys72	Fmoc-Cys(SSt-Bu)-OH ^[c]	284.2	-	2.5	180
Val71	Fmoc-Val-OH ^[a]	111.7	2.0	-	30
Leu70	Fmoc-Leu-OH ^[a]	116.3	2.0	-	30
Glu69	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	140.0	2.0	-	30

Experimenteller Teil

Pro68	Fmoc-Pro-OH ^[a]	111.0	2.0	-	30
Ser67	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH ^[a]	126.2	2.0	-	30
Val66	Fmoc-Val-OH ^[a]	111.7	2.0	-	30
Glu65	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	140.0	2.0	-	30
Glu64	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	140.0	2.0	-	30
Leu63	Fmoc-Leu-OH ^[a]	116.3	2.0	-	30
Leu62	Fmoc-Leu-OH ^[a]	116.3	2.0	-	30
Ile61	Fmoc-Ile-OH ^[a]	116.3	2.0	-	30
Ser60	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH ^[a]	126.2	2.0	-	30
Leu59	Fmoc-Leu-OH ^[a]	116.3	2.0	-	30
Ile58	Fmoc-Ile-OH ^[a]	116.3	2.0	-	30
Ser57, Ser56	Fmoc-Ser(t-Bu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH ^[b]	100.8	1.5	0.5	45
Gly55	Fmoc-Gly-OH ^[a]	97.9	2.0	-	30
Tyr54	Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ^[a]	151.3	2.0	-	30
Thr53	Fmoc-Thr(t-Bu)-OH ^[a]	130.8	2.0	-	30
Asp52	Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH ^[a]	135.4	2.0	-	30
Val51	Fmoc-Val-OH ^[a]	111.7	2.0	-	30
Val50	Fmoc-Val-OH ^[a]	111.7	2.0	-	30
Glu49	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	140.0	2.0	-	30
Gln48	Fmoc-Gln(Trt)-OH ^[a]	201.0	2.0	-	30
Cys47	Fmoc-Cys(SSt-Bu)-OH ^[c]	284.2	-	2.5	180
Glu46	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	140.0	2.0	-	30
Glu45	Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH ^[a]	140.0	2.0	-	45
Ser44, Leu43	Fmoc-Leu-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH ^[b]	94.9	1.5	0.5	45
Ser42	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH ^[a]	126.2	2.0	-	30
Lys41	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	154.2	2.0	-	30
Pro40	Fmoc-Pro-OH ^[a]	111.0	2.0	-	30
Leu39	Fmoc-Leu-OH ^[a]	116.3	2.0	-	30
Lys38	Fmoc-Lys(Boc)-OH ^[a]	154.2	2.0	-	30
Ser37	Fmoc-Ser(t-Bu)-OH ^[a]	126.2	2.0	-	30
Cys36	Boc-Cys(SSt-Bu)-OH ^[c]	203.7	-	2.5	180

^[a]Für diese Kupplungen werden je 5 eq Aminosäure (0.33 mmol) und 136.2 mg HCTU (0.33 mmol, 5 eq) verwendet.

^[b]Für diese Kupplungen werden je 3 eq Aminosäure (0.20 mmol) und 102.8 mg HCTU (0.20 mmol, 3 eq) verwendet.

^[c]Für diese Kupplung werden je 10 eq Aminosäure (0.66 mmol) und 51.3 μL DIC (0.33 mmol, 5 eq) verwendet.

Nach beendeter Festphasensynthese wird das Peptidylharz mit DCM (5x) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Dieses besitzt einen Beladungsgrad von 99.3 $\mu\text{mol/g}$ was einer quantitativen Gesamtkupplungsausbeute entspricht.

H-Cys(SSt-Bu)-Ser-Lys-Leu-Pro-Lys-Ser-Leu-Ser-Glu-Glu-Cys(SSt-Bu)-Gln-Glu-Val-Val-Asp-Thr-Tyr-Gly-Ser-Ile-Leu-Ser-Ile-Leu-Leu-Glu-Glu-Val-Ser-Pro-Glu-Leu-Val-Cys(SSt-Bu)-Ser-Nle-Leu-His-Leu-Cys(SSt-Bu)-Ser-Gly-Thr-OH **58**

(Saposin C 36-81)

100.0 mg Peptidylharz **57** ($B_H = 99.3 \mu\text{mol/g}$, $9.93 \mu\text{mol}$) werden mit 6 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) 2 h geschüttelt. Das Harz wird weitere 3x mit je 1 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) für 10 min geschüttelt. Die Abspalllösungen werden filtriert, vereinigt und im Vakuum auf 1 mL eingengt. Das Peptid wird durch Zugabe von 10 mL kaltem Diethylether ($-10 \text{ }^\circ\text{C}$) 10 min bei $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wird 2x mit je 10 mL kaltem Diethylether gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet, durch HPLC-MS (Säule: A I, 30 \rightarrow 90 % B, 25 min, 0.2 mL/min) analysiert. Der Rückstand wird in 3 ml 58 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und in 2 Portionen durch RP-HPLC gereinigt (Säule: YMC Hydrosphere C18 (150 mm x 10 mm); 55 \rightarrow 68 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA; 33 min; 4 mL/min). Die Produktfraktionen werden lyophilisiert, vereinigt und das Produkt wird durch HPLC-MS Analyse (Säule: A I, 30 \rightarrow 90 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute an **58** C₂₂₉H₃₈₅N₅₁O₇₄S₈ (5293.32): 8.5 mg (1.61 μmol , 16 %), weißer Feststoff, ESI-MS: m/z (durchschnittliche Isotopenverteilung): C₂₂₉H₃₈₅N₅₁O₇₄S₈ (5293.32); berechnet: (M+5H)⁵⁺ 1059.67, (M+4H)⁴⁺ 1324.34, (M+3H)³⁺ 1765.45, (M+2H)²⁺ 2647.67, gefunden: 1059.87, 1324.10, 1765.53, 2648.36.

11.15 Versuche zu Kapitel 8.3

Allgemeine Vorgehensweise für die Ligationen zu Saposin C **59a** und **59b**

Die Experimente werden in einer anaeroben Stickstoffkammer durchgeführt. Peptid **58** (1 eq, c = 1.8 mM) wird in einem frisch hergestellten Ligationspuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.1 M MPAA, 30 mM TCEP, pH 6.9) gelöst. Nach 15 min wird die Lösung zu den entsprechenden Gycopeptidthioestern **56a** bzw. **56b** (1.5 eq) gegeben. Die Reaktionen werden durch HPLC-MS (Säule: B III, 20 \rightarrow 80 % B, 15 min, 0.3 mL/min) oder UHPLC-MS (Säule: A IV, 20 \rightarrow 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min) überwacht und zeigen nach 1 d einen vollständigen Umsatz.

Allgemeine Vorgehensweise für die Rückfaltung und Oxidation zu Saposin C **60a** und **60b**

Die Dialyse wird in einer anaeroben Stickstoffkammer durchgeführt. DTT (Endkonzentration_{DTT} = 0.1 M) wird als Feststoff zu dem entsprechende Ligationsansatz gegeben und für 30 min inkubiert. Danach wird die Ligation auf eine Proteinkonzentration von 35 µM (bezogen auf die in der Ligation verwendete Menge **58**) mit einem Puffer (6 M GdmCl, 50 mM Tris, pH 8.5) verdünnt. Die Lösung wird in einen Dialyseschlauch (Roth Zellotrans V Serie, MW cutoff: 5000, Breite: 40 mm) überführt und die Dialyse wird jeweils gegen 330 mL eines Dialysepuffers (0.5 M Arg, 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.5) und im Anschluss gegen jeweils 330 mL H₂O durchgeführt. Der Dialysepuffer wird nach 2 h und weiteren 4 h ausgetauscht. Nach weiteren 12 h wird der Dialysepuffer gegen H₂O ersetzt. Dieses wird nach 2 h und weiteren 4 h gewechselt. Nach zusätzlichen 12 h wird die Dialyse beendet.

Das Dialysat wird in ein geeignetes Gefäß überführt und langsam unter leichten Rühren mit einem frisch hergestellten Puffer (NaCl, Tris, Cysteamin, pH 8.5) auf eine Endkonzentration von 15 µM Protein, 150 mM NaCl, 100 mM Tris und 0.1 mM Cysteamin verdünnt. Die Reaktion wird unter Luftexposition 4 d leicht gerührt. Das Rohprodukt wird durch HPLC-MS (Säule: B III, 20 → 70 % B, 15 min, 0.3 mL/min) oder UHPLC-MS (Säule: A IV, 20 → 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert und der Ansatz durch Gefriertrocknung eingengt. Der Rückstand wird in H₂O + 0.1 % TFA gelöst und das Rohprodukt durch RP-HPLC (YMC-Pack Protein RP 10 x 150 mm, 10 → 70 % (für **60a**) bzw. 10 → 55 % (für **60b**) MeCN/H₂O + 0.1 % TFA; 80 min; 2 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion wird lyophilisiert und das Produkt wird durch UHPLC (Säule: A IV, 20 → 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min), Hochauflösungs-Massenspektrometrie, CD-Spektroskopie und SDS-PAGE Analyse charakterisiert.

*H-Ser-Asp-Val-Tyr-Glu-Val-Cys-Glu-Phe-Leu-Val-Lys-Glu-Val-Thr-Lys-Leu-Ile-Asp-Asn-Asn[GlcNAc]-Lys-Thr-Glu-Lys-Glu-Ile-Leu-Asp-Ala-Phe-Asp-Lys-Nle-Cys-Ser-Lys-Leu-Pro-Lys-Ser-Leu-Ser-Glu-Glu-Cys-Gln-Glu-Val-Val-Asp-Thr-Tyr-Gly-Ser-Ile-Leu-Ser-Ile-Leu-Leu-Glu-Glu-Val-Ser-Pro-Glu-Leu-Val-Cys-Ser-Nle-Leu-His-Leu-Cys-Ser-Gly-Thr-OH **60a***
(Saposin C (GlcNAc))

Mit 1.8 mg Saposin C 36-81 **58** (0.37 µmol, 1 eq) und 2.6 mg Glycopeptidthioester **56a** (0.56 µmol, 1.5 eq) wird nach der allgemeinen Vorgehensweise für die Ligation (siehe S.166) und nach der allgemeinen Vorgehensweise für die Rückfaltung und Disulfidbrückenbildung (siehe S. 167) Saposin C (GlcNAc) **60a** dargestellt.

Ausbeute an **60a** C₄₀₃H₆₅₀N₉₄O₁₃₈S₆ (9212.41): 1.4 mg (0.15 µmol, 41 %), weißer Feststoff, HR-MS: m/z (exakte Masse): C₄₀₃H₆₅₀N₉₄O₁₃₈S₆ (9206.5059); berechnet: (M+9H)⁹⁺ 1023.9524, (M+8H)⁸⁺ 1151.8205, (M+7H)⁷⁺ 1316.2224, (M+6H)⁶⁺ 1535.4250, (M+5H)⁵⁺ 1842.3121, gefunden: 1023.9544, 1151.8235, 1316.2255, 1535.4240, 1842.3085.

H-Ser-Asp-Val-Tyr-Glu-Val-Cys-Glu-Phe-Leu-Val-Lys-Glu-Val-Thr-Lys-Leu-Ile-Asp-Asn-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Lys-Thr-Glu-Lys-Glu-Ile-Leu-Asp-Ala-Phe-Asp-Lys-Nle-Cys-Ser-Lys-Leu-Pro-Lys-Ser-Leu-Ser-Glu-Glu-Cys-Gln-Glu-Val-Val-Asp-Thr-Tyr-Gly-Ser-Ile-Leu-Ser-Ile-Leu-Leu-Glu-Glu-Val-Ser-Pro-Glu-Leu-Val-Cys-Ser-Nle-Leu-His-Leu-Cys-Ser-Gly-Thr-OH **60b**

(Saposin C (Nona))

Mit 1.3 mg Saposin C 36-81 **58** (0.26 µmol, 1 eq) und 2.3 mg Glycopeptidthioester **56b** (0.39 µmol, 1.5 eq) wird nach der allgemeinen Vorgehensweise für die Ligation (siehe S.166) und nach der allgemeinen Vorgehensweise für die Rückfaltung und Disulfidbrückenbildung (siehe S. 167) Saposin C (GlcNAc) **60b** dargestellt.

Ausbeute an **60b** C₄₅₇H₇₃₉N₉₇O₁₇₈S₆ (10632.69): 1.6 mg (0.15 µmol, 58 %), weißer Feststoff, HR-MS: m/z (exakte Masse): C₄₅₇H₇₃₉N₉₇O₁₇₈S₆ (10626.0081); berechnet: (M+9H)⁹⁺ 1181.6749, (M+8H)⁸⁺ 1329.2583, (M+7H)⁷⁺ 1519.0084, (M+6H)⁶⁺ 1772.0087, gefunden: 1181.6784, 1329.2615, 1519.0085, 1772.0098.

12 Literaturverzeichnis

- [1] C. M. Taylor, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11317–11362.
- [2] R. Apweiler, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 4–8.
- [3] R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Ann. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631–634.
- [4] J. K. Welply, P. Shenbagamurthili, W. J. Lennarz III, F. Naiderp, *J. Biol. Chem.* **1983**, *268*, 11856–11863.
- [5] C. Lizak, S. Gerber, S. Numao, M. Aebi, K. Locher, *Nature* **2011**, *474*, 350–355.
- [6] A. Helenius, M. Aebi, *Science* **2001**, *291*, 2364–2369.
- [7] A. Helenius, M. Aebi, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 1019–1049.
- [8] T. W. Rademacher, R. B. Parekh, R. A. Dweck, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 785–838.
- [9] R. Dweck, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
- [10] S. van Kasteren, H. Kramer, H. Jensen, S. Campbell, J. Kirkpatrick, N. Oldham, D. Anthony, B. Davis, *Nature* **2007**, *446*, 1105–1109.
- [11] R. Parekh, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1991**, *2*, 730–734.
- [12] H. Gabius, S. Andre, H. Kaltner, H. Siebert, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 165–177.
- [13] N. Fujitani, J. Furukawa, K. Araki, T. Fujioka, Y. Takegawa, J. Piao, T. Nishioka, T. Tamura, T. Nikaido, M. Ito, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 2105–2110.
- [14] K. Yamashita, K. Inui, K. Totani, N. Kochibe, M. Furukawa, S. Okada, *Biochemistry* **1990**, *29*, 3030–3039.
- [15] F. Dall'Olivo, F. Malagolini, M. Trinschera, M. Chiricolo, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 2752–2764.
- [16] R. Goulabchand, T. Vincent, F. Batteaux, J. Eliaou, P. Guilpain, *Autoimmun. Rev.* **2014**, *13*, 742–750.
- [17] S. Tobhani, C. Yuen, M. Bailey, C. Jones, *Glycobiology* **2009**, *19*, 201–211.
- [18] K. Witte, P. Sears, R. Martin, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2214–2118.
- [19] P. M. Rubb, T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dweck, *Science*. **2001**, *291*, 2370–2376.
- [20] L. Wells, K. Vosseller, G. Hart, *Science*. **2001**, *291*, 2376–2378.
- [21] Y. Yamaguchi, M. Nishimura, M. Nagano, H. Yagi, H. Sasakawa, K. Uchida, K. Shitara, K. Kato, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 693–700.
- [22] J. N. Arnold, M. R. Wormald, R. B. Sim, *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, *25*, 21–50.

- [23] D. Skropeta, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2645–2653.
- [24] D. Macmillan, C. Bertozzi, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9515–9525.
- [25] D. Gamblin, E. Scanlan, B. Davis, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 131–163.
- [26] C. Unverzagt, Y. Kajihara, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4408–4420.
- [27] S. Ritter, *Chem. Eng. News* **2005**, *83*, 24–26.
- [28] F. Li, N. Vijayasankaran, A. Shen, R. Kiss, A. Amanullah, *MAbs* **2010**, *2*, 466–477.
- [29] S. Hamilton, R. Davidson, N. Sethuraman, J. Nett, Y. Jiang, S. Rios, P. Bobrowicz, T. Stadheim, H. Li, B. Choi, et al., *Science* **2006**, *313*, 1441–1443.
- [30] Y. Chiba, A. Jigami, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 670–676.
- [31] G. Walsh, R. Jeffris, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1241–1252.
- [32] D. Ghaderi, M. Zhang, N. Hurtado-Ziola, A. Varki, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **2012**, *28*, 147–175.
- [33] R. Werner, K. Kopp, M. Schlueter, *Acta Paediatr. Suppl.* **2007**, *96*, 17–22.
- [34] R. Sola, K. Griebenow, *BioDrugs* **2010**, *24*, 9–21.
- [35] S. Hamilton, P. Bobrowicz, B. Bobrowicz, R. Davidson, H. Li, T. Mitchell, J. Nett, S. Rausch, T. Stadheim, H. Wischnewski, et al., *Science* **2003**, *301*, 1244–1246.
- [36] K. Pourcq De, W. Vervecken, I. Dewerte, A. Valevska, A. van Hecke, N. Callewaert, *PLoS One* **2012**, *7*, 1–12.
- [37] B. Li, Y. Zeng, S. Hauser, H. Song, L.-X. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9692–9693.
- [38] M. Fujita, S. Shoda, K. Haneda, T. Inazu, K. Takegawa, K. Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1528*, 9–14.
- [39] K. Takegawa, M. Tabuchi, S. Yamaguchi, A. Kondo, I. Kato, S. Iwahara, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3094–3099.
- [40] B. Li, H. Song, S. Hauser, L. Wang, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3081–3084.
- [41] W. Huang, C. Li, B. Li, M. Umekawa, K. Yamamoto, X. Zhang, L. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2214–2223.
- [42] G. A. Lemieux, C. R. Bertozzi, *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 506–513.
- [43] T. W. Muir, *Struct. Lond. Engl.* **1995**, *3*, 649–652.
- [44] H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1987**, *26*, 294–308.
- [45] N. Yamamoto, A. Takayanagi, A. Yoshino, S. Sakakibara, Y. Kajihara, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 613–625.
- [46] N. Yamamoto, Y. Tanabe, R. Okamoto, P. E. Dawson, Y. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 501–510.

- [47] C. Heinlein, D. Varón Silva, A. Tröster, J. Schmidt, A. Gross, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3077–3080.
- [48] S. T. Cohen-Anisfeld, P. T. Lansbury, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10531.
- [49] R. Subirós-Funosas, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8595.
- [50] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [51] S. B. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 957–989.
- [52] M. Schnölzer, P. Alewood, A. Jones, D. Alewood, S. B. H. Kent, *Int. J. Pept. Protein Res.* **2009**, *40*, 180–193.
- [53] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218–9227.
- [54] T. Johnson, L. C. Packman, C. B. Hyde, D. Owen, M. Quibell, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1996**, 719–728.
- [55] S. T. Cohen-Anisfeld, P. T. Lansbury, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5560–5562.
- [56] Y. C. Meinwald, E. R. Stimsons, A. Sheraga, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *28*, 79–84.
- [57] T. Geiger, S. Clarke, *J. Biol. Chem.* **1987**, *126*, 785–794.
- [58] N. E. Robinson, A. B. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 1249–12413.
- [59] K. Patel, R. T. Borchardt, *Pharm. Res.* **1990**, *7*, 703–711.
- [60] K. Patel, R. T. Borchardt, *Pharm. Res.* **1990**, *7*, 787–793.
- [61] C. Oliyai, R. T. Borchardt, *Pharm Res.* **1993**, *10*, 95–102.
- [62] R. Tyler-Cross, V. Schirch, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 22549–22556.
- [63] J. F. Sydow, F. Lipsmeier, V. Larraillet, M. Hilger, B. Mautz, M. Molhoj, J. Kuentzer, S. Klostermann, J. Schoch, H. R. Voelger, et al., *PLoS One* **2014**, *9*, 1–13.
- [64] D. W. Aswad, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, *613*, 26–36.
- [65] C. E. M. Voorter, E. S. Roersma, H. Bloemendal, W. W. De Jong, *FEBS Lett.* **1987**, *221*, 249–252.
- [66] V. Ullmann, M. Rädisch, I. Boos, J. Freund, C. Pöhner, S. Schwarzinger, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11566–11570.
- [67] R. Chen, T. J. Tolbert, *J. Am. Chem Soc.* **2010**, *132*, 3211–3216.
- [68] J. Ruczynski, B. Lewandowska, P. Mucha, P. Rekowski, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 335–41.
- [69] H. Kunz, H. Waldmann, C. Unverzagt, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1985**, *26*, 493.
- [70] T. Conroy, K. A. Jolliffe, R. J. Payne, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3723–3733.
- [71] P. Wang, B. Aussedat, Y. Vohra, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11571–11575.
- [72] S. Capasso, L. Mazzarella, A. Zagari, *Chirality* **1995**, *7*, 605.

- [73] P. Wang, B. Aussedat, Y. Vohra, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11571–11575.
- [74] T. Inazu, K. Kobayashi, *Synlett* **1993**, *1993*, 869–870.
- [75] I. L. Deras, K. Takegawa, A. Kondo, I. Kato, Y. C. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *8*, 1763–1766.
- [76] Y. He, J. Hinklin, J. Chang, L. Kiessling, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4479–4482.
- [77] H. Liu, L. Wang, A. Brock, C.-H. Wong, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1702–1703.
- [78] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, *266*, 887–779.
- [79] P. Dawson, S. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960.
- [80] D. Bang, S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534–2538.
- [81] J. P. Tam, Y.-A. Lu, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1583–1592.
- [82] D. F. Veber, J. D. Milkowski, S. L. Varga, R. G. Denkewalter, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5456–5461.
- [83] D. Bang, N. Chopra, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1377–1383.
- [84] M. Royo, J. Alsina, E. Giralt, U. Slomczynska, F. Albericio, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1995**, *4*, 1095–1102.
- [85] M. Villian, J. Vizzavona, K. Rose, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 673–679.
- [86] D. Bang, B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3887.
- [87] P. Wang, R. Layfield, M. Landon, R. Mayer, R. Ramage, *J. Pept. Res.* **1999**, *53*, 673–677.
- [88] G.-M. Fang, Y.-M. Li, F. Shen, Y.-C. Huang, J.-B. Li, Y. Lin, H.-K. Cui, L. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *1250*, 7645–7649.
- [89] W. Chen, J. W. Yewdell, R. L. Levine, J. R. Bennink, *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 1757–1764.
- [90] R. J. Payne, S. Ficht, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4411–4415.
- [91] J. Offer, *Biopolymers* **2010**, *94*, 530–541.
- [92] J. Offer, N. C. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4642–4646.
- [93] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526–533.
- [94] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248–9252.
- [95] B. Pentelute, S. Kent, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 687–690.
- [96] L. R. Malins, K. M. Cergol, R. J. Payne, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 559–563.

- [97] R. E. Thompson, B. Chan, L. Radom, K. A. Jolliffe, R. J. Payne, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9723–9727.
- [98] P. Siman, S. V. Karthikeyan, A. Brik, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1520–1523.
- [99] K. M. Cergol, R. E. Thompson, L. R. Malins, P. Turner, R. J. Payne, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 290–293.
- [100] Z. Tan, S. Shang, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9500–9503.
- [101] R. Yang, K. K. Pasunooti, F. Li, X.-W. Liu, C.-F. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13592–13593.
- [102] D. Crich, A. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10064–10065.
- [103] S. Shang, Z. Tan, S. Dong, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10784–10786.
- [104] J. Chen, P. Wang, J. Zhu, Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2277–2283.
- [105] L. R. Malins, K. M. Cergol, R. J. Payne, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 260–266.
- [106] C. Haase, H. Rohde, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6807–6810.
- [107] C. J. Noren, J. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 450–466.
- [108] H. Hojo, S. Aimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 111–117.
- [109] H. Kunz, H. Waldmann, J. Maerz, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 45–49.
- [110] F. Mende, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1232–1240.
- [111] J.-S. Zheng, S. Tang, Y.-C. Huang, L. Liu, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2475–2484.
- [112] G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1971**, 636–637.
- [113] B. J. Backes, A. A. Virgilio, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3055–3056.
- [114] B. J. Backes, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322–2330.
- [115] S. Mezzato, M. Schaffrath, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1650–1654.
- [116] J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6851–6855.
- [117] S. Futaki, K. Sogawa, J. Maruyama, T. Asahara, M. Niwa, H. Hojo, *Tetrahedron* **1997**, *38*, 6237–6240.
- [118] R. Eggelkraut-Gottanka, A. Klose, A. G. Beck-Sickinger, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3551–3554.
- [119] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6237–6240.
- [120] Y. Kajihara, A. Yoshihara, K. Hirano, N. Yamamoto, *Carbohydr. Res.* **2006**, *10*, 1333–1340.
- [121] S. Flemer, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 693–696.

- [122] T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3809–3924.
- [123] M. Schmälzlein, Dissertation, Universität Bayreuth, **2013**.
- [124] R. Huber, J. Deisenhofer, P. M. Colman et al., *Nature* **1976**, *264*, 415–420.
- [125] F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, *Immunity* **2006**, *24*, 19–28.
- [126] F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, *Curr. Opin. Immunol.* **2007**, *19*, 239–245.
- [127] F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 34–47.
- [128] Y. Kaneko, F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, *Science* **2006**, *313*, 670–673.
- [129] R. G. Miller, F. Anderson, B. R. Brooks, W. G. Mitsumoto, W. G. Bradley, S. P. Ringel, *Ann. Neurol.* **2009**, *65*, 24–28.
- [130] M. Edri-Brami, B. Rosental, D. Hayoun, M. Welt, H. Rosen, I. Wirguin, B. Nefussy, V. E. Drory, A. Porgador, R. G. Lichtenstein, *PLoS One* **2012**, *7*, e35772.
- [131] G. L. Wang, G. L. Semenza, *Curr. Opin. Hematol.* **1996**, *3*, 156–162.
- [132] C. T. Noguchi, L. Wang, H. M. Rogers, R. Teng, Y. Jia, *Expert Rev. Mol. Med.* **2008**, *10*, 36.
- [133] W. Jelkmann, *Transfus. Med. Hemotherapy* **2013**, *40*, 302–309.
- [134] F. K. Lin, C. Suggs, H. Lin, J. K. Browne, R. Smalling, J. C. Egrie, K. K. Chen, G. M. Fox, F. Martin, Z. Stabinsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 7580–7584.
- [135] A. Anagnostou, Z. Liu, M. Steiner, K. Chin, E. S. Lee, N. Kessimian, C. T. Noguchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3974–3978.
- [136] M. Ogilvie, X. Yu, V. Nicolas-Metral, S. M. Pulido, C. Liu, U. T. Ruegg, C. T. Noguchi, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 39754–39761.
- [137] S. E. Juul, D. K. Anderson, Y. Li, D. Christensen, *Pediatr. Res.* **1998**, *43*, 40–49.
- [138] V. Mastromarino, M. Volpe, M. B. Musumeci, C. Autore, E. Conti, *Clin. Sci.* **2001**, *120*, 51–63.
- [139] M. A. Bogoyevitch, *Cardiovasc.* **2004**, *63*, 51–63.
- [140] B. Adamcio et al., *BMC Biol.* **2008**, *6*, 37.
- [141] M. A. Recny, H. A. Scoble, Y. Kim, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17156–17163.
- [142] J. Cheetham, D. M. Smith, K. H. Aoki, J. L. Stevenson, T. J. Hoeffel, R. S. Syed, J. Egrie, T. S. Harvey, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 861–866.
- [143] P. H. Lai, R. Everett, F. F. Wang, T. Arakawa, E. Godlwasser, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 3116–3121.
- [144] F. F. Wang, C. K.-H. Kung, E. Goldwasser, *Endocrinology* **1985**, *116*, 2286–2292.
- [145] M. Takeuchi, N. Inoue, T. W. Strckland, M. Kubota, M. Wada, R. Shimizu, S. Hoshi, H. Kozusumi, S. Takasaki, A. Kobata, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7819–7822.

- [146] Z. Sharokh, L. Royle, R. Saldova, J. Bones, J. L. Abrahams, N. V. Artemenko, S. Flatman, M. Davies, A. Baycroft, S. Sehgal et al., *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 286–296.
- [147] M. Takeuchi, S. Takasaki, H. Miyazaki, T. Kato, S. Hoshi, N. Kochibe, A. Kobata, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3657–3663.
- [148] V. Skibeli, G. Nissen-Lie, P. Torjesen, *Blood* **2001**, *98*, 3626–3634.
- [149] E. Delorme, T. Lorenzini, J. Giffin, F. Martin, F. Jacobsen, T. Boone, S. Elliott, *Biochem.* **1992**, *31*, 9871–9876.
- [150] L. C. Wasley, G. Timony, P. Murtha, J. Stoudemire, A. J. Dorner, J. Caro, M. Krieger, R. J. Kaufman, *Blood* **1991**, *77*, 2624–2632.
- [151] M. Takeuchi, S. Takasaki, M. Shimada, A. Kobata, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 12127–12130.
- [152] E. Tsuda, G. Kawanishi, M. Ueda, S. Masuda, R. Sasaki, *Eur. J. Biochem. FEBS* **1990**, *188*, 405–411.
- [153] Y. J. Dong, C. Kung, E. Goldwasser, *J. Cell. Biochem.* **1992**, *48*, 269–276.
- [154] J. C. Egrie, E. Dwyer, J. K. Browne, A. Hitz, M. A. Lykos, *Exp. Hematol.* **2003**, *31*, 290–299.
- [155] D. Su, H. Zhao, H. Xia, *Int. J. Hematol.* **2010**, *91*, 238–244.
- [156] C. G. Schuette, B. Pierstorff, S. Huettler, K. Sandhoff, *Glycobiology* **2001**, *11*, 81R–90R.
- [157] D. a. Wenger, P. Luzi, M. A. Rafi, *Bioimpacts* **2013**, *3*, 145–147.
- [158] N. Deconinck, A. Messaaoui, F. Ziereisen, H. Kadhim, Y. Sznajder, K. Pelc, M. C. Nassogne, M. T. Vanier, B. Dan, *Eur. J. Paediatr. Neuro.* **2008**, *12*, 46–50.
- [159] R. J. Tamargo, A. Velayati, E. Goldin, E. Sidransky, *Mol. Genet. Metab.* **2012**, *106*, 257–263.
- [160] Y. Kishimoto, M. Hiraiwa, J. S. O'Brien, *J. Lipid Res.* **1992**, *33*, 1255–1267.
- [161] M. Rossmann, R. Schultz-Heienbrock, J. Behlke, N. Rimmel, C. Alings, K. Sandhoff, W. Saenger, T. Maier, *Structure* **2008**, *16*, 809–817.
- [162] S. Morimoto, B. M. Martin, Y. Yamamoto, K. A. Kretz, J. S. O'Brien, Y. Kishimoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 3389–3393.
- [163] J. O'Brien, Y. Kishimoto, *J. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1991**, *5*, 301–308.
- [164] M. A. Rafi, X. L. Zhang, G. DeGala, D. A. Wenger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *166*, 1017–1023.
- [165] M. A. Rafi, G. DeGala, X. L. Zhang, D. A. Wenger, *Somat. Cell Mol. Genet.* **1993**, *19*, 1–7.

- [166] N. Azuma, J. S. O'Brien, H. W. Moser, Y. Kishimoto, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *311*, 354–357.
- [167] K. Ito, N. Takahashi, A. Takahashi, I. Shimada, Y. Arata, J. S. O'Brien, Y. Kishimoto, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *215*, 171–179.
- [168] Y. Yang, *Side Reactions in Peptide Synthesis*, Elsevier Inc., **2016**.
- [169] J. L. Lauer, C. G. Fields, G. B. Fields, *Lett Pept Sci* **1995**, *1*, 197.
- [170] T. H. Wright, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biologgy* **1991**, *26*, 1–52.
- [171] V. Ullmann, Dissertation, Universität Bayreuth, **2012**.
- [172] W. J. Wu, D. P. Raleigh, *Biopolymers* **1998**, *45*, 381–394.
- [173] A. A. Kossiakoff, *Science* **1988**, *240*, 191–194.
- [174] M. Rädisch, Dissertation, Universität Bayreuth, **2016**.
- [175] A. S. El-Azab, A. A.-M. Abdel-Aziz, *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* **2012**, *187*, 1046–1055.
- [176] A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504.
- [177] M. Murakami, T. Kiuchi, M. Nishihara, K. Tezuka, R. Okamoto, M. Izumi, Y. Kajihara, *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1500678.
- [178] P. Wang, S. Dong, J. A. Brailsford, K. Iyer, S. D. Townsend, Q. Zhang, R. C. Hendrickson, J. Shieh, M. A. S. Moore, S. J. Danishefsky, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51*, 11576–11584.
- [179] A. Gross, Dissertation, Universität Bayreuth, **2016**.
- [180] E. Atherton, R. C. Sheppard, P. Ward, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1985**, 2070.
- [181] S. Liu, B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 993–999.
- [182] H. Lamthanh, C. Roumestand, C. Deprun, A. Ménez, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, *41*, 85–95.
- [183] O. Nishimura, C. Kitada, M. Fujino, *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, *26*, 1576–1585.
- [184] M. Mochikzuki, H. Hibino, Y. Nishiuchi, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5740–5743.
- [185] S. Akabori, S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Nobuhara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1964**, *37*, 433.
- [186] M. Mochikzuki, S. Tsuda, K. Tanimura, Y. Nishiuchi, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2202–2205.
- [187] M. Hessefort, Masterarbeit, Universität Bayreuth, **2016**.
- [188] A. Fernandez-Tejada, P. A. Vadola, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem Soc.* **2014**, *136*, 8450–8458.
- [189] A. Nathan, D. Bolikal, N. Vyavahare, S. Zalipsky, J. Kohn, *Macromolecules* **1992**, *25*, 4476–4484.

- [190] A. Seko, M. Koketsu, M. Nishizono, Y. Enoki, H. R. Ibrahim, L. R. Juneja, M. Kim, T. Yamamoto, *Biochem. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1997**, *1335*, 23–32.
- [191] T. Tanaka, H. Nagai, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, *Chem. Commun.* **2009**, 3378–3379.
- [192] H. Bayley, D. N. Standring, J. R. Knowles, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 33633–3634.
- [193] I. Photaki, J. Taylor-Papadimitriou, C. Sakarellos, P. Mazarakis, L. Zervas, *J. Chem. Soc. C* **1970**, 2683–2687.
- [194] E. E. Büllsbach, W. Danho, H. J. Helbig, H. Zahn, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1980**, *361*, 865–873.
- [195] A. Reif, S. Siebenhaar, A. Tröster, M. Schmälzlein, C. Lechner, P. Velisetty, K. Gottwald, C. Pöhner, I. Boos, V. Schubert, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12125–12131.
- [196] E. Rozanski, Masterarbeit, Universität Bayreuth, **2015**.
- [197] P. Siman, S. V. Karthikeyan, M. Nikolov, W. Fischle, A. Brik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8059–8063.
- [198] C. G. F. Graf, C. Schulz, M. Schm, C. Heinlein, M. Mçnnich, L. Perkams, M. Püttner, I. Boos, M. Hessefort, J. Nelson, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 5252–5257.
- [199] H. Hojo, H. Tanaka, M. Hagiwara, Y. Asahina, A. Ueki, H. Katayama, Y. Nakahara, A. Yoneshige, J. Matsuda, Y. Ito, et al., *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 9437–9446.
- [200] M. Püttner, Dissertation, Universität Bayreuth, **2005**.
- [201] C. Heinlein, Dissertation, Universität Bayreuth, **2010**.
- [202] C. Schulz, Masterarbeit, Universität Bayreuth, **2013**.
- [203] A. M. Pérez-López, D. González-Calderón, A. Occorso, J. Galindo-Ángel, J. F. Domínguez-Seglar, J. A. Tamayo, M. Díaz-Gavilán, J. A. Gómez-Vidal, *Synlett* **2014**, *25*, 2319–2322.
- [204] C. Amatore, A. Jutand, A. Thuilliez, *Organometallics* **2001**, *20*, 3241–3249.
- [205] M. Mönnich, Arbeiten Zur Dissertation, Universität Bayreuth, **2016**.
- [206] L. Moroder, *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 187–214.
- [207] A. K. Trickler, C. J. Barrow, J. D. Wade, *J Pept Sci* **2001**, *7*, 488–494.
- [208] R. Rudolph, G. Bchem, H. Lilie, R. Jaenicke, *Protein Function*, Oxford University Press, Oxford, **1997**.
- [209] J. P. Tam, C. R. Wu, W. Liu, J. W. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6657–6662.
- [210] R. Wynn, F. M. Richards, *Methods Enzym.* **1995**, *251*, 351–356.

- [211] T. Linke, G. Wilkening, F. Sadeghlar, H. Mozcall, K. Bernardo, E. Schuchmann, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5760–5768.
- [212] G. Schwarzmann, B. Breiden, K. Sandhoff, *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 1861–1879.
- [213] K. Popovic, J. Holyaoka, R. Pomes, G. G. Prive, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 2908–2912.
- [214] N. Rimmel, S. Locatelli-Hoops, B. Breiden, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, *FEBS J.* **2007**, *274*.
- [215] S. Locatelli-Hoops, N. Rimmel, R. Klingenstein, B. Breiden, M. Rossocha, M. Schoeniger, C. Koenigs, W. Saenger, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 32451–32460.
- [216] I. Lemmer, Bachelorarbeit, Universität Bayreuth, **2015**.
- [217] U. Mueller, N. Darowski, M. R. Fuchs, R. Förster, M. Hellming, K. S. Paithankar, S. Pühringer, M. Steffien, G. Zocher, M. S. Weiss, *J. Synchrotron Rad.* **2012**, *19*, 442–449.
- [218] W. Kabsch, *Acta. Cryst.* **2010**, *D66*, 125–132.
- [219] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, R. J. Read, *J. Appl. Cryst* **2007**, *40*, 658–674.
- [220] G. N. Murshudov, P. Skubak, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn, F. Long, A. A. Vagin, *Acta Cryst.* **2011**, *D67*, 355–367.

13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. CARLO UNVERZAGT** für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die interessante und vielseitige Themenstellung sowie die sehr gute Betreuung mit vielen hilfreichen Tipps.

Bei Prof. Dr. FRANZ SCHMID; Prof. Dr. ANDREAS MÖGLICH und Prof. Dr. CLEMENS STEEGBORN bedanke ich mich für die Erlaubnis zur Benutzung von Geräten und Materialien in ihren Laboratorien sowie bei deren Mitarbeitern für die Hilfestellung.

Dr. CLAUDIA PÖHNER gilt mein besonderer Dank für die Hilfe bei der Praktikumsbetreuung und die stete Diskussionsbereitschaft.

Bei meinen Laborkolleginnen und -kollegen Dr. ANGELINA GROSS, ELISABETH ROZANSKI, SIMONE SEELEITNER, Dr. MARISA RÄDISCH, HENDRIK HESSEFORT und MARKUS HESSEFORT sowie bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern Dr. IRENE BOOS, LUKAS PERKAMS, THOMAS LUBER, MANUEL MÖNNICH, THEODOROS KARAGIANNIS, Dr. KAREN GOTTWALD, ANDREAS REIF, MARIE LOTT, SASCHA WEIDLER, SILVIA BERNSDORF und VOLKER SCHUBERT bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima.

Für das Destillieren der Lösungsmittel, das Bestellen der Chemikalien und für die Wartung und Reparatur von Laborgeräten danke ich besonders SILVIA KRAPP und VOLKER SCHUBERT.

Dr. KAREN GOTTWALD und Dr. MARISA RÄDISCH gilt mein besonderer Dank für die Einweisung in die Bedienung des Massenspektrometers.

IRMTRAUD HEROLD und SILVIA KASTNER danke ich für die stets problemlose Erledigung der Verwaltungsarbeiten im Sekretariat.

Dr. ANGELINA GROSS und VOLKER SCHUBERT danke ich für die Hilfe bei allen Computerfragen und die Gewährleistung des Netzwerkbetriebes.

Bei Dr. KAREN GOTTWALD, Dr. MARISA RÄDISCH, SIMONE SEELEITNER und THEODOROS KARAGIANNIS bedanke ich mich für die zahlreichen LC-MS Messungen. THOMAS LUBER

Danksagung

danke ich für die Aufnahme hochauflösender Massenspektren. MARIE LOTT und SASCHA WEIDLER danke ich für die SDS-PAGE Analysen.

Ein herzliches Dankeschön gilt ELISABETH ROZANSKI, MARKUS HESSEFORT und HENDRIK HESSEFORT für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt MANUEL MÖNNICH für die Bereitstellung des mannosereichen Heptasaccharids. Ebenfalls möchte ich mich bei LUKAS PERKAMS, Dr. IRENE BOOS, VOLKER SCHUBERT und SILVIA BERNSDORF für die Bereitstellung des komplexen Nonasaccharids bedanken. Meiner Laborkollegin ELISABETH ROZANSKI danke ich für das zur Verfügung gestellte Glycopeptidhydrazid.

Bei Prof. Dr. KONRAD SANDHOFF und bei Dr. BERNADETT BREIDEN bedanke ich mich für die Durchführung der biologischen Aktivitätstests. Prof. Dr. CLEMENS STEEGBORN und Dr. MICHAEL WEYAND danke ich für die Einweisung in die Proteinkristallisation und die Durchführung der kristallographischen Studien.

Dem gesamten Arbeitskreis und allen nicht erwähnten danke ich für die hervorragende freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Ich bedanke mich bei allen meinen Praktikanten, die einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Besonders hervorheben möchte ich hierbei IMKE LEMMER und BÜNYAMIN PEHLIVAN, die durch ihre Praktika und ihren ausgezeichneten Bachelorarbeiten einen besonderen Beitrag zu meiner Arbeit geleistet haben.

Zuletzt möchte ich mich für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion bei meinen Eltern sowie bei meinen Freunden bedanken.

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 5 Nr. 4 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach den gesetzlichen Bestimmungen über die Führung akademischer Grade zur Führung eines Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.

(§ 8 S. 2 Nr. 5 PromO)

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

(§ 8 S. 2 Nr. 7 PromO)

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

(§ 8 S. 2 Nr. 8 PromO)

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

(§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

.....
Ort, Datum, Unterschrift