

Department Chemie
der Technischen Universität München

Monosaccharide als α 4-Integrinantagonisten und oligomere Somatostatinanaloga für die Nuklearmedizin

Armin Modlinger

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauf

Prüfer der Dissertation: Univ.-Prof. Dr. H. Kessler

Univ.-Prof. Dr. A. Türler

Die Dissertation wurde am 27.10.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 07.12.2004 angenommen.

meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München und im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München in der Zeit von Oktober 2000 bis Oktober 2004 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Kessler angefertigt.

Meinem verehrten Lehrer Herrn Professor Kessler danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, das Interesse an meiner Arbeit und seinem mir stets entgegengebrachten Vertrauen. Besonderer Dank gilt neben der Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen der Schaffung eines hervorragenden Arbeitsklimas und seinem enormen Bemühen der Vermittlung einer breiten naturwissenschaftlichen Bildung.

Mein weiterer Dank gilt:

- meinen Laborkollegen Dr. Claudia Dahmen, Dr. Elsa Locardi, Dr. Uli Hersel, Timo Huber, Florian Manzenrieder und Dr. Matthias Stöckle für ein immer gut gelauntes und fröhliches Umfeld,
- Dr. Monika Semmrich, Anja Schuster, Thorsten Poethko und Dr. Daniel Hoyer für die Durchführung von biologischen Untersuchungen,
- Dr. Hans-Jürgen Wester, Timo Weide und Axel Meyer für engagiertes Korrekturlesen von Teilen des Manuskripts
- Johanna Förster, Albert Schröder und insbesondere Mona Wolff für die Durchführung zahlreicher Synthesen und ihrer Leihgaben verschiedenster Laborgeräte,
- Maria Kranawatter für die Unterstützung bei HPLC-Trennungen,
- Burghard Cordes für die reibungslose ESI-MS-Analytik,
- meinen „Praktis“ Christoph, Martin B., Lena, Patrick, Peter, Alexandra, Andrea, Ernst, Sebastian, Tobi, Martin P., Christian und Nathalie für ihre rege Mitarbeit am Arbeitsplatz,
- Rainer Haeßner, Monika Goede, Alex Dehner und Alex Frenzel für ihre Hilfe bei Fragen rund um den Computer, NMR, etc.,
- Den „NMRlern“ Dr. Julien Furrer, Dr. Michael John, Dr. Melina Haupt, Dr. Markus Heller, und v.a. Andreas Enthart für die Hilfe bei 2D-NMR Spektren,
- Bobby, Gábor, Kanti, Niko, Uli, Axel, Flo, Floppi, Clemens, Lukas, und Timo für entspannte sportliche Ertüchtigungen nach der Mittagspause,

- Allen bisher nicht namentlich genannten wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern für das tolle Arbeitsklima.

Besonders danken möchte ich meiner Familie, die mich in während des Studiums und während der vorliegenden Arbeit in allen Belangen unterstützte. Schließlich danke ich Stefanie für ihr entgegengebrachtes Vertrauen und Verständnis sowie ihrem stetem Bemühen mich an andere schöne Dinge neben der Chemie zu erinnern.

ABKÜRZUNGEN

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Å	Ångström, 10^{-10} m
abs.	absolutiert
Ac	Acetyl
ADO	8-Amino-3,6-dioxooctansäure
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination
Ahx	Aminohexansäure
Ar	Aromat
AS	Aminosäure
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
BSA	<i>Bovine Albumin</i> ; Rinderserumalbumin
Bu	Butyl
tBu	<i>tert</i> -Butyl
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CD	<i>Crohn disease</i>
CD49d/CD29	$\alpha 4\beta 1$
CHO	<i>chinese hamster ovarial</i>
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
Col	Kollagen
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CS1-CS5	Peptide aus <i>epitope mapping</i> der IIICS-Region (Fibronectin)
COX	Cyclooxygenase
d	Dublett oder <i>days</i>
DCM	Dichlormethan
δ	chemische Verschiebung
1D, 2D	eindimensional, zweidimensional
DC	Dünnschichtchromatographie/-chromatogramm
dd	Doppeldublett
dest.	destilliert
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EE	Essigsäureethylester

Ep	Epiligrin
Eq	Äquivalent(e)
ESI-MS	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
Et	Ethyl
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fn	Fibronektin
ges.	gesättigt
h	Stunde
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HMQC-COSY	<i>heteronuclear multiple quantum correlation mit COSY-Sequenz</i>
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
HV	Hochvakuum
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
IC	<i>inhibitory capacity</i>
ICAM	<i>intercellular cell adhesion molecules</i>
Ig	<i>immunoglobulin</i>
IgCAM	<i>immunoglobulin cell adhesion molecule</i>
IgSF	<i>immunoglobulin superfamily</i>
ivDde	(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-3-methylbutyl
J	Skalare Kopplungskonstante
IIICS	<i>typeIII connecting segment</i> (Fibronektin)
In	Invasin
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
Ln	Laminin
LPAM	<i>lymphocyte Peyer's patch specific adhesion molecule-1</i> , $\alpha 4\beta 7$ -Integrin
m	Multipllett
M	molar
MAdCAM-1	<i>mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i>
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min.	Minuten
MG	Molgewicht

mL	Milliliter
mmol	millimol
MS	Massenspektrometrie oder Multiple Sklerose
${}^N J_{(XY)}$	skalare Kopplungskonstante zwischen den Kernen X und Y über n Bindungen
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
Opn	Osteopontin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBL	<i>peripheral blood lymphocytes</i>
PET	Positronenemmissionstomographie
Ph	Phenyl
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
rh	recombinant human
ROESY	<i>rotating frame nuclear Overhauser and exchange spectroscopy</i>
R _t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Smp	Schmelzpunkt
SPECT	<i>single photon emission computer tomographie</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
SST(R)	Somatostatin(rezeptor)
t	Triplett
TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TCM	Trichlormethan
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol-Harz
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TMOF	Trimethylorthoformiat
Tn	Tenascin
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TMS	Trimethylsilyl-
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
Trt	Trityl
UC	<i>Colitis ulcerosa</i>

UV	Ultraviolett
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLA	<i>very late activation antigen</i>
VLA-4	$\alpha 4\beta 1$ -Integrin
Vn	Vitronectin
vWF	von Willebrand Faktor
Xaa	beliebige Aminosäure
z	Ladung
δ	chemische Verschiebung

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

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	α4-Integrine als targets in der Medizinischen Chemie	3
2.1	Grundlagen der Medizinischen Chemie	3
2.2	Allgemeine Grundlagen zur biologischen Bedeutung von Integrinen	6
2.3	α 4-Integrinrezeptoren	11
2.4	Natürliche Liganden von α 4-Integrinrezeptoren	13
2.5	Pathologische Bedeutung von α 4-Integrinen	16
2.6	Nichtpeptidische small molecules als α 4-Integrinantagonisten	18
3	Gerüstmetika auf Basis von Monosacchariden	20
4	Synthese und biologische Evaluation von Monosacchariden als α4-Integrinliganden	26
4.1	Bisheriger Kenntnisstand und Ziele	26
4.2	Synthese von Glycosiden	29
4.2.1	Synthesen von in 1-, 2- und 6-Stellung selektiv substituierbaren Glucosederivaten	31
4.2.2	Synthese von β -Glycosiden	34
4.2.3	Synthese von α -Glycosiden	38
4.2.4	Synthese von C-Glycosiden	40
4.2.5	Synthese von Mannosederivaten	41
4.3	Biologische Evaluation	44
4.3.1	Zelladhäsionsassay - Allgemeine Testbedingungen	44
4.3.2	Biologische Evaluation und Diskussion der synthetisierten Monosaccharide	45
4.3.3	Kritische Betrachtung von Zell-Adhäsionsassays	49
5	Somatostatinrezeptoren als Zielstrukturen für Tumorimaging und –Therapie	51
5.1	Bildgebung und Therapie von Tumoren	51
5.2	Methoden zur Radiomarkierung	54
5.3	Somatostatin	57
5.4	Somatostatinrezeptoren und ihre Funktion	57
5.5	Somatostatinanaloga in der Krebsdiagnose und –therapie	59
6	Synthese oligomerer Somatostatinanaloga für die Tumordiagnostik	62
6.1	Theorie multivalenter Wechselwirkungen	62
6.2	Grundlagen der Peptidsynthese	64
6.3	Synthesestrategie	68
6.4	Synthese der oligomeren Somatostatin-Analoga	72
6.5	Biologische Evaluation der oligomeren Somatostatin-Analoga	77
7	DOTA-Derivate für chemoselektive Synthesen	81
8	Zusammenfassung	84
9	Experimenteller Teil	87
9.1	Material und Methoden	87
9.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	89

9.3	Synthese von Monosacchariden als α 4-Integrinantagonisten.....	95
9.3.1	Synthese von Alkylierungsreagentien.....	95
9.3.2	Synthese von Monosacchariden.....	96
9.4	Allgemeine Arbeitsvorschriften für Adhäsionsassays mit α 4-Integrin exprimierenden Zellen.....	135
9.5	Synthese von oligomeren SST-Analoga.....	137
9.5.1	Synthese der Bausteine.....	137
9.6	Synthese von DOTA-Derivaten.....	141
10	Anhang.....	146
11	Literatur.....	147

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Mit seinem Leitsatz „*corpora non agunt nisi fixata*“ aus der Rezeptortheorie und seinen grundlegenden Beiträgen für die Entwicklung der Chemotherapie war der ausgebildete Mediziner und leidenschaftliche Chemiker Paul Ehrlich zu Beginn des letzten Jahrhunderts einer der wichtigsten Wegbereiter für ein rationales Design von Arzneimitteln. Das von ihm entwickelte erste Chemotherapeutikum Salvarsan[®] gegen Syphilis wurde sehr schnell als „Zauberkegel“ („*magic bullet*“ gilt heute als Synonym für Substanzen mit „Blockbuster“-Potential) zum Wundermittel in der Behandlung dieser Krankheit. Zudem war ihm schon damals die Bedeutung der Pharmakokinetik in Bezug auf die Wirksamkeit von Arzneien klar. Er stellte fest, dass Parameter wie Lipophilie, Hydrophilie und Säure- und Baseneigenschaften über das Verhalten im Körper entscheiden und beschrieb als erster die Blut-Hirn-Schranke im lebenden Organismus.^[1] Bis heute werden solche Parameter, unter denen Lipinskis „*rule of five*“^[2] gegenwärtig wohl die bekannteste darstellt, für die Wirkstoffsuche optimiert, woraus wiederum neue Leitlinien resultieren.

Besonders in den letzten drei Jahrzehnten wurden zahlreiche Methoden zur Beschleunigung des Wirkstoffentwicklungsprozesses beschrieben. Die Suche nach Wirkstoffen zur Modulation von Protein-Protein Wechselwirkungen beginnt in der Regel mit dem Identifizieren einer essentiellen Bindungssequenz innerhalb des Proteinliganden. Dazu kommen Methoden wie Mutationsstudien, *phage display* oder *epitope mapping* zum Einsatz. Zu den wichtigsten Methoden zur Optimierung von Liganden zählen sicher die kombinatorische Festphasensynthese zusammen mit dem *High-throughput Screening* zur schnellen biologischen Testung und ferner *in-silico* Methoden für die Optimierung und für das Design von Liganden bei Kenntnis der Struktur des *targets*. Erfolge können nur aus gemeinsamen Anstrengungen von Medizinern, Chemikern, Pharmakologen, Biologen etc. resultieren, was die Interdisziplinarität der Medizinischen Chemie unterstreicht. In den Anfängen der kombinatorischen Chemie glaubte man durch eine simple Erhöhung der Zahl von Testsubstanzen eine hohe Trefferanzahl zu erzielen, was jedoch zu vielen lipophilen unspezifisch bindenden Verbindungen führte. So werden bei sogenannten *biased libraries* bereits existierende Informationen des *targets* oder Informationen aus bereits aktiven Verbindungen bei dem Design einer neuen Bibliothek berücksichtigt, um die Anzahl der zu synthetisierenden Verbindungen handhabbar zu halten.

Neben der Chirurgie stellt die Therapie mit radioaktiver Strahlung eine wichtige Säule zur Behandlung von Krebserkrankungen dar. Die klassische systemische Chemotherapie hat

insbesondere bei soliden Tumoren nicht zu befriedigenden klinischen Ergebnissen geführt. Dabei liegt die besondere Schwierigkeit darin, effiziente Konzentrationen der pharmazeutischen Substanzen im Tumorgewebe zu erreichen, ohne Normalgewebe zu schädigen. Daher wurden intensive Anstrengungen unternommen, um Zielstrukturen im Tumorgewebe zu identifizieren und Substanzen zu entwickeln, welche spezifisch an diese binden, um eine lokale Therapie durchzuführen. Die endogene Radionuklidtherapie basiert auf dem Einsatz von radioaktiv markierten Molekülen, die sich gezielt im Tumorgewebe anreichern sollen, um dort hohe Strahlendosen zu erreichen. Mit einem verbessertem Verständnis von Antigen- und Rezeptorexpression kann dieses Konzept auf eine Vielzahl onkologischer Krankheiten übertragen werden. Die Herausforderung des Chemikers in dieser interdisziplinären Aufgabenstellung besteht darin, Substanzen mit hoher Tumoranreicherung zu synthetisieren und anschließend elegante Wege zur Radiomarkierung zu erschließen.

In der vorliegenden Arbeit sollen Mini-Bibliotheken von derivatisierten Monosacchariden in Lösung synthetisiert werden und auf ihre Eignung als $\alpha 4$ -Integrinantagonisten evaluiert werden. $\alpha 4$ -Integrine spielen zusammen mit ihren endogenen Liganden MAdCAM-1, VCAM-1 und Fibronektin eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung und Funktion des Immunsystems und sind an zahlreichen Autoimmunerkrankungen, chronischen Entzündungen oder Allergien beteiligt. Aufbauend auf den Ansatz von Dr. J. Boer, der ein biologisch aktives β -Mannosid als Mimetikum der tripeptidischen Erkennungssequenz LDT für $\alpha 4$ -Integrine fand, sollen vorwiegend Glucosederivate und metabolisch stabilere C-Glycoside und -Mannoside mit eventuell besseren pharmakologischen Profil entwickelt werden. Es werden möglichst effiziente Synthesestrategien für selektiv substituierbare Glucosederivate ausgearbeitet und durch Betrachtung der biologischen Eigenschaften schließlich Aussagen zur Struktur-Wirkungsbeziehung gemacht.

In einem zweiten unabhängigen Teil der Arbeit werden die Synthese und die biologische Evaluation von oligomeren Somatostatinanaloga, die zusätzlich für eine einfache Radiomarkierung geeignet sind, vorgestellt. Diese sollen im Idealfall zu einer verbesserten Tumoranreicherung führen und als mögliche Substanzen zum Einsatz in der Radiodiagnostik und -therapie dienen. Außerdem sollen Synthesewege zu neuartigen Chelatoren für Radionuklide erschlossen werden, welche die Einführung der Chelatoren über chemoselektive Methoden erlaubt.

2 α 4-INTEGRINE ALS TARGETS IN DER MEDIZINISCHEN CHEMIE

2.1 Grundlagen der Medizinischen Chemie

Die Medizinische Chemie beschreibt ein modernes und multidisziplinäres Forschungsgebiet, welches die Entdeckung und Herstellung von biologisch aktiven Substanzen, die letztendlich zu Medikamenten führen sollen, zum Ziel hat. Außerdem beinhaltet sie die Erforschung der molekularen Wirkungsweise und des Metabolismus von Wirkstoffen. Aufgrund der komplexen Thematik des Arbeitsgebiets soll im Folgenden nur auf einige für die vorliegende Arbeit wichtige Aspekte wie Leitstrukturfindung und -optimierung eingegangen werden.

Eine Leitstruktur besitzt bereits eine gewünschte biologische Wirkung, die z.B. durch *in vitro* Testsysteme nachgewiesen wurde. Neben dieser biologischen Aktivität wird eine gefundene Leitverbindung meist noch unerwünschte Eigenschaften wie Toxizität, schlechte Löslichkeit, mangelnde Selektivität etc. aufweisen. In einem iterativen Prozess aus chemischer Synthese und biologischer Testung sollen anschließend gewünschte Eigenschaften optimiert und Nebenwirkungen minimiert werden.

Mit der Etablierung der kombinatorischen Chemie und dem *High-Throughput-Screening* (HTS) verlagerte man die Wirkstoffsuche vom Tiermodell zunehmend auf *target* orientierte *in vitro* Modelle. Durch einfaches Erhöhen der Zahl an synthetisierten und biologisch evaluierten Verbindungen hoffte man rasch eine Vielzahl neuer Medikamente zu finden. Erste Generationen von erzeugten kombinatorischen Bibliotheken enthielten meist große und lipophile, z.T. biologisch aktive aber pharmakologisch ungünstige Moleküle. Aus dieser Erfahrung heraus wird nun bereits bei dem Design von Bibliotheken versucht, Medikamenten-ähnliche Verbindungen (*drug-like molecules*), welche potentiell oral verfügbar sind, zu generieren.^[3] Die Faktoren, die das pharmakologische Profil eines Wirkstoffes ausmachen, werden unter dem Begriff ADME-Parameter zusammengefasst. Sie beschreiben die Aufnahme einer Substanz (**A**bsorption), ihre Verteilung im Körper (**D**istribution), sowie den Abbau insbesondere in der Leber (**M**etabolismus) und die Ausscheidung vor allem über Niere und/oder Darm (**E**liminierung). Häufig werden sie durch **T** - die Toxizität- ergänzt. Um diese Parameter zu beschreiben, werden verschiedenste

Methoden vom simplen Abzählen von Wasserstoff-Donatoren und -Akzeptoren bis hin zu ihrer Berechnung mittels komplexer neuronaler Netzwerke, verwendet.^[4]

Damit ein Wirkstoff seinen Wirkort erreichen kann, muss er sowohl mit einer wässrigen Umgebung (z.B. Cytoplasma) als auch mit einer lipophilen Umgebung (z.B. Membran) wechselwirken können. Viele quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen zeigen daher einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Lipophilie einer Verbindung und deren biologischer Wirkung. Zur Beschreibung der Lipophilie hat sich der von Hansch *et al.* vorgeschlagene Verteilungskoeffizient P (*partition coefficient*) zwischen 1-Octanol und Wasser als geeignet erwiesen.^[5, 6]

$$P = \frac{[\text{Verbindung}]_{\text{Octanol}}}{[\text{Verbindung}]_{\text{Wasser}} \cdot (1 - \alpha)} \quad \alpha: \text{Dissoziationsgrad der Verbindung in Wasser}$$

Verbindungen mit $P > 1$ und somit positivem $\log P$ sind in 1-Octanol besser löslich. Die Beiträge einzelner Teile eines Moleküls zum Verteilungskoeffizienten verhalten sich additiv, wodurch die Berechnung bzw. theoretische Abschätzung des $\log P$ -Wertes einer Verbindung als sehr brauchbare Alternative zur experimentellen Bestimmung ermöglicht wird. Diese Funktion ist in einigen Chemie-Software-Programmen bereits implementiert.^[7]

Lipinski *et al.* von der Firma *Pfizer Inc.* untersuchten 2245 oral bioverfügbare Wirkstoffe auf verschiedene Parameter, die für das Absorptionsverhalten von Bedeutung sind.^[2] Die als „*Pfizer's bzw. Lipinski's Rule of Five*“ bekannt gewordenen folgenden Eigenschaften trafen auf ca. 90 % der analysierten Verbindungen zu:

- $\log P < 5$
- Anzahl der Wasserstoff-Donoren < 5
- Anzahl der Wasserstoff-Akzeptoren < 10 (= 2 x 5)
- Molekulargewicht < 500 g/mol (= 100 x 5)
- eine der vier vorgenannten Regeln kann verletzt sein.

Trotz der Verletzung der ‚*Rule of Five*‘ waren jedoch viele Antibiotika, Fungizide, Vitamine und herzwirksame Glykoside oral bioverfügbar. Ein sehr bekanntes Beispiel ist das Immunsuppressivum Cyclosporin, welches gegen jede dieser Regeln verstößt aber gut oral bioverfügbar ist. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass diese Moleküle Substrate für biologische Transportsysteme darstellen.^[8] Die Regeln stellen somit lediglich einige notwendige, jedoch keineswegs hinreichende Bedingungen für die Entwicklung von

drug like molecules dar. Weitere Eigenschaften, welche die orale Bioverfügbarkeit beeinflussen sind u.a. Größe der polaren Oberfläche des Moleküls,^[9] VolSurf Parameter^[10] und Anzahl der flexiblen Bindungen.^[11] Außerdem ist man ständig bestrebt die Regeln und die Herangehensweise zu einer möglichst effizienten Arzneimittelentwicklung zu optimieren. Ein neuerer Ansatz ist beispielsweise das Generieren von Bibliotheken von Verbindungen geringerer Molekülmasse (bis zu 300 g/mol), geringerer Lipophilie ($\log P < 3$), mit bis zu drei rotierbaren Bindungen und einer höheren Bindungseffizienz (höhere durchschnittliche Bindungsenergie der Verbindung pro Atom). Dies führt die Autoren zu einer „*rule of three*“ und impliziert den Aufbau von so genannten *fragment based* Bibliotheken.^[12]

Anhand der dieser Regeln lassen sich jedoch kaum Aussagen über die metabolische Stabilität der Verbindungen ableiten. Normalerweise werden fremde, in den Körper eindringende Moleküle (Xenobiotika) vom Immunsystem durch Antikörperbildung bekämpft. Kleine Fremdmoleküle lösen in der Regel jedoch keine Antikörperreaktion aus, weshalb der Körper zum Schutz vor diesen Umweltgiften einen anderen Mechanismus entwickelt hat. Sie werden durch unspezifische Enzyme in polare Verbindungen umgewandelt und können so anschließend ausgeschieden werden (Metabolismus). Da der Körper nicht zwischen Umweltgift und Medikament unterscheiden kann, werden auch Wirkstoffe durch enzymatische Biotransformationen abgebaut (Wirkstoffmetabolismus). In Abhängigkeit von der Applikationsform gibt es verschiedene Möglichkeiten für die Metabolisierung eines Arzneimittels. Der Weg eines Arzneimittels nach oraler Einnahme, der häufigsten und einfachsten Form der Applikation, ist in Abb. 2.1 dargestellt. Dabei wird der Wirkstoff über die Schleimhaut des Magens oder des Dünndarms aufgenommen (**A**bsorption). Aus dem Magen-Darm-Trakt wird er im Blutstrom zur Leber transportiert, in der er normalerweise zum ersten Mal metabolisiert wird (**M**etabolismus), was man auch als *first pass*-Effekt bezeichnet. Dieser gewinnt vor allem bei lipophilen Wirkstoffen und Substanzen mit einem Molekulargewicht über 500 g/mol an Bedeutung. Über den Blutkreislauf werden das Arzneimittel und seine Metaboliten im Körper verteilt (**D**istribution). Bei der Metabolisierung werden die Substanzen in der Regel in polare Substanzen umgewandelt und über die Niere (renal) ausgeschieden (**E**liminierung).^[13]

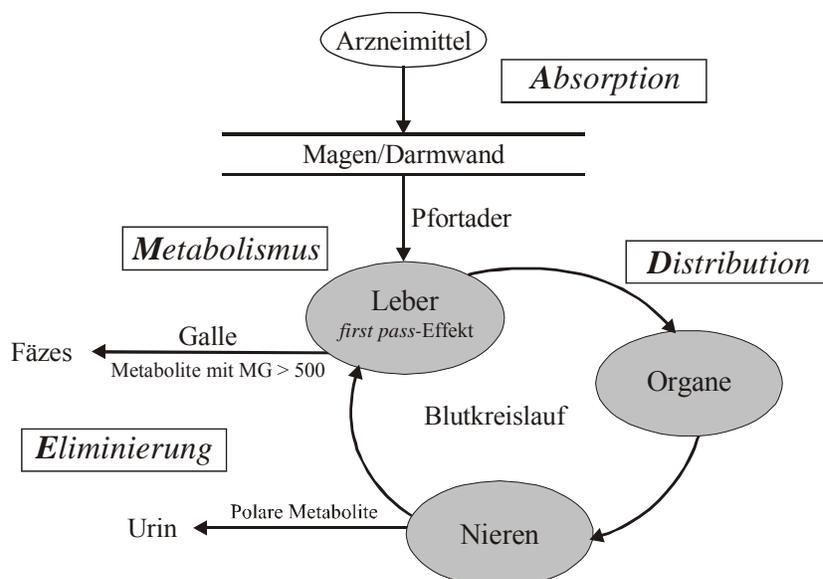


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Metabolisierung eines Arzneimittels nach oraler Gabe.

2.2 Allgemeine Grundlagen zur biologischen Bedeutung von Integrinen

Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen werden durch Zelladhäsionsrezeptoren vermittelt, die sich in vier verschiedene Klassen einteilen lassen: Cadherine, Selektine, Immunoglobulin-Superfamilie und Integrine. Letztere ist dabei die größte und vielseitigste Rezeptorklasse. Der Begriff „Integrin“ wurde erstmals von Hynes *et al.* verwendet, um eine Familie strukturell, immunochemisch und funktionell ähnlicher Oberflächenrezeptoren zu beschreiben. Sie integrieren durch die Zellmembran hindurch in fokalen Adhäsionskomplexen das Cytoskelett der Zelle in das Gerüst der extrazellulären Matrix.^[14, 15] Auf einer Zelle befinden sich typischerweise ca. 100 000 Integrine, bevorzugt in cholesterinreichen Bereichen, den sogenannten *rafts*.^[16, 17]

Integrine sind transmembrane Glykoproteine, die in eine Vielzahl von biologischen Prozessen, wie beispielsweise Wundheilung,^[18] Embryogenese^[19] oder Immunantworten^[20] involviert sind. Sie dienen neben der Verankerung der Zellen zur Signalübertragung über die Plasmamembran in beiden Richtungen. Ihre Beteiligung an pathologischen Prozessen wie tumorinduzierter Angiogenese,^[21] Tumormetastasierung,^[22] Thrombose,^[23] Osteoporose^[24] oder akutem Nierenversagen^[25] macht sie zu viel versprechenden *targets* in der Medizinischen Chemie.

Seit ihrer Entdeckung im Jahr 1987 sind sie mittlerweile zu den am besten verstandenen Zelladhäsionsrezeptoren geworden. Sie setzen sich aus nicht kovalent verbrückten α - und β -Untereinheiten zusammen, die je eine große extrazelluläre Domäne, eine Transmembranhelix und eine kleine intrazelluläre Domäne pro Untereinheit enthalten.^[26] Gegenwärtig ist die Existenz von 18 α - und 8 β -Untereinheiten, die zusammen 24 verschiedene Heterodimere ausbilden, gesichert. Die größere α -Untereinheit besitzt ca. 1100 Aminosäuren und ist häufig aus zwei über Disulfidbrücken verknüpften Ketten aufgebaut. Die kleinere β -Untereinheit bestehend aus ca. 800 Aminosäuren (Ausnahme β 4 mit ca. 1750 Aminosäuren) enthält u.a. vier hochkonservierte cysteinreiche Domänen nahe der transmembranen Region. Die Verankerung mit dem Cytoskelett über α -Actin und Talin geschieht mit Ausnahme der β 4-Untereinheit mit der cytoplasmatischen Region von β -Untereinheiten. Eine Darstellung der einzelnen Integrine mit ihren bekannten Liganden findet sich in Tabelle 2.1.

Tab. 2.1: Darstellung der bekannten Kombinationen aus α - und β -Untereinheit und ihre natürlichen Liganden.^[27-29] Grau hinterlegte Felder kennzeichnen Integrine mit RGD-abhängiger Ligand-Bindung.^[30, 31]

	β 1	β 2	β 3	β 4	β 5	β 6	β 7	β 8
α 1	Col, Ln							
α 2	Col, Ln, Fn							
α 3	Col, Ln5, Fn							
α 4	Fn, In, VCAM-1						MAdCAM-1, VCAM-1, Fn	
α 5	Fn							
α 6	Ln			Ln, Ep				
α 7	Ln							
α 8	Fn, Vn, Tn							
α 9	Col, Ln, Tn, VCAM-1							
α 10	Col							
α 11	Col							
α E							E-Cadherin	
α L		ICAM-1, ICAM-2						
α M		iC3b, Fb, Faktor X, ICAM-1, ICAM-2						
α X		iC3b, Fb						
α D		ICAM-3, VCAM-1						
α IIb			Fb, Fn, Vn, vWF, Tsp					
α v	Vn, Fn, Opn		Vn, Ln, Fn, vWF, Tsp Tn, Opn, Fib, Fbu		Vn, Fn, Opn, Fb, vWF	Fn, Fb, Tn		Vn

Abkürzungen der Integrinliganden: Col = Kollagen; Ep = Epiligrin; Faktor X = Blutgerinnungsfaktor X; Fb = Fibrinogen; Fbu = Fibulin; Fib = Fibrillin; Fn = Fibronectin; iC3b = *inactivate complement factor 3b*; ICAM = *intercellular adhesion molecule* (Isoformen von ICAM sind durch eine Nummer spezifiziert); In = Invasin; Ln = Laminin (Isoformen von Laminin sind durch eine Nummer spezifiziert); MAdCAM = *mucosal adressing cell adhesion molecule*; Opn = Osteopontin; Tn = Tenascin; Tsp = Thrombospondin; VCAM = *vascular cell adhesion molecule*; Vn = Vitronectin; vWF = von Willebrand Faktor.

Jedes der aufgeführten Integrine scheint eine spezifische, nicht-redundante Funktion im Organismus zu erfüllen. Dies lässt sich z. T. aus den Ligandenspezifitäten ableiten und ist durch Beobachtung von Phänotypen von *knockout*-Mäusen gezeigt worden.^[32]

Bislang ist unter den Integrinen lediglich die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von $\alpha v \beta 3$ gelöst.^[33] Außerdem wurden kürzlich Strukturmodelle des $\alpha v \beta 5$ -^[34] und des $\alpha IIb \beta 3$ -Integrins vorgestellt,^[35] die durch Homologie-Modelling basierend auf der erwähnten Kristallstruktur und *docking* Studien von selektiven Liganden erhalten wurden.

Wie in Abbildung 2.2 gezeigt, konnten durch die Kristallstruktur charakteristische Struktur motive zugeordnet werden. Die Kopfgruppe der α -Untereinheit besteht aus einem siebenblättrigen β -Propeller. An diese schließt sich eine Stelzenregion („*stalk*“-Region) an, die von drei linear angeordneten β -Faltblättern gebildet wird. Die Kopfgruppe der β -Untereinheit setzt sich aus der βI -Domäne und einer Immunoglobulin(Ig)-ähnlichen „Hybrid“-Domäne zusammen. Auf der βI -Domäne befindet sich zudem die MIDAS (*metal ion dependent adhesion site*)-Region, welche zusammen mit Teilen des β -Propellers der α -Untereinheit die Bindungsstelle für Liganden darstellt.^[33] Die Bindung der Liganden hängt von der Anwesenheit zweiwertiger Metallkationen ab. Im Allgemeinen verstärken Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen die Affinität zum Liganden, wohingegen Ca^{2+} -Ionen einen gegenteiligen Effekt hervorrufen.^[36] Der Zusammenhalt der Kopfgruppen der α - und β -Untereinheit wird u.a. durch Kationen- π -Kontakte gewährleistet, indem eine Guanidiniumgruppe eines Arginins der βI -Domäne in den von aromatischen Resten umgebenen zentralen Hohlraum des Propellers der α -Untereinheit hineinragt.

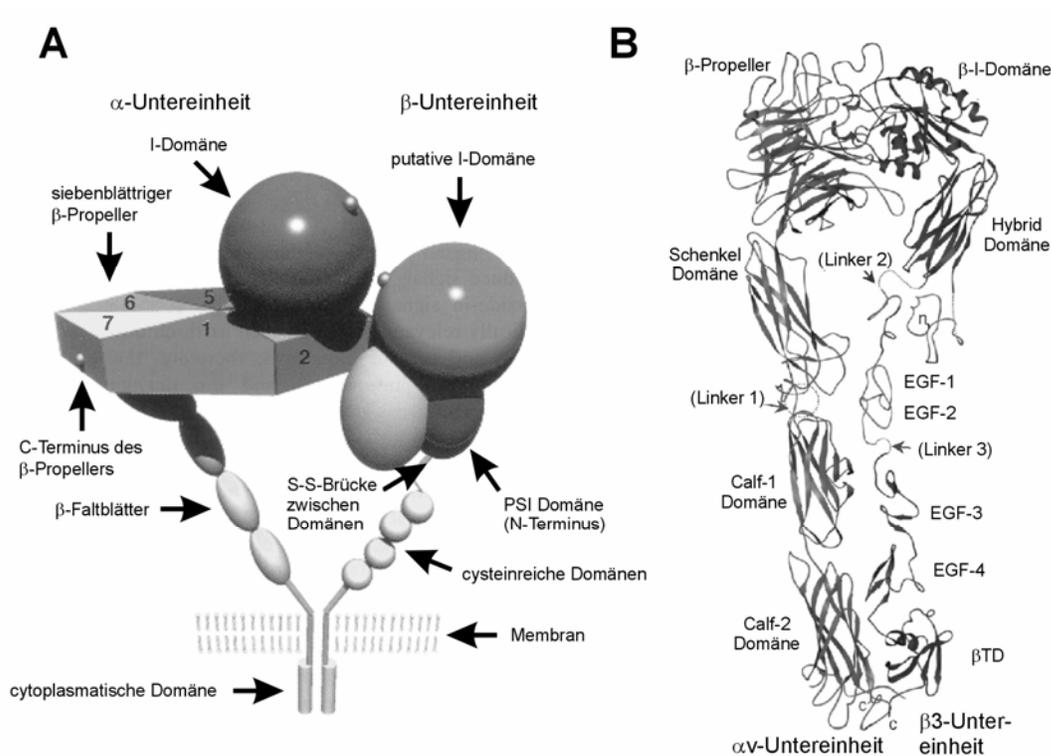


Abb. 2.2: A) Schematische Darstellung des Aufbaus der Integrine. Die α -Untereinheit enthält einen siebenblättrigen β -Propeller und meist eine I-Domäne, die auch für die β -Untereinheit postuliert wird.^[37] B) Korrigierte Kristallstruktur des extrazellulären Teils von $\alpha v \beta 3$ mit 4 Domänen der α -Untereinheit und 8 Domänen der β -Untereinheit. Die αv -Untereinheit weist keine I-Domäne auf.^[33]

Die Kenntnis der Kristallstruktur erlaubte weitere Rückschlüsse auf den Mechanismus der Integrin vermittelten Signaltransduktion. In einem postulierten dreistufigen Mechanismus bewirkt eine durch ein intrazelluläres Signal ausgelöste Verdrehung der α - und β -Untereinheit einen Übergang vom niedrigaffinen in einen ligandenbindenden Zustand. Die Bindung eines Liganden induziert anschließend eine scherenartige Bewegung der beiden Untereinheiten was schließlich zur Trennung der Kopfgruppen führt.^[38, 39] In Anlehnung an die geknickte Form der Kristallstruktur und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wird auch ein sog. „Klappmessermodell“ für den Mechanismus der Konformationsänderung und Signaltransduktion diskutiert.^[40]

Die Integrine können mehr oder weniger selektiv mit verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM), Zelladhäsionsproteinen (*cell adhesion molecules*, CAMs) Zelloberflächen- und Plasmaproteinen (z.B. Laminin, Fibronectin oder Vitronectin)

interagieren, was zu einer Funktion gewebespezifischer Rezeptoren führt. Die meisten Integrine erkennen in ihren Liganden die für die Bindung essentiellen Tripeptidsequenzen RGD (v.a. α v-Integrine) oder LDV. Während die meisten ECM-Proteine das RGD-Motiv in invarianter Form tragen, ist das LDV-Motiv variabel. So erkennen beispielsweise die Leukozytenintegrine α 4 β 7 und α 4 β 1 LDVP in Fibronectin (Fn), IDSP in der N-terminalen Domäne von *vascular cell adhesion molecule-1*(VCAM) und LDTS in *mucosal addressin cell adhesion molecule-1*(MAdCAM-1).^[31]

Allen an Integrine bindenden Peptidsequenzen ist eine darin enthaltene Aminosäure mit saurer Seitenkette (Asp oder Glu) gemeinsam. Diese für die Rezeptorbindung essentielle Tatsache lässt sich anhand der Kristallstruktur des an c[RGDf(NMe)V] gebundenen α v β 3-Integrins verstehen. Die Carboxylatseitenkette komplexiert ein zweiwertiges Kation der MIDAS-region in der β -Untereinheit.^[41] Eine entsprechende MIDAS-Region findet sich auch in der Ligandenbindungsstelle der Integrine mit α I-Domäne.^[37]

2.3 α 4-Integrinrezeptoren

Die Gruppe der α 4-Integrine umfasst zwei Rezeptoren: α 4 β 1-(VLA-4, CD49d/CD29) und α 4 β 7 (LPAM-1). Zusammen mit dem α E β 7-Integrin und den Leukocytenintegrinen (α L β 2, α M β 2, α d β 2 und α X β 2) sind sie vor allem auf den Zellen des Immunsystems exprimiert.^[42, 43]

Im Immunsystem spielt die Extravasation (=Austreten von Körperflüssigkeit aus einem Gefäß in das benachbarte Gewebe) von Leukocyten eine entscheidende Rolle. Sie ermöglicht den Leukozyten sich in Infektionsherden anzusammeln und Abwehrreaktionen durchzuführen. Die Extravasation setzt sich aus verschiedenen Schritten wie *Rollen*, Adhäsion und schließlich Migration durch die Endothelschicht zusammen (s. Abb. 2.3). Die ersten Kontakte (*tethering*) (1) zwischen Leukocyten und den Endothelzellen kommen durch Glycoprotein-, L-Selektin- und z.T. durch Integrin- vermittelte Wechselwirkungen mit den auf Endothelzellen durch Entzündung verstärkt exprimierten E- und P-Selektinen oder CAMs zustande. Dies führt zu einer Abnahme der Geschwindigkeit von zirkulierenden Leukocyten und ermöglicht es ihnen die Blutgefäße nach proadhäsiven Faktoren zu „durchsuchen“.

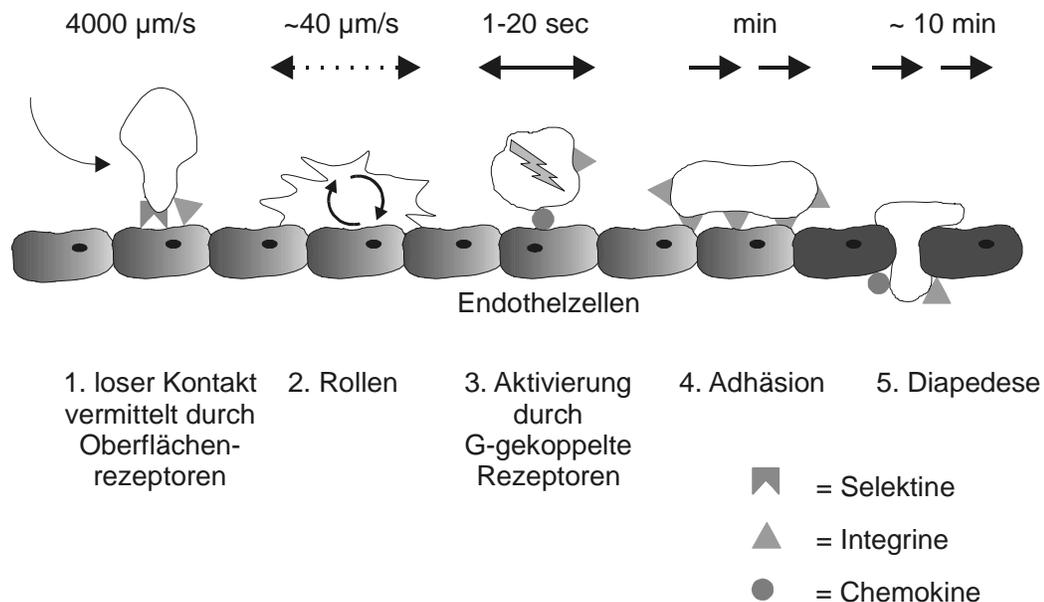


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der schrittweisen Extravasation von Leukozyten.

Durch Kontakt mit Signalstoffen auf der Endotheloberfläche, wie z.B. den Chemokinen, wird die Aktivierung von Integrinen auf der Leukozytenoberfläche stimuliert, die dann die effiziente Bindung dieser Zellen an die Endotheloberfläche vermitteln (4. Adhäsion).^[44] Als Liganden der Integrine fungieren Mitglieder der Immunglobulin (Ig) Superfamilie. Die nun stabil adhärierenden Leukozyten können sich gezielt fortbewegen und schließlich aktiv durch die Endothelzellschicht hindurchwandern.

In jedem der gezeigten Schritte kann das sogenannte *homing* (=erreichen des spezifischen Bestimmungsorts) reguliert werden. Im Gegensatz zu den Selektinen können α 4-Integrine sowohl am *tethering* als auch an der Adhäsion der Leukozyten an das Endothel beteiligt sein.

Obwohl die α 4-Integrine an verschiedene Proteine binden, geht man davon aus, dass die für Autoimmunkrankheiten wesentliche Ursache in der Wechselwirkung mit VCAM-1 und MAdCAM-1 liegt. Die stark unterschiedlichen Expressionsprofile dieser Proteine in entzündetem Gewebe sprechen stark für diese Interpretationen. So wird erhöhte MAdCAM-1 Expression im gastrointestinalen Trakt mit der Crohn Krankheit, *colitis ulcerosa* und Hepatitis C^[45, 46] sowie erhöhte VCAM-1 Expression mit Asthma,^[47] Multipler Sklerosis oder Rheuma^[48] in Verbindung gebracht.

Die α 4-Integrinuntereinheit wird an der Zelloberfläche als 155 kDa Protein exprimiert. Durch Aktivierung der T-Lymphocyten kann diese Integrinuntereinheit zwischen Arg558 und

Ser559 gespalten werden, was jedoch die Bindung der Liganden VACM-1 und Fibronectin nicht beeinträchtigt.^[49]

α 4 β 1-Integrine (VLA-4, CD49d/CD29) werden auf Lymphocyten und anderen Leukocyten exprimiert. Die Familie der β 1-Integrine wird auch als *very late antigens* (VLA) bezeichnet, da sie erst nach einer Verzögerung auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Wie die meisten Integrine kommt das α 4 β 1-Integrin in einem hoch aktivierten (*high affinity*) und einem niedrig (*low affinity*) aktivierten Zustand vor. Man nimmt an, dass zunächst ein durch Chemokine ausgelöstes Integrincluster eine multivalente VCAM-1/ α 4 β 1 Wechselwirkung induziert. Daran schließt sich eine Konformationsänderung zum *high affinity* Zustand an.^[50] Für die biologische Evaluierung von α 4 β 1-Liganden ist es wichtig, dass auch durch zweiwertige Kationen (Mn^{2+}) diese Zustandsänderung hervorgerufen werden kann und somit eine Verbindung unter Mn^{2+} -Aktivierung eine höhere Aktivität als unter Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -aktivierten Bedingungen zeigt.^[51]

α 4 β 7-Integrine werden häufig auch als LPAM-1 bezeichnet (*lymphocyte Peyer's patch specific adhesion molecule*), da sie das *homing* α 4 β 7-Integrin-exprimierender Leukocyten an Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe steuern. In erwachsenen Menschen werden α 4 β 7-Integrine unterschiedlich stark auf T- und B-Zellen exprimiert. Wie β 7-*knockout* Mäuse zeigten, sind β 7-Integrine für die Bildung und den Erhalt des mucosa lymphatischen Gewebes essentiell.^[52] Die zielgerichtete Wanderung von Leukocyten in dieses Gewebe beruht zu einem Großteil auf der Wechselwirkung zwischen α 4 β 7-Integrinen und MAdCAM-1.

2.4 Natürliche Liganden von α 4-Integrinrezeptoren

α 4-Integrine binden an Fibronectin (Fn), Invasin (In), *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und MAdCAM, sowie an das N-terminale Fragment von Osteopontin (Opn).^[53, 54] An Fn wurde erstmalig entdeckt, dass Integrine in extrazellulären Matrixproteinen die Tripeptidsequenz RGD erkennen.^[55] Für α 4 β 1-Integrine ist die minimale Erkennungssequenz von Fn die Tripeptidsequenz LDV, welche in humanem, Rinder-, Ratten und Hühner-Fibronectin sehr stark konserviert ist.^[56]

Die transmembranen Glykoproteine *Vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und *mucosal addressin cell adhesion molecule-1* (MAdCAM-1) gehören zusammen mit ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3 in die integrinbindende Untergruppe der *immunoglobulin superfamily* (IgSF)-Rezeptoren (Abb. 2.5).^[43] VCAM und MAdCAM werden normalerweise im

Gastrointestinalen Trakt exprimiert. Während MAdCAM ausschließlich im Darm zu finden ist,^[57] wird VCAM auch in den peripheren Organen exprimiert.^[18]

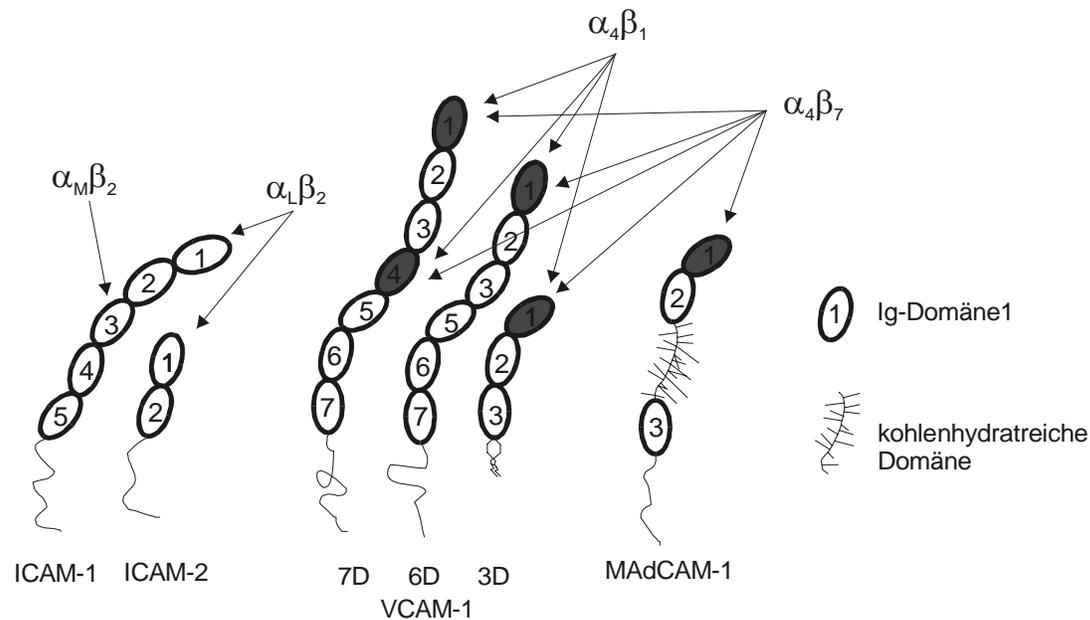


Abb. 2.4: Domänenstruktur der IgSF-Adhäsionsrezeptoren. Domänen, die mit $\alpha 4$ -Integrinen wechselwirken, sind dunkel hervorgehoben.

Wie aus Abb. 2.4 ersichtlich, ist VCAM sowohl ein Ligand für $\alpha 4\beta 1$ - als auch für $\alpha 4\beta 7$ -Integrine, während MAdCAM selektiv an das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin bindet. Daneben sind auch Wechselwirkungen von MAdCAM mit dem L-Selektin bekannt. Aufgrund der letzteren beiden Bindungen, die für das *lymphocyte homing* wichtig sind, wird MAdCAM häufig auch als *lymphocyte homing factor* bezeichnet.^[43]

Mittels Mutagenese-Studien wurden die D1 Domänen und die D4 Domäne in 7D-VCAM^[58] als Bindungsstellen für $\alpha 4$ -Integrine identifiziert.^[59, 60] Diese Studien zeigten, dass MAdCAM und VCAM jeweils einen kritischen Aspartatrest innerhalb der Erkennungssequenzen (QIDSP in VCAM, LDT in MAdCAM) enthalten. Die Selektivität von MAdCAM für $\alpha 4\beta 7$ -Integrine könnte in der D2 Domäne begründet sein: Ein Hybrid-Protein aus MAdCAMs D2 Domäne und VCAMs D1 Domäne zeigte ebenfalls eine selektive Anbindung an $\alpha 4\beta 7$ -Integrine.^[61]

Die sehr ähnlichen Kristallstrukturen von zwei extrazellulären, N-terminalen Ig-Domänen D1 und D2 von VCAM^[62, 63] (Abb. 2.5) und MAdCAM^[64, 65] (Abb. 2.6) zeigen typische Ig-Faltungsmerkmale. So besteht jede Ig Domäne aus sieben β -Strängen, die mit A bis G

bezeichnet werden. Die beiden β -Faltblätter ABE und CDFG sind über eine Disulfidbrücke zwischen B und F miteinander verknüpft.

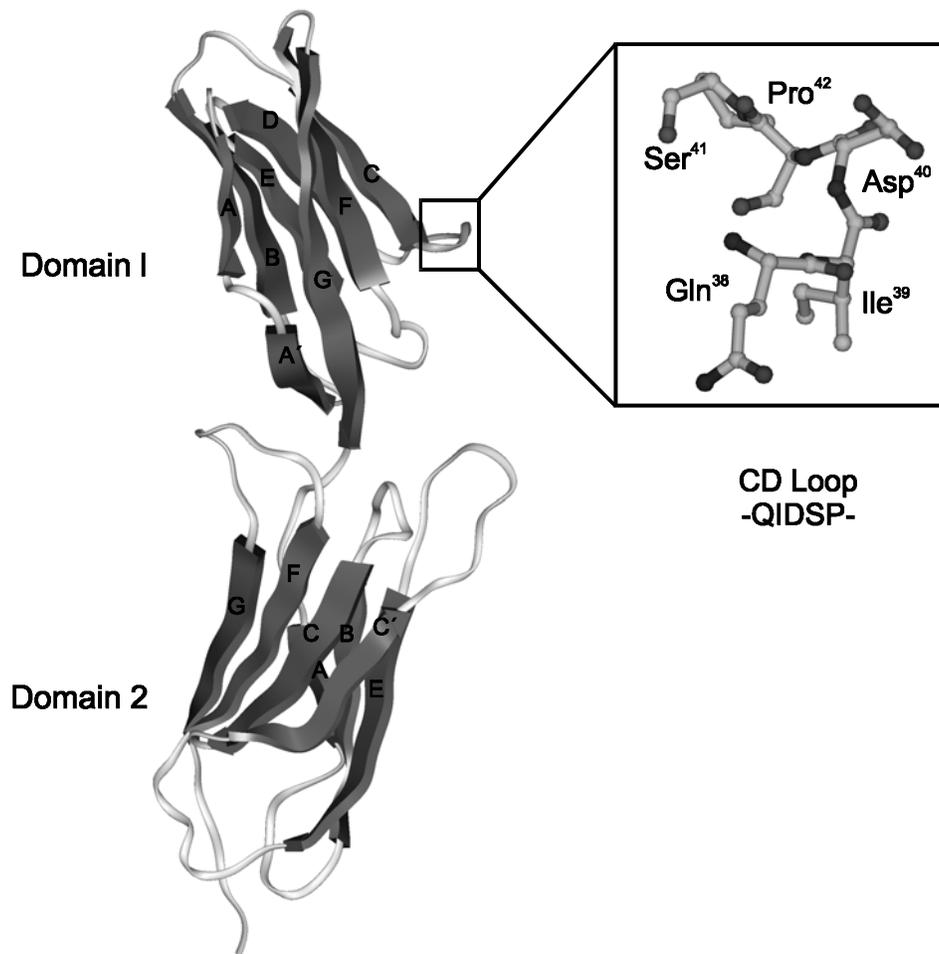


Abb. 2.5: Kristallstruktur der Ig-Domänen D1 und D2 von VCAM-1.^[62, 63] Die QIDSP-Erkennungssequenz liegt innerhalb des CD-loops.

Eine neuere Kristallstruktur von MAdCAM in Arbeiten von R. L. Brady *et al.*^[64] zeigt in der D1 Domäne stärkere strukturelle Übereinstimmung der bindenden CD-loops in VCAM und MAdCAM als bisher angenommen. Bei einer Überlagerung der beiden D1 Domänen liegen die beiden kritischen Aspartatreste im neuen Modell nur 2 Å, anstelle von bisher angenommenen 8 Å auseinander. Außerdem zeigt die aktuelle Kristallstruktur von MAdCAM am C-Terminus von D2 eine unterschiedliche Konformation. Deutliche Unterschiede in den beiden Kristallstrukturen zeigen sich im DE-loop der D2 Domäne. Während dort in MAdCAM negative Ladungen vorherrschen (Glu¹⁴⁸-Glu¹⁴⁹), sind in VCAM zwei positiv geladene Reste zu finden (Arg¹⁴⁶-Lys¹⁴⁷).

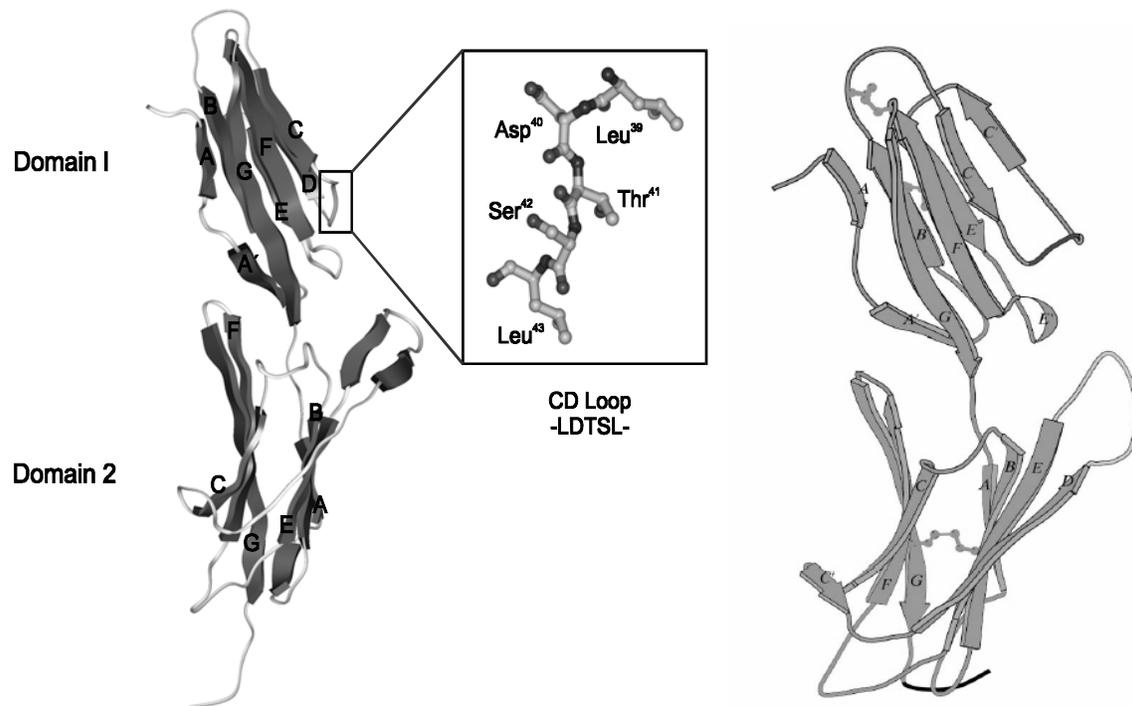


Abb. 2.6: Kristallstrukturen der Ig-Domänen D1 und D2 von MAdCAM-1.^[64, 65] Das LDT-Bindungsmotiv liegt innerhalb des CD-loops. (links: Kristallstruktur von 1998, rechts: Kristallstruktur von 2002).

Die großen Ähnlichkeiten in der D1 Domäne zusammen mit den oben erwähnten Ergebnissen des D2-MAdCAM/D1-VCAM-Hybrids legen den Schluss nahe, dass die Bindung an α 4-Integrine über die D1 Domäne erfolgt und die D2 Domäne wichtig für die Selektivität ist.

2.5 Pathologische Bedeutung von α 4-Integrinen

Entzündungskrankheiten und Autoimmunkrankheiten wie rheumatoide Arthritis, *inflammatory bowel diseases* (IBD), Multiple Sklerose, Psoriasis oder Asthma werden gegenwärtig mit relativ alten Medikamenten, wie etwa Corticosteroiden und Methotrexat behandelt. Neuere Therapieansätze wurden basierend auf Leukorien-Antagonisten,^[66] COX2 Inhibitoren^[67] oder *tumor necrosis factor* (TNF) *blockers*^[68] vorgestellt.

Obwohl die genaue Ursache der Autoimmunerkrankungen nicht klar ist, weiß man, dass die Akkumulierung von bestimmten Leukocyten (T-Lymphocyten, Plasmazellen, Monocyten/Makrophagen, Neutrophile) im betroffenen Gewebe entscheidend zur Pathogenese beiträgt. Wie z.T. in Kapitel 2.3 dargestellt, spielen Zelladhäsionsmoleküle zusammen mit

den α 4-Integrinen eine wichtige Rolle bei der Wanderung von Entzündungszellen vom Blutstrom in das entzündete Gewebe. Zudem werden Adhäsionsmoleküle an Entzündungsherden überexprimiert.

Ein möglicher Therapieansatz bei Entzündungskrankheiten besteht in der Inhibierung von α 4-Integrinen. Dadurch würde die Infiltration bzw. die Aktivierung von Immunzellen verhindert werden. Potentielle Nachteile einer solchen Therapie könnten in der Expression der Adhäsionsmoleküle auf verschiedenen Zelltypen liegen, was eine Beeinflussung des gesamten Immunsystems zur Folge haben könnte. Trotzdem liegen bereits viel versprechende Ergebnisse zur Therapie von Asthma, Arteriosklerose u.a. mittels selektiver Inhibierung der α 4 β 1/VCAM-1 Wechselwirkung vor.^[69-72]

Bei IBD ist die Expression von MAdCAM im Darm erhöht, was eine erhöhte Lymphocytenakkumulierung zur Folge hat. Klinisch kann diese Krankheit in zwei sich überschneidende Phänotypen eingeteilt werden: *colitis ulcerosa* (UC) und Crohn-Krankheit (CD, *enteritis regionalis*). Dadurch dass MAdCAM im Vergleich zu anderen Adhäsionsmolekülen nur auf sehr wenigen Geweben exprimiert ist, ist es ein idealer Ansatzpunkt zur Behandlung von Darmerkrankungen, ohne das übrige Immungeschehen drastisch zu beeinflussen. Zur Behandlung von IBD basierend auf der Modulation der α 4 β 7/MAdCAM Wechselwirkung im Darm liegen für die monoklonalen Antikörper Natalizumab (Antegren[®], Elan/Biogen, South San Francisco, CA; unspezifischer α 4-Integrinligand) und LDP-02 (Millennium Pharmaceuticals/Genentech, Cambridge, MA; selektiver α 4 β 7-Integrinligand) bereits klinische Studien (Phase II) vor. Diese zeigten ein deutlich verlangsamtes Fortschreiten der Krankheiten bei guter Verträglichkeit. Natalizumab zeigte außerdem bei Multipler Sklerose erste Therapieerfolge.^[73]

Auch in der Metastasierungskaskade spielen α 4-Integrine eine wichtige Rolle. Auf Zellen des Primärtumors verhindern α 4-Integrine die Loslösung und Invasion von malignen Zellen. Bei zirkulierenden Tumorzellen können α 4-Integrine die Dissemination verstärken.^[74, 75]

α 4-Integrinliganden besitzen somit großes therapeutisches Potential bei Entzündungen und Autoimmunerkrankungen und möglicherweise auch bei Tumoren, die eine α 4-Integrin abhängige Metastasierung zeigen. Substanzen die selektiv die α 4 β 7/MAdCAM Interaktion blockieren, scheinen sehr aussichtsreich in einer Therapie von IBD zu sein. α 4 β 1 selektive Verbindungen würden die Migration von α 4 β 1-positiven Leukocyten zu VCAM-reichen Gewebe unterbinden. Ob Selektivitäten für α 4 β 1 bzw. α 4 β 7 klinisch relevant sind, werden

zukünftige klinische Studien beantworten müssen. Allerdings werden selektiv wirkende Medikamente höchstwahrscheinlich weniger Nebenwirkungen aufweisen.

2.6 Nichtpeptidische small molecules als α 4-Integrinantagonisten

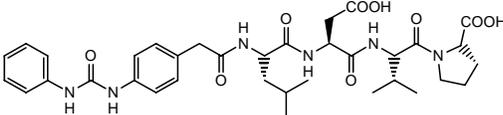
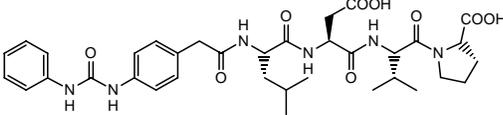
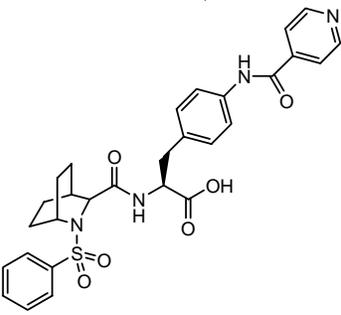
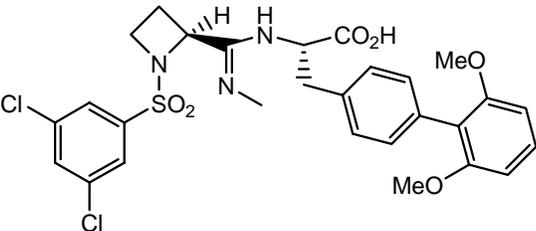
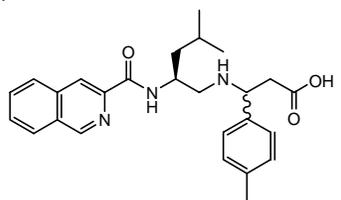
Die ersten klinischen Studien mit oben erwähnten monoklonalen Antikörpern (*monoclonal antibody* = mAB) sind sehr viel versprechend. Eine Therapie mit Antikörpern ist jedoch sehr kostspielig, kann zu Immunreaktionen führen und erfordert weniger wünschenswerte intravenöse Administrationen. Die geringere Plasmahalbwertszeit von mAbs wird ebenfalls als problematisch angesehen. Auch durch die bereitzustellende Menge angesichts der chronischen Natur der zu behandelnden Krankheiten ist man bestrebt kostengünstigere *small molecules* als Pharmazeutika zu entwickeln. Allerdings sind kleine Moleküle, die Protein-Protein Wechselwirkungen modulieren, oftmals sehr schwierig oder bei großen hydrophoben Kontaktflächen überhaupt nicht zu erhalten.^[76]

Die Entwicklung potenter α 4-Integrinantagonisten stützt sich auf die Kenntnis der Bindungssequenzen der natürlichen α 4-Integrinliganden. Zwar eröffnet die 2001 bekannt gewordene Struktur der Kopfgruppe des α v β 3-Integrins neue Möglichkeiten der Integrinligandensuche, jedoch ist die Sequenzhomologie zu α 4-Integrinen zu gering, um hier struktur-gestütztes Design zu erlauben. Somit ist die Wirkstoffsuche derzeit noch auf die Liganden-orientierte Vorgehensweise beschränkt.

Zunächst ging man bei der Entwicklung von α 4-Integrinantagonisten von den Proteinen Fibronectin, VCAM-1 und einem α 4-Antikörper aus, was zu potenten Peptiden führte. Basierend auf diesen Entdeckungen konnte Vanderslice *et al.* potente, cyclische VLA-4 Integrinantagonisten **1** entwickeln.^[77] Der erste niedermolekulare VLA-4 Antagonist (**2**), der in die klinische Phase eingebracht wurde, stammt von Lin *et al.*^[78] Derivate der Verbindung **3** konnten erfolgreich in einem Tiermodell gegen Asthma eingesetzt werden. Mittlerweile liegen zahlreiche Patentschriften und Veröffentlichungen für α 4-Integrinantagonisten vor.^[79] Zwei Beispiele aus jüngster Zeit (Verbindungen **4** und **5**) illustrieren, dass die Suche nach optimalen α 4-Integrinantagonisten noch nicht abgeschlossen ist. Verbindung **6** zeigt ein Beispiel eines selektiven α 4 β 7-Integrinantagonisten aus unserer Arbeitsgruppe.^[80, 81] Die angegebenen erheblich voneinander abweichenden IC50-Werte lassen sich jedoch aufgrund der stark unterschiedlichen Testbedingungen nur schwer miteinander vergleichen. So ergeben

sich aus zellulären Assays meist niedriger biologische Aktivitäten als aus Testungen an isolierten Rezeptoren.

Tabelle 2.3: Auswahl von $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 4\beta 7$ Integrinantagonisten.

Nr.	Struktur	Rezeptor	IC ₅₀	Lit.
1	$\alpha(*C-Y-L-D-V-C*)$	$\alpha 4\beta 1$	50 nM	[77]
2		$\alpha 4\beta 1$	1 nM	[78]
3		$\alpha 4\beta 1$	1 nM	[82]
4		$\alpha 4\beta 1$ $\alpha 4\beta 7$	36 nM 175 nM	[83]
5		$\alpha 4\beta 1$ $\alpha 4\beta 7$	0.05 nM 21 nM	[84]
6		$\alpha 4\beta 7$	1402 μ M	[80, 81]

In der vorliegenden Arbeit sollte der von J. Boer initiierte Ansatz, Monosaccharide als niedermolekulare $\alpha 4$ -Integrinantagonisten zu verwenden weiter verfolgt werden. Dabei sollte der Schwerpunkt auf die Synthese von Glucosederivaten gelegt werden. Im folgenden Abschnitt wird zunächst ein Überblick über bekannte Anwendungen von Monosacchariden in der Wirkstoffentwicklung gegeben.

3 Gerüstmimetika auf Basis von Monosacchariden

Ersetzt man in einem Peptid das *backbone* durch ein völlig artfremdes Rückgrat, an dem die für die Effektivität essentiellen Seitenkettenelemente des Peptid-Originals verankert sind, so gelangt man zu sogenannten Gerüstmimetika (*scaffold mimetics*). Seit der theoretischen Ausarbeitung dieses Konzepts durch P. S. Farmer vor knapp 25 Jahren^[85] und der Entdeckung von Morphinum als Gerüstmimetikum für Endorphine sind zahlreiche erfolgreiche Anwendungen beschrieben worden.

Abb. 3.1 zeigt zwei Beispiele einer erfolgreichen Umsetzung dieses Konzepts. In Verbindung **7b** liegt ein typisches Gerüstmimetikum vor, dessen Steroidgerüst die für die Bindung an α IIb β 3-Integrine wichtigen Seitenketten in der gleichen räumlichen Anordnung präsentiert wie im peptidischen RGD-Peptid **7a**.^[86] Nichtpeptidische *scaffolds* basierend auf diphenyl-Einheiten wurden kürzlich von A.D. Hamilton *et al.* beschrieben: Hier zeigt das Mimetikum **8b** sogar eine deutlich höhere inhibitorische Wirkung gegenüber der Farnesyltransferase als der peptidische Ligand **8a**.^[87]

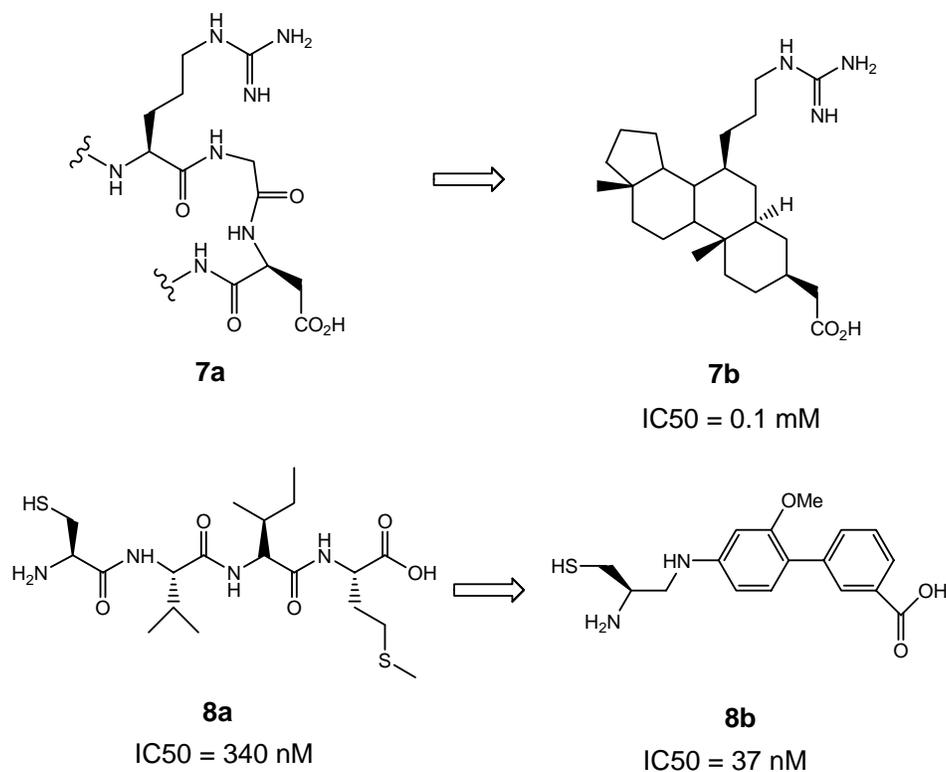


Abb. 3.1: Beispiele für Gerüstmimetika und ihren peptidischen Vorläufern.

Prinzipiell haben sich folgende Anforderungen an *scaffolds* als günstig erwiesen:

- Grundkörper oder Strukturelemente aus dem Bereich der Naturstoffe, deren orale Verfügbarkeit bekannt ist.
- Die Konformation soll über eine gewisse Starrheit besitzen, um ein Kollabieren (*hydrophobic collapse*) der Struktur zu verhindern.
- Ein breites synthetisches Wissen zur einfachen Modifikation der Grundkörper
- An das Grundgerüst sollen Pharmakophore in räumlichen Anordnungen geknüpft werden können, die man aus biologisch aktiven Peptiden kennt (z.B. β -turns, γ -turns).

Eine weitere Voraussetzung für die Wirksamkeit von Gerüstmimetika ist, dass das Amidrückgrat keine für die Bindung an das *target* wichtigen Bindungen eingeht.

R. Hirschmann *et al.* entwickelte Anfang der 90er Jahre in Zusammenarbeit mit K. C. Nicolaou Gerüstmimetika auf Basis von Monosacchariden. Alle oben genannten günstigen Eigenschaften treffen dabei auf das verwendete *scaffold* zu. Vergleicht man geometrische Parameter von Monosaccharidgerüsten und Amidrückgrat, so wird ersichtlich, dass man durch Zuckergerüste besonders gut β I'-turns und γ -turns und auch andere privilegierte Strukturen wie β II'-turns, β II-turns oder α -helikale Strukturen imitieren kann.^[88]

Ausgehend von einer Konformationsanalyse des somatostatinanalogen cyclischen Hexapeptids **9** (*Veber-Hirschmann-Peptid*) wurde das *backbone* des β -turns mit den für die Aktivität wichtigen Seitenketten von -Phe-D-Trp-Lys- durch ein β -D-Glucose Gerüst ersetzt.

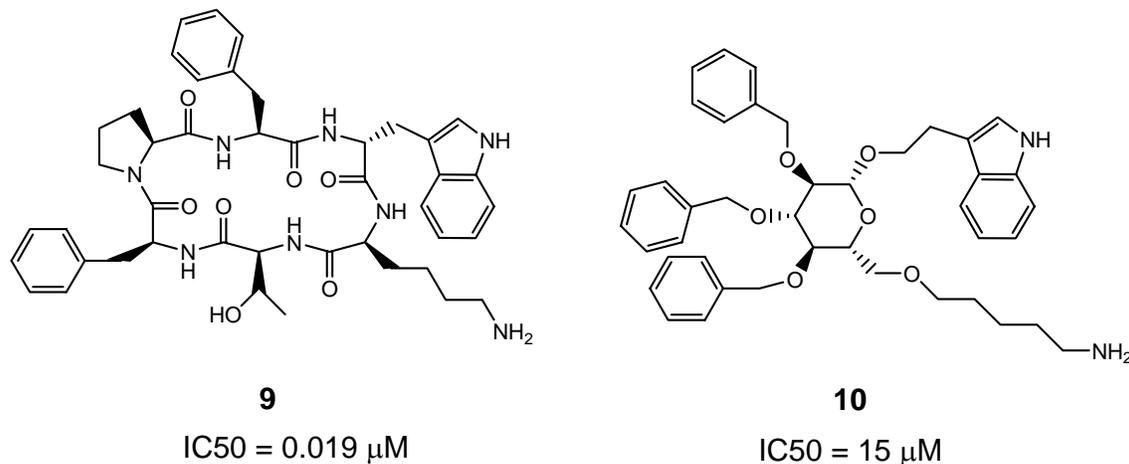
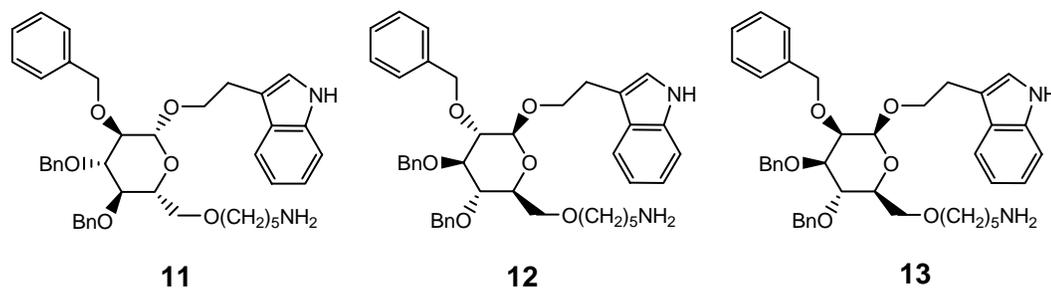


Abb. 3.1: *Veber-Hirschmann-Peptid im Vergleich mit einem de-novo designten Glucosegerüstmimetikum.*

Wenngleich die Affinität zu AtT-20 Zellen (Expression von verschiedenen Somaotstatinrezeptoren) der nichtpeptidischen Verbindungen um drei Größenordnungen geringer ausfällt, als die der peptidischen Referenz, wurde die prinzipielle erfolgreiche

Anwendung von Monosacchariden als Gerüstmimetika erstmals gezeigt.^{[89] [90]} In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss unterschiedlicher Konfigurationen auf die biologische Aktivität getestet.^[91]



	D-Glucosid	L-Glucosid	L-Mannosid
IC50(AtT20)	15 μ M	47 μ M	7 μ M
IC50(NK-1)	120 μ M	<1 μ M	1 μ M
IC50(hSSTR)	4.0 μ M	4.4 μ M	4.0

Abb. 3.2: Abhängigkeiten der biologischen Aktivität von enantiomeren und diastereomeren Mimetika.^[91]

Während sich bei der Affinität zum NK-1 Rezeptor deutliche Unterschiede bei den verschiedenen Stereoisomeren zeigen, sind die IC50-Werte in den beiden anderen Fällen sehr ähnlich. Leider geben die Autoren keine Fehler bei den IC50-Werten an, so dass der Einfluss von Konformation auf die biologische Aktivität sehr schwer zu bewerten ist. Möglich wäre eine nicht spezifische Bindung an Somatostatinrezeptoren und eine spezifische an den NK-1 Rezeptor.

Im Falle von RGD Mimetika konnten nur nichtaktive bzw. schwach aktive Glucosederivate erhalten werden. K. C. Nicolaou *et al.* begründeten dies mit einem möglichen Mangel einer rigiden Struktur.^[92] Außerdem ist bei *c*(RGDFV) mindestens eine der in Abb. 14 angezeigten Amidbindungen für die Aktivität wichtig.^[93]

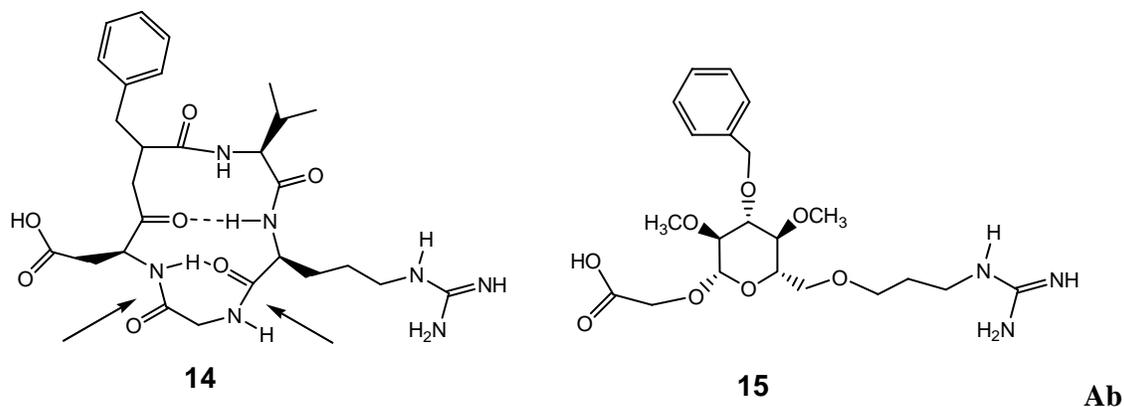


Abb. 3.3: *c(RGDfV)* und ein Mimetikum basierend auf Glucose.

N. Moitessier *et al.* synthetisierten Bibliotheken von Xyloederivaten in Lösung. Insgesamt resultierten daraus neun Minibibliotheken mit jeweils 16 verschiedenen Substanzen der allgemeinen Formel **16**, welche auf ihre Fähigkeit der Inhibierung der Zelladhäsion von Vitronectin an $\alpha\beta 3$ -Integrine getestet wurden. Aus der aktivsten Mischung konnte schließlich **17** als moderat aktiver $\alpha\beta 3$ -Integrinligand identifiziert werden.^[94] Das erhaltene Xyloderivat zeigte dabei die gleiche biologische Aktivität wie das Vergleichspeptid RGDS.

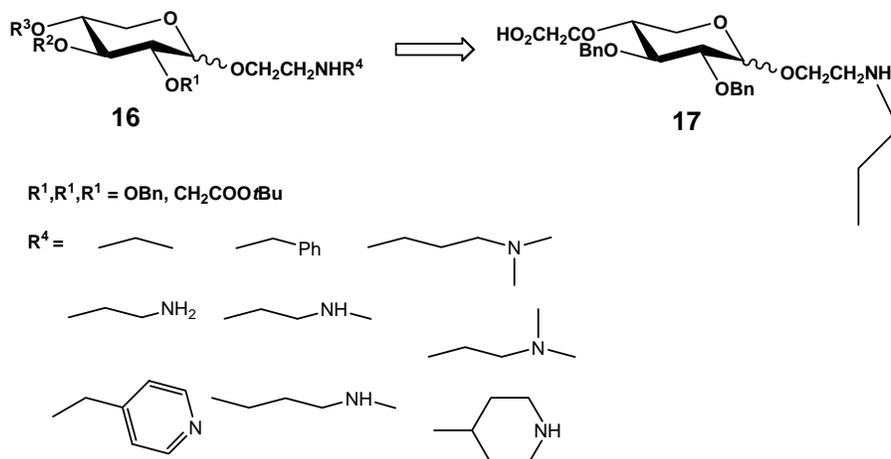
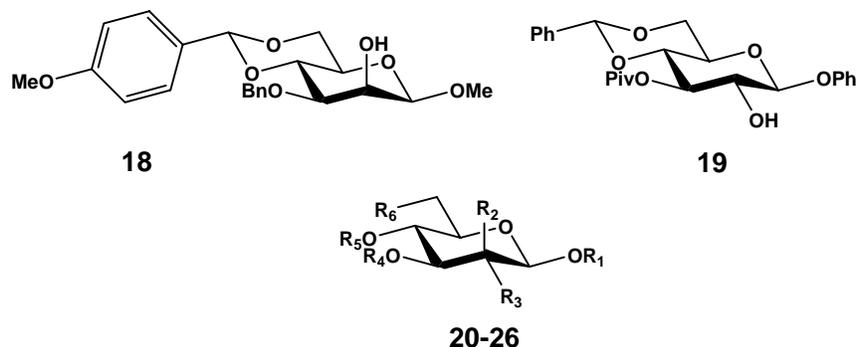


Abb. 3.5: Aus neun Minibibliotheken der allgemeinen Struktur **16** wurde ein moderat aktiver $\alpha\beta 3$ -Integrinligand **17** identifiziert.^[94]

P. V. Murphy *et al.* beschrieben kürzlich das Design und die Synthese von Monosaccharidderivaten, die eine Hemmung der HIV-1 Protease in mikromolaren Konzentrationen zeigten (s. Abb. 3.6).^[95, 96] Auffallend ist, dass die aktivste Verbindung **19** den höchsten $\log P$ -Wert von 4.62 und die inaktive Verbindung **23** mit -1 den geringsten $\log P$ -Wert aufweist. Dies lässt zwei Schlüsse zu: Entweder sind die aromatischen Seitenketten

notwendig, um hydrophobe Bindetaschen in der Aspartylprotease auszufüllen oder die erhaltenen Verbindungen gehen nur unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Enzym ein.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	IC ₅₀ [μM]
18							4.85 ±1.63
19							3.81 ±1.11
20	Me	OH	H	Bn	H	NHCbz	4.66 ±2.21
21	Me	OH	H	Bn	MPM	NHCbz	4.48 ±0.98
22	Me	OH	H	Bn	MPM	NHAc	7.74 ±3.19
23	Me	H	OH	H	H	NHBoc	nicht aktiv
24	Me	H	OH	Bn	H	NHAc	5.06 ±0.61
25	Ph	H	OH	Piv	H	OPiv	3.97 ±1.00
26	Ph	H	OH	H	H	NHAc	8.95 ±1.48

Abb. 3.6: HIV-1 Inhibitoren auf Basis von Zuckergerüsten und biologische Aktivitäten. Klinisch genutzte Derivate zeigten Aktivitäten zwischen 0.37 und 0.53 nM.^[95]

Zur kombinatorischen Synthese an der Festphase immobilisiert werden konnten Monosaccharide als in drei Positionen entschützbare Aminouronsäure-Derivate,^[97] als selektiv deblockierbare Glucose- und Galactosegerüste in vier^[98] und schließlich auch in fünf Positionen.^[99] Abb. 3.7 zeigt einige der kürzlich vorgestellten Bausteine. Von H. Kunz *et al.* wurde kürzlich Verbindung **27** vorgestellt, welche an vier Positionen in beliebiger Reihenfolge an der festen Phase entschützt werden kann.^[100]

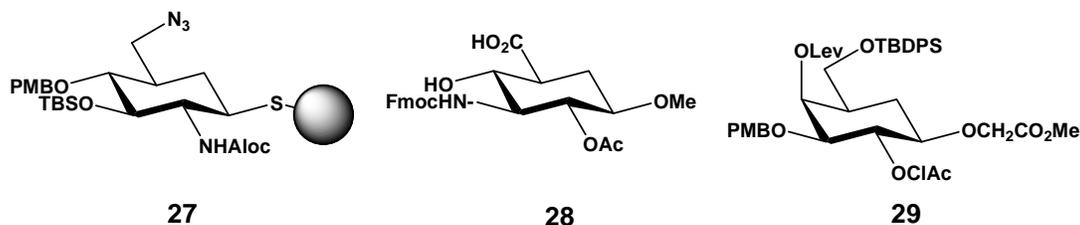


Abb. 3.7: Monosaccharid Bausteine 27,^[100] 28^[97] und 29^[101] für kombinatorische Synthesen.

Die dargestellten Beispiele zeigen, dass Monosaccharide als geeignete *scaffolds* prinzipiell in der Wirkstoffforschung eingesetzt werden können. Bisher ist dieser Zugang zu potentiellen neuen Wirkstoffen auf die nicht-industrielle Forschung beschränkt, da der Aufwand für die Darstellung kleiner Bibliotheken noch sehr groß ist. Mit zunehmender Etablierung von kombinatorischen Kohlenhydratsynthesen an der festen Phase sollte man in Zukunft jedoch schneller zu einer größeren Anzahl von Substanzen gelangen.

4 SYNTHESE UND BIOLOGISCHE EVALUATION VON MONOSACCHARIDEN ALS α 4-INTEGRINLIGANDEN

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Minibibliotheken von ausgewählten Monosacchariden in Lösung synthetisiert werden. Daraus sollten definierte Strukturen resultieren, die einzeln im Zelladhäsionsassay auf ihre Fähigkeit die Adhäsion von VCAM-1 bzw. MAdCAM-1 an das α 4 β 1-Integrin bzw. α 4 β 7-Integrin zu inhibieren, getestet werden sollen.

4.1 Bisheriger Kenntnisstand und Ziele

Zu Beginn der Arbeit wurde von J. Boer ein von einem aktiven Cyclohexapeptid **30**^[102] abgeleitetes Mannosederivat **32**^[103] gefunden, welches bei einer Konzentration von 2 mg/mL die Adhäsion von α 4 β 1-Integrin exprimierenden Zellen an VCAM-1 zu 70% inhibierte.

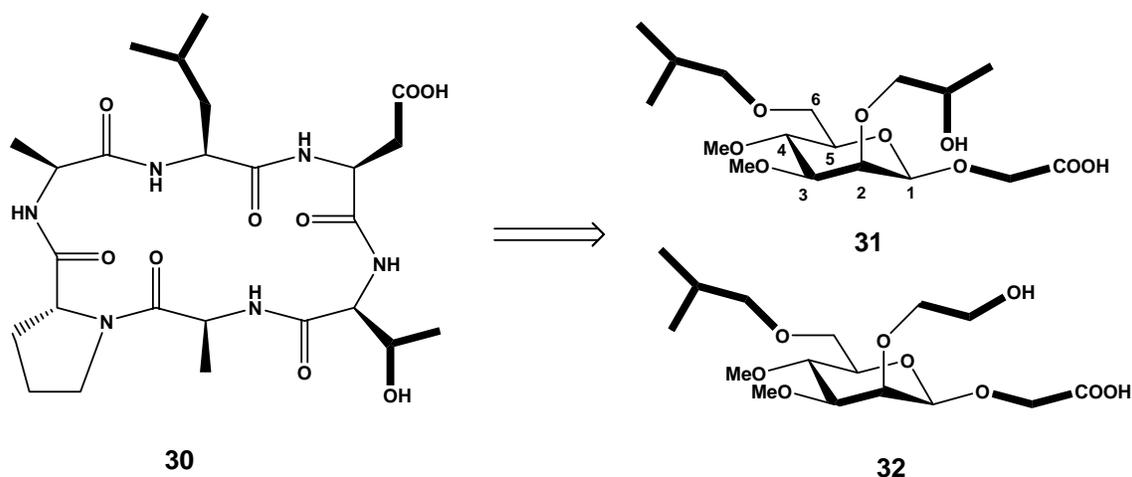


Abb. 4.1: Nichtpeptidische Peptidmimetika basierend auf β -D-Mannose ausgehend von einem aktiven Cyclohexapeptid. Die für die Bindung essentiellen Seitenketten sind fett dargestellt.

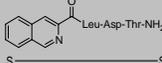
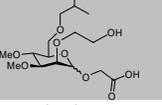
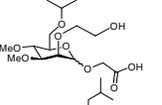
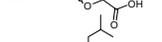
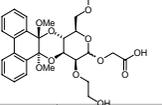
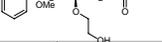
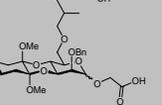
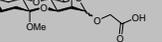
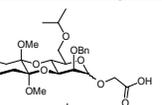
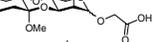
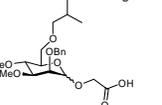
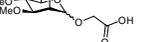
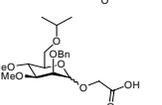
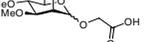
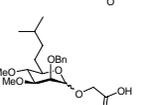
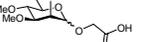
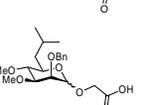
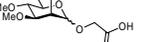
Die Verbindung **32** sollte nun weiter verändert und möglichst im Hinblick einer Verbesserung der biologischen Aktivität modifiziert werden. Dabei standen folgende Fragen im Mittelpunkt:

- welchen Einfluss hat das Stereozentrum in Position 2 ? Es sollten Minibibliotheken von β -D-Glucosederivaten zur biologischen Testung bereitgestellt werden.
- welchen Einfluss hat die Länge der Seitenkette in Position 6 ? Ist es möglich sie zu verkürzen und somit ein starreres Gerüst ohne Aktivitätsverlust zu verwenden?

- Ist es unter Beibehaltung bzw. Verbesserung der biologischen Aktivität möglich, metabolisch stabilere C-Glycoside bzw. C-Mannoside zu verwenden?
- welchen Einfluss haben die Methoxygruppen in Position 3 und 4?

Im Verlauf der Arbeit konnte durch E. Locardi außerdem ein α 4 β 7-selektives Mannosederivat **38 β** gefunden werden,^[104] welches im Zelladhäsionsassay einen IC50 Wert von 420 μ M gegenüber der Adhäsion von α 4 β 7-Integrin exprimierenden 38C13 β 7-Zellen an MAdCAM aufwies. Derivate mit verkürzter Seitenkette in Position 6 und α -konfigurierte Mannoside waren nicht in der Lage die Adhäsion von MAdCAM an α 4 β 7-Integrine zu inhibieren (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Minibibliothek von Mannosederivaten und biologische Aktivität.

		38- β 7 (α 4 β 7) MAdCAM-1 adhesion [%] ^a	Jurkat (α 4 β 1) VCAM-1 adhesion [%]
33^b		10 \pm 8	10 \pm 6
34^c		n.d.	52 \pm 12
35		100 \pm 19	60 \pm 15
α		100 \pm 21	100 \pm 20
36		100 \pm 22	100 \pm 19
α		100 \pm 20	98 \pm 22
37		80 \pm 16	82 \pm 15
α		76 \pm 19	81 \pm 19
38		15 \pm 6	77 \pm 5
α		90 \pm 11	89 \pm 14
39		76 \pm 10	100 \pm 18
α		100 \pm 20	100 \pm 22
40		100 \pm 7	86 \pm 10
α		100 \pm 20	100 \pm 11
41		100 \pm 14	86 \pm 16
α		100 \pm 7	92 \pm 15
42		100 \pm 10	100 \pm 21
α		100 \pm 10	97 \pm 15
43		100 \pm 11	100 \pm 21
α		100 \pm 14	100 \pm 18

Da bislang nur β -Mannoside eine gewünschte biologische Aktivität zeigten, sollte zunächst das Hauptaugenmerk auf die Synthese von β -Glycosiden gelegt werden, um einen direkten Einfluss des Stereozentrums in Position 2 zu untersuchen. Außerdem wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von α 4-Integrinantagonisten gefunden, welche anstelle der Threonin-Seitenkette Phenylalanin (oder Phenylalaninderivate) als Pharmakophor besitzen.^[83, 105, 106] Die zuerst gefundene Erkennungssequenz für α 4-Integrine war LDV. Daher sollten zu den in

obiger Tabelle analoge Glucosederivate sowohl mit Phenylalanin-, Valin als auch Serinseitenketten in Position 2 synthetisiert werden. Die essentielle Aspartatseitenkette wird sowohl über *O*-glycosidische sowie als *C*-glycosidische Verknüpfungen an das Gerüst gebunden.

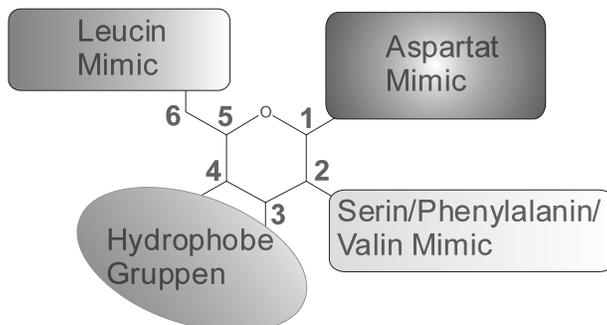


Abb. 4.2: Monosaccharide als α 4-Integrinantagonisten mit den Pharmakophoren in Position 1, 2 und 6. Die Hydroxyfunktionen in Position 3 und 4 sollen als Ether in hydrophobe Gruppen überführt werden.

4.2 Synthese von Glycosiden

Bei der Synthese ist zunächst darauf zu achten, dass die pharmakophoren Gruppen in den Positionen 1, 2 und 6 unabhängig voneinander eingeführt werden können. Außerdem sollten die gewünschten Seitenketten in Position 3 und 4 im Molekül bereits enthalten sein. Insgesamt wurden Verbindungen mit drei verschiedenen Resten in Position 3 und 4 synthetisiert (Abb. 4.3).

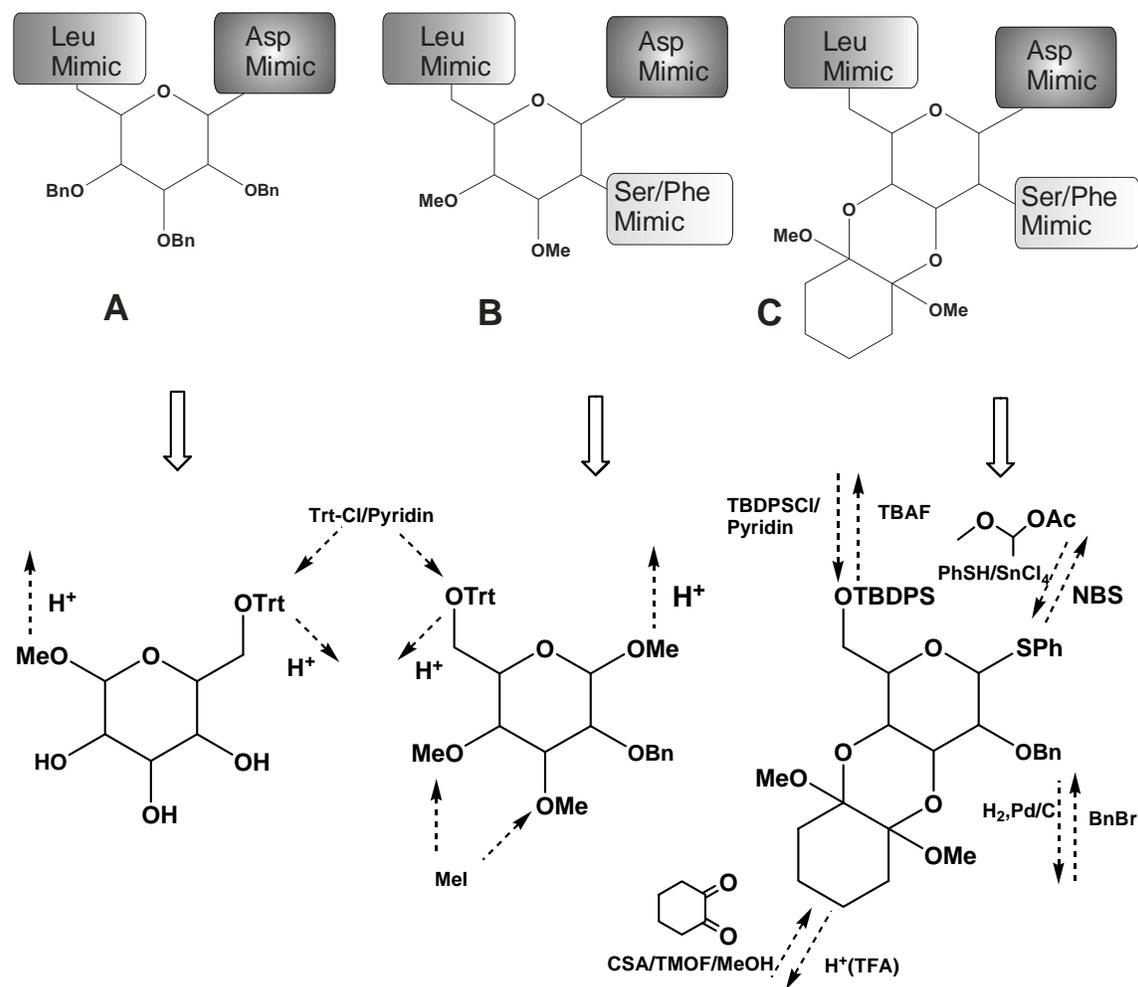


Abb. 4.3: Orthogonal geschützte Monosaccharide

Bei Verbindungen des Typs A und B bot sich für das anomere Zentrum der Schutz über das Methylacetal an, welches durch stark saure Bedingungen wieder gespalten wird. Unter diesen Bedingungen sind die an den anderen Positionen vorliegenden Ether stabil. Dagegen würde bei Verbindungen des Typs C die eingeführte CDA-Gruppe in den Positionen 3 und 4 durch saure Bedingungen wieder entfernt werden, was eine Verwendung von säure- und basestabilen Thioacetalen am anomeren Zentrum notwendig machte. Die Hydroxyfunktion in Position 6 kann mittels sterisch anspruchsvoller Gruppen wie der Trityl- (Trt) oder *tert*Butyl-diphenyl-silyl-Schutzgruppe leicht erreicht werden. Da bei den Endverbindungen in Position 2 zum Teil ohnehin die Seitenkette von Phenylalanin eingeführt wird, ist hier die Benzylschutzgruppe das Mittel der Wahl.

4.2.1 Synthesen von in 1-, 2- und 6-Stellung selektiv substituierbaren Glucosederivaten

Es wurden zwei Synthesestrategien verfolgt, um in 1-, 2- und 6-Stellung selektiv substituierbare Glucosederivate zu erhalten. Bei ersterer wurde die anomere Position als Methylacetal geschützt eingesetzt, was in der Folge eine saure Entschützung erfordert.

Ausgehend von käuflichem Methyl- α -D-glycopyranosid wurde durch die von Qin *et al.* vorgestellte Methode^[107] über das Dibutylstannylacetal die 2,6-dibenzylierte Verbindung **46** regioselektiv in guten Ausbeuten erhalten. Dabei wurde ausgehend von der Originalvorschrift ein *up scale* von einem Gramm Edukt auf die 25-fache Menge ohne Ausbeuteverlust erarbeitet.

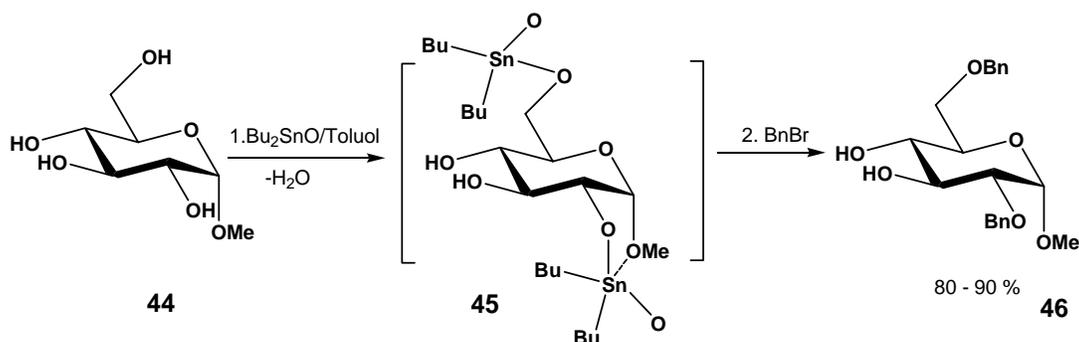


Abb. 4.4: Regioselektive Dibenzylieung von Methyl- α -D-glycopyranosid.

Der Mechanismus der regioselektiven Benzylierung kann gut durch z.T. polymerer Zwischenstufen **45** beschrieben werden: Durch die Bildung von Stannylacetalen in den bevorzugten Positionen 2 und 6 wird die Nucleophilie der dort befindlichen Sauerstoffatome stark erhöht, was eine selektive Reaktion mit Benzylbromid bei Temperaturen von 80-90 °C zur Folge hat.

Durch anschließende Methylierung und Entfernung der Benzyl-Schutzgruppen wird **48** erhalten, wobei die Positionen 3 und 4 bereits als gewünschte Methylether vorliegen und der primäre Alkohol in Position 6 leicht selektiv modifiziert werden kann. Dies gelingt einfach durch Reaktion mit Tritylchlorid in siedendem Pyridin.

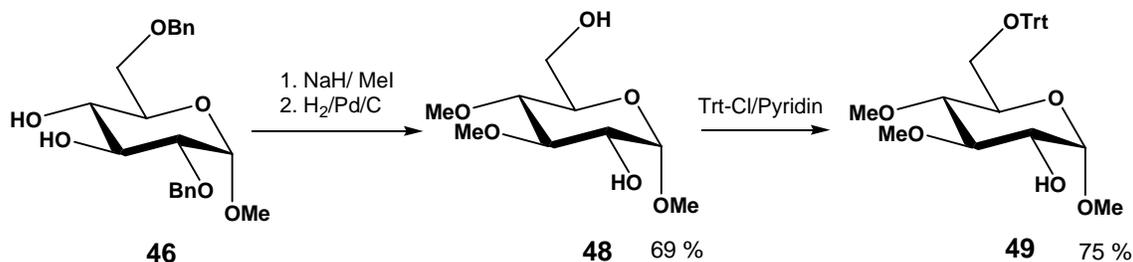


Abb. 4.5: Synthese eines in den Positionen 1, 2 und 6 selektiv substituierbaren Glucosederivats.

Für Monosaccharide des Typs C wurde eine Schutzgruppenstrategie, die zum Schutz der Positionen 3 und 4 bei Mannosederivaten zu guten Selektivitäten führt, auf Glucosederivate übertragen. Ley *et al.* führten 1994 Cyclohexan-1,2-diacetale (CDA) als Schutzgruppe ein. Dabei konnte **51** in die 3,4-geschützte Verbindung **52** in Ausbeuten von knapp über 50 % überführt werden. Als Hauptnebenprodukt fiel **53** und daneben geringe Mengen anderer Isomere an.^[108]

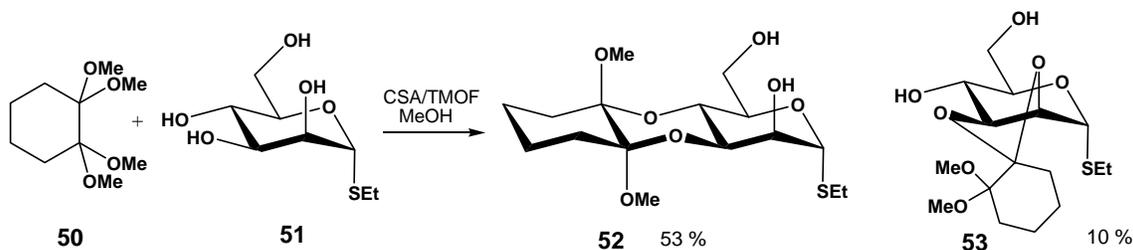


Abb. 4.6: Synthese von 3,4-CDA-geschützten Mannosederivaten.^[108]

Die Selektivität der Reaktion ist im stabilisierenden Einfluss der vier anomeren Effekte im entstehenden Ketal und der äquatorialen Anordnung aller vier Alkylsubstituenten der zentralen 1,4-Dioxaneinheit begründet. Wendet man die Reaktion für Glucosederivate an, so sind keine Selektivitäten zu erwarten. Weil aber die Synthese selektiv 3,4-geschützter Glucosederivate mit anschließender Umschüttung über mehrere Stufen sehr aufwändig ist, und die CDA-Gruppe im Endprodukt erhalten bleiben sollte, wurde die mangelnde Selektivität in Kauf genommen. So wurde **56** durch eine etwas modifizierte Vorschrift in Ausbeuten von ca. 40 % erhalten. Als Nebenprodukt fiel das 2,3-verbrückte Derivat in gleicher Menge an. Die im Zwischenprodukt **55** vorhandene, säure- und basenstabile Thiophenyl-Schutzgruppe wurde zuvor ausgehend von **54** in zwei Stufen in Anlehnung an eine Vorschrift von K.C. Nicolaou *et al.*^[109] eingeführt.

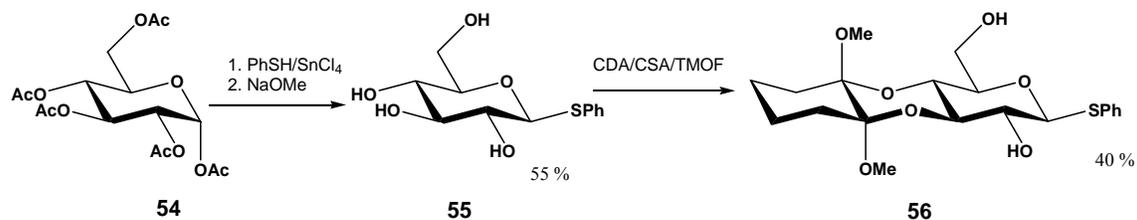


Abb. 4.7: Synthese eines 3,4-CDA-geschützten Glucosederivats.

Die 3,4-Verbrückung konnte durch die Aufnahme von HMBC-Spektren eindeutig nachgewiesen werden.

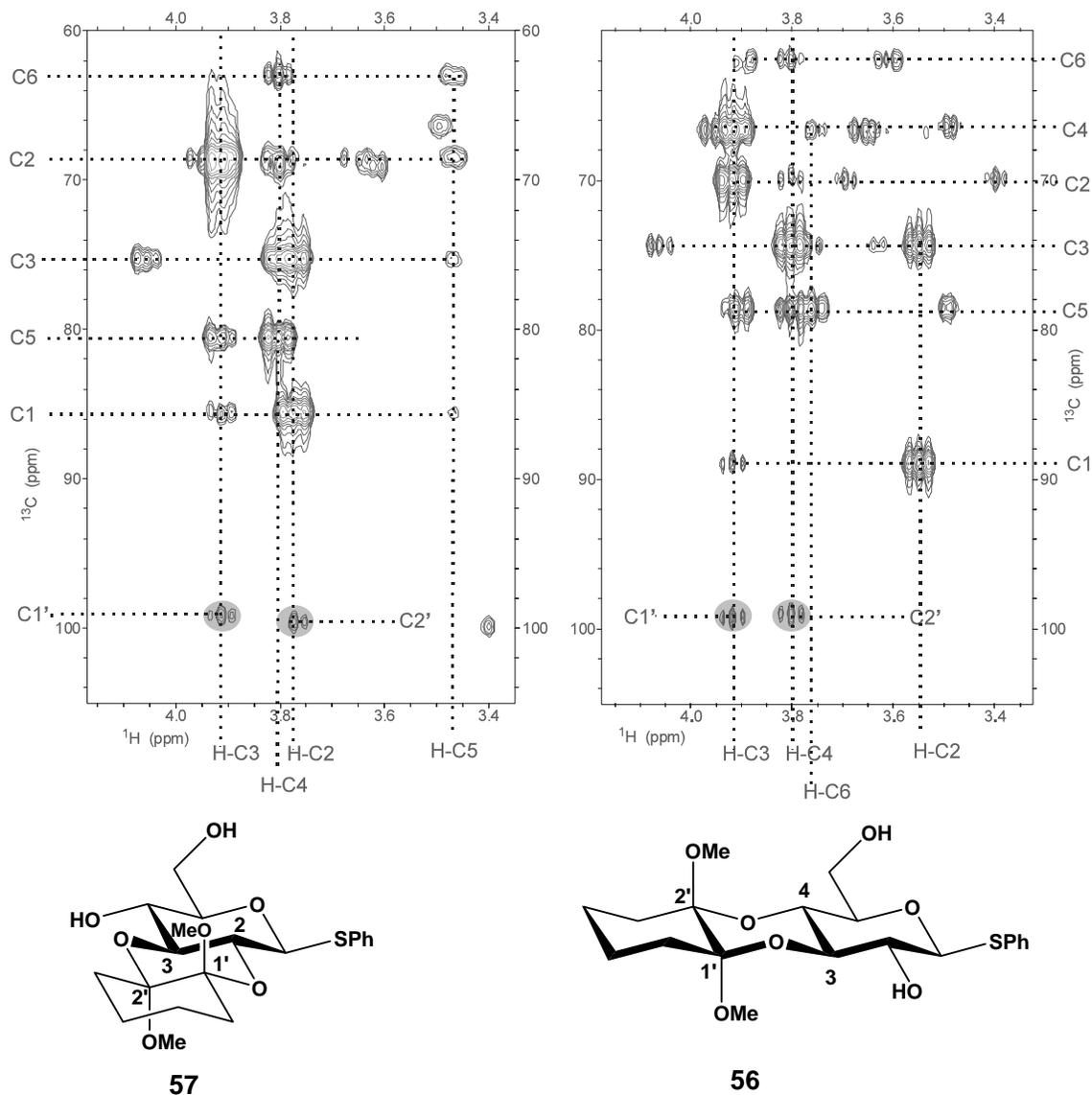


Abb. 4.8: HMBC-Spektren der Regioisomeren 57 und 56.

Ausgehend von **56** konnte in vier Stufen **59** in guten Ausbeuten erhalten werden (s. Abb. 4.9). Als temporäre Schutzgruppe für die Position 6 wurde die *tert*Butyl-diphenyl-silyl-Schutzgruppe gewählt, die selektiv wieder durch Reaktion mit TBAF entfernt werden konnte.

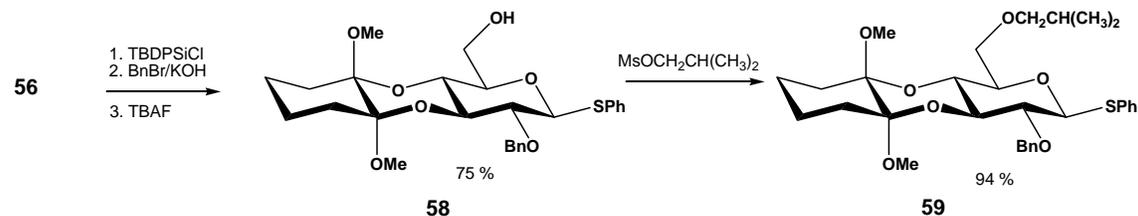


Abb. 4.9: Synthese von **59**.

Die Einführung der Benzyl- und Isobutyl-Reste erfolgte nach der *Williamsonschen* Ethersynthese. Während die Reaktion mit dem sehr reaktiven Benzylbromid sehr gut in THF mit KOH als Base verlaufen, sind Ethersynthesen mit Isobutylbromid sehr langsam. Außerdem neigt Isobutylbromid (und auch Isopropylhalogenide, s. weiter unten) stark zur Eliminierung von HBr. Daher wurden die entsprechenden Mesylate synthetisiert und für Veretherungen eingesetzt.^[110] Zur Erhöhung der Nukleophilie der Alkoholate wurden außerdem 0.1 Äquivalente Kronenether 18-c-6 zugegeben.

4.2.2 Synthese von β -Glycosiden

Der Schlüsselschritt in der Synthese der geplanten Verbindungen ist die stereoselektive Einführung des Aspartyl-Pharmakophors am anomeren Zentrum. Das Mittel der Wahl für die Synthese von β -Glycosiden ist die Koenigs-Knorr-Reaktion - die älteste und immer noch am häufigsten angewandte Reaktion zur stereospezifischen Synthese von 1,2-*trans*-Glycosiden ausgehend von Alkoholen und Glycosylhalogeniden.^[111] Letztere liegen aufgrund des starken anomeren Effekts bei Halogeniden vorwiegend als α -Anomere vor.

Die Reaktion ist von heterogener Natur und verläuft unter Inversion der Konfiguration des anomeren Zentrums. Man nimmt an, dass bei Verbindungen ohne Nachbargruppenbeteiligungen durch Reste in Position 2 das α -Glycosylhalogenid mit seinem Halogenatom an die Oberfläche des Silbercarbonats vorkoordiniert und so die „ α -Seite“ des Glucosederivats abgeschirmt wird. Der Angriff des Alkohols kann demnach nur von der „ β -Seite“ in einer S_N2 -artigen Reaktion erfolgen. Es entsteht mit guten Ausbeuten nahezu ausschließlich das β -Glycosid. Daneben fällt das entsprechende Silberhalogenid an.

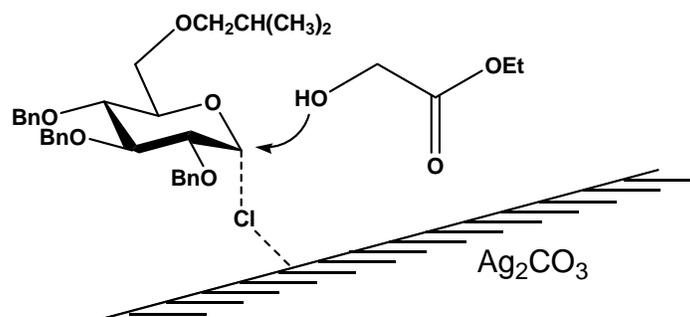


Abb. 4.10: β -Glycosylierung via Koenigs-Knorr-Reaktion.

Die zur Koenigs-Knorr-Reaktion notwendigen Halogenide sind aus den entsprechenden Methylglycosiden durch Reaktion mit HCl in Essigsäure/DCM-Gemischen zugänglich.

Um die prinzipielle Durchführbarkeit des geplanten Syntheseweges zu zeigen, wurde zunächst eine Verbindung des Typs A in sieben Stufen dargestellt.

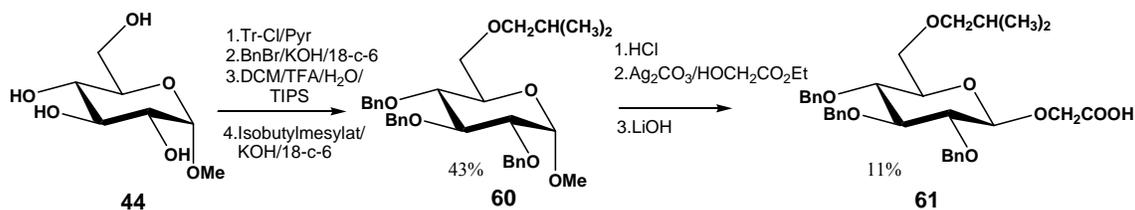


Abb. 4.11: Synthese von **61**.

Als temporäre Schutzgruppe für die Position 6 wurde die Tritylgruppe gewählt. Unter den Bedingungen der sauren Entfernung mit 2%iger TFA bleibt das anomere Zentrum erhalten. Die ersten vier Schritte der Synthese – Schützen, Benzylierung, Entschützen und Verethern mit Isobutylmesylat – verliefen mit guten Ausbeuten. Der problematischste Schritt in der Synthese ist die Halogenierung am anomeren Zentrum unter stark sauren Bedingungen. Bei Verwendung von HCl-gesättigtem Ether oder DCM als Lösungsmittel war die Umsetzung sehr langsam und unvollständig, während in HCl-gesättigter Essigsäure bei längerer Reaktionszeit bei 0 °C zunehmend Zersetzung der Zucker zu beobachten war. Daher wurden bei dieser und bei anderen Umsetzungen Essigsäure/DCM-Gemische verwendet und eine nicht vollständige Umsetzung in Kauf genommen. Auf weitere Optimierungen wurde verzichtet, da diese Reaktion einer der letzten Schritte in der Synthesesequenz war. Die anschließende Koenigs-Knorr-Reaktion verlief hier und bei anderen analogen Umsetzungen in Ausbeuten zwischen 50 und 70 %. Als Nebenprodukt bei der Reaktion mit

Glykolsäureethylester konnten hier und in anderen Fällen entsprechende Ethylglycoside gefunden werden. Die abschließende unproblematische Verseifung des Esters mit LiOH in einem Dioxan/Wasser-Gemisch wurde in analogen Reaktionen ebenfalls eingesetzt.

Die potentiellen LDV-Mimetika **64** und **65** wurden aus **48** durch die oben erläuterten Methoden dargestellt.

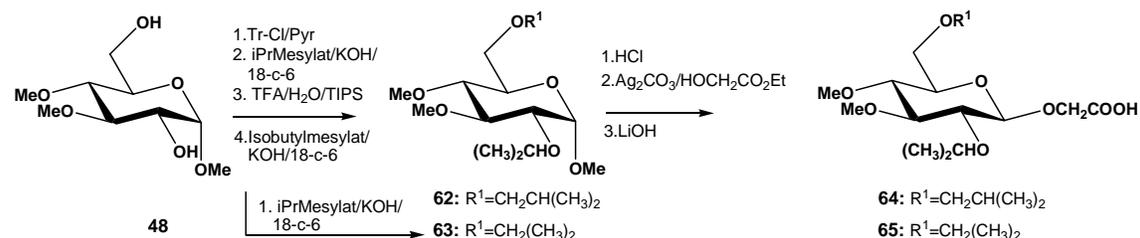


Abb. 4.12: Synthese von **64** und **65**.

Nach den gleichen Methoden konnten auch die Verbindungen **68** und **69** mit der Benzylseitenkette in Position 2 aus **49** erhalten werden.

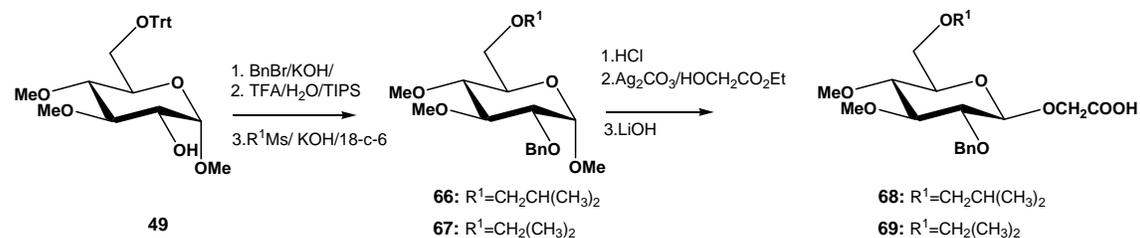


Abb. 4.13: Synthese von **68** und **69**.

Für die Synthese von Verbindungen mit dem Serin-Pharmakophor in Position 2 wurde die Seitenkette als Benzyl-geschützter Ether eingeführt, der im letzten Schritt mit Pd/C in MeOH quantitativ hydrogenolytisch gespalten wurde.

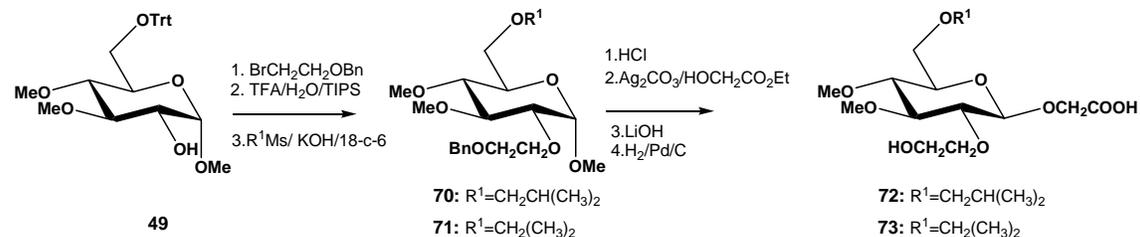


Abb. 4.14: Synthese von **72** und **73**.

Bei der Durchführung der Koenigs-Knorr-Reaktion bei obigen Verbindungen wurden zunächst deutlich erniedrigte Ausbeuten festgestellt. Die Analyse der Nebenprodukte ergab neben dem Ethylglycosid auch Verbindungen in denen die Benzylschutzgruppe der

Seitenkette in Position 2 in Folge der Bildung von bicyclischen Verbindungen **75** abgespalten wurde.

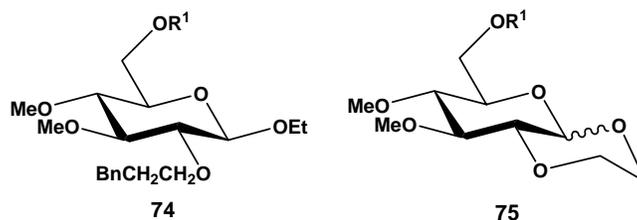


Abb. 4.15: Nebenprodukte der Koenigs-Knorr-Reaktion.

Bei der Synthese des zum gefundenen α 4 β 7-selektiven Mannosederivat **38 β** korrespondierendem Glucosederivat wurde von **59** ausgegangen. Thioglycoside sind allgemein durch die hohe Nukleophilie des Schwefels mit elektrophilen Reagenzien aktivierbar. Durch die Positivierung am S-Atom entsteht somit eine gute Abgangsgruppe. Setzt man das Thioglycosid mit Brom in DCM bei 0 °C um, so erhält man in 30 Minuten das Bromglycosid in guten Ausbeuten. Die anschließende Koenigs-Knorr Reaktion und Verseifung des Esters führte schließlich zur gewünschten Verbindung **76**.

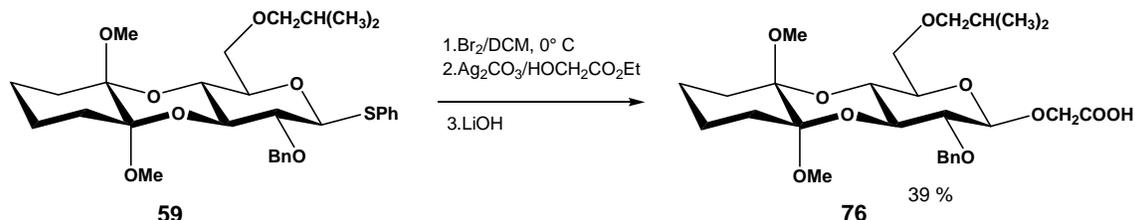


Abb. 4.16: Synthese eines Bromglycosids aus dem Thioglycosid und anschließende Koenigs-Knorr-Reaktion.

Die Stereoselektivität der Koenigs-Knorr-Reaktionen bei Glycosiden wurde durch ^1H und ^{13}C -NMR Spektroskopie, sowie durch Messung der direkten $^1\text{J}(^{13}\text{C}-^1\text{H})$ Kopplungskonstante nachgewiesen. Im ^1H -NMR Spektrum liegt das Signal des direkt am anomeren C-Atom befindlichen Protons im Vergleich zum α -Anomer um 0.3-0.5 ppm hochfeldverschoben und weist eine typische diaxiale $^3\text{J}(^1\text{H}-^1\text{H})$ Kopplungskonstante von 7-9 Hz auf. Das Signal des anomeren C-Atoms ist im Vergleich zu dem α -Anomer um ca. 5 ppm tieffeldverschoben und ist bei einer Verschiebung von ca. 103-106 ppm zu finden. Ein weiteres Unterscheidungskriterium für α - und β -Glycoside ist die stereochemische Abhängigkeit der $^1\text{J}(^{13}\text{C}-^1\text{H})$ Kopplungskonstante: Für das β -Anomer erhält man Werte <160 Hz und für α -Anomere Werte >170 Hz.^[112]

4.2.3 Synthese von α -Glycosiden

Die von Schmidt *et al.* eingeführte Trichloracetimidatmethode zählt zu den am häufigsten angewendeten und erfolgreichsten Glycolysierungsmethoden. Durch basenkatalysierte Addition von Trichloracetnitril an die freie Lactol-Gruppe eines ansonsten geschützten Saccharids kann man in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen α - oder β -Trichloracetimide erhalten.^[113] Die so erhaltenen Trichloracetimide sind stabile und häufig kristalline Verbindungen. Durch Reaktion mit Nucleophilen entstehen unter Standardbedingungen (unpolares Lösungsmittel, inaktive Nachbargruppe an C-2, tiefe Temperaturen) überwiegend die invertierten Glycoside durch eine S_N2 -artige Reaktion.

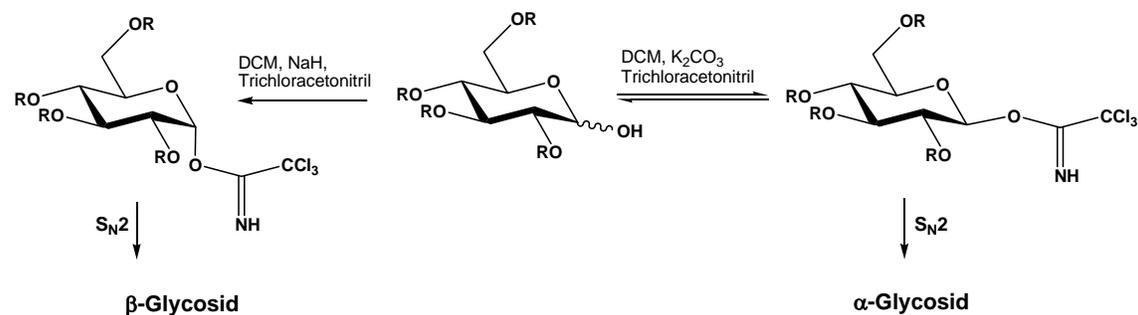


Abb. 4.17: Darstellung von Glycosiden nach der Trichloracetimidatmethode.^[113]

Die für die Trichloracetimidatmethode notwendigen C-1 ungeschützten Saccharide **77** und **78** wurden durch saure Hydrolyse der Methylglycoside mittels Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) in Essigsäure in Ausbeuten von 70-90 % erhalten.^[114] Die anschließende kinetisch kontrollierte Addition von Trichloroacetonitril ergab in überwiegender Menge die β -Trichloracetimide ($\alpha:\beta \cong 1:7$). Die folgende Umsetzung mit dem elektrophilen Promotor Trimethylsilyltriflat und dem Glycosylakzeptor Glykolsäureethylester ergab die α -Glycoside **79** und **80** ($\alpha:\beta \cong 4:1$).

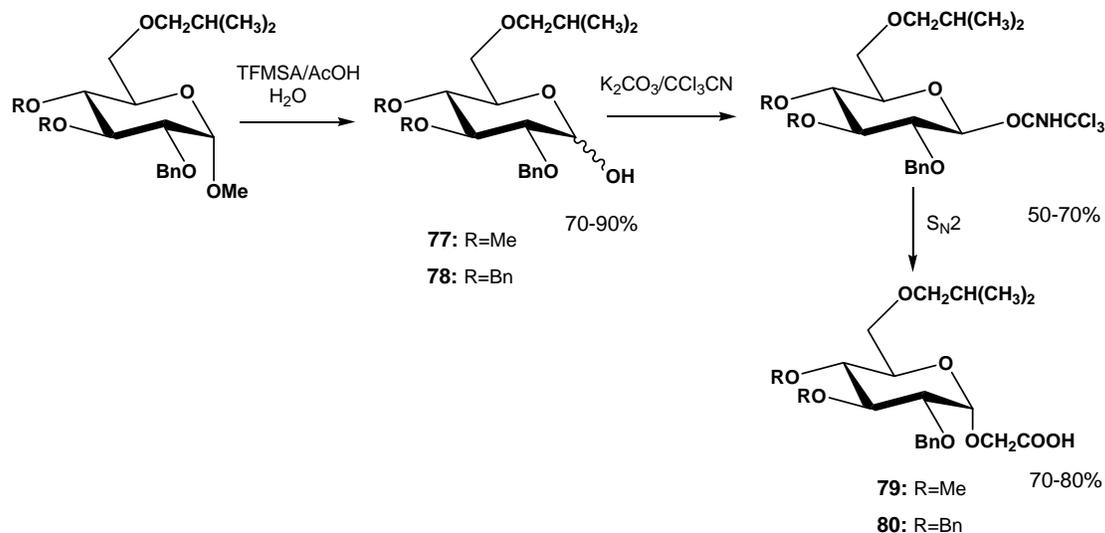


Abb. 4.18: Darstellung von Glycosiden nach der Trichloracetimidatmethode.

Eine analoge Umsetzung mit Verbindungen mit einem 2-Benzyloxyethyl-Rest in Position 2 scheiterte an der Bildung von dem bereits weiter oben angeführten bicyklischen Produkt **75** unter den sauren Bedingungen der Acetalspaltung. Daher wurde das zu **72** korrespondierende α -Anomer über den in Abb. 4.19 gezeigten Weg synthetisiert.

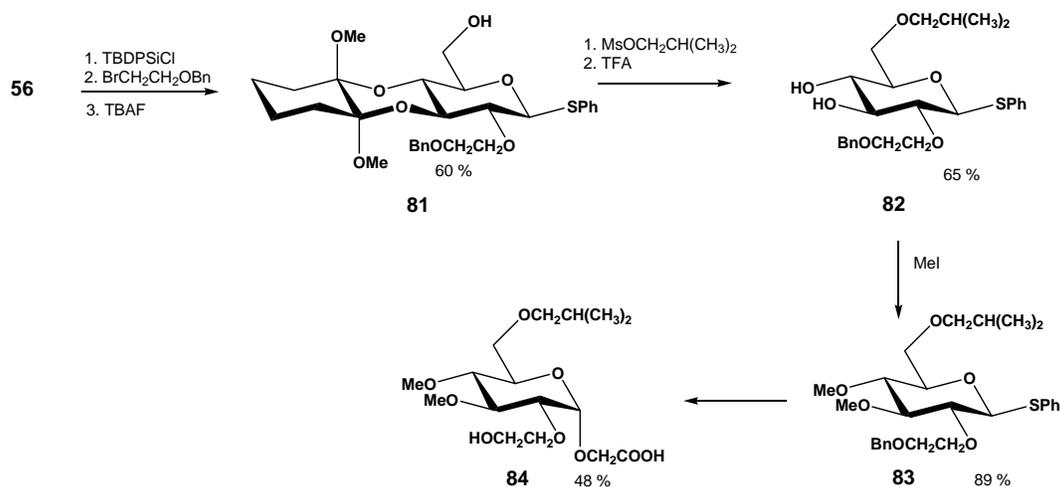


Abb. 4.19: Darstellung von **84**.

Die Darstellung des α -Anomers von **76** gelang aus **59**, durch eine S_N2-artige Reaktion des Glycosyldonors **59** mit einem großen Überschuss an Glykolsäureethylester. Nach Verseifung des Esters konnte **85** in 37%iger Ausbeute über zwei Stufen erhalten werden.

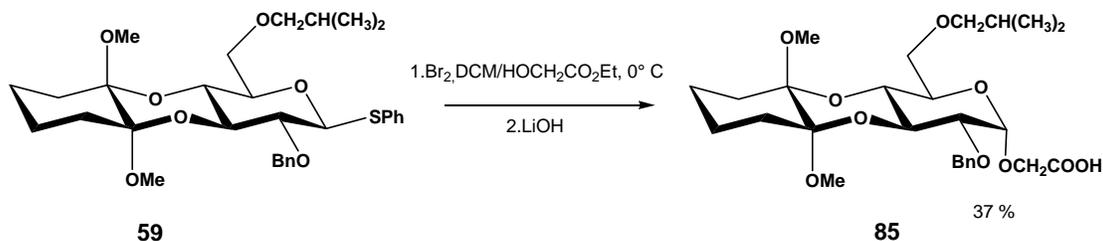


Abb. 4.20: Darstellung von 85.

4.2.4 Synthese von C-Glycosiden

C-Glycoside sollten im Vergleich zu O-Glycosiden metabolisch stabiler sein und außerdem werden durch die Verkürzung der Seitenkette um eine Bindung, starrere Moleküle erhalten.

1992 berichteten Demailly *et al.* über ein einfaches Verfahren zur stereoselektiven Darstellung von C-Glycosiden über eine Reaktion vom Wittig-Typ ausgehend vom Lactol.^[115] Dabei wurden tetrabenzilylierte Monosaccharide mit Tributylphosphin, großem Überschuss Zn und Bromessigsäuremethylester in siedendem Benzol versetzt. Die Reaktion verlief über das isolierbare Reformatsky-Intermediat **84** und lieferte nach Wasserabspaltung und anschließender Zyklisierung stereoselektiv das β -C-Glycosid in 64%iger Ausbeute. Die Reaktion wurde zum Wittig-Typ geordnet, da ohne Tributylphosphin die Reaktion lediglich zum Hydroxyester **88** führte. Eine nachträgliche Zugabe von Tributylphosphin bewirkte keine Dehydratisierung.

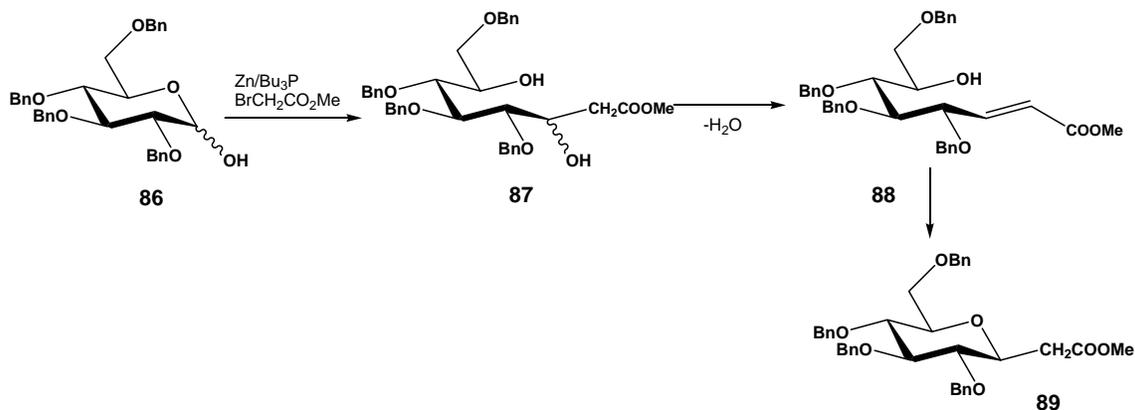


Abb. 4.21: Darstellung von β -C-Glycosiden nach Demailly *et al.*^[115]

Beim Anwenden dieser Reaktion auf **77** ergab sich ein Diastereomerenverhältnis von 5.5:1 zugunsten des β -C-Glycosids. Die Gesamtausbeute bezogen auf die beiden Anomeren war mit 77% zufrieden stellend. Beim mehrmaligen Durchführen der Reaktion zeigte sich eine sehr schlechte Reproduzierbarkeit der Reaktion. Als essentiell für eine erfolgreiche Durchführung erwies sich das Anätzen von elementarem Zink mit verdünnter Salzsäure und das Verwenden von absolutem Benzol. Die anschließende Esterverseifung ergab schließlich die gewünschten diastereomeren Endverbindungen **91** und **92**.

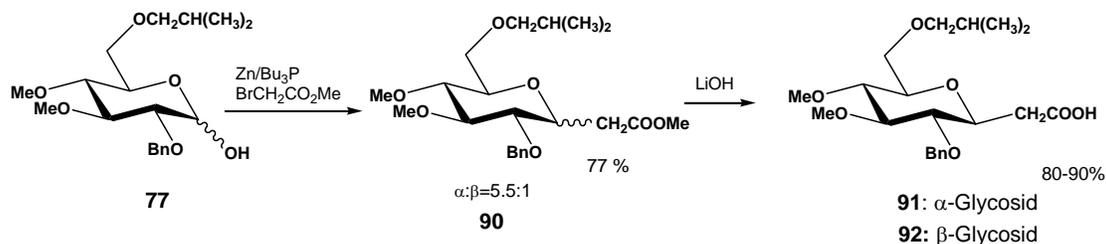


Abb. 4.22: Darstellung von β -C-Glycosiden.

4.2.5 Synthese von Mannosederivaten

Zunächst musste für die biologischen Testungen das als α 4 β 7-selektiv beschriebene Mannosederivat ausgehend von **51** nochmals hergestellt werden.^[104]

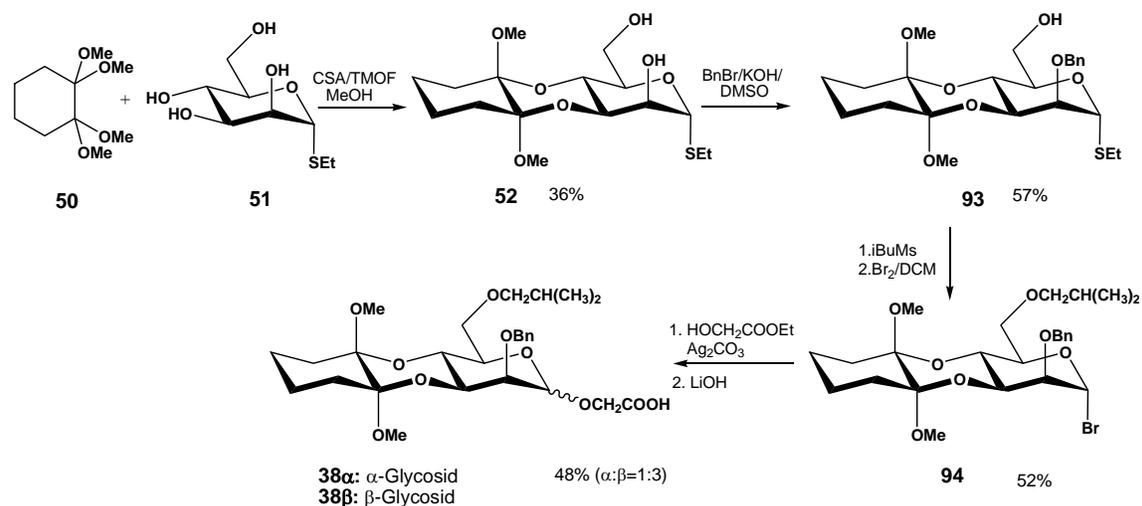


Abb. 4.23: Synthese eines von E. Locardi beschriebenen Mannosederivats.^[104]

Von den erhaltenen CDA-geschützten Mannosiden zeigte nur das β -Anomere **38** eine deutliche Inhibierung der Zelladhäsion von MAdCAM an α 4 β 7-exprimierende Zellen. Um

die Verbindung einerseits metabolisch stabiler zu machen und um andererseits den Einfluss der Kettenlänge des Aspartat-Pharmakophors zu untersuchen, wurde auch das entsprechende um eine Bindung verkürzte β -C-Mannosid dargestellt.

S. Hanessian *et al.* stellten in den frühen 70er Jahren eine Methode zur Darstellung von C-Glycosiden durch Reaktion von Carbanionen mit Glycosylhalogeniden vor. Als C-H-acide Verbindung wurde Malonester eingesetzt.^[116] Es wurden die C-Glycoside durch 40-stündige Reaktion bei Raumtemperatur ausgehend vom Halogenid und Na-Diethylmalonat in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten, wobei die Bildung der β -Glycoside unter Inversion begünstigt war.

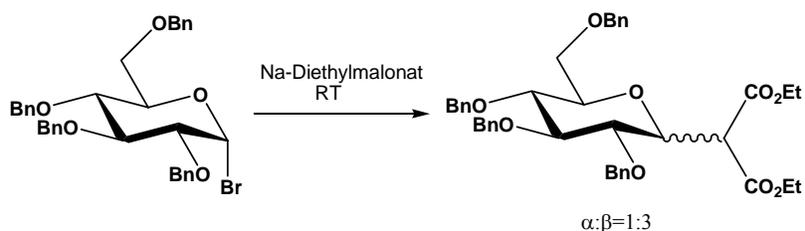


Abb. 4.24: Synthese von C-Glycosiden nach S. Hanessian.^[116]

Bei Anwendung dieser Reaktion auf **94** war auch nach einwöchigem Rühren bei RT keinerlei Reaktion zu beobachten. Auch der Zusatz von Kronenether zur Komplexierung des Na^+ -Kations mit damit verbundener Erhöhung der Nukleophilie des Carbanions brachte keinen Erfolg. Schließlich wurde durch sukzessives Erhöhen der Temperatur die Umsetzung bei 90 °C zum alkylierten Malonester **95** mit guten Ausbeuten durchgeführt. Die Decarboxylierung im Anschluss an die Esterverseifung war erwartungsgemäß mit Schwierigkeiten verbunden, aufgrund der säurelabilen CDA-Gruppe in Position 3 und 4. Durch Behandeln mit Essigsäure bei 90 °C für eine Stunde konnte die gewünschte Verbindung in 35%iger Ausbeute erhalten werden. Bei niedrigeren Temperaturen war die Umsetzung zu langsam und bei höheren kam es zu einer verstärkten Abspaltung von Methanol. Auf weitere Variationen der Reaktionsführung z.B. durch Verwendung anderer Säuren wurde verzichtet. Neben geringen Mengen nicht weiter identifizierten Nebenprodukten konnten in größerer Menge noch **96** (13%, Position der freien OH-Gruppe wurde nicht bestimmt) und nicht umgesetztes Edukt (28 %) nachgewiesen werden (Abb. 4.25)

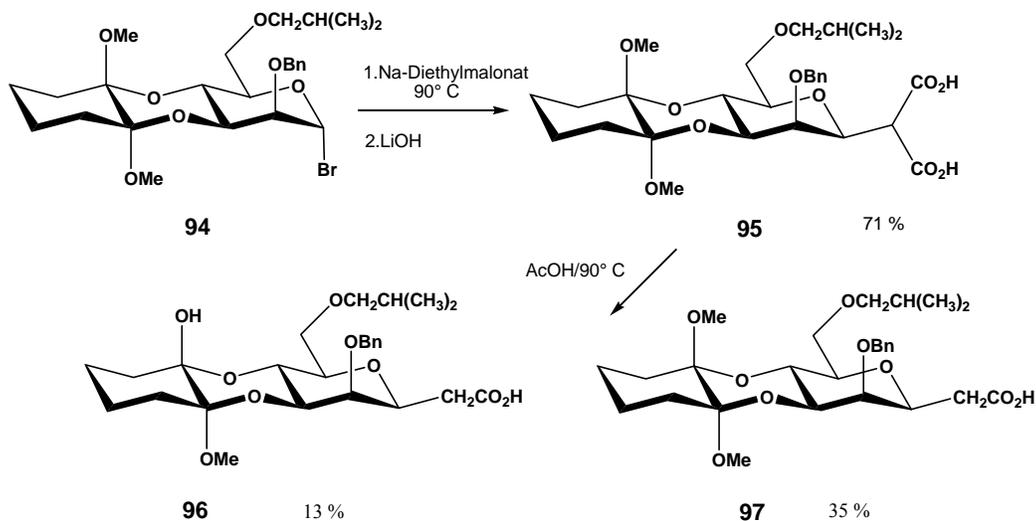


Abb. 4.25: Synthese von C-Mannosiden.

Die Konfiguration in Position 1 wurde durch die Aufnahme von ROESY Spektren bestimmt, welches die nur bei β -Mannosiden auftretenden Kreuzsignale zwischen H1 und H3 bzw. H5 zeigt.

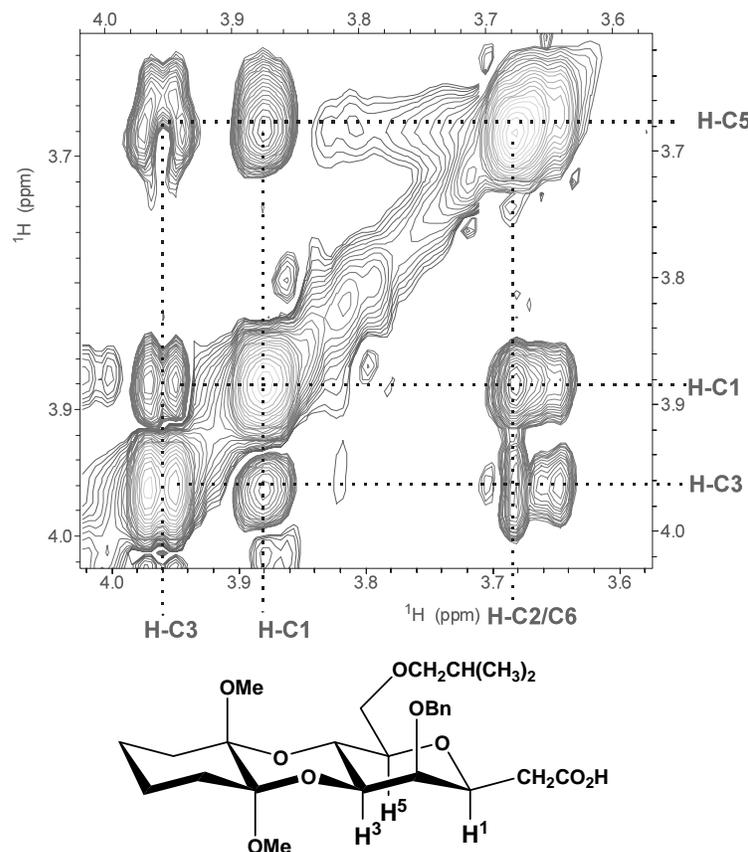


Abb. 4.26: Ausschnitt des ROESY-Spektrums von **97**.

4.3 Biologische Evaluation

Die Synthese der Endverbindungen diene zur Klärung der Frage inwieweit sie als α 4-Integrinantagonisten dienen können. Die daraus gewonnenen Informationen sollten für die Entwicklung neuartiger α 4 β 7-Integrinantagonisten verwendet werden. Die biologische Testung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Bernhard Holzmann, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar durchgeführt.

4.3.1 Zelladhäsionsassay - Allgemeine Testbedingungen

Die Testung der Verbindungen auf ihre biologische Aktivität erfolgte mit Zelladhäsionsassays. Dazu wurden 96er Mikrotiterplatten mit dem entsprechenden natürlichen Liganden MAdCAM-1 und VCAM-1 beschichtet. α 4 β 1- und α 4 β 7- Integrin exprimierende Zellen wurden zunächst fluoreszenzmarkiert und mit der Testsubstanz inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf der Mikrotiterplatte ausgesät und die Fluoreszenz bestimmt. Nach halbstündiger Inkubation wurden nicht adhärierte Zellen durch inverse Zentrifugation entfernt. Adhārierte Zellen konnten durch erneutes Messen der Fluoreszenz quantifiziert werden. Dabei ist die Abnahme der Fluoreszenz ein Maß dafür, wie stark die Verbindung die Ligand-Protein-Wechselwirkung inhibieren kann. Die so erhaltenen Werte stellen keine Fixgrößen dar, sondern sie erlauben aufgrund der Streuung des Testsystems nur Aussagen über aktive und nicht-aktive Verbindungen. Dabei repräsentiert jeder Messwert den Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, bestehend aus drei Einzelmesswerten.

Bei der Beschichtung der Mikrotiterplatten kann durch Variation der Ligandkonzentration die Empfindlichkeit des Testsystems eingestellt werden. Die Empfindlichkeit des Testsystems steigt, wenn die Ligandkonzentration verringert wird. Um stets reproduzierbare Werte zu erhalten ist es wichtig, dass sich bei der biologischen Testung das Verhältnis Zellen/Ligand entweder im Sättigungsbereich bzw. knapp unterhalb davon befindet. Alle Verbindungen wurden mit jenem Testsystem untersucht, bei dem das Verhältnis Zellen/Ligand im Sättigungsbereich lag.

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um α 4 β 7-Integrin- exprimierende 38C13 β 7-Zellen (B Lymphoma-Zelllinie) und um α 4 β 1-Integrin exprimierende Jurkat-Zellen. Da bei der Entwicklung eines Wirkstoffes die Selektivität oftmals eine entscheidende Rolle spielt,

wurden die synthetisierten Verbindungen in den folgenden Testsystemen evaluiert: 38C13 β 7-Lymphoma-Zellen/MAdCAM-1 und Jurkat-Zellen/VCAM-1. Sowohl VCAM-1 als auch MAdCAM-1 gehören zu den endogenen Liganden der α 4 β 7-Integrine. Die Bindungsmotive beider Liganden sind sehr ähnlich. α 4 β 7-Integrine erkennen in MAdCAM-1 die (-GLDTS)-Sequenz, in VCAM-1 die (-QIDSP)-Sequenz und α 4 β 1-Integrine binden ebenfalls über die (-QIDSP)-Sequenz an VCAM-1. Die Selektivitätstests stellen auch einen internen Kontrollversuch dar. Weist eine Verbindung nun in einem Testsystem eine biologische Aktivität auf und in einem anderen nicht, so kann man davon ausgehen, dass diese Verbindung einen spezifischen Effekt hervorruft. Zudem wurden alle *wells* einer Mikrotiterplatte unter dem Mikroskop überprüft, ob sich während der biologischen Testung ein Niederschlag bildete oder die Zellen deformiert aussahen.

Oftmals werden in der Literatur Integrinliganden an aktivierten Integrinrezeptoren getestet. Die Ergebnisse dieser Tests sind aber hinsichtlich ihrer *in vivo* Aussagekraft fraglich. Zum einen fehlen isolierten Integrinrezeptoren wichtige Funktionen, wie etwa die Möglichkeit zur Signaltransduktion oder auch die Möglichkeit andere Ligand/Rezeptor-Wechselwirkungen auszubilden. Darüber hinaus liegen unter physiologischen Bedingungen weniger als 10% der VLA4-Integrine in einem aktivierten Zustand vor. Viele α 4-Integrinantagonisten, die selektiv für aktivierte Integrine sind, binden um Größenordnungen schlechter an nicht-aktivierte Integrine. Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit zelluläre Testsysteme verwendet, die auf eine Aktivierung der Integrine verzichteten. Allerdings sei noch angemerkt, dass auch den α 4-Integrinliganden, die selektiv nur an aktivierte Integrine binden, eine Rolle bei der Behandlung von Krankheiten zukommen kann.

4.3.2 Biologische Evaluation und Diskussion der synthetisierten Monosaccharide

Bei der Durchführung der biologischen Assays wurden die Substanzen zunächst in wenig DMSO angelöst und dann mit der wässrigen Zellsuspension inkubiert. Dabei zeigten die Lösungen der Verbindungen **61** und **80** ($\log P = 5.12$) eine sofortige Trübung nach Zugabe der Zellsuspension. Somit lässt sich bei diesen nicht löslichen Verbindungen keine Aussage über die biologische Aktivität machen. Eine Übersicht über die erhaltenen Werte gibt Abb. 4.27.

Die erhaltenen Werte für die Adhäsion von VCAM-1 an α 4 β 1-Integrine sind dabei nur wenig aussagekräftig, da selbst die in der Literatur als aktiv beschriebene Verbindung **33**^[17] nur einen sehr geringen Effekt auszulösen vermochte. Es scheint, dass im Falle der Verbindung **72** die Konfiguration in Position 2 für die Aktivität wichtig ist, da das

entsprechende Mannosederivat **32** in früheren Testungen eine gewisse biologische Aktivität aufwies.^[103] Allerdings wurde dies bei einer höheren Konzentration von 2 mg/mL beobachtet und nicht in einem gleichzeitigen Assay mit der hier vorliegenden Verbindung verglichen. Die neuerliche Synthese von **32** wäre sehr aufwändig gewesen und wurde nicht wiederholt. Eindeutige Aussagen könnten nur bei der parallelen Evaluation durch Verwendung der gleichen Zellsuspension gemacht werden.

Verbindungen mit Methoxygruppen in den Positionen 3 und 4 (z.B. **63**, **64**, **79**, **91**, **92** oder **72**) scheinen angesichts der erhaltenen Daten generell schlecht geeignet zu sein die Adhäsion von CAMs an α 4-Integrine zu inhibieren. Zusätzliche polare Gruppen wie in Verbindung **95** (zusätzliche Säuregruppe) oder in Verbindung **96** (freie Hydroxygruppe) wirken sich ebenfalls ungünstig auf die biologische Aktivität aus.

	38- β 7(α 4 β 7) MAdCAM Adhäsion [%]	Jurkat (α 4 β 1) VCAM Adhäsion [%]		38- β 7(α 4 β 7) MAdCAM Adhäsion [%]	Jurkat (α 4 β 1) VCAM Adhäsion [%]
	ausgefallen		80	ausgefallen	
	n. d.	100 \pm 7 ^a	64	n. d.	79 \pm 1
	100 \pm 3 ^a	82 \pm 10	73	60 \pm 5 ^a	85 \pm 20 ^a
	30 \pm 16	85 \pm 7	79	46 \pm 9	n. d.
	89 \pm 6	90 \pm 11	91	88 \pm 3	n. d.
	80 \pm 9	92 \pm 8	84	24 \pm 9	100 \pm 1 ^a
	8 \pm 3	87 \pm 2 ^a	85	9 \pm 3	63 \pm 10 ^a
	6 \pm 4	57 \pm 1 ^a	38alpha	16 \pm 5	93 \pm 4 ^a
	8 \pm 3	60 \pm 9 ^a	95	82 \pm 8	n. d.
	29 \pm 1	63 \pm 1 ^a	33b	1 \pm 2 ^a	54 \pm 9 ^a

^aEinzelmessung^bLit. [117]

Abb. 4.27: Zelladhäsion in Prozent bezüglich eines Kontrollmediums in Gegenwart von 1 mg/mL Testverbindung \pm Standardabweichung.

Die Stereoisomere **38 α** , **76** und **85** des beschriebenen α 4 β 7 selektiven Mannosederivats **38 β** zeigten alle innerhalb des Fehlers vergleichbare Werte. Das früher als inaktiv beschriebene α -Mannosid **38 α** zeigte immerhin die geringste Aktivität darunter. Auch das

verkürzte C-Mannosid zeigte eine hohe Reduktion der Adhäsion von MAdCAM an α 4 β 7-Integrin exprimierende Zellen bei einer Konzentration von 1 mg/mL. Von den Verbindungen **33**, **38 β** , **76** und **97** wurden zudem die IC₅₀ Werte bestimmt (Abb. 4.28). Leider waren bei den Messungen die Fehlerwerte sehr hoch. Innerhalb dieser Fehler ergaben sich etwa vergleichbare Werte für die vier Verbindungen. Das Mannosid **38 β** zeigte dabei die höchste biologische Aktivität, das entsprechende Glycosid die niedrigste. Im Gegensatz zu früheren Experimenten erwies sich die Referenzverbindung **33** im Vergleich zum Mannosederivat als weniger aktiv.

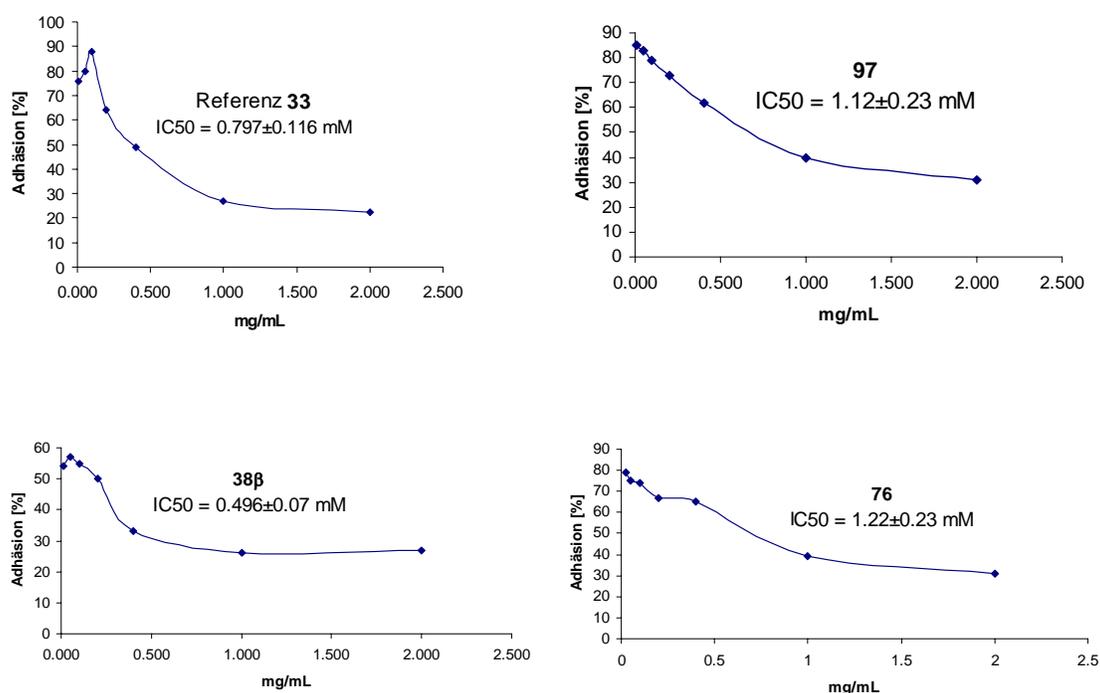


Abb. 4.28: IC₅₀-Kurven der Verbindungen **33**, **38 β** , **76** und **97**.

Eine mögliche Erklärung der vergleichbaren Aktivitäten wurde anhand von Rechnungen von engerminimierten Strukturen versucht. Bei der Superimposition von möglichen Strukturen (generiert durch SYBYL version 6.9) der stereoisomeren Verbindungen **38 β** und **85** kann man die Phenylgruppe und die Säuregruppierung über die zwei frei drehbaren Bindungen gut zur Deckung bringen (Abb. 4.29). Falls diese Gruppierungen spezifische Bindungen zum α 4 β 7-Integrin eingehen, könnten sie somit bei beiden stereoisomeren Verbindungen stattfinden.

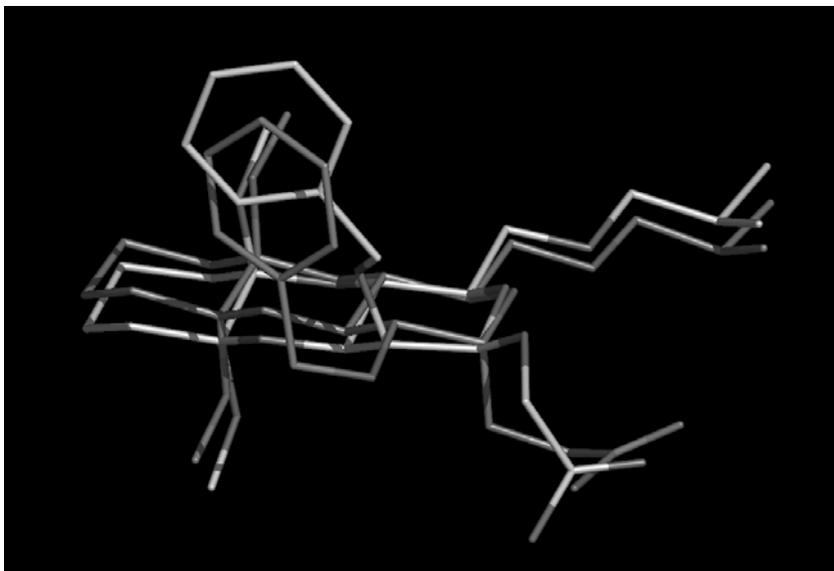


Abb. 4.29: Überlagerung von energieminierten Strukturen der Verbindungen 38β und 85 .

Insgesamt gesehen sind insbesondere die Derivate mit Methoxygruppen in den Positionen 3 und 4 und ohne zusätzlicher Hydroxygruppe in der Seitenkette in Position 2 wenig geeignet für medizinische Anwendungen, da sie weder als Pulver noch kristallin erhalten wurden, sondern als Öle vorliegen. Dies erschwert die Handhabung der Substanzen für biologische Testungen. Beim Lyophilisieren der Substanzen in kleinen Gläschen befindet sich oft ein beträchtlicher Teil am Rand des Gläschens und beim Anlösen in wenig DMSO kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der Substanz dort verbleibt. Die Verbindungen mit der CDA-Schutzgruppe in den Positionen 3 und 4 tendieren zum Vorliegen in fester Form. Aussichtsreichster Kandidat für eine weitergehende Optimierung dieser Liganden scheint, aufgrund der erhöhten Stabilität im Vergleich zu *O*-Glycosiden, das *C*-Mannosid **97** zu sein,.

4.3.3 Kritische Betrachtung von Zell-Adhäsionsassays

Beim Vergleich der Wirksamkeit von Antagonisten ist zu beachten, dass die beschriebenen Affinitäten keine wahren Gleichgewichtskonstanten darstellen. IC₅₀-Werte hängen stark von der Konzentration, dem Assayformat und dem Expressionsmuster der Zellen ab, und spiegeln eventuell die wahren Affinitäten der getesteten Verbindungen für die Integrinrezeptoren nicht exakt wieder. Die verschiedensten Assay-Bedingungen, die in verschiedenen Laboratorien etabliert wurden, um Integrinliganden zu evaluieren, lässt den Vergleich der verschiedenen Verbindungen untereinander zu einer schwierigen Herausforderung werden. Zudem

betrachten die meisten Bindungsassays eine kompetitive Hemmung der Antagonisten mit zwei verschiedenen Liganden – VCAM und MAdCAM – an zwei verschiedenen Integrinrezeptoren, woraufhin die Bestimmung von Selektivitäten auf α 4 β 1 bzw. α 4 β 7, die sich auf die bestimmten IC₅₀-Werte bezieht, irreführend sein kann.

Trotzdem können viele Schlüsse aus den ermittelten Daten gezogen werden. Meist liefern Zell-Adhäsionsassays höhere IC₅₀-Werte im Vergleich zu Testsystemen an isolierten Rezeptoren, da es an der Zelloberfläche zu multiplen Rezeptor-Wechselwirkungen kommen kann. Die IC₅₀-Werte von Verbindungen aus der gleichen Testreihe spiegeln gewöhnlich verlässliche relative Affinitäten wieder. Dagegen variieren die Werte aus unterschiedlichen Laboratorien teils beträchtlich und die Daten sollten mit äußerster Vorsicht interpretiert werden.

5 SOMATOSTATINREZEPTOREN ALS ZIELSTRUKTUREN FÜR TUMORIMAGING UND -THERAPIE

5.1 Bildgebung und Therapie von Tumoren

Antikörper, Peptide oder nicht-peptidische Verbindungen, welche in der Lage sind, an Antigene oder Rezeptoren, die auf Tumorzellen überexprimiert werden, selektiv und mit hoher Affinität zu binden, sind aussichtsreiche „*tracer*“-Kandidaten für bildgebende Verfahren (*imaging*) sowie für Antigen- und Rezeptor-basierte Radiotherapie (Peptidrezeptorradiotherapie, Radioimmuntherapie).

Im Hinblick auf die Diagnostik von Tumoren wurden in den letzten drei Jahrzehnten große Fortschritte erzielt und eine Reihe sich ergänzender bildgebender Verfahren entwickelt. Dazu gehören die MRI (Magnetresonanztomographie),^[118, 119] die FMT (*fluorescence-mediated molecular tomography*),^[120] das FRI (*fluorescence reflectance imaging*), die Doppler Sonographie und szintigraphische Methoden.^[121] Bei den szintigraphischen Methoden SPECT (*single photon emission computed tomography*) und PET (Positronenemissionstomographie)^[122] werden Adressierungseinheiten (mABs oder kleine organische Moleküle, wie Zucker, Aminosäuren, aber auch Peptide und Peptidmimetika) mit einem Radionuklid markiert. Die resultierenden *tracer* bzw. Radiopharmaka wechselwirken *in vivo* mit ihren Zielstrukturen und erlauben daher eine nicht-invasive Visualisierung und auch Quantifizierung der Verteilung der adressierten Prozesse. So können z.B. spezifische *targets* vor einem Therapiebeginn quantifiziert werden und somit Aussagen über die erwartete Therapiewirkung gemacht werden. Außerdem kann eine optimale Dosierung von Chemotherapeutika bestimmt und der Therapieverlauf durch ein abnehmendes *target binding* verfolgt werden. In jüngster Zeit gelingt durch den Einsatz von Hybrid-Techniken, wie beispielsweise SPECT/CT oder PET/CT, die gleichzeitige Aufnahme von biochemischem Signal (PET/SPECT) und Morphologie (CT).^[123]

Einige radiomarkierte monoklonale Antikörper (mAB *monoclonal antibody*) zur Radioimmuntherapie onkologischer Erkrankungen sind bereits von der FDA freigegeben oder befinden sich in klinischen Studien unterschiedlicher Phasen.^[124] So wird z.B. ¹³¹I-Tositumomab[®] - ein radiomarkierter anti-CD20-Antikörper - von der Firma Bexxar erfolgreich zur Behandlung des Non-Hodgkin Lymphomas (NHL) eingesetzt.^[125] Gleiches gilt für den anti-CD20-AK ⁹⁰Y-Zevalin (⁹⁰Y-Ibritumomab-Tiuxetan, Schering). Als generelle Nachteile einer Radioimmuntherapie mit Antikörpern sind zu nennen: a) die Immunogenität

bei Verwendung von Maus-Antikörpern (HAMA, *Human anti-Mouse-antibody response*), die eine wiederholte Gabe einschränkt, b) die erschwerte Aufnahme (Diffusion) ins Tumorgewebe und c) die verzögerte Ganzkörpereliminierung aufgrund ihres hohen Molekulargewichts.^[126] Eine viel versprechende Alternative zu den Antikörpern stellen kleine Peptide und Peptidmimetika, oder andere niedermolekulare Verbindungen wie Steroide, dar.^{[127, 128] [129]}

Die Wahl des Radionuklids hängt von der Fragestellung (Diagnostik, Therapie) und der Aufnahmemethode (PET, SPECT) ab. Eine Übersicht über einige eingesetzte Radioisotope, deren Strahlungseigenschaften, Markierungsmethode und zugehöriger Bildgebungsmethode zeigt Tab. 5.1.

Tab. 5.1: Bei der nicht-invasiven Bildgebung verwendete Radionuklide.

Isotop	$t_{1/2}$	Strahlung	Energie [keV]	Verwendung	Markierungsmethode
^{11}C	20 min	β^+	960	PET	Alkylierung mit $^{11}\text{CH}_3\text{I}$, $\text{S}_{\text{N}}2$ mit $^{11}\text{CN}^-$
^{18}F	109.8 min	β^+	635	PET	Substitutionsreaktion mit $^{18}\text{F}^-$ ($\text{S}_{\text{N}}2$) oder „ ^{18}F “ ($\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$)
^{124}I	4.2 d	β^+ (23%)	2130	PET	$\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$
^{68}Ga	68 min	β^+ (88%)	1899	PET	Komplexierung
^{123}I	13 h	γ	159	SPECT	$\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6 h	γ	140	SPECT	Komplexierung
^{111}In	2.8 d	γ , Auger	247	SPECT	Komplexierung
^{125}I	8 d	γ	364	in vitro Tests	$\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$
^{131}I	8.0 d	γ , β^-	606	Radiotherapie	$\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$
^{177}Lu	6.7 d	β^-	490	Radiotherapie	Komplexierung
^{188}Re	17 h	γ , β^-	2118	Radiotherapie	Komplexierung
^{90}Y	2.7 d	β^-	2270	Radiotherapie	Komplexierung

Bei der PET-Technik werden die durch 2-Quantenvernichtung eines Positroniums resultierenden Photonen, die mit einer Energie von 511 keV in einem Winkel von 180° emittiert werden, detektiert, während in der SPECT-Technik die Photonen von γ -Emittoren mit einer Gammakamera nachgewiesen werden. Durch die antiparallele Anordnung der γ -Quanten kann beim PET ohne Kollimator (lässt Photonen nur aus bestimmten Richtungen passieren) eine quantitative Bestimmung der Verteilung der Radioaktivität mit hoher Auflösung erreicht werden. Außerdem ist die tomographische Abbildung innerhalb weniger Minuten möglich (Aufnahme von Kinetiken), während bei der Aufnahme von SPECT-Bildern längere Messzeiten benötigt werden. Bei *tracern* mit sehr rascher Verteilung im Organismus, wie kleinen Peptiden und Peptidmimetika, ist somit nur PET als bildgebendes Verfahren geeignet.

Für den Erfolg der PET in der Onkologie und den daraus resultierenden Entwicklungen war hauptsächlich die Einführung des Glucoseanalogons ^{18}F -Fluorodeoxyglucose (FDG) ausschlaggebend. Durch die erhöhte Aufnahme von FDG als exogenes Substrat für den Glukosetransporter und der Hexokinase in Tumorzellen ist es möglich, die erhöhte Glukoseutilisation von Tumoren (Biochemisches Signal) mittels PET zu visualisieren (Lokalisation des Tumors) und zu Quantifizieren (*Tumorstaging and -grading*).^[130, 131] Für die PET geeignete Radionuklide sind u.a. ^{18}F , ^{13}N , ^{11}C , ^{15}O , ^{68}Ga und ^{124}I .^[132] Gegenüber anderen Positronenstrahlern zeichnet sich ^{18}F durch folgende Vorteile aus und ist somit ein nahezu idealer Kandidat für klinische Anwendungen.^[133]

- Die Halbwertszeit von 109.7 min erlaubt genügend Zeit für die Synthese und die PET-Untersuchung und erleichtert auch kinetische Studien.
- In nicht fluorhaltigen metabolischen Substraten sind bei Substitution eines Wasserstoffatoms durch Fluor die sterischen Veränderungen minimal (Erhalt der biologischen Integrität).
- Im Vergleich zu anderen Positronenemittern besitzt ^{18}F die niedrigste Positronenenergie; die erzielte Auflösung ist somit maximal.

Ein generell als optimal zu bewertendes Radionuklid für die PET kann es jedoch nicht geben, da die nuklearen Eigenschaften stets mit der physiologischen Zielstruktur und der *Tracerkinetik* korrelieren muss. So wird man z.B. bei der Markierung von mABs mit längerer Biodistribution auf Radionuklide wie ^{124}I oder ^{86}Y mit längerer Halbwertszeit zurückgreifen.^[134]

Typische γ -Strahler, die in der SPECT eingesetzt werden sind ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ und ^{111}In . Gegenwärtig finden $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - und ^{111}In -markierte Liganden Anwendung für das *Peptidrezeptorimaging* bei Rezeptorsystemen wie z.B. Somatostatinrezeptor-2,^[135]

„Glucagon-like-peptide“-Rezeptor GLP-1^[136], Cholecystkinin-Rezeptoren^[137] und Neurokinin-1-Rezeptor NK-1^[138], oder werden gegenwärtig evaluiert.

Radiopharmaka werden auch verstärkt in der Therapie als Alternative oder adjuvante Therapieoption zur herkömmlichen Chemotherapie verwendet. Neben der Kontrolle des Therapieverlaufs durch *imaging* ist man bestrebt, die Tumorzellen direkt durch die radioaktive Strahlung zu zerstören. Während ¹³¹I schon länger zur Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen eingesetzt wird,^[139] werden radiomarkierte Somatostatinanaloga zur Behandlung neuroendokriner Tumore als sehr viel versprechend angesehen.^[140, 141] Aufgrund der unterschiedlichen Reichweiten radioaktiver Strahlung im Gewebe wird ⁹⁰Y z.B. zur Behandlung größerer Tumorcluster eingesetzt, während für kleinere ¹⁷⁷Lu gegenwärtig als optimales Nuklid diskutiert wird.^[142]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Radionuklidtherapie als Ergänzung zur chirurgischen und zur Chemotherapie-basierten Behandlung von Tumoren dienen kann, während die Diagnostik mittels Radiopharmaka zunehmend unverzichtbar wird. Angesichts der erwähnten Nachteile der Antikörper gegenüber kleineren Peptiden, Mimetika etc. stellen hoch affine und selektive Radiopharmaka auf der Basis von kleineren Molekülen eine viel versprechende Alternative dar.

5.2 Methoden zur Radiomarkierung

Um ein Radionuklid an die gewünschte Adressierungseinheit zu knüpfen, stehen prinzipiell die kovalente Verknüpfung und die Komplexierung von Radionukliden über Chelatoren zur Verfügung.

Eine radioaktive Markierung mit Iod kann durch elektrophile aromatische Substitution in *ortho*-Position zu einer phenolischen OH-Gruppe mit Hilfe von z.B. Chloramin T^[143] oder Iodogen^{®[144]} eingeführt werden (Abb. 5.1). Diese Reagenzien bewirken eine Oxidation von Iodiden zu Iod, das anschließend elektrophil an aktivierte Aromaten substituiert wird. Da Monoiodtyrosin im Organismus einer enzymatischen Deiodierung^[145] unterliegt, ist man bestrebt, entsprechende iodierte Aromaten ohne Hydroxygruppe über geeignete *precursor* wie aromatische Silyl-^[146] oder Stannylderivate^[147] durch *ipso*-Substitution darzustellen. Neue Ansätze zur direkten regioselektiven Iodierung von nicht aktivierten Phenylalaninen mittels Bis(pyridin)iodonium tetrafluoroborat in Gegenwart von TFA könnten in Zukunft ebenfalls für Radiomarkierungen in nicht tyrosinhaltigen Peptiden genutzt werden.^[148]

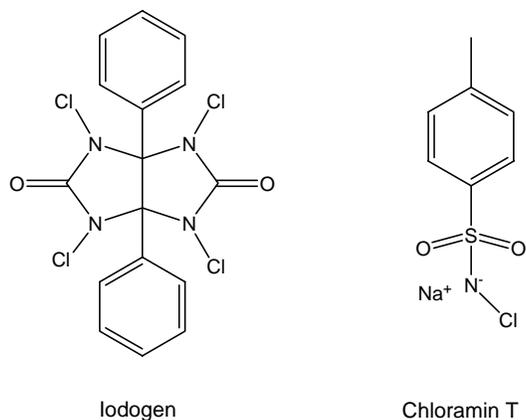


Abb. 5.1: Für die Einführung von radioaktiven Iod verwendete Reagenzien.

^{11}C für PET-Untersuchungen wird häufig durch Methylierung von Alkoholen, Aminen, Säuren etc. mit $[^{11}\text{C}]$ -Iodmethan oder durch nukleophile Substitution mit $[^{11}\text{C}]$ -Cyanid eingeführt. ^{18}F kann durch nukleophile Substitution im K_2CO_3 /Kryptofix 2.2.2 System (Komplexierung des Kaliums mit Kryptofix 2.2.2) sowie durch elektrophile aromatische Substitution mit ^{18}F -Acetylhypofluorid^[149] eingeführt werden. Außerdem werden auch ^{18}F -markierte prosthetische Gruppen, wie 2- ^{18}F -Fluorpropionsäure oder 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure bzw. die entsprechenden aktivierten Vorstufen in Acylierungsreaktionen eingesetzt.^[150, 151] Kürzlich wurde im Klinikum rechts der Isar in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe eine rasche und effiziente Methode der Radiomarkierung durch chemoselektive Oximligation mit p- ^{18}F -Fluorbenzaldehyd entwickelt. Zunächst wird durch nukleophile aromatische Substitution p- ^{18}F -Fluorbenzaldehyd hergestellt, der anschließend mit dem aminooxy-funktionalisiertem Peptid umgesetzt wird.^[152]

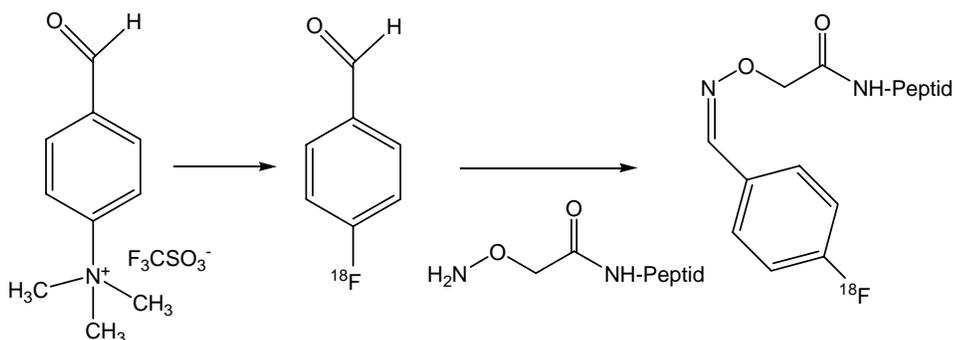


Abb. 5.2: ^{18}F -Markierung von Peptiden mittels chemoselektiver Ligation.

Über einen Chelator, der über einen *linker* kovalent an das Trägermolekül gebunden ist, können Radionuklide indirekt an die gewünschte Verbindung geknüpft werden. Ein idealer Chelator sollte das Radionuklid rasch, in hoher Ausbeute und unter möglichst milden

Bedingungen koordinieren und einen möglichst stabilen Komplex *in vivo* bilden. Sehr verbreitet sind mehrzählige Liganden basierend auf Polyaminocarboxy-Verbindungen wie z.B. Diethyltriaminpentaessigsäure (DTPA), 1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) oder 1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure (NOTA). Diese Liganden eignen sich hervorragend für die Komplexbildung zwei- und vor allem dreiwertiger Kationen durch bis zu achtfache Koordinierung über die N/O-Donoren.^[128, 153] Cyclische Liganden haben gegenüber linearen den Vorteil einer stabileren Komplexbildung.^[154] So kommt es bei Komplexen mit DOTA selbst bei pH-Werten von <2 zu keiner wesentlichen Dekomplexierung.^[155, 156]

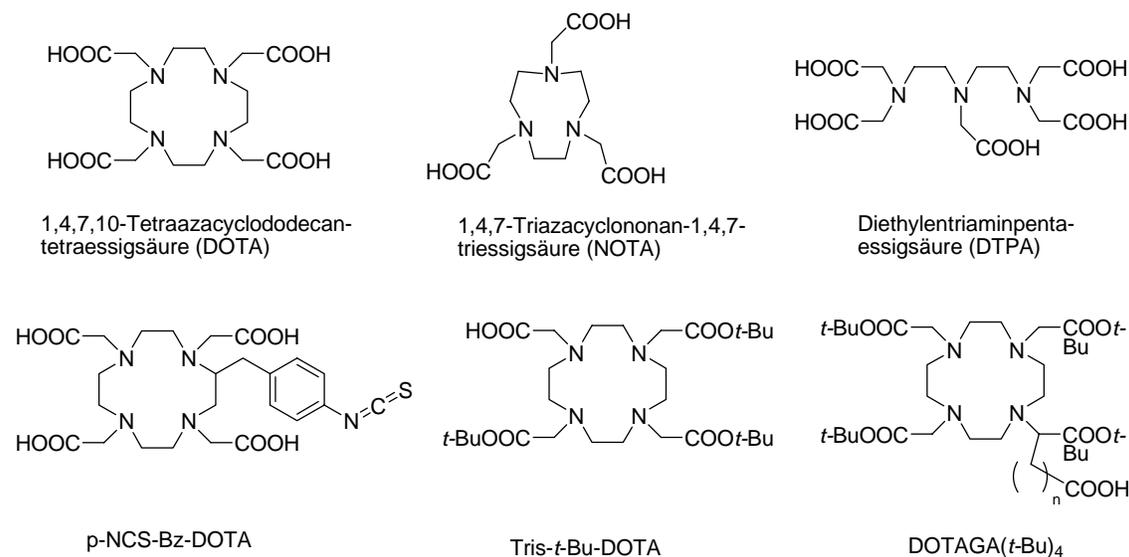
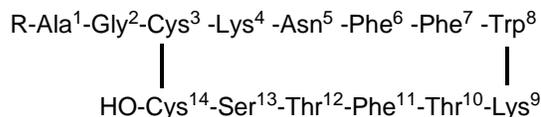


Abb. 5.3: Verschiedene bivalente Chelatliganden für Metallkationen (oben) und Chelatliganden mit freier Funktionalität zur Anbindung an Adressierungseinheiten (unten), die in der Nuklearmedizin Verwendung finden.

Die Isothiocyanatgruppe in p-NCS-Bz-DOTA^[157] sowie die einzige freie Säuregruppe in DOTAGA(*t*-Bu)₄^[158] können zur selektiven Anbindung an freie Aminogruppen im Trägermolekül benutzt werden. Bei dreifach *t*Bu-geschütztem DOTA kann über die freie Säuregruppierung an freie Amine in Peptiden gebunden werden. Das Sauerstoffatom der resultierenden Amidbindung kann weiterhin als Donor für die Chelatbindung an Radionuklide dienen. Gegenwärtig werden in der Literatur zunehmend auch Festphasensynthesen zur direkten DOTA-Funktionalisierung beschrieben.^[159, 160]

5.3 Somatostatin

Somatostatin (SST) bzw. "somatotropin release-inhibiting factor" (SRIF) ist ein endogenes, cyclisches Peptidhormon, welches hauptsächlich von endokrinen, gastrointestinalen, immun- und neuronalen Zellen und von verschiedenen Tumoren produziert wird und in zwei natürlich vorkommenden, biologisch aktiven Formen existiert.^[161-164] Sowohl SRIF-14 als auch SRIF-28 werden biosynthetisch als C-terminale Fragmente aus Prosomatostatin erhalten.^[165]



98 SST-14: R = H

99 SST-28: R = H-Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Lys-

Abb. 5.4: Natürlich vorkommende Somatostatine.

Bei der Entdeckung 1973 wurde gefunden, dass Somatostatin die Ausschüttung von Wachstumshormon (*growth factor*, GH) inhibiert. Später hat man noch eine Reihe von anderen physiologischen Funktionen gefunden, die durch die Anbindung an die Somatostatin-Rezeptoren vermittelt werden. So spielt es eine zentrale regulatorische Rolle bei der Neurotransmission, Zellproliferation und bei der endo- und exokrinen Hormonausschüttung. Die Fülle der Effekte sind auf die Inhibierung von endokriner Sekretion – z.B. von Insulin, Glucagon, Gastrin oder Cholecystokinin – sowie exokriner Sekretion, wie z.B. von Magensäure oder Enzymen des Magens, und auf die Inhibierung der Zellproliferation zurückzuführen.^[166, 167] Zudem hat man mehrere Wirkungen im Bereich des zentralen Nervensystems beobachtet, wo Somatostatin die lokomotorische Aktivität, kognitive Funktionen und die Entwicklung des neuroendokrinen Systems beeinflusst.^[168, 169]

5.4 Somatostatinrezeptoren und ihre Funktion

Man kennt bis heute fünf Somatostatinrezeptor-Subtypen (SSTR1-5), wobei im Falle des SSTR2 zwei verschiedene *splice*-Varianten gefunden wurden (SSTR2A und SSTR2B). Die SSTRs gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) mit sieben transmembranen α -Helices und wurden durch Klonierung identifiziert und charakterisiert. Die Sequenzhomologie der unterschiedlichen Subtypen beträgt 39-57%. Die hauptsächlichsten

Unterschiede liegen in ihren C- bzw. N-terminalen Segmenten, was für die Ligandenspezifität und die intrazelluläre Signaltransduktion maßgeblich ist. Für einen gegebenen Subtyp liegt eine sehr hohe Sequenzhomologie zwischen unterschiedlichen Spezies (81-98% für Maus, Mensch und Ratte) vor.^[170] Die SSTRs werden hauptsächlich in der Hypophyse, im Pankreas und im gastrointestinalen Trakt gefunden.^[166] Wichtig für die Tumordiagnose und -therapie ist die starke Expression auf einer Vielzahl von Krebszellen. Die meisten Tumore exprimieren hauptsächlich SSTR2 und weniger häufig SSTR1,3,5 und selten SSTR4.^[171-174] Die vorliegenden Daten in der Literatur über die Quantifizierung von SST-Rezeptoren in Tumoren sind allerdings häufig nicht direkt zu vergleichen, aufgrund der verschiedenen Detektionsmethoden wie Rezeptorautoradiographie, Bindungsstudien an isolierten Membranen, immunohistochemische Methoden mit Antikörpern oder Reverser Transkriptase Polymerase Kettenreaktion.

Die natürlichen Liganden SRIF-14 und SRIF-28 sowie Cortistatin binden in nanomolarer Affinität an SST-Rezeptoren. Die Liganden-vermittelte Aktivierung der SST-Rezeptoren induziert eine G-Protein Aktivierung und Signalübertragung über verschiedene Wege. Die Bedeutung von SST-Rezeptoren als *targets* für die Tumorthherapie liegt in ihrer Fähigkeit, die Zellproliferation zu steuern sowie die Apoptose einzuleiten und Zellwachstum zu stoppen.^[175-177]

GPCRs besitzen die Fähigkeit agonistenabhängig zu internalisieren. Unter den SST-Rezeptoren zeigen die Subtypen 2-5 gegenüber dem SSTR1 eine verstärkte Internalisierung.^[178, 179] Dies wird therapeutisch vor allem im Falle des SSTR2 ausgenutzt, indem man hochaffine Liganden mit cytotoxischen Liganden oder mit Radionukliden mit geringer Strahlenreichweite verknüpft, und so gezielt Tumorzellen zerstört.

Eine weitere Eigenschaft der SST-Rezeptoren, wie auch anderer GPCRs, ist die Oligomerisierung in der Membran infolge einer Ligandenaktivierung. Durch korrelierte Fluoreszenzspektroskopie konnten Abstände von zwei fluoreszenzmarkierten Liganden, die an unterschiedliche Rezeptoren binden, von 50-60 Å ermittelt werden. Allerdings ist bislang noch nicht geklärt inwieweit die Oligomerisierung für die Rezeptoraktivierung oder -modulation eine Rolle spielt.^[180, 181]

5.5 Somatostatinanaloga in der Krebsdiagnose und -therapie

Neben der Beeinflussung von Krankheiten wie z.B. Diabetes,^[182] rheumatoide Arthritis,^[183] und gastrointestinale Fehlfunktionen^[184] durch Somatostatin-vermittelte Wirkungen, sind die Einflüsse auf die GH-Sekretion und Zellproliferation für die Entwicklung von Somatostatin-analogen Verbindungen bei der Krebsbekämpfung von großem Interesse. Somatostatin selbst ist aufgrund seiner geringen Plasmahalbwertszeit von weniger als drei Minuten (90 sec) nur sehr begrenzt einsetzbar.^[185] Außerdem binden die beiden endogenen Somatostatine SST-14 und SST-28 unselektiv an alle fünf SST-Rezeptoren. Daher wurden in den letzten zwei Jahrzehnten zahlreiche Somatostatin-analoge Verbindungen mit stark verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften und erhöhten Rezeptorselektivitäten entwickelt.^[167, 186] So konnte man die Peptidsequenz systematisch auf acht Aminosäuren verkürzen, woraus kleinere, cyclische, endopeptidastabile Peptide resultierten, wie z.B. Octreotid,^[187] Lanreotid oder Vapreotid^[188] mit hohen Affinitäten (im unteren nanomolaren Bereich) für SSTR2,5 einer stärkeren Inhibierung der GH-Sekretion und deutlich verlängerten Plasmahalbwertszeiten (80-100 min). Für den Erhalt der biologischen Aktivität waren dabei die Aminosäurereste Phe⁷-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰ essentiell, wobei die Positionen 7 und 10 leichte Modifikationen (Phe⁷ → Tyr⁷ bzw. Thr¹⁰ → Ser¹⁰, Val¹⁰) tolerieren.

	$\begin{array}{c} \text{H-D-Phe}^5\text{-Cys-Phe-D-Trp}^8 \\ \qquad \qquad \\ \text{Thr(ol)-Cys-Thr-Lys}^9 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H-D-Phe}^5\text{-Cys-Phe-D-Trp}^8 \\ \qquad \qquad \\ \text{H}_2\text{N-Trp-Cys-Val-Lys}^9 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H-D-}\beta\text{Nal}^5\text{-Cys-Tyr-D-Trp}^8 \\ \qquad \qquad \\ \text{HO-Thr-Cys-Val-Lys}^9 \end{array}$		
	Octreotid	Vapreotid	Lanreotid		
Peptid	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
SST-14	1.1	1.3	1.6	0.53	0.9
SST-28	2.2	4.1	6.1	1.1	0.07
Octreotid	>1000	2.1	4.4	>1000	5.6
Vapreotid	>1000	5.4	31	45	0.7
Lanreotid	>1000	1.8	43	66	0.62

Abb. 5.5: Peptidische Somatostatin-Analoga und ihre receptorspezifischen Affinitäten K_i (in nM).

Die hervorragenden Affinitäten von Octreotid für SSTR2 machten das Peptid zum idealen Kandidaten für die nuklearmedizinische Tumordiagnostik basierend auf einem *in vivo*

targeting des SSTR2. Mögliche Stellen zur Radiomarkierung finden sich am *N*-Terminus, der eine Verlängerung ohne drastischen Aktivitätsverlust gut toleriert, und in der Tyr³-Seitenkette, wo man durch die Iodogen-Methode radioaktives Iod einführen kann. So war [¹²³I]Tyr-Octreotid das erste radioaktiv markierte SST-Analogon, welches zur szintigraphischen *in vivo* Lokalisierung SSTR2-exprimierender Primärtumoren und Metastasen eingesetzt wurde.^[189] Im letzten Jahrzehnt etablierte sich in der klinischen Routineszintigraphie [¹¹¹In]DTPA-D-Phe¹-Octreotid (Octreoscan[®]) aufgrund der guten renalen *Clearance* und verhältnismäßig langen Aktivitätsretention im Tumor.^[135] Ein Nachteil dieses *tracers* besteht in der renalen Aufnahme im proximalen Tubulus und der Nephrotoxizität. Außerdem ist er nur für die Bildgebung mittels SPECT geeignet, was die Nachteile dieser Aufnahmetechnik gegenüber PET beinhaltet. Verbesserungen von *tracern* und therapeutisch einsetzbaren Radiopharmaka zielen hauptsächlich auf folgende Eigenschaften:

- Erhöhung der Tumor/Hintergrund Verhältnisse der radiomarkierten Verbindung. Dies impliziert eine rasche Eliminierung aus der Blutzirkulation (*blood clearance*).
- Die hepatobiliäre Ausscheidung sollte möglichst gering sein, um die Gesamt-Strahlenbelastung niedrig zu halten. Die Verbindung sollte möglichst über die Nieren ausgeschieden werden.
- Die Rezeptorselektivität soll bei den Veränderungen beibehalten werden.

Eine Verringerung der Nephrotoxizität durch Koapplikation von basischen Aminosäurelösungen wird seit einigen Jahren klinisch erprobt.^[190] Durch die Substitution von Thr⁸-ol mit Thr von Octreotid-analogen Verbindungen zu sogenannten „Octreotaten“ gelang eine Verstärkung der Tumoranreicherung und Internalisierung, ohne Beeinflussung der renalen Aufnahme.^[191, 192] Eine weitere Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften, und einer damit verbundenen Erniedrigung der Lipophilie, wurde durch „Verzuckerung“ von Octreotaten ermöglicht. Die Derivate Glucose-[¹²⁵I]Tyr³-Octreotat ([¹²⁵I]-TOCA), Maltose-[¹²⁵I]Tyr³-Octreotat ([¹²⁵I]-TOCA) und Maltotriose-[¹²⁵I]-Octreotat zeigten abnehmende Werte bezüglich ihrer Ausscheidung über die Leber, was mit der in der gleichen Reihenfolge zunehmenden Hydrophilie begründet wurde.^[193-195] Die Aufnahme in der Niere war bei dem Glucose-Derivat und dem Maltose-Derivat um den Faktor zwei erniedrigt, während sie beim Maltotriose-Derivat gegenüber der Referenz [¹²⁵I]Tyr³-TOCA unverändert blieb.

Für die Peptidrezeptor-Radiotherapie wurden zuletzt vorwiegend [⁹⁰Y]DOTA-TOC und [¹⁷⁷Lu]DOTA-TOC untersucht und viel versprechende Ergebnisse erzielt.^[186, 196, 197] Hinsichtlich einer Steigerung der applizierten kumulierten Dosis zur Verbesserung der

Therapieeffizienz ist gegenwärtig die maximal tolerierbare Nierendosis von 20-23 Gy limitierend. Um die Nierendosis zu reduzieren wurden bereits erwähnte Koinjektionen von basischen Aminosäurelösungen und eine Zugabe von freiem DTPA zur Komplexbildung von freien Radionukliden erprobt^[198] und klinisch verwendet. Außerdem wurde eine Limitation der zu administrierenden Peptidmenge durch die begrenzte Anzahl an Rezeptoren diskutiert. Daher wurden SST-Analoga mit oligomeren DOTA-Konjugaten verknüpft.^[199] Eine weitere Erhöhung der Tumor/Hintergrund-Verhältnisse könnte durch Verwendung von radiomarkierten oligomeren SST-Analoga erreicht werden. In der vorliegenden Arbeit sollen leicht markierbare oligomere SST-Analoga für eine eventuell verbesserte Diagnostik und Therapie bereitgestellt werden.

6 SYNTHESE OLIGOMERER SOMATOSTATINANALOGA FÜR DIE TUMORDIAGNOSTIK

Die Synthese von einfach radiomarkierbaren und oligomeren SST-Analoga sollte zur Klärung der Frage beitragen, inwieweit sich diese Substanzen als *tracer* eignen und zur Entwicklung von oligomeren Tumortheraeutika beitragen können. Dazu musste zunächst der Erhalt der Rezeptoraffinität überprüft werden. Dies wurde durchgeführt von der Firma *Novartis*/Basel unter der Leitung von Dr. Daniel Hoyer. Die radioaktiven Markierungen und Untersuchungen der *in vivo* Biodistribution in tumortragenden Nacktmäusen der Verbindungen erfolgte durch T. Poethko in der Arbeitsgruppe Radiochemie/Radiopharmakologie (Dr. H.-J. Wester) in der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München (Prof. M. Schweiger).

Zunächst werden allgemeine Aspekte von multivalenten Wechselwirkungen und anschließend für die Arbeit relevante Aspekte zur Peptidsynthese betrachtet. Im Folgenden werden die Ergebnisse der biologischen Testungen diskutiert.

6.1 Theorie multivalenter Wechselwirkungen

Während monovalente Liganden typischerweise nur „einfach“ an Rezeptoren binden können oder – sehr selten – Rezeptoren über zwei Bindungsstellen zu dimerisieren vermögen (Abb. 6.1 a und b), treten bei multivalenten Liganden zusätzliche Effekte auf (Abb.6.1).^[200-202]

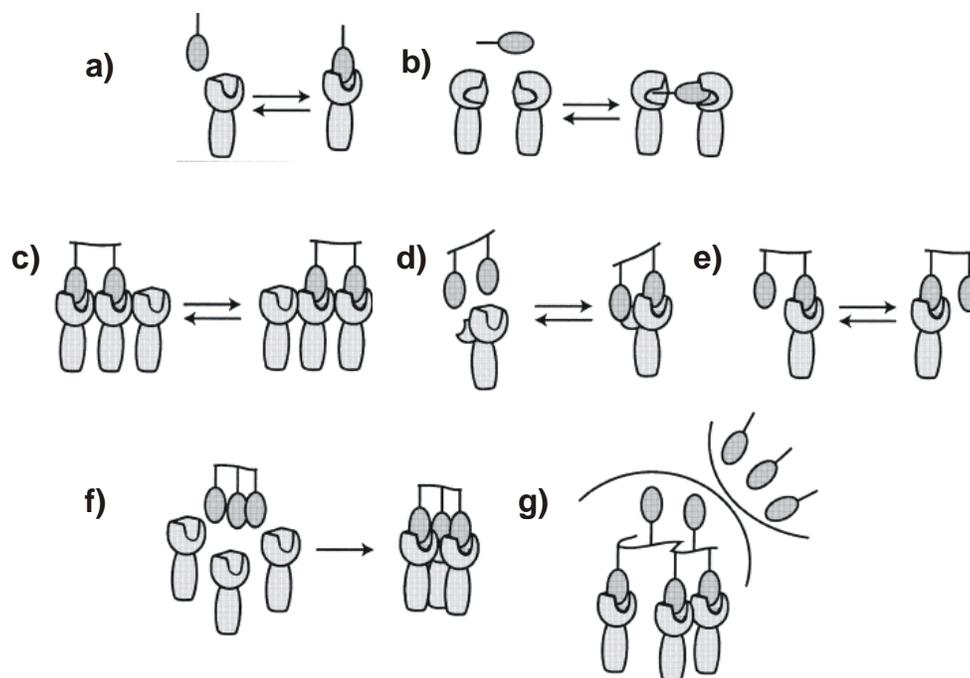


Abb. 6.1: Mechanismen der Ligandenbindung. a) einfache Bindung; b) Dimerisierung eines Rezeptors durch zwei Bindungsstellen; c) Chelat-Effekt; d) gleichzeitige Bindung an primäre und sekundäre Bindungsstellen; e) lokale Konzentrationserhöhung; f) induziertes Clustern von Rezeptoren; g) Abschirmungseffekt.

Durch den Chelateffekt, durch die lokal erhöhte Konzentration von Bindungs epitopen (und damit verbundener Erniedrigung der *off-rate*) und durch den Effekt der Abschirmung aufgrund der Größe der Liganden, sind multivalente Liganden prinzipiell in der Lage stärker an Rezeptoren zu binden als entsprechende Monomere. Allerdings kann eine Verringerung der Entropie (insbesondere Verlust von Translations- und Rotationsentropie aufgrund flexibler *linker*) durch gleichzeitige Bindung an mehrere Rezeptoren die Bindungsenergie auch stark herabsetzen und in einer schwächeren Bindung resultieren.^[203] Somit spielt die Architektur der Verbindungen eine entscheidende Rolle, wie z.B. Anzahl^[204-206] und Dichte der Bindungs epitope^[207-209] und die Art ihrer Verknüpfung.^[210, 211]

Besonders bei biologischen Prozessen wie Zell/Zell-Erkennungsprozessen unter Beteiligung von Sacchariden spielen polyvalente Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle. Oftmals werden statt einer starken monovalenten Wechselwirkung mehrere schwache multivalente Wechselwirkungen eingegangen. Der evolutionäre Vorteil der Rekrutierung mehrerer schwacher Wechselwirkungen könnte darin bestehen, dass anstatt auf einen entsprechenden Stimulus einen neuen Rezeptor zu entwickeln, lediglich die Zahl oder die

komplexe Zusammensetzung unterschiedlicher, bereits vorhandener Rezeptoren verändert wird.^[203]

In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für eine Erhöhung der Bindungsaffinität - in Extremfällen, wie bei Shiga-toxinen, um bis zu sechs Größenordnungen^[212] - durch die Verwendung multimerer Verbindungen.^[213-218] Die pharmakokinetischen Eigenschaften multimerer Verbindungen unterscheiden sich z.T. völlig von den monomeren Analoga.^[219] Zudem reichern sich größere Makromoleküle bevorzugt im Tumorgewebe an, was durch den sogenannten EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention*)^[220] erklärt wird. Danach lässt eine intakte Endothelschicht im normalen Gewebe nur kleine Moleküle passieren, während größere Moleküle durch poröse Schichten im geschädigten Gewebe passieren können.^[221]

Eine deutlich erhöhte Anreicherung im $\alpha\beta3$ -positiven Tumorgewebe konnte im Falle von radiomarkierten RGD-Oligomeren gegenüber monomeren Verbindungen erreicht werden (Abb. 6.2). So gilt das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte tetramere RGD-Peptid momentan als vielversprechender *tracer* zur nicht-invasiven Bestimmung der $\alpha\beta3$ -Integrinexpression in Melanomen.^[222-224]

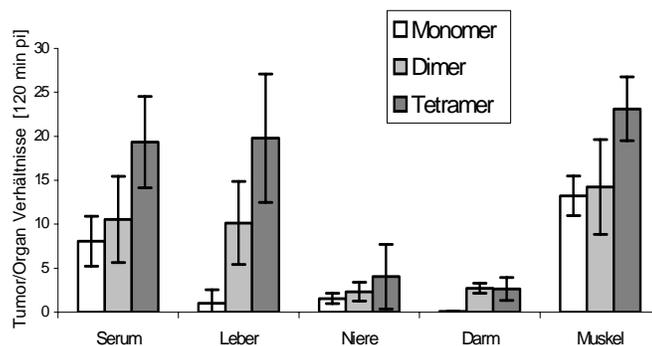


Abb. 6.2: Akkumulationsverhältnisse Tumor/Nicht-Tumorgewebe von RGD-Multimeren (60 min *p.i.* Nacktmäuse mit AR42J-Tumor).

6.2 Grundlagen der Peptidsynthese

Die Festphasensynthese wurde gleichzeitig und unabhängig voneinander von Merrifield (Festphasensynthese von Peptiden, Nobelpreis 1984)^[225] und Letsinger (Festphasensynthese von Oligonukleotiden)^[226] entwickelt. Das Prinzip der Festphasensynthese von Peptiden (SPPS) besteht in der kovalenten Verknüpfung der wachsenden Peptidkette an einen

unlöslichen polymeren Träger und dem schrittweisen Aufbau des Peptides vom C- zum N-Terminus mittels aufeinander folgender Kupplungs- und Abspaltzyklen:

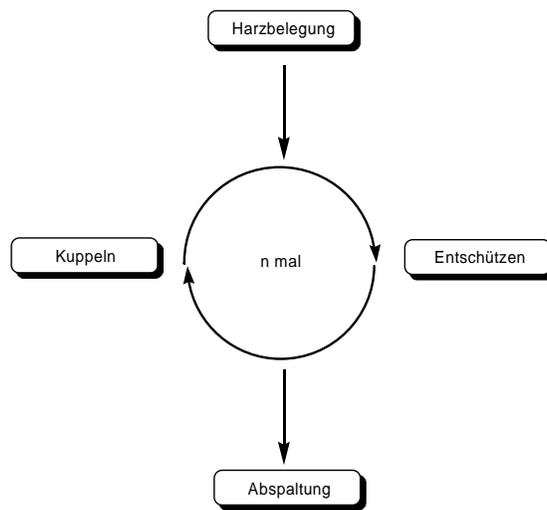


Abb. 6.3: Schematische Darstellung der Festphasen-Peptidsynthese.

Der entscheidende Vorteil liegt darin, dass Überschüsse an Reagenzien und Nebenprodukte durch einfache Wasch- und Filterprozesse vom polymergebundenen Peptid abgetrennt werden können, womit eine Automatisierung der Synthese vereinfacht wird. Voraussetzung für die Herstellung einheitlicher Produkte ist, dass jede Teilreaktion eindeutig und quantitativ verläuft. Die Bildung von Rumpf- und Fehlsequenzen bei unvollständigen Umsätzen, die oft schwierig abtrennen lassen sowie der vorzeitige Kettenabbruch durch konformationsabhängige Effekte, wie die Ausbildung von β -Faltblattstrukturen, sind Probleme, die bislang nicht vollständig überwunden wurden.^[227]

Die 1972 von Carpino *et al.* veröffentlichte Methode zum Schützen von Aminogruppen mit Hilfe der 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe^[228] bietet gegenüber anderen α -Aminoschutzgruppen den Vorteil der Abspaltbarkeit unter milden basischen und nicht hydrolytischen Bedingungen. Die Einführung der Fmoc-Schutzgruppe kann durch die Reaktion einer Aminosäure mit Fmoc-Cl geschehen:

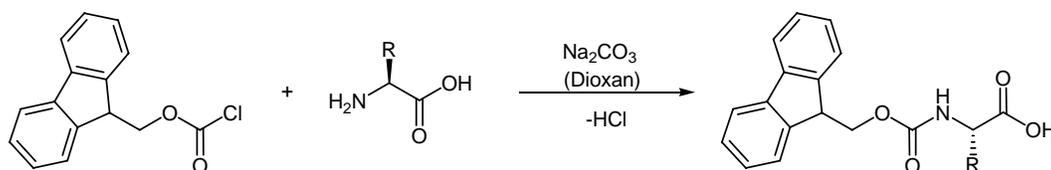


Abb. 6.4: Synthese Fmoc-geschützter Aminosäuren.

Die Bildung von Amidbindungen soll quantitativ unter milden Bedingungen, ohne Nebenprodukte und unter Erhalt der chiralen Zentren verlaufen. Dafür wird die an sich

reaktionsträge Carboxylgruppe in ein aktiviertes Derivat überführt. Über viele Jahre hinweg waren in der SPPS Carbodiimide (hauptsächlich Dicyclohexylcarbodiimid, DCC) die Acylierungsreagenzien der Wahl. Der Aktivierungsschritt der DCC- vermittelten Kupplung verläuft über die Bildung von O-Acylisoharnstoff der Carbonsäuregruppe der Aminosäure. Als Nebenprodukt wird jeweils der schwerlösliche Harnstoff des DCC gebildet, daher wurde DCC durch Phosphonium- (BOP, PyBOP etc.) und Uroniumreagenzien wie TBTU und ähnliche Aktivierungsreagenzien (HBTU, HATU, TOTU etc.) ersetzt.^[229] Der Mechanismus der Peptidkupplung mit TBTU **II**^[230] und HOBt **IV**^[231] als Additiv wird durch das folgende Reaktionsschema verdeutlicht:

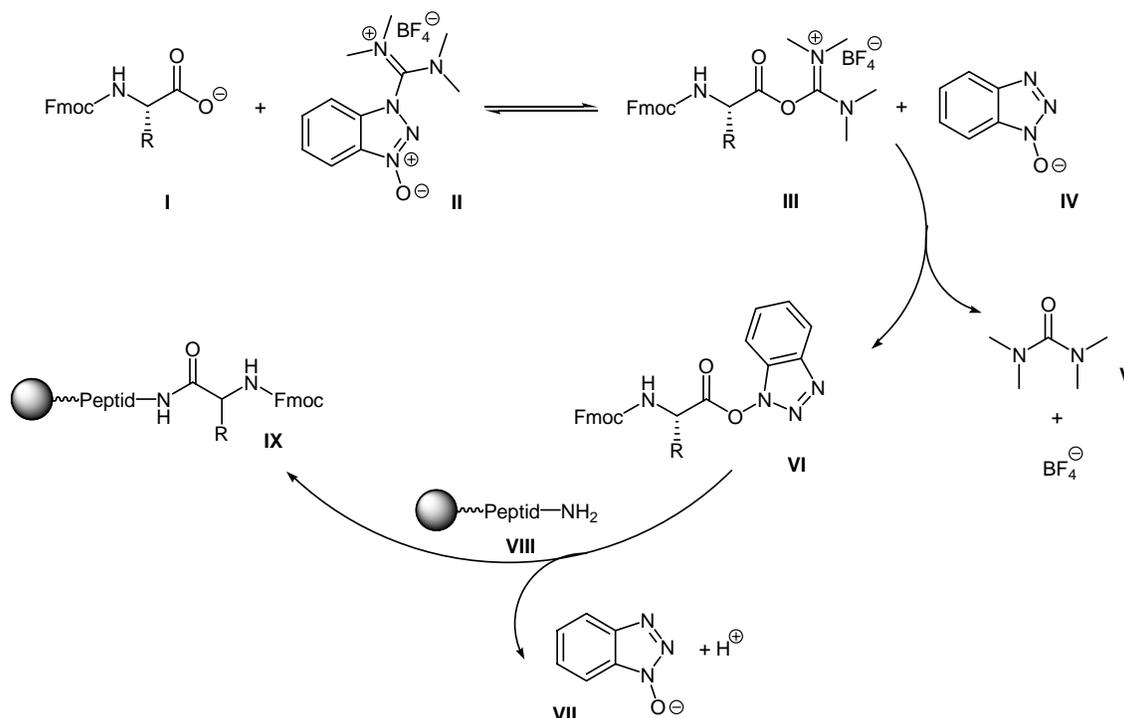


Abb. 6.5: Peptidkupplung mit TBTU/HOBt.

Durch die zusätzliche Zugabe von HOBt wird das intermediäre Acyluroniumderivat **III** schnell aus dem Gleichgewicht zu dem OBt-Aktivester **VI** abgefangen, womit eine mögliche Cyclisierung und Epimerisierung von **III** verhindert wird.

Für die SPPS werden funktionalisierte Polymere (Harze) benötigt, welche mechanisch stabil und gegenüber Lösungsmitteln und Reagenzien inert sind. Die meisten Harze, welche heute in der SPPS verwendet werden, sind Varianten des originalen chlormethylierten Polystyrol-Harzes (PS), welches von Merrifield benutzt wurde. Die Kupplung der ersten Aminosäure an das Harz erfolgt unter Zugabe von DIPEA in DCM unter Abspaltung von

Chlorwasserstoff:

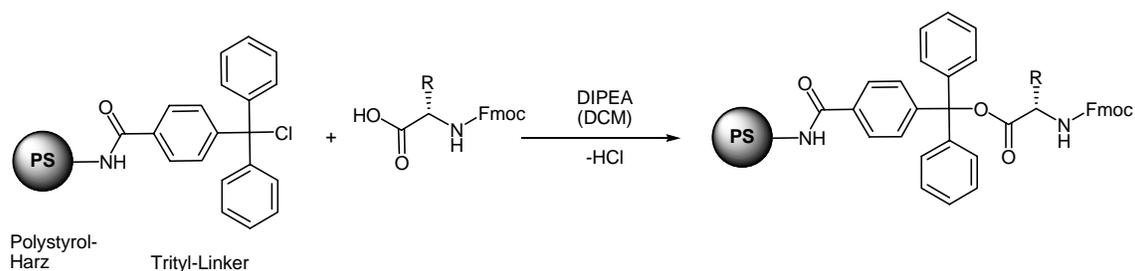


Abb. 6.6: Kupplung der ersten Aminosäure an TCP-Harz.

Bei der Synthese von Peptiden mit C-terminal reduzierten Aminosäuren (z.B. Octreotid) ist zuerst ein Fmoc-Aminoalkohol an das Harz zu koppeln. Hierfür stehen prinzipiell zwei verschiedene Linkersysteme zur Verfügung: das bekannte TCP-Harz und ein von Ellman *et al.* eingeführtes Dihydropyran(DHP)-Polystyrolharz.^[232]

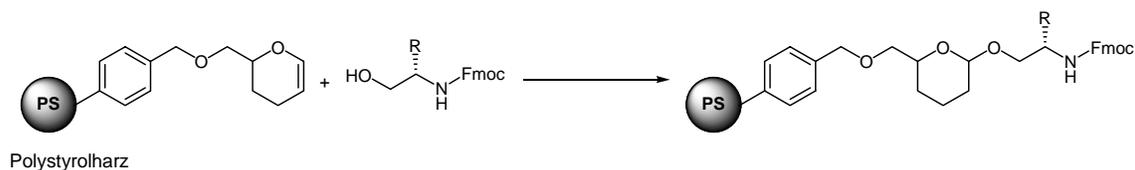


Abb. 6.7: Kupplung des Aminoalkohols an DHP-Polystyrolharz.

Die Abspaltung vom Harz erfolgt durch Behandlung mit schwachen Säuren wie Hexafluorisopropanol (HFIP) oder Essigsäure in Dichlormethan. Dabei bleiben Seitenkettenschutzgruppen wie z.B. BOC erhalten. Zur Harzabspaltung unter gleichzeitiger, vollständiger Entschützung des Peptids verwendet man Trifluoressigsäure (TFA). Die dabei entstehenden Carbokationen werden mittels geeigneter *scavenger* (Wasser, Anisol, Thioanisol, Ethandithiol, Phenol^[233] oder geruchloses Triisopropylsilan^[234]) abgefangen, um die irreversible Alkylierung nucleophiler Aminosäureseitenketten zu verhindern.

Zur Synthese von Proteinen synthetisiert man zunächst Peptidsequenzen von bis zu 50 Aminosäuren an der Festphase und fügt sie anschließend idealerweise in Seitenkettenentschützter Form mittels chemoselektiver Ligation zusammen. Im letzten Jahrzehnt sind dazu verschiedene Methoden zur Synthese nativer Peptide mit natürlichen Amidbindungen und zur Synthese modifizierter Peptide (z.B. mit Oxim-, Thioether- oder Thioesterbindungen) ausgearbeitet worden.^[235, 236] Wichtig für die vorliegende Arbeit war die chemoselektive Oximligation,^[237, 238] bei der eine Aminoxy-Komponente und ein Aldehyd oder ein Methylketon unter schwach sauren Bedingungen ohne Kupplungsreagenz zum Oxim umgesetzt werden. Die Oximligation ist kompatibel mit allen freien Aminosäureseitenketten

mit der Ausnahme von *N*-terminalen Cystein. Sie hat Anwendung gefunden z.B. bei der Synthese von TASP (*template assembled synthetic protein*)-Konstrukten,^[239-243] radioaktiv markierten Peptidkonjugaten,^[152, 244] cyclischen Peptiden^[245] und Proteinanaloga.^[246, 247] Der Aldehyd ist bei peptidischen Strukturen gut aus *N*-terminalem Serin oder Threonin durch NaIO₄-Oxidation erhältlich.^[248, 249]

6.3 Synthesestrategie

Die in Kap. 6.1 dargestellten potentiellen Vorteile von multimeren Verbindungen zusammen mit der in Kap. 5.3 erwähnten Möglichkeit eines *clusters* von SST-Rezeptoren wurde als viel versprechend für die Entwicklung verbesserter Tumorthapeutika auf Basis radiomarkierter oligomerer SST-Analoga angesehen. Wegen seiner exzellenten Bindungsaffinität und der erhöhten Aufnahme im Tumor gegenüber Octreotid, wurde als SST-analoge Verbindung ³Tyr-Octreotat ausgewählt. Außerdem bietet sich die Tyrosin-Seitenkette für eine Radiomarkierung mit der Iodogen[®]-Methode an. Die Moleküle sollten eine definierte Größe und einen definierten Aufbau aufweisen und somit keine polydispersen Polymere darstellen. Als Verankerungsstelle für eine Oligomerisierung bietet sich der gegenüber der biologischen Aktivität relativ unempfindliche *N*-Terminus an, welcher über *spacer* an eine Verzweigungseinheit (*core*) gebunden wird. Ferner ist die Darstellung von Verbindungen geplant, die im *core* zusätzliche Stellen einer Radiomarkierung aufweisen. Der allgemeine Aufbau und die Synthesestrategie einer divalenten Beispielverbindung ist in Abb. 6.8 verdeutlicht:

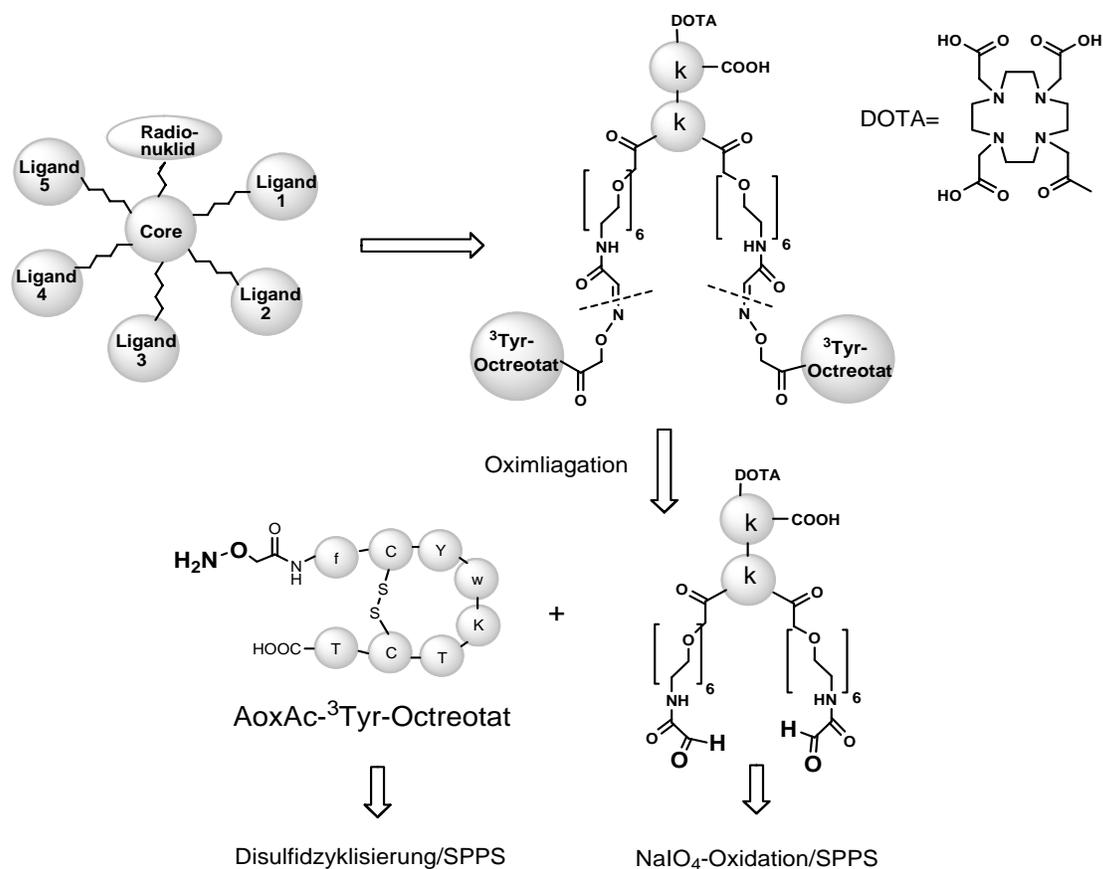


Abb. 6.8: Allgemeiner Aufbau einer oligomeren radiomarkierten Verbindung und retrosynthetische Analyse anhand eines divalenten SST-Analogons.

Demnach wird das bewährte Tyr³-Octreotate über einen Aminoxy-funktionalisierten verlängerten *N*-Terminus durch gekoppelte Festphasen- und Lösungssynthese (Disulfidzyklisierung in Lösung) hergestellt. Das vollständig entschützte Peptid soll anschließend durch chemoselektive Ligation in Lösung an einen multivalenten Aldehyd geknüpft werden, der bereits die notwendigen *spacer* enthält. Die Aldehyde werden ebenfalls durch kombinierte Festphasen- und Lösungssynthese (NaIO₄-Oxidation von *N*-terminalen Serin in Lösung) dargestellt.

Für die Festphasensynthese von verzweigten Peptiden ^[250] wurden verschiedene chirale (**100** und **103**^[251]) und achirale (**104**)^[252] Aminosäurebausteine beschrieben, die zu einer zwei- oder dreifachen (**105**)^[253] Verzweigung führen. Außerdem stehen Aminosäuren mit verschiedenen *N*-Schutzgruppen (**101**^[254], **102**^[255]) für den Aufbau komplexerer Peptiddendrimere zur Verfügung.

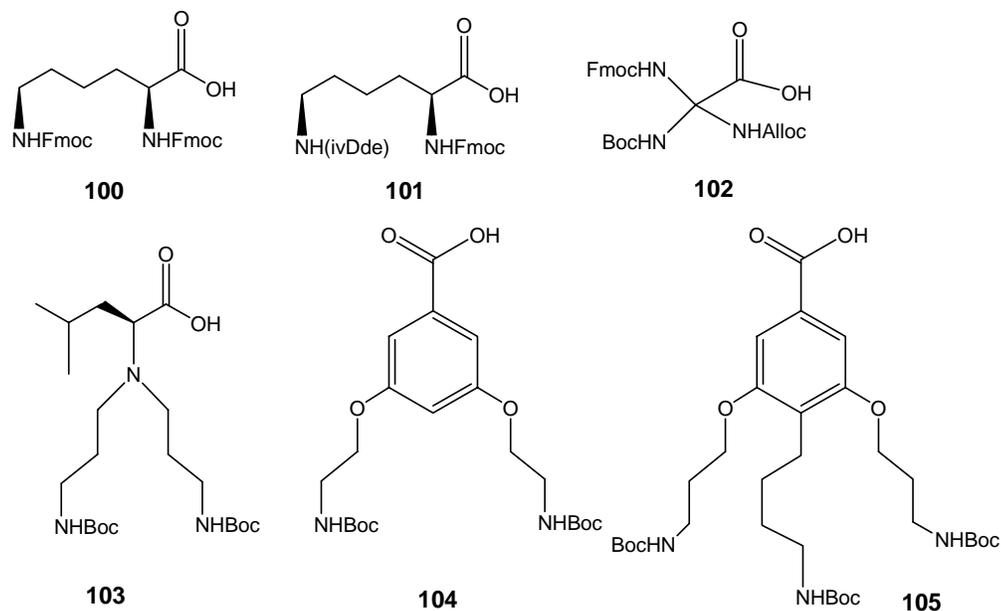


Abb. 6.9: Verzweigte Aminosäuren für die SPPS.

Für die vorliegenden Synthesen wurde ein D-Lysin *core* mit Bis-Fmoc-Schutz benutzt, welches durch Verwendung des Lys in der unnatürlichen D-Konfiguration stabiler gegenüber Proteasen ist.^[250, 256-258]

Die *N*-terminalen Serine werden über *spacer* an das Lysin-*core* angebracht. Sie sind notwendig, um eine gewisse Distanz der bindenden Liganden für eine mögliche simultane Anbindung an den Rezeptor zu gewährleisten und um eine Aggregation der Struktur zu vermeiden. Die Beschaffenheit des *spacers* spielt bei der thermodynamischen Betrachtung von multivalenten Wechselwirkungen eine zentrale Rolle.

Die Beiträge des *spacers* zur Entropie und Enthalpie sind für die Abschätzung der Gibbsschen Bindungsenergie bei multivalenten Wechselwirkungen äußerst schwierig zu quantifizieren. Die Enthalpie einer multivalenten Wechselwirkung kann in einer Bindungsstärkung oder auch –schwächung resultieren. So würde z.B. ein etwas zu kurzer *spacer* im Falle einer simultanen Anbindung in einen enthalpisch ungünstigen gespannten Zustand vorliegen können und zu einer Bindungsschwächung führen. Eine Erhöhung der Bindungsstärke durch einen Chelateffekt ist somit nur mit einem *spacer* der richtigen Länge zu verwirklichen. Ein flexibler *spacer* mit vielen frei rotierbaren Bindungen erhöht einerseits die Wahrscheinlichkeit alle möglichen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen spannungsfrei auszubilden, andererseits kann man vereinfachend das Einfrieren von rotationsfähigen Bindungen für den Verlust an Entropie verantwortlich machen. Nach einer Methode von Mammen und Whitesides lässt sich die Konformationsentropie eines *spacers* durch einfaches

Aufsummieren der Torsionsentropien der einzelnen Bindungen bestimmen. Nimmt man für das Einfrieren der Rotation um eine C-C-Einfachbindung einen Entropieverlust von 2 kJ/mol an, kann für einen Hexaethylenglykolspacer ein Gesamtverlust von 40 kJ/mol resultieren.^[203] Jedoch sind in der Literatur Beispiele beschrieben, bei denen trotz einse längeren Polyethylenglykol(PEG)-*spacers* eine verstärkte bivalente Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung beobachtet werden konnte.^[259-261]

Für die Darstellung oligomerer Verbindungen kamen in unserem Arbeitskreis in jüngster Zeit ϵ -Aminohexansäure als hydrophobe Aminosäure, 8-Amino-3,6-Dioxaoctansäure (Ado) und die nicht kommerziell erhältliche Heptaethylenglykolaminosäure (Hegas) als wasserlösliche Aminosäure zum Einsatz.

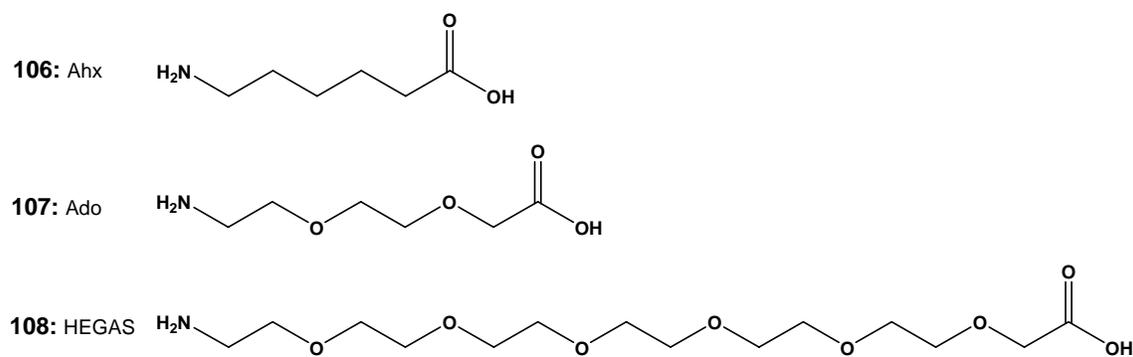


Abb. 6.10: Spacer Ahx, Ado und Hegas.

Aufgrund der guten Erfahrungen mit PEG-*spacern* in unserem Arbeitskreis,^[223, 224] der Wasserlöslichkeit und den in der Literatur oftmals vorteilhaft beschriebenen pharmakokinetischen Eigenschaften von „pegylierten“ Pharmaka einerseits^[262, 263] und der Gefahr der Bildung unlöslicher Präzipitate bei Verknüpfung mit Peptiden mit längeren hydrophoben Alkylketten^[264] andererseits, wurden für die oligomeren SST-Analoga Ado und Hegas als *spacer* ausgewählt. Letzterer kann synthetisch aus Hexaethylenglykol in sechs Stufen erhalten werden.^[223, 265, 266]

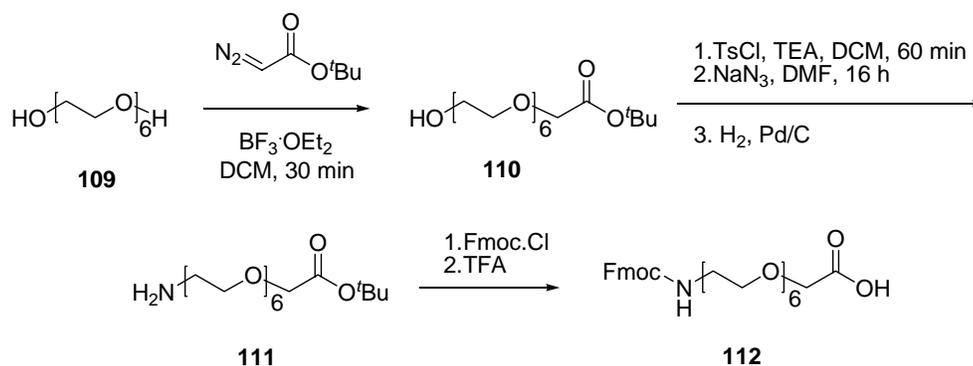


Abb. 6.11: Synthese von Fmoc-Hegas.

Zunächst wird Hexaethyenglykol mit Diazoessigsäure-*tert*-Butylester verlängert. Die Hydroxyfunktion wird durch Tosylierung, Umsetzung mit Azid und anschließender Reduktion zum Amin umgewandelt.^[223, 265, 266] Schließlich wird nach Fmoc-Schützung die freie Säure durch Reaktion mit TFA generiert. Die Lagerung von Fmoc-Hegas erfolgte wegen der Labilität der Schutzgruppe bei -18 °C.

6.4 Synthese der oligomeren Somatostatin-Analoga

Zunächst wurde das für die Oximligation benötigte, am *N*-Terminus verlängerte SST-Analogon Aminoxyacetyl-³Tyr-Octreotat **114** dargestellt. Dazu wurde das geschützte Nonapeptid **113** nach der Fmoc-Strategie^[267] am TCP-Harz unter Verwendung von HOBt/TBTU^[231, 268, 269] und DIPEA bzw. Collidin (für die Kupplung von Cystein zur Vermeidung von Racemisierung^[270]) aufgebaut. Anschließend wurde das Peptid unter gleichzeitiger Seitenkettenentschützung vom Harz mittels 90%iger TFA abgespalten. Hierbei ist auf die Verwendung von Lösemittel sehr hoher Reinheit (HPLC-Qualität) zu achten, da die reaktive Aminoxygruppe äußerst schnell mit Spuren von Aldehyden und Ketonen zum Oxim reagiert.^[246, 271]

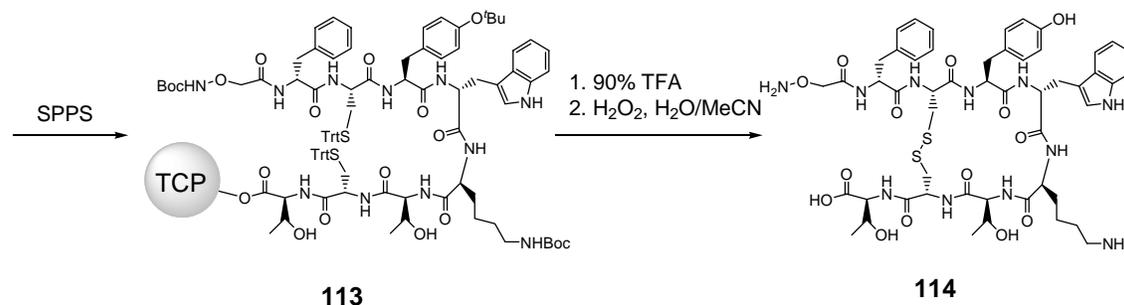


Abb. 6.12: Synthese von Aminoxyacetyl-³Tyr-Octreotat.

Die Disulfid-Zyklisierung wurde zunächst mit der sehr milden Oxidation mit DMSO in Wasser nach Tam *et al.*^[272] durchgeführt. Hierbei konnten allerdings, bedingt durch die langen Reaktionszeiten von bis zu 24 h unter sauren, neutralen und basischen Bedingungen, nur sehr geringe Ausbeuten erzielt werden. Die massenspektroskopische Analyse zeigte die Bildung von dimeren Verbindungen (sowohl zyklisiert, nicht-zyklisiert als auch teilweise zyklisiert) an, die sich durch die Abspaltung von NH₃ aus der Aminoxygruppe und anschließende Reaktion zum Oxim mit einer noch intakten Aminoxygruppe erklären ließen (Abb. 6.13). Durch Verwendung von Wasserstoffperoxid als Oxidans konnte in 30 min die Zyklisierung

nahezu ohne Nebenprodukte in hohen Ausbeuten erreicht werden. Das erhaltene Aminoxyacetyl-³Tyr-Octreotat wurde vor der Oximligation mittels HPLC gereinigt.

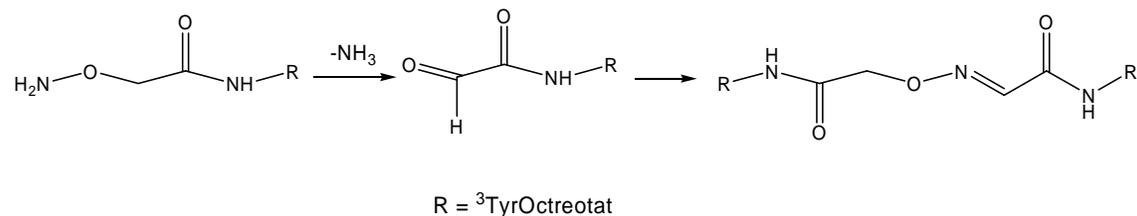


Abb. 6.13: Nebenreaktion der Disulfid-Zyklisierung mit DMSO.

Die aldehydischen Verzweigungseinheiten wurden ebenfalls durch kombinierte Festphasen- und Lösungssynthese dargestellt. Für Verbindungen mit zusätzlicher Möglichkeit der Radiomarkierung in der Verzweigungseinheit wurden folgende Aminosäuren verwendet:

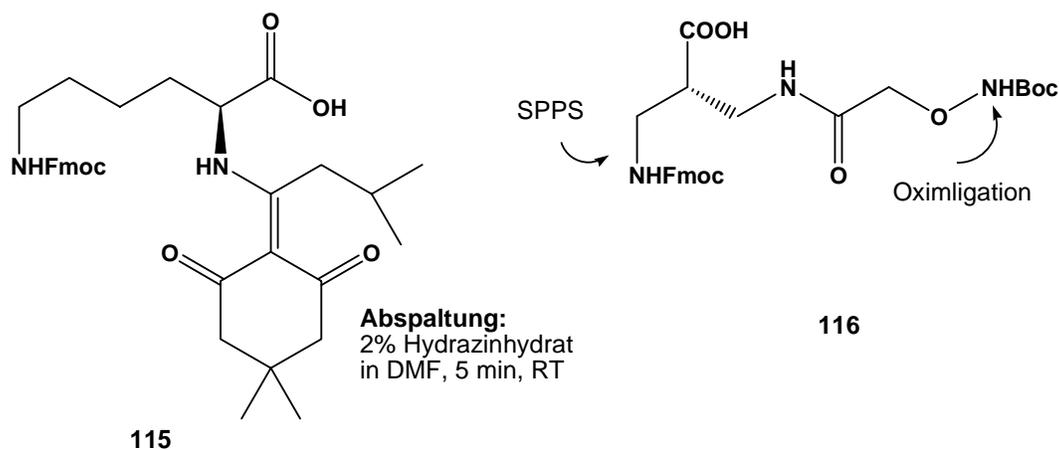


Abb. 6.14: Orthogonal geschützte Aminosäuren für die Anbringung einer zusätzlichen Radiomarkierung.

Das kommerziell erhältliche Fmoc-Lys(ivDde)-OH wurde für die Verknüpfung mit DOTA-tris-*t*Bu-Ester nach Aufbau der restlichen Verzweigungseinheit verwendet. Die ivDde-Schutzgruppe ist stabil unter den Bedingungen der Fmoc-Entschützung mit 20% Piperidin in NMP und kann nach Aufbau des Peptids nach der Fmoc-Strategie mit 2 % Hydrazinhydrat abgespalten werden. ^[254, 273] Allerdings kann die ivDde-Entschützung nicht bei gleichzeitiger Anwesenheit von Fmoc vorgenommen werden. Somit sind die beiden Schutzgruppen nicht vollständig orthogonal. Ebenfalls kommerziell erhältlich ist die von Wahl und Mutter^[245] eingeführte Aminosäure Fmoc-Dpr[Aoa(Boc)]-OH (*N*- α -Fmoc-*N*- β -(*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-aminoxyacetyl)-L-diaminopropionsäure, **116**). Die Seitenkette ist mit einer Aminoxygruppe funktionalisiert, die die weiter oben schon erwähnte Einführung von radioaktiven ¹⁸F-Benzaldehyd erlaubt.

Die beispielhafte Synthese einer dimeren Verzweigungseinheit mit einem DOTA-Chelator für Radionuklide ist in Abb. 6.15 illustriert:

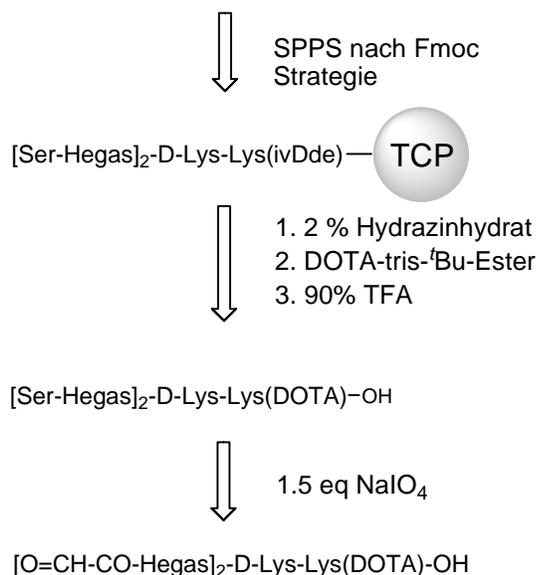


Abb. 6.15: Synthese einer dialdehydischen Verzweigungseinheit mit zusätzlicher Markierungsstelle.

Zunächst wurde das Peptid nach Fmoc-Strategie am TCP-Harz aufgebaut und dann der Chelator DOTA über die vormals ivDde-geschützte α -Aminogruppe von Lysin verknüpft. Nach Abspaltung vom Harz wurden die *N*-terminalen Serine mit NaIO₄ zum Aldehyd oxidiert. Die Ausbeute bezogen auf die Harzbelegung betrug knapp 30 %. Die resultierenden Aldehyde wurden schließlich per HPLC gereinigt und möglichst schnell (innerhalb von 24 h) für die anschließende Oximligation eingesetzt. Bei längerer Lagerung wurde auch bei -18 °C langsame Zersetzung der Aldehyde beobachtet.

Die abschließende chemoselektive Ligation wurde in Wasser/Acetonitril-Gemischen mit 1.1 eq. Aminoxyacetyl-³Tyr-Octreotat pro Aldehydfunktionalität bei pH 4 durchgeführt. Nach 1 h war die Reaktion komplett und die erhaltenen Produkte wurden schließlich nochmals mittels HPLC gereinigt. Abb. 6.16 zeigt die Synthese eines einfachen Dimers mit Hegas-Spacer.

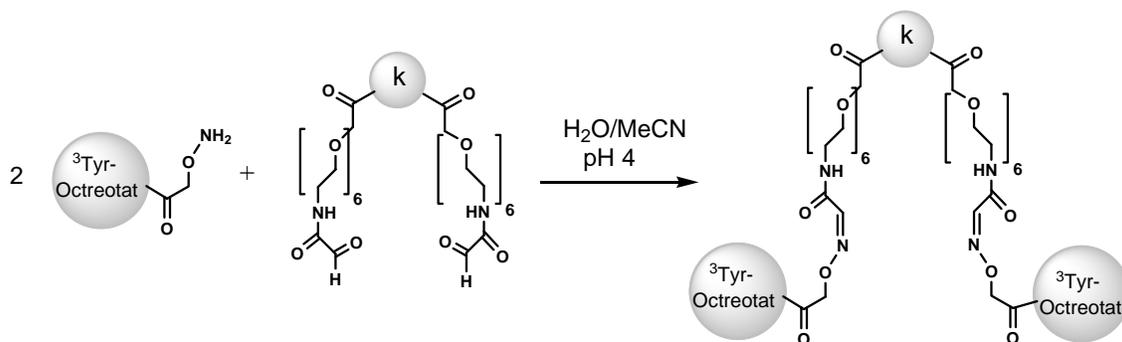


Abb. 6.16: Synthese eines Dimers mittels Oximilation.

Die massenspektroskopische Charakterisierung der oligomeren Verbindungen erfolgte mittels ESI-MS (einfach und mehrfach geladene Ionen) und durch MALDI-TOF. Die Aufbewahrung erfolgte bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

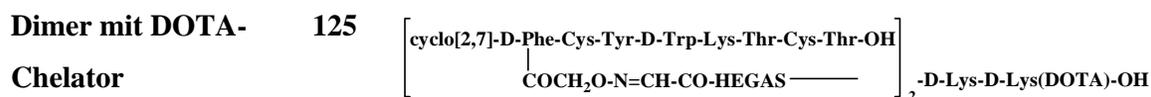
Insgesamt wurden nach den genannten Methoden folgende Verbindungen erhalten:

Monomere

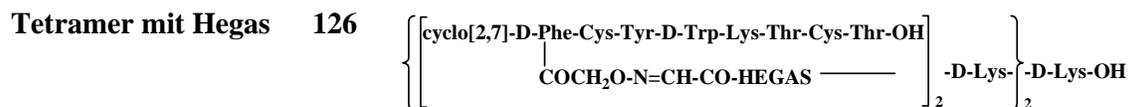
Octreotat	117	cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH
³Tyr-Octreotat	118	cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH
monomere Referenz mit modifiziertem N-Terminus	119	cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH COCH ₂ O-N=CH-CO-HEGAS-OH

Dimere

Dimer mit Hegas	120	$\left[\begin{array}{c} \text{cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH} \\ \\ \text{COCH}_2\text{O-N=CH-CO-HEGAS} \end{array} \right]_2$ -D-Lys-OH
Dimer mit Hegas/Asp in Verzweigung	121	$\left[\begin{array}{c} \text{cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH} \\ \\ \text{COCH}_2\text{O-N=CH-CO-HEGAS} \end{array} \right]_2$ -D-Lys-D-Asp-OH
Dimer mit Ado/Asp in Verzweigung	122	$\left[\begin{array}{c} \text{cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH} \\ \\ \text{COCH}_2\text{O-N=CH-CO-ADO} \end{array} \right]_2$ -D-Lys-D-Asp-OH
Dimer mit geschützter Aminooxygruppe	123	$\left[\begin{array}{c} \text{cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH} \\ \\ \text{COCH}_2\text{O-N=CH-CO-HEGAS} \end{array} \right]_2$ -D-Lys-Dpr[Aoa(Boc)]-OH
Dimer mit p- Fluorbenzaldehyd	124	$\left[\begin{array}{c} \text{cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH} \\ \\ \text{COCH}_2\text{O-N=CH-CO-HEGAS} \end{array} \right]_2$ -D-Lys-Dpr(Aoa-pFPh)-OH



Tetramer



Verbindung **123** war ursprünglich als Vorläufer für eine Radiomarkierung mit ^{18}F -Benzaldehyd, nach Boc-Entschützung, konzipiert. Da jedoch bei den *in vivo* Untersuchungen ungünstige Nierenanreicherung bei dimeren Verbindungen beobachtet wurde und auch die Boc-Entschützung (unter Verwendung 50%iger TFA) mit teilweiser Spaltung der Oximbindung einherging wurde auf weitere Umsetzungen verzichtet. Verbindung **124** wurde hergestellt, indem die nicht-oxidierte und entschützte Verzweigungseinheit zunächst mit p-Fluorbenzaldehyd umgesetzt wurde und anschließend erst oxidiert und schließlich zum Dimer umgesetzt wurde.

6.5 Biologische Evaluation der oligomeren Somatostatin-Analoga

Die Verbindungen wurden unter der Leitung von Dr. D. Hoyer bei Novartis/Basel auf ihre Bindungsaffinität für humane SST-Rezeptoren, die in CCL39 Fibroblasten exprimiert wurden, mittels Verdrängungsassays gegen radiomarkierte Liganden an isolierten Membranen getestet.

Tab. 6.1: K_D -Werte von oligomeren SST-Analoga an isolierten Membranen von SSTR2-exprimierenden CCL39-Fibroblasten.

Verbindung	pK_D	K_D [nmol/l]
117 cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH	8.96±0.07	1.10
118 cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH	9.02±0.13	0.95
119 cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH COCH ₂ O-N=CH-CO-HEGAS-OH	7.90±0.06	12.59
120 $\left[\begin{array}{c} \text{cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH} \\ \\ \text{COCH}_2\text{O-N=CH-CO-HEGAS} \end{array} \right]_2$ -D-Lys-OH	8.19±0.06	6.46
121 $\left[\begin{array}{c} \text{cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH} \\ \\ \text{COCH}_2\text{O-N=CH-CO-HEGAS} \end{array} \right]_2$ -D-Lys-D-Asp-OH	8.10±0.04	7.94
122 $\left[\begin{array}{c} \text{cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH} \\ \\ \text{COCH}_2\text{O-N=CH-CO-ADO} \end{array} \right]_2$ -D-Lys-D-Asp-OH	8.01±0.10	9.77
124 $\left[\begin{array}{c} \text{cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH} \\ \\ \text{COCH}_2\text{O-N=CH-CO-HEGAS} \end{array} \right]_2$ -D-Lys-Dpr(Aoa- <i>p</i> FPh)-OH	8.10±0.07	7.94
126 $\left\{ \left[\begin{array}{c} \text{cyclo[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH} \\ \\ \text{COCH}_2\text{O-N=CH-CO-HEGAS} \end{array} \right]_2 \right\} \left. \begin{array}{l} \text{-D-Lys-} \\ \text{-D-Lys-OH} \end{array} \right\}_2$	8.18±0.06	6.61

Dabei zeigte sich ein Erhalt der nanomolaren Bindungsaffinität gegenüber SSTR2. Zudem wurde in weiteren Testungen der Erhalt der bekannten Selektivität von ³Tyr-Octreotat gezeigt (s. Anhang). Durch die Verlängerung des N-Terminus in **119** ging die Bindungsaffinität um eine Größenordnung gegenüber der Verbindung **118** zurück. Bei allen dimeren Verbindungen erhöhte sich die Affinität anschließend wieder etwa um den erwarteten Faktor zwei (zwei Bindungsepitope). Eine weitere Erhöhung der Bindungsepitope auf vier resultierte dagegen

nicht in einer weiteren Zunahme. Die dimere Verbindung **122** mit verkürztem *spacer* weist unter den dimeren Verbindungen die geringste Bindungsaffinität auf. Eine eindeutige Bewertung des Einflusses der Multivalenz erlaubt dieser Bindungsassay an Membranfragmenten jedoch nicht. Es wird lediglich das Verdrängungsverhalten gegenüber den Liganden SST-28([¹²⁵I]-³Tyr) getestet. Inwieweit mögliche Rezeptor-*cluster* an solchen Fragmenten vorliegen ist überdies nicht klar. Für die folgenden *in vivo* Studien zur Biodistribution war es jedoch wichtig den Erhalt der Rezeptoraffinität von Oligomeren zu verifizieren.

Die Radiomarkierung und Durchführung der Studien zur Biodistribution von ausgewählten Verbindungen wurde von T. Poethko in der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München durchgeführt. Es wurden zunächst die Verbindungen **119**, **120**, **121** und **122** ausgewählt (das Tetramer **126** war laut T. Poethko nur sehr schwer radioaktiv zu präparieren). Dabei sollte das Monomer **119** mit den verschiedenen Dimeren **122** (verkürzter *spacer*), **120** und **121** (zusätzliche Säuregruppierung wurde als günstig für erhöhte Tumoranreicherung angesehen) verglichen werden. Die Markierung erfolgte nach der Iodogen[®] Methode mit ¹²⁵I ($t_{1/2}=13$ h) und ¹²³I ($t_{1/2}=8$ d), was bedingt durch die stark unterschiedlichen Halbwertszeiten der beiden Radionuklide die parallele Untersuchung von zwei Verbindungen in einer Maus erlaubt. Für die Untersuchungen wurden tumortragende (AR42J) Nacktmäuse (männlich und weiblich, Alter 6-8 Wochen) mit hoher SSTR2-Expression verwendet. Die Verabreichung von 10 μ Ci (¹²⁵I) bzw. 12 μ Ci (¹²³I) der radiomarkierten Substanzen erfolgte intravenös in die Schwanzvene von jeweils 3 Mäusen für jede Substanz. Die Tiere wurden 30 bzw. 60 min nach der Injektion getötet (*post injection, p.i.*), sezirt und der prozentuale Anteil der injizierten Dosis (Radioaktivität) normiert auf ein Gramm des Organs (% ID/g) bestimmt. Die Spezifität der Akkumulation der Radioaktivität im Tumorgewebe wurde in Wettbewerbsstudien 60 min *p.i.* durch die gleichzeitige Verabreichung von Octreotid nachgewiesen.

In Abb. 6.17 sind die Biodistributionsdaten 60 min *p.i.* der untersuchten Verbindungen dargestellt. Dabei ist besonders die ungünstig hohe Akkumulation in der Niere bei nicht erhöhtem *tumor uptake* der dimeren Verbindungen gegenüber der monomeren Referenz auffallend. Die beiden Verbindungen mit zusätzlichem Aspartat in der Seitenkette zeigen keine erhöhte Tumoranreicherung und reichern sich verstärkt in der Leber an. Somit wirkt sich im Falle der dimeren Verbindungen die Einführung einer zusätzlichen Säuregruppierung ungünstig auf die Biodistribution aus. Ein wesentlicher Einfluss der *Spacer*längen

(Verbindung **120** und **122**) ist aus den vorliegenden Daten nicht zu erkennen; innerhalb der Fehler liefern beide Substanzen nahezu identische Werte.

In den Abbildungen 6.18 und 6.19 sind die Tumor/Organverhältnisse der Verbindungen veranschaulicht. Dabei fällt auf, dass sich die dimere Verbindung **120** im Vergleich zur monomeren **121** zunächst stärker im Tumor anreichert und nach 60 min *p.i.* in den meisten Organen ein niedrigeres Tumor/Organ Verhältnis als in der monomeren Verbindung vorliegt. Dies könnte auf höhere Bindungsaffinitäten der dimeren Verbindung zurückzuführen sein, die zunächst zu einer höheren Tumoranreicherung führt. Im weiteren Verlauf würde dieser Effekt durch eine mögliche schnellere Internalisierung von monomeren Verbindungen (die zu insgesamt höheren *tumor uptake* führt) wieder wettgemacht. Für die Bestätigung dieser Vermutungen wären allerdings explizite Internalisierungsstudien an SSSTR-exprimierenden Zellen notwendig.

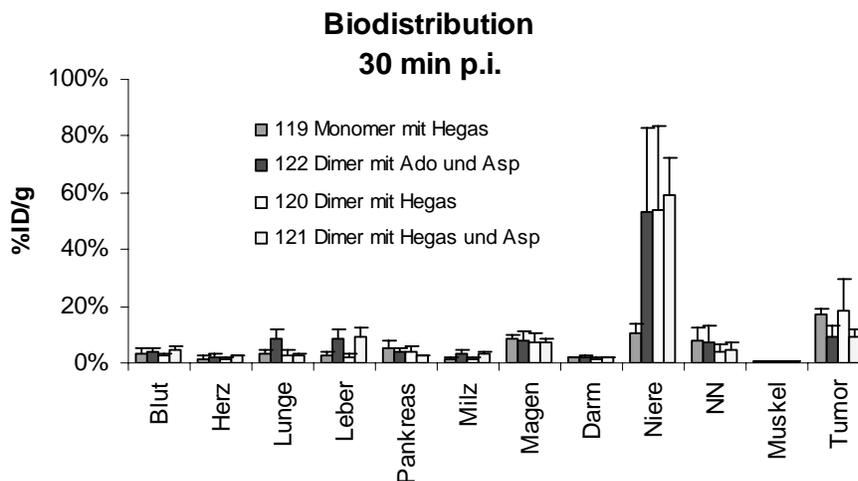


Abb. 6.17: Biodistribution von **119,120,121** und **122** 30 min *p.i.* in Mäusen.

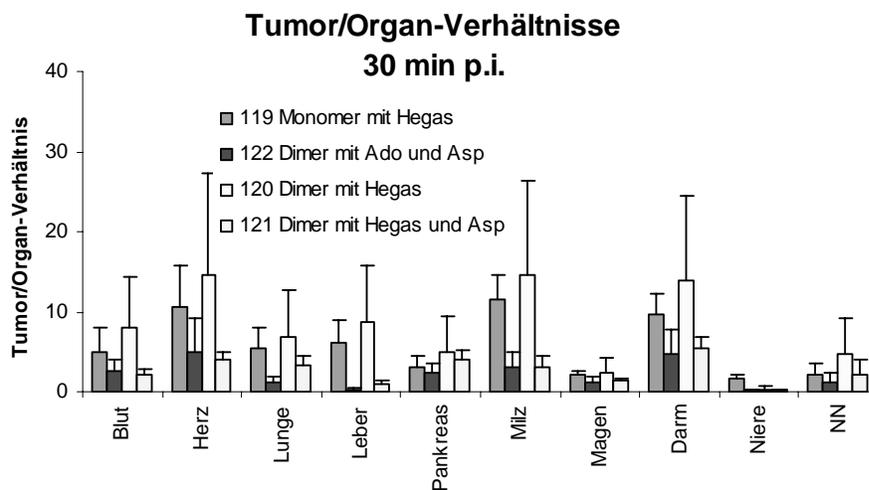


Abb. 6.18: Tumor/Organ Verhältnisse von 119,120,121 und 122 30 min p.i. in Mäusen.

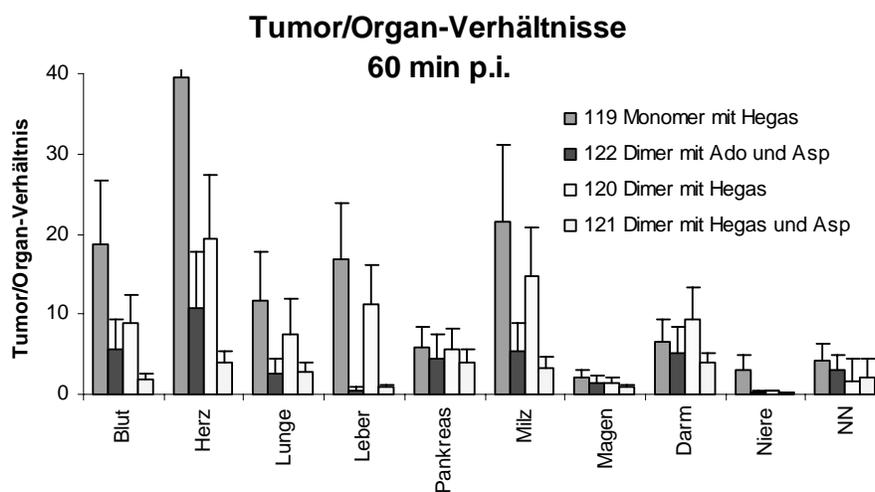
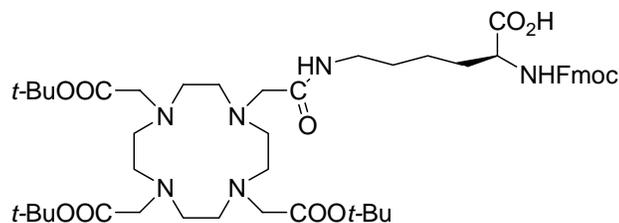


Abb. 6.19: Tumor/Organ Verhältnisse von 119,120,121 und 122 60 min p.i. in Mäusen.

7 DOTA-DERIVATE FÜR CHEMOSELEKTIVE SYNTHESSEN

Bislang sind kommerziell lediglich Chelatoren mit Funktionalitäten zur Reaktion mit Amino- oder Carboxylfunktionen erhältlich. Auch in der Literatur wurden ausschließlich Synthesen von DOTA-Derivaten beschrieben, die sich über die genannten funktionellen Gruppen in Peptide einbauen lassen. Die kürzlich publizierte Verbindung **127** lässt sich an einer beliebigen Stelle innerhalb einer gegebenen Peptidsequenz einbauen.^[160]

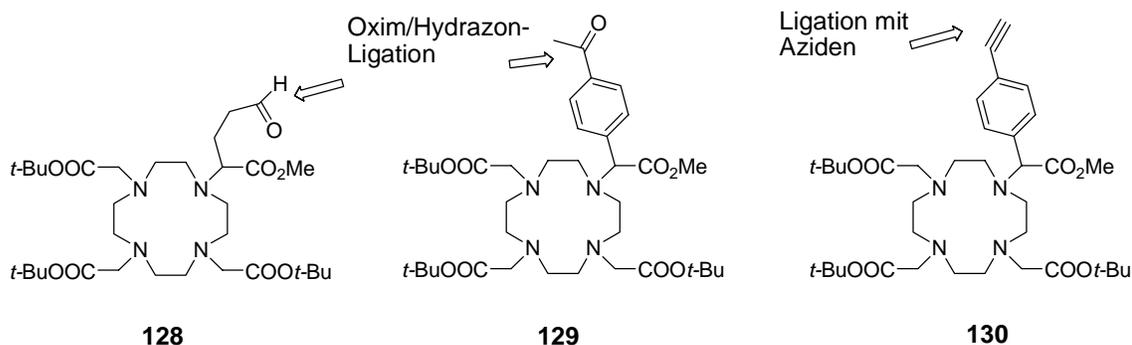


127

Abb. 7.1: DOTA-Derivat für den Einbau in eine beliebige Stelle eines Peptids.^[160]

Für die Einführung eines Chelators bei multimeren RGD-Peptiden mit freier Aminoxyfunktionalität, wie sie von Dr. G. Thumshirn erhalten wurden,^[223] wären Aldehyd- oder Methylketon-funktionalisierte DOTA-Derivate das Mittel der Wahl. Außerdem würden sich derartige Chelatoren gut für die Markierung größerer, entsprechend funktionalisierter Polypeptide eignen, die ihrerseits durch schrittweisen Aufbau mittels chemoselektiver Verknüpfung mehrerer Teilsequenzen erhalten wurden und z.B. zusätzliche freie Amino- oder Carboxylgruppen in Seitenketten aufweisen.

Folgende neuartigen Derivate des mehrzähligen Komplexbildners DOTA sollten schließlich gemeinsam mit S. Knör in unserem Arbeitskreis synthetisiert werden:



128

129

130

Abb. 7.2: Neuartige DOTA-Derivate für chemoselektive Synthesen.

Die Derivate **128** und **129** erlauben die chemoselektive Einführung des Chelators über die Oxim- bzw. Hydrazonligation.^[274, 275] Die Verknüpfung von Radionuklid tragenden Chelatoren über Hydrazone ist überdies angesichts der Säurelabilität der Hydrazon-Bindung interessant. So könnte bei Internalisierung von radiomarkierten Peptiden in Tumorzellen mit erniedrigten pH-Werten (pH~5) der Radionuklid tragende Komplex durch saure Hydrolyse in der Zelle freigesetzt werden und für eine verlängerte Verweildauer in der Tumorzelle sorgen. Bei Hydrazon-Konjugaten von Neuropeptid Y mit Chemotherapeutika konnte im Vergleich mit entsprechenden Amid-verbrückten Verbindungen, nur bei ersteren erhöhte cytotoxische Aktivität in Glioblastom XF-498L Zellen gefunden werden, was auf die Freisetzung des Chemotherapeutikums in Lysosomen und anschließende Diffusion ins Cytoplasma zurückgeführt wurde.^[276]

Das Derivat **130** würde eine Einführung von Chelatoren über die chemoselektive Triazolbildung aus Aziden und Alkinen ermöglichen. Diese Dipolare Cycloaddition nach Huisgen^[277, 278] wird als äußerst leistungsfähige „Click“-Reaktion^[279] angesehen und wurde erst vor kurzem als Bereicherung für verschiedene Entwicklungen der medizinischen Chemie entdeckt.^[280, 281]

Die Synthesen der in Abb. 7.1 gezeigten DOTA-Derivate gelingen aus käuflichem Cyclen und entsprechenden Bromessigsäureestern. Während einfache Bromessigsäureester kommerziell erhältlich sind, müssen α -verzweigte Bromessigsäureester mit zusätzlicher Alkin-, Aldehyd- oder Methylketon-Funktionalität selbst dargestellt werden. Für die Synthese von **129** wurde (*RS*)-4-Acetyl-phenyl-bromessigsäuremethylester **133** ausgehend von **131** in zwei Stufen dargestellt. Zunächst wurde die Methylcarboxylmethyl-Einheit in einer Palladium-(0) katalysierten Kreuzkupplung aus der Boronsäure **131** und Bromessigsäuremethylester eingeführt. Die Reaktion wurde in Gegenwart des kostengünstigeren Tris(*o*-tolyl)phosphin anstelle des in der Literatur verwendeten Trinaphthylphosphin durchgeführt, was als mögliche Erklärung für die verringerte Ausbeute angesehen wird.^[282] Die daran anschließende radikalische Bromierung mit NBS in Benzylstellung verlief ohne Probleme in guten Ausbeuten.

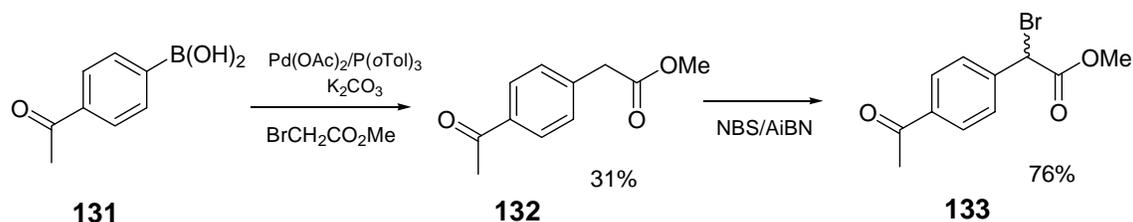


Abb. 7.3: Synthese von **133**.

Das für die Synthese von **130** α -verzweigte Bromessigsäureester-Derivat war ausgehend von **136** nicht durch eine radikalische Seitenkettenbromierung unter obigen Bedingungen zu erhalten. Mögliche Alternativen werden von S. Knör ausgearbeitet. Die Vorstufe konnte in drei Stufen durch Veresterung von **134** und anschließender Sonogashira-Kupplung synthetisiert werden.^[283, 284]

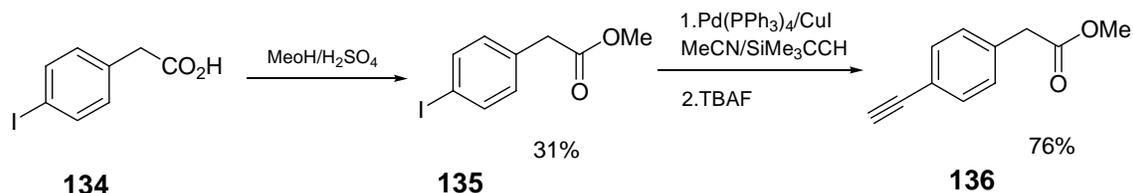


Abb. 7.4: Synthese von **136**.

Eine Vorstufe von **128** konnte ausschließlich aus kommerziell erhältlichen Reagenzien durch Umsetzung mit Cyclen **137** erhalten werden. Bei der Reaktion von Cyclen mit α -Brombutyrolacton kann eine teilweise zweifache Alkylierung nicht verhindert werden. Die besten Resultate konnten bei Verwendung von 1.5 eq Alkylierungsreagenz und anschließender Zugabe von 3.3 eq Bromessigsäure-*tert*butylester in DMF beobachtet werden. Die Verbindung **138** soll anschließend durch Lactonöffnung und Oxidation zum Aldehyd **128** umgesetzt werden. Bei der analogen Reaktion von 1.2 eq **133** mit Cyclen und Bromessigsäure-*tert*butylester konnte **129** in 60%iger Ausbeute hergestellt werden.

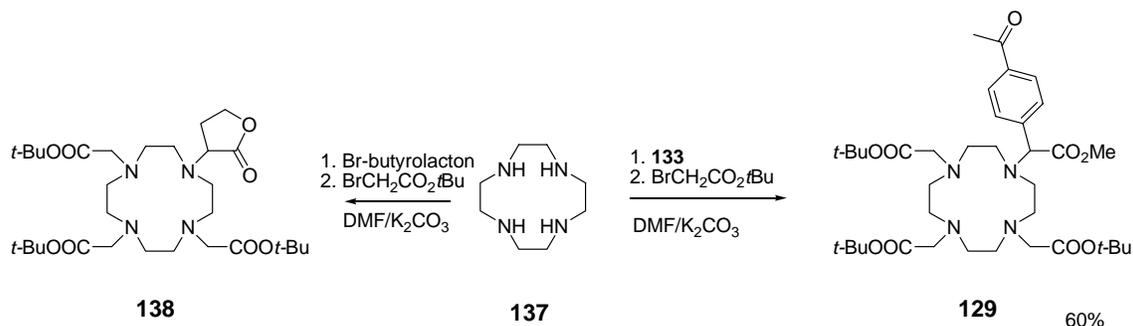


Abb. 7.5: Synthese neuartiger DOTA-Derivate.

Die Verbindung **129** erlaubt die chemoselektive Einführung des Chelators an Hydrazon- oder Aminoxyfunktionalisierte Peptide über das Methylketon. Außerdem können nach selektiver Verseifung des Methylrestes über Amidbindungen weitere Einheiten wie z.B. Zuckerreste (zur Verbesserung von pharmakokinetischen Eigenschaften), cytotoxische Verbindungen etc. eingeführt werden.

8 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unabhängige Projekte bearbeitet. Zunächst standen die Synthese und die biologische Evaluation von Minibibliotheken basierend auf Monosacchariden als niedermolekulare α 4-Integrinantagonisten im Mittelpunkt. Die Inhibierung der Adhäsion von MAdCAM-1 an α 4 β 7-Integrine bzw. von VCAM-1 an α 4 β 1-Integrine stellt bei einer Vielzahl von pathologischen Prozessen wie Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen einen viel versprechenden Therapieansatz dar. Im zweiten Teil wurden oligomere Somatostatinanaloge für eine mögliche Anwendung in der Tumordiagnostik und -therapie entwickelt.

Peptidmimetika, denen Zuckergerüste zugrunde liegen, sind im letzten Jahrzehnt zunehmend in den Fokus der Wirkstoffentwicklung gerückt. Durch die enorme Strukturvielfalt, die sich durch Variation der Seitenketten, der Konfiguration und der Position von Pharmakophoren ergibt, und ein breites synthetisches Wissen scheinen Saccharide äußerst flexible und geeignete Grundgerüste in der kombinatorischen Chemie zu sein. Zu Beginn der Arbeit war das Mannosederivat **32** als schwach aktiver und selektiver α 4 β 1-Integrinligand bekannt. Im weiteren Verlauf wurde **38 β** als α 4 β 7-selektiver Integrinligand gefunden (Abb. 8.1). Um die biologische Relevanz der Konfiguration in Position 1 und 2, der Länge des Aspartat- und Leucin-Pharmakophors sowie der hydrophoben Reste in Position 3 und 4 auszuloten und um Substanzen mit eventuell verbessertem pharmakologischem Profil zu erhalten, wurden Minibibliotheken von α - und β -D-Glucosederivaten durch effiziente Schutzgruppenstrategien in sieben bis zwölf Stufen in Lösung dargestellt. Außerdem wurden Synthesen für C-Glycoside und C-Mannoside mit den entsprechenden Pharmakophoren entwickelt, um die metabolische Stabilität zu erhöhen.

Im Falle von Verbindung **32** scheint die Konfiguration in Position 2 für die biologische Aktivität wichtig zu sein, da das entsprechende Glucosederivat **72** die Adhäsion von VCAM-1 an α 4 β 1-Integrine nicht unterbindet. Allerdings müssten zur Untermauerung dieser Ergebnisse weitere Testungen durchgeführt werden. Das Glycosid **76** und das korrespondierende C2-Epimer **38 β** zeigten ähnliche Aktivitäten gegenüber der Adhäsion von MAdCAM-1 an α 4 β 7-Integrine, was durch die Möglichkeit der nahezu identischen räumlichen Anordnung des Phenylrests in gerechneten Strukturen erklärt werden konnte. Eine Verkürzung des Aspartat-Pharmakophors zum C-Mannosid **97** war ohne Aktivitätsverlust

möglich. Somit ergeben sich nun prinzipiell weitere Möglichkeiten zur Darstellung metabolisch stabilerer Derivate.

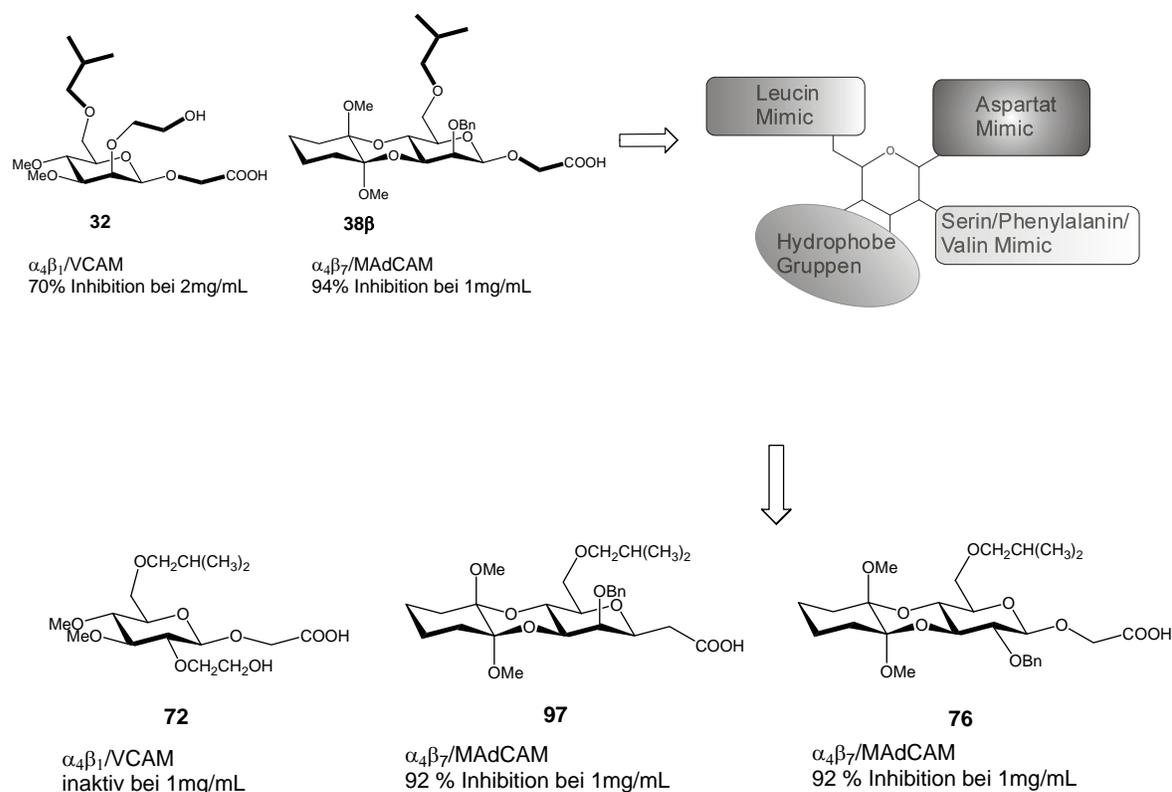


Abb. 8.1: Entwicklung von Monosacchariden als $\alpha 4$ -Integrinantagonisten.

Die Verwendung oligomerer Liganden, die synchron an mehrere Rezeptoren binden können, ermöglichte im Falle von radioaktiv markierten RGD-Oligomeren äußerst kontrastreiche PET-Aufnahmen des $\alpha v\beta 3$ -positiven Tumorgewebes in der Maus.^[222] In Anlehnung an das Multimerenkonzept wurden im zweiten Teil der Arbeit erstmals oligomere Somatostatinanaloge für eine Anwendung in der Diagnose und Therapie von Somatostatinrezeptor-2 (SSTR-2) positiven Tumoren evaluiert. Die Synthese gelang durch Verknüpfung der aminoxyfunktionalisierten monomeren Somatostatinanaloge mit verzweigten oligomeren Aldehyden mittels chemoselektiver Oximligation. Gegenüber einem vergleichbaren Monomer zeigten verschiedene Dimere und ein Tetramer erhöhte Bindungsaffinitäten gegenüber dem Somatostatinrezeptor-2. Allerdings wurde bei *in vivo* Biodistributionsanalysen, die im Klinikum rechts der Isar von T. Poethko durchgeführt wurden, eine drastisch erhöhte Nierenanreicherung der dimeren Substanzen beobachtet. Um die Frage zu klären, inwieweit oligomere Somatostatinanaloge die Internalisierung der Rezeptoren verlangsamen oder verhindern wären Internalisierungstudien an SSTR-2

tragenden Zellen notwendig. Insgesamt scheinen oligomere Somatostatinanaloga aufgrund der vorliegenden Biodistributionsdaten für einen Einsatz in der Diagnose und Therapie von Tumoren wenig geeignet zu sein.

Schließlich wurden in Zusammenarbeit mit S. Knör neuartige Chelatoren für Radionuklide entwickelt, die eine Einführung in zu markierende, hochfunktionalisierte Zielmoleküle über chemoselektive Synthesen ohne umständliche Schutzgruppenstrategien ermöglichen. Darüber hinaus besteht in Verbindung **129** nach selektiver Verseifung des Methylesters die Möglichkeit der Einführung von weiteren Funktionalitäten, wie z.B. Zuckern zur Verbesserung pharmakokinetischer Eigenschaften.

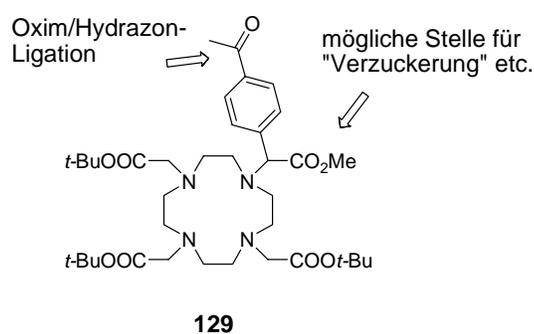


Abb. 8.2: Neuartiges DOTA-Derivat für chemoselektive Synthesen.

9 EXPERIMENTELLER TEIL

9.1 Material und Methoden

Alle technischen **Lösungsmittel** wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach den gängigen Verfahren absolutiert oder direkt von den Firmen *Aldrich*, *Fluka* oder *Merck* bezogen. NMP wurde von der Firma *BASF* gespendet.

Die eingesetzten **Reagenzien** stammten von den Firmen *Acros*, *Fluka*, *Lancaster*, *Merck*, *NovaBiochem*, *Neosystem*, *Senn* und *Sigma Aldrich* und entsprachen dem Reinheitsgrad „zur Synthese“ oder „per analysis“. Palladium/Aktivkohle war eine Spende der Firma *Degussa*.

Sämtliche **luft- oder hydrolyseempfindliche** Reaktionen wurden in ausgeheizten Glasgeräten unter einer Argonatmosphäre (99.996%) durchgeführt. Das Entfernen des Luftsauerstoffs aus Reagenzien erfolgte durch Behandlung der Probe im Ultraschallbad mit anschließendem Durchleiten von Argon. Bei **lichtempfindlichen Reaktionen** wurden die Reaktionsgefäße mit Alufolie umhüllt.

Reaktionen an fester Phase wurden in 2 mL, 5 mL, 10 mL oder 20 mL Einmalspritzen der Firma *Becton-Dickinson* durchgeführt, die mit PE-Fritten von der Firma *Vetter Labortechnik* versehen wurden. Die Durchmischung der Harzsuspension erfolgte durch Rotation oder Schütteln der Kunststoffspritzen. Typischerweise wurde 1 mL gequollenes Harz dreimal mit je 5 mL Lösungsmittel für 5 min. gewaschen. Um bei Festphasenreaktionen sowohl die Reaktionsäquivalente als auch die Ausbeute berechnen zu können, wurden entweder die UV-spektroskopisch bestimmten, gravimetrisch bestimmten oder die vom Hersteller angegebenen Belegungen verwendet.

Die **dünnschichtchromatographische Analytik** wurde mit Aluminiumfertigfolien der Firma *Merck* (Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.25 mm) durchgeführt. Die Detektion erfolgte unter der UV-Lampe bei 254 nm. Als Färbereagenz wurde eine wässrige, schwefelsaure Cersulfat/Phosphormolybdänlösung (6.25 g Phosphormolybdänsäurehydrat, 2.5 g Cer(IV)sulfat, 15 mL Schwefelsäure, 235 mL Wasser) verwendet. Anschließend erfolgte die Entwicklung mit dem Heißluftföhn.

Säulenchromatographische Trennungen erfolgten mit 30- bis 100-fachem Massenüberschuss an Kieselgel 60 bzw. 40 (Korngröße 63-200 bzw. 40-63 μm) der Firma *Merck* bei einem Überdruck von 0.8 – 1.4 bar (Flash-Chromatographie).

Die **Massenspektren** wurden durch Laser-Desorption (MALDI), *chemical ionisation* (CI) oder *electrospray ionisation* (ESI) erhalten. HPLC-ESI-MS Massenspektren wurden mit einem Gerät der Firma Finnigan vom Typ LCQ in Kombination mit dem HPLC-System Hewlett Packard HP 1100 (Säulenmaterial Nucleosil 100 5C₁₈) durchgeführt. Die ESI-Spektren werden in der Form „**X** (**Y**) [**M** + **Z**]“ angegeben, wobei die Molekülmasse **X** mit der Intensität **Y** % detektiert wurde. **X** entspricht dabei dem Anlagerungsprodukt aus dem untersuchten Molekül mit dem Molekulargewicht **M** und dem Kation **Z**⁺.

Die **Schmelzpunkte** wurden an einer Apparatur nach Dr. Tottoli, Büchi 510 gemessen und sind nicht korrigiert

Analytische und präparative RP-HPLC wurden an folgenden Geräten (*Beckmann, Amersham Pharmacia Biotech, Waters*) und Säulen (*Omniscrom YMC Europe GmbH*) durchgeführt:

- a) *Amersham Pharmacia Biotech*: Äkta Basic 10F, Pumpensystem P-900, Detektor UV-900, Steuerungssoftware Unicorn Vers. 3.00; Säulenmaterial: ODS-A C₁₈ (120 Å, 5 μM , 250 mm x 4.6 mm);
- b) *Amersham Pharmacia Biotech*: Äkta Basic 100F, Pumpensystem P-900, Detektor UV-900, Steuerungssoftware Unicorn Vers. 3.00; Säulenmaterial: (1) ODS-A C₁₈ (120 Å, 10 μM , 250 mm x 20 mm) semipräparativ; (2) ODS-A C₁₈ (120 Å 10 μM , 250 mm x 30 mm) präparativ;
- c) *Beckman*: System Gold, Hochdruckpumpenmodul 125, UV-Detektor 166; Säulenmaterial: (1) ODS-A C₁₈ (120 Å, 5 μM , 250 mm x 20 mm) semipräparativ; (2) ODS-A C₁₈ (120 Å 11 μM , 250 mm x 20 mm) semipräparativ;
- d) *Waters*: System Breeze, Pumpensystem 1525, UV-Detektor 2487 Dual, Steuerungssoftware Breeze Vers. 3.20; Säulenmaterial: ODS-A C₁₈ (120 Å, 5 μM , 250 mm x 20 mm) semipräparativ.

Als Eluent kamen verschiedene lineare Gradienten aus Acetonitril und Wasser mit 0.1 % TFA zum Einsatz. Präparationen wurden bei einem Fluss von 8 mL/min (semipräparativ) und

25 mL/min (präparativ) durchgeführt. Analytische Retentionszeiten wurden bei Durchflussraten von 1 mL/min ermittelt. Die UV-Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 220 und 254 nm.

Die **NMR-Spektren** wurden mit den Geräten AC250 und DMX500 der Firma *Bruker* aufgenommen und an SGI-Workstations mit dem Programm UXNMR Version 3.1 (*Bruker*) prozessiert. Die verwendeten Pulsprogramme stammen von *Bruker* oder wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe geschrieben. Die NMR-Experimente wurden in Proberöhrchen mit 0.5 cm Durchmesser durchgeführt, wobei in der Regel zwischen 5 mg und 15 mg Substanz in je 5 mL DMSO- d_6 bzw. $CDCl_3$ gelöst wurden. Die chemischen Verschiebungen wurden auf das Restprotonensignal von DMSO- d_6 bei 2.50 ppm bzw. von $CDCl_3$ bei 7.24 ppm in den 1H -Spektren und auf das ^{13}C -Signal von DMSO- d_6 bei 39.5 ppm bzw. von $CDCl_3$ bei 77.0 ppm in den ^{13}C -Spektren kalibriert. Die vollständige Zuordnung der Signale erfolgte mittels 2D-homo- und heteronuklearer NMR-Spektroskopie (DQF-COSY, HMQC, HMBC, HMQC-COSY, ROESY).

Die **logP**-Werte, Logarithmen der Verteilungskoeffizienten zwischen *n*-Octanol und Wasser, wurden mithilfe der Software ChemDraw Ultra 8.0 nach der von Crippen *et al.* [7] vorgeschlagenen Fragmentierungsmethode berechnet.

Die **Adhäsionsassays** führte man in 96er Mikrotiterplatten der Firma Corning durch. rhVCAM-1 stammte von *R&D Systems*. MAdCAM-1 wurde aus dem Überstand transfizierter 293T-Zellen gewonnen. Der *donkey anti-human IgG* wurde von *Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.* hergestellt. Der Fluoreszenzfarbstoff H33342 wurde von der Firma *Calbiochem* bezogen. Die Fluoreszenz wurde mit einem Cytofluor 2300 der Firma *Millipore* gemessen. Zur einheitlichen Durchführung der Adhäsionsassays wurden die Verbindungen in DMSO gelöst. Die Stammlösungen hatten eine Konzentration von 1 mg/10 μ L und wurden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

9.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV I: Spaltung eines Benzylethers durch Hydrierung

Eine Lösung des benzylgeschützten Alkohols (0.5 mmol) in 10 mL EtOH wird mit 60 mg 10% Pd/C (ca. 50% Wasser, Typ E 10 N/W) versetzt und bei Raumtemperatur und Normaldruck in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach vollständigem Umsatz (ca. 1 h,

DC-Kontrolle) wird die Lösung über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel abgezogen und das Produkt ohne weitere Reinigung für die nächste Synthese eingesetzt.

AAV 2: Tritylierung von Glucosederivaten in Position 6

10 mmol des zu tritylierenden Zuckers und 12 mmol Chlortriphenylmethan werden in 80 mL abs. Pyridin gelöst und 15 h unter Rühren und Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von 5 mL Methanol wird das LM abgezogen und der Rückstand zwischen 80 mL EE und 60 mL Wasser verteilt. Die wässrige Phase wird mit EE extrahiert und die gesammelten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und über Kieselgel filtriert.

Die Reinigung des öligen, gelblichen Rohprodukts erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel mit H/EE Gemischen als Laufmittel. Nach Abziehen des LM verbleiben die tritylierten Verbindungen zumeist als weißer Schaum.

AAV 3: Spalten von Tritylethern

10 mmol des zu spaltenden Tritylethers werden bei RT mit 200 mL einer Lösung bestehend aus DCM, TFA und Wasser (88:2:5) versetzt. Dazu gibt man anschließend 3.1 mL (2.37 g, 15 mmol) Triisopropylsilan und lässt 30 min bei RT rühren. Nach vollständigem Umsatz gibt man wässrige ges. Na_2CO_3 -Lsg. solange zu, bis die auftretende Gasentwicklung stoppt.

Zur Aufarbeitung wird die Lösung einmal mit DCM und mehrmals mit EE extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, über Kieselgel filtriert und anschließend mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel mit H/EE Gemischen als Laufmittel gereinigt.

AAV 4: Ethersynthese nach Williams I

10 mmol des zu verethernden Alkohols werden in 75 mL abs. THF gelöst. Anschließend gibt man 30 mmol KOH-Pulver und 3 mmol Kronenether 18-c-6 zu. Nach 20-minütigem Rühren werden 30 mmol des Alkylierungsmittels hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Zur Vervollständigung der Reaktion (DC-Kontrolle) kann noch mehrmals KOH, 18-c-6 und Alkylierungsreagenz zugegeben werden.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch zunächst mit 60 ml wässriger NH_3 -Lsg (25 %) versetzt und 1 h lang gerührt (Zerstören des Alkylierungsreagenz). Die mehrmalige Extraktion des Produkts erfolgt mit EE. Die gesammelten organischen Phasen werden über

Na₂SO₄ getrocknet, über Kieselgel filtriert und anschließend mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel mit H/EE Gemischen als Laufmittel gereinigt.

AAV 5: Ethersynthese nach Williams II

Gepulvertes KOH (20 mmol je zu verethernder OH-Gruppe) wird in 10 mL DMSO suspendiert und nach 10 min Rühren bei RT der Alkohol hinzugegeben. Anschließend erfolgt die Zugabe des Alkylierungsreagenz (10 mmol). Nach vollständiger Reaktion (DC-Kontrolle) wird die Reaktionslösung zwischen 20 mL Wasser und 20 mL Diethylether verteilt und mehrmals mit Diethylether extrahiert. Die weitere Aufarbeitung und Reinigung erfolgt gemäß AAV 4.

AAV 6: *Synthese von α -Glycopyranosylchloriden aus Methylglycopyranosiden*

1 mmol getrocknetes Methylglycopyranosid werden in einer Ar-Atmosphäre in einer Mischung aus 3 mL abs. DCM und 7 mL Eisessig gelöst. Bei 0 °C wird 45 min lang HCl-Gas durch die Lösung geleitet. Zur Vervollständigung der Reaktion wird das Reaktionsgemisch für 24 h bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Nachdem überschüssiges HCl-Gas durch einen Ar-Strom ausgetrieben wurde, wird das LM abgezogen. Das ölige, farblose Rohprodukt wird anschließend mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel mit H/EE Gemischen als Laufmittel gereinigt.

AAV 7: *Synthese von β -O-Glycosiden mittels Koenigs-Knorr-Reaktion*

1 mmol Glycopyranosylchlorid werden in 5 mL abs. DCM über wenigen Kügelchen Molekularsieb (4 Å) gelöst und unter Rühren bei 0 °C mit 10 mmol des Glycosylakzeptors versetzt. Unter Lichtausschluss gibt man nach 30 min 2 mmol Ag₂CO₃ zu. Die Reaktion läuft bei bis RT ansteigender Temperatur über Nacht unter Lichtausschluss.

Das Reaktionsgemisch wird über eine kurze Strecke Kieselgel filtriert und das LM abgezogen. Die Reinigung erfolgt anschließend mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel mit H/EE Gemischen als Laufmittel.

AAV 8: *Synthese von Glycopyranosen aus Methylglycopyranosid*

1 mmol Methylglycopyranosid werden in 10 mL Essigsäure gelöst. Nach Zugabe von 1.5 mL 0.2 M Trifluormethansulfonsäure wird die Lösung für 5 h bei 90 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von ges. Na_2CO_3 -Lsg. auf pH4 eingestellt, eingeengt und zwischen Wasser und EE verteilt. Nach mehrmaliger Extraktion des Produkts mit EE werden die gesammelten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet, über Kieselgel filtriert und anschließend mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel mit H/EE Gemischen als Laufmittel gereinigt.

AAV 9: *Synthese von Glycopyranosyl- bzw. Mannopyranosylbromiden*

1 mmol Phenyl-1-thio-glycopyranosid bzw. Ethyl-1-thio-mannopyranosid werden in 10 mL abs. DCM gelöst. Nach Zugabe von 1 mmol Brom wird die Lösung für 25 min bei 0 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird kalte 10%ige wässrige NaHSO_3 -Lsg. zugegeben und mehrmals mit DCM extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, über Kieselgel filtriert und anschließend mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel mit H/EE Gemischen als Laufmittel gereinigt.

AAV 10: *Hydrolyse von Estern*

1 mmol des Esters werden in Wasser/Dioxan Mischungen gelöst und anschließend mit 3 mmol LiOH versetzt und 3 h bei RT gerührt. Nach Filtration über eine kurze Strecke Kieselgel und Lyophilisieren wird die Verbindung mittels HPLC gereinigt.

AAV 11: *Belegung von TCP-Harz*

Zu trockenem TCP-Harz (maximale Belegungsdichte 0.9 mmol/g, 1.0 g) werden *N*-terminal geschützte Aminosäure bzw. Säurebaustein (1.2 bis 1.5 mmol), abs. DCM (8 mL) und DIPEA (3 mmol) hinzugefügt. Zum *Cappen* von nicht umgesetzten Trityl-Gruppen werden nach 1 h Schütteln DIPEA (0.05 mL, 0.3 mmol) und Methanol (3 mL) zugesetzt und weitere 15 min geschüttelt. Das Harz wird über eine Fritte abgesaugt und mit DCM (3 x 8 mL, je 3 min), NMP (3 x 8 mL, je 3 min), und nochmals mit DCM (3 x 8 mL, je 3 min) gewaschen. Beim letzten Waschschrift gibt man sukzessive kleinere Mengen Methanol zu und wäscht abschließend mit reinem Methanol (2 x 8 mL, je 3 min). Nach Trocknen des Harzes über Nacht im Hochvakuum wird die Belegungsdichte nach folgender Formel bestimmt:

n	Belegungsdichte [mmol / g belegtes Harz]
m_{ges}	Gesamtmasse des Harzes nach der Belegung [g]
m_{Harz}	Masse des eingesetzten Harzes [g]

$$n = \frac{m_{ges} - m_{Harz}}{(M_{Xxx} - M_{HCl}) \cdot m_{ges}}$$

M_{Xxx} Molmasse der Aminosäure [g/mol]
 M_{HCl} Molmasse HCl (36.461 g/mol)

Der Fehler, der dabei durch die unterschiedlichen Massen von Cl- und MeO- entsteht, ist vernachlässigbar.

AAV 12: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Das Harz (1 g) wird für 5 min in NMP (1 x 10 mL) gequollen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt mit 20 %iger Piperidin/NMP Lösung (2 x 10 mL) zuerst 5 min danach 15 min. In Gegenwart von ivDde-Schutzgruppen erfolgt die Fmoc-Entschützung nur zweimal 5 min, da sonst eine Teilabspaltung der ivDde-Schutzgruppen erfolgt. Das Harz wird anschließend mit NMP (5 x 10 mL, je 3 min) gewaschen.

AAV 13: Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe:

Das Harz (1 g) wird für 5 min in NMP (1 x 10 mL) gequollen. Die Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe erfolgt mit 2 %iger Hydrazin/NMP Lösung (2 x 10 mL, je 5 min). Das Harz wird anschließend mit NMP (5 x 10 mL, je 3 min) gewaschen.

AAV 14: Festphasensynthese linearer Peptide mit Fmoc/tButyl-Schutzgruppenstrategie

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe der harzgebundenen Aminosäure und die Kupplung einer weiteren N-Fmoc-geschützten Aminosäure erfolgt nach folgendem Fließschema:

Schritt	Reagenzien	Operation	Zeit / min
1	NMP	waschen	1 x 3
2	20% Piperidin / NMP	Fmoc-Abspaltung	1 x 5
3	20% Piperidin / NMP	Fmoc-Abspaltung	1 x 15
4	NMP	waschen	4 x 2
5	Fmoc-AS-OH Kupplungsreagenz/Base	kuppeln	1 x 60 - 90
6	NMP	waschen	4 x 2

Wird die Synthese an einer Stelle unterbrochen, so wäscht man das Harz mit NMP (5 x 3 min), DCM (5 x 3 min), und trocknet es im Vakuum. Vor der Abspaltung des Peptids vom

Harz wird die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe analog der Schritte 1-3 des Fließschemas entfernt.

AAV 15: Kupplung mit TBTU/HOBt:

Das harzgebundene freie Amin wird mit einer 0.1-0.2 M Lösung aus *N*-Fmoc-geschützter Aminosäure (2 – 2.5 eq. bezogen auf freien *N*-Terminus an der Festphase im Schüttelgefäß), TBTU und HOBt (jeweils 1 eq. bezogen auf die Aminosäure) und DIPEA (pH 8 – 9, 5.2 – 5.6 eq. bezogen auf die Aminosäure) in NMP versetzt. Die Kupplungsdauer beträgt 60 min. Anschließend wird das Harz mit NMP (5 x 3 min) gewaschen.

AAV 16: Abspaltung seitenkettengeschützter Verbindungen vom TCP-Harz

Nach Waschen des Harzes (0.25 g) mit DCM (4 x 2 mL, je 2 min) erfolgt die Abspaltung durch

- a) DCM:AcOH:TFE (3:1:1) 1 x 60 min, 1 x 30 min und 2 x 10 min oder
- b) 20 % HFIP in DCM 5 x 20 min.

Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum eingeeengt und der Rückstand bei (a) zweimal mit Toluol koevaporiert, um eine Anreicherung von Essigsäure mit möglicher Schutzgruppenabspaltung zu vermeiden. Abschließend lyophilisiert man aus *t*-Butanol/Wasser.

AAV 17: Abspaltung vollständig entschützter Verbindungen vom TCP-Harz

Das Harz (0.25 g) wird zunächst mit DCM (4 x 2 mL, je 2 min) gewaschen. Vor der Zugabe der Abspalllösung werden ca. 250 µL TIPS in wenig DCM zu dem Harz hinzugefügt. Anschließend erfolgt die Abspaltung vom Harz mit einem Gemisch aus 95 % TFA und 5 % Wasser (3 x 2 mL, je 5 min). Wird das Harz nicht entfärbt, so wird zusätzlich TIPS zur Abspalllösung gegeben. Die vereinigten Filtrate werden noch 1 h unter gelegentlichem Schütteln stehen gelassen. Anschließend wird das Lösungsmittel im Hochvakuum bei 35 °C abdestilliert. Der Rückstand wird aus Wasser/*t*-Butanol lyophilisiert. Zur Fällung in Ether werden die Filtrate in einen 30fachen Überschuss an Ether eingetropft, das Peptid abzentrifugiert und aus Wasser/*t*-Butanol lyophilisiert.

AAV 18: Oximligation

Zu einer 0.5 M Lösung des vollständig entschützten, aminoxyfunktionalisierten und HPLC-gereinigten Peptids in ACN/H₂O = 1:1_{v/v} (HPLC-Qualität) bei pH 4 (TFA, HPLC-Qualität)

gibt man den Aldehyd (3 eq) und lässt 1 h bei RT rühren. Anschließend wird die saure Lösung mit Wasser verdünnt und die Lösungsmittel durch Lyophilisieren entfernt. Der Rückstand wird mittels HPLC gereinigt.

AAV 19: *Oxidation von C-terminalen Serin mit NaIO₄*

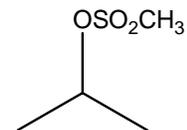
Eine 0.1 molare Lösung des zu oxidierenden Peptids in 25 %iger Essigsäure wird mit 1.5 eq. NaIO₄ versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Nach verdünnen mit Wasser wird das LM durch lyophilisieren entfernt. Der Rückstand wird mittels HPLC gereinigt.

AAV 20: *Disulfidbrückenzyklisierung seitenkettenentschützter Peptide in Lösung*

- Eine 1 mM Lösung des Peptids in H₂O/DMSO (50:1 v/v) wird bis zum vollständigen Umsatz (HPLC-Kontrolle) bei RT unter Sauerstoffeinfluss gerührt (24-48 h). Nach Entfernen des LM durch lyophilisieren wird der Rückstand mittels HPLC gereinigt.
- Eine 1 mM Lösung des Peptids in wässriger 5mM NH₄OAc-Lösung wird mit gesättigter NaHCO₃-Lösung auf pH 7–8 gebracht. Anschließend gibt man 3 Äquivalente H₂O₂ in Form einer 30 % H₂O₂-Lösung zu und rührt 30 min bei RT. Nach Entfernen des LM durch lyophilisieren wird der Rückstand mittels HPLC gereinigt.

9.3 Synthese von Monosacchariden als α 4-Integrinantagonisten

9.3.1 Synthese von Alkylierungsreagentien



Isopropylmesylat^[110]

Zu einer Lösung bestehend aus 27.8 mL (27.2 g, 344 mmol) Pyridin und 23 mL (18.1 g, 301 mmol) getrocknetem Isopropanol werden bei – 20° C 16.2 mL (24.0 g, 209 mmol) Methansulfonylchlorid innerhalb 5 min zugetropft. Das Eis-Kochsalzbad wird nach beendeter Zugabe durch ein Eisbad ersetzt und die Lösung 30 min gerührt. Anschließend wird noch 2 h lang bei RT gerührt.

Zur Aufarbeitung werden 50 mL Ether und 30 mL Eiswasser zugegeben. Die organische Phase wird einmal mit kaltem Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wird

am Rotationsverdampfer abgezogen. Zur Reinigung des Isopropylmesylats wird fraktionierend destilliert (Sdp. 88 – 93° C / 12 torr).

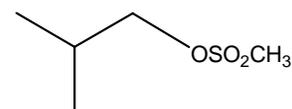
Ausbeute 21.5 g (156 mmol; 75 %)

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

4.93 (h, 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 2.96 (s, 3H, SCH_3), 1.39 (d, 6H, $J_{\text{HH}} = 9.24$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)

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

77.1 (SCH_3), 39.0 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 23.4 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$),



Isobutylmesylat^[285]

Die Darstellung von Isobutylmesylat gelingt ausgehend von 500 mmol Isobutanol analog zur Darstellung von Isopropylmesylat.

Ausbeute 62.3 g (410 mmol; 82 %)

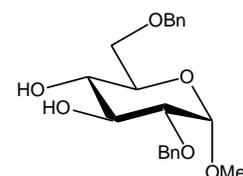
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz):

3.92 (d, 2H, $J=7.5$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$), 2.93 (s, 3H, SCH_3), 1.98 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.94 (d, 6H, $J=7.2$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)

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

76.3 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$), 37.5 (SCH_3), 28.6 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$), 23.4 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)

9.3.2 Synthese von Monosacchariden



46

Methyl-2,6-di-O-benzyl- α -D-glycopyranosid^[107]

21 g (108.2 mmol) Methyl- α -D-glycopyranosid und 40.4 g (161 mmol) Dibutylzinnoxid werden in 500 mL Toluol am Wasserabscheider 14 h lang unter Rückfluss erhitzt. Danach wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Zu dem verbleibendem

gelblichem Feststoff werden 100 mL Benzylbromid gegeben. Die Lösung wird bei 85-95 °C (Ölbadtemperatur) 24 h lang gerührt.

Zur Aufarbeitung werden 160 mL TCM zugegeben und mit 320 mL Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wird mehrmals mit EE extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, über eine kurze Strecke Kieselgel filtriert und im Vakuum eingengt. Die restliche, Benzylbromid enthaltende Lösung wird am Stickstoffrotationsverdampfer weiter eingengt.

Der verbleibende gelbliche Sirup wird mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: H/EE = 3:1 bis 1:8).

Zur weiteren Reinigung kann noch aus Ether/Hexan/Aceton = 1:1:0.1 umkristallisiert werden. Methyl-2,6-di-*O*-benzyl- α -D-glycopyranosid wird als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 20 g (27 mmol, 90 %), Smp.: 84-86 °C

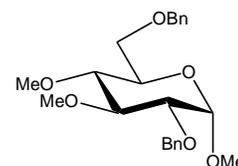
R_f [H/EE (1:2)] = 0.38

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.35 – 7.27 (m, 10 H, H-Aromaten), 4.71 (d, 1H, J=12.1 Hz, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}'\text{Ph}$), 4.67 (d, 1H, J= 12.2 Hz, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}'\text{Ph}$), 4.65 (d, 1H, J₁₂=3.5 Hz, H-C(1)), 4.62 (d, 1H, J=12.1 Hz, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}'\text{Ph}$), 4.56 (d, 1H, J=12.1 Hz, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}'\text{Ph}$), 3.91 (dd, 1H, J₂₃= J₃₄=9.2 Hz, H-C(3)), 3.73-3.70 (m, 3H, H-C(5), H₂-C(6)), 3.60 (m, 1H, H-C(4)), 3.39 (dd, 1H, J₁₂= 3.5 Hz, J₂₃=9.2 Hz, H-C(2)), 3.36 (s, 3H, OCH₃)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):

138.3 (Benzyl C-1), 129.0, 128.8, 128.5, 128.1, 128.2 (C-Aromaten), 98.1 (C-(1)), 79.6 (C-(2)), 74.0 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{2}\text{Ph}$), 73.4 (C-(3)), 71.6 (C-(4)), 70.0 (C-(5)), 69.9 C(6), 55.7 (O $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{3}$)



47

Methyl-2,6-di-*O*-benzyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid^[286]

Die Synthese erfolgt nach AAV 4 ausgehend von 10 g Methyl-2,6-di-*O*-benzyl- α -D-glycopyranosid **46**. Die Reinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel

(Laufmittel: H/EE = 5:1 bis 2:1). Es wird Methyl-2,6-di-*O*-benzyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **47** als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute 7.9 g (9.69 mmol, 73 %)

R_f [H/EE (4:1)] = 0.47

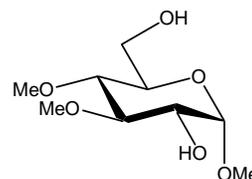
ESI-MS: 425.3 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.34 – 7.28 (m, 10 H, H-Aromaten), 4.79 (d, 1H, J=12.2 Hz, CHH'Ph), 4.64 (d, 2H, J= 12.2 Hz, CHH'Ph), 4.58 (d, 1H, J₁₂=3.6 Hz, H-C(1)), 4.52 (d, 1H, J=12.1 Hz, CHH'Ph), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 3.67- 3.56 (m, 4H, H-C(3), H-C(5), H₂-C(6)), 3.48 (s, 3H, OCH₃), 3.41 (dd, 1H, J₁₂= 3.6 Hz, J₂₃=9.6 Hz, H-C(2)), 3.36 (s, 3H, OCH₃), 3.24 (dd, 1H, J₃₄= J₄₅=9.6 Hz, H-C(4))

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):

138.8, 138.5 (Benzyl C-1), 128.8, 128.7, 128.4, 128.2, 128.0 (C-Aromaten), 98.7 (C-(1)), 84.2 (C-(3)), 79.9 (C-(2)), 73.9 (CH₂Ph), 73.7(CH₂Ph), 70.3 (C-(5)), 69.0 (C(6), 61.4 (OCH₃), 60.8 (OCH₃), 55.6 (OCH₃)



48

Methyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid^[286]

Die Synthese erfolgt ausgehend von 6 g (24,9 mmol) Methyl-2,6-di-*O*-benzyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **47** nach AAV 1. Es verbleibt Methyl 3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **48** als farbloses Öl.

Ausbeute 5.2 g (23.4 mmol, 94 %),

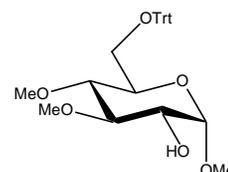
R_f (EE) = 0.26

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

4.75 (d, 1H, $J_{12}=3.5$ Hz, H-(C-(1))), 3.85 (dd, 1H, $J_{56}<1$ Hz, $J_{66'}=11.3$ Hz, H-(C-(6))), 3.76 (dd, 1H, $J_{56'}=4$ Hz, $J_{6'6}=11.3$ Hz H'-(C-(6))), 3.67 (s, 3 H, OCH₃), 3.57 (s, 3H, OCH₃), 3.57 (m, 1H, H-(C-(5))), 3.54 (m, 1H, H-(C-(2))), 3.43 (s, 3H, OCH₃), 3.40 (m, 1H, H-(C-(3))), 3.17 (dd, 1H, $J_{34}=J_{45}=11.9$ Hz, H-(C-(4)))

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

99.7 (C-(1)), 84.8 (C-(3)), 80.0 (C-(4)), 73.0 (C-(2)), 71.4 (C-(5)), 62.2 (C-(6)), 61.3 (OCH₃), 60.8 (OCH₃), 55.7 (OCH₃)



49

Methyl-3,4-di-O-methyl-6-O-trityl- α -D-glycopyranosid

Die Synthese erfolgt nach AAV 2 aus 8.00 g (36.00 mmol) Methyl-3,4-di-O-methyl- α -D-glycopyranosid **48**. Nach Reinigung des öligen, gelblichen Rohprodukts mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 1:1) verbleibt Methyl-3,4-di-O-methyl-6-O-trityl-1- α -D-glycopyranosid **49** als weißer Schaum.

Ausbeute: 12.6 g (27 mmol, 75 %).

R_f [H/EE (1:1)] = 0.38

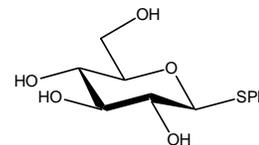
ESI-MS: 487.3 (M+Na⁺), 243 (Trt⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.52-7.27 (m, 15H, H-Aromaten), 4.86 (d, 1H, $J_{12}=3.9$ Hz, H-C-(1)), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 3.66 (m, 2H, H-C-(2), H-C(5)), 3.49 (s, 3H, OCH₃), 3.43 (dd, 1H, $J_{56}=1.6$ Hz, $J_{66'}=10.1$ Hz, H-C-(6)), 3.37 (dd, 1H, $J_{34}=J_{32}=9.2$ Hz, H-C-(3)), 3.31 (dd, 1H, $J_{43}=J_{45}=9.3$ Hz, H-C-(4)), 3.29 (s, 3H, OCH₃), 3.16 (dd, 1H, $J_{56'}=4.5$ Hz, $J_{66'}=10.1$ Hz, H-C-(6))

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

144.4 (Trityl C-1), 129.2, 129.1, 127.4 (C-Aromaten), 99.5 (C-(1)), 85.2 (C-(3)), 80.4 (C-(4)), 73.1 (C-(2)), 70.9 (C-(5)), 62.8 (C-(6)), 61.4 (OCH₃), 60.6 (OCH₃), 55.4 (OCH₃)

**55**^[109]**Phenyl-1-thio-β-D-glycopyranosid**

25 g (64 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-α-D-glycopyranosid werden unter Argon in 60 mL abs. DCM gelöst. Dazu werden bei 0 °C 7.4 mL (72 mmol) Thiophenol zugegeben und 5.3 mL (45 mmol) SnCl₄ vorsichtig zugetropft. Die Reaktion läuft bei bis RT ansteigender Temperatur für 16 h.

Zur Aufarbeitung wird die Lösung mit 60 mL 1 M KF-Lösung und gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird mit EE rückextrahiert und anschließend die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und über Kieselgel filtriert. Die Reinigung kann durch Umkristallisieren in H/EE = 3:1 oder mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 3:1) erfolgen. Man erhält Phenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glycopyranosid in Form farbloser Kristalle.

Ausbeute 16.1 g (36.6 mmol, 57 %)

18 g (41 mmol) Phenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glycopyranosid werden in 150 mL MeOH gelöst. Anschließend gibt man 2.21 g (41 mmol) NaOMe zu und lässt 2 h bei RT rühren. Anschließend wird die basische Lösung mit Ionentauscher Amberlite IR-120 neutralisiert. Nach Abtrennen des Harzes und Abziehen des LM verbleibt ein gelblicher Feststoff, der mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel DCM/MeOH = 9:1) gereinigt wird. Man erhält Phenyl 1-thio-β-D-glycopyranosid **55** als farblosen Feststoff.

Ausbeute 10.7 g (39 mmol, 95 %)

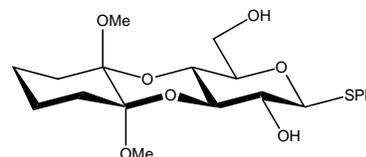
R_f [H/EE (1:1)] = 0.09

¹H-NMR (DMSO, 500 MHz, 300 K):

7.46-7.18 (m, 5H, H-Aromaten), 4.60 (d, 1H, J₁₂=9.8 Hz, H-C(1)), 3.70 (m, 1H, H-C(6)), 3.48 (m, 1H, H'-C(6)), 3.24 (m, 1H, H-C(3)), 3.24 (m, 1H, H-C(5)), 3.14 (m, 1H, H-C(4)), 3.09 (m, 1H, H-C(2))

¹³C-NMR (DMSO, 125 MHz, 300K):

133.8 (Phenyl C-1), 130.6, 129.6, 129.4, 127.1 (C-Aromaten), 88.0 (C-(1)), 81.8 (C(5)), 79.1 (C(3)), 73.2 (C(2)), 70.7 (C(4)), 61.9 (C(6))



56

Phenyl-3,4-O-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-1-thio- β -D-glycopyranosid

10 g (36.7 mmol) Phenyl-1-thio- β -D-glycopyranosid **55** werden in 120 mL abs. MeOH gelöst und mit 2.37 g CSA, 10.34 g (50.6 mmol) CDA und 5.42 g Trimethylorthoformiat versetzt. Die Lösung wird für 10 h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wird mit 3 g NaHCO₃ neutralisiert, über Kieselgel filtriert und das LM abgezogen. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:2 bis 1:1) gereinigt. Es werden etwa gleiche Mengen an Phenyl-2,3-O-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-1-thio- β -D-glycopyranosid und Phenyl-3,4-O-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-1-thio- α -D-glycopyranosid erhalten.

Ausbeute 6.05 g (14.7 mmol, 40 %)

R_f [H/EE (1:1)] = 0.46

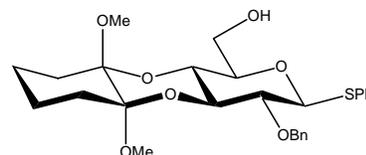
ESI-MS: 381.3 (M-OMe⁻)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.52, 7.33-7.27 (m, 5H, H-Aromaten), 4.60 (d, 1H, J₁₂=9.7 Hz, H-C(1)), 3.91 (dd, 1H, J₂₃=J₃₄=10.3 Hz, H-C(3)), 3.89 (dd, 1H, J₅₆=2.9 Hz, J_{HH'}=12.0 Hz, H-C(6)), 3.80 (dd, 1H, J₃₄=J₄₅=10 Hz, H-C(4)), 3.74 (dd, 1H, J_{HH'}=12 Hz, J_{56'}=4.3 Hz, H'-C(6)), 3.63 (m, 1H, H-C(5)), 3.54 (dd, 1H, J₁₂=J₂₃=9.3 Hz, H-C(2)), 3.26 (s, 3H, OCH₃), 3.20 (s, 3H, OCH₃), 1.78 (m, 1H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.76 (m, 4H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.56 (m, 2H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.42 (m, 2H, CH₂CH₂C(OMe))

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

133.6, 131.7, 129.5, 128.8 (C-Aromaten), 99.0, 98.9 (-COCH₃), 88.8 (C-(1)), 78.5 (C(5)), 74.3 (C(3)), 69.9 C(2), 66.2 (C(4)), 61.9 (C(6)), 47.3 (OCH₃), 46.4 (OCH₃), 27.4, 27.3 (CH₂CH₂COMe), 21.7 (CH₂CH₂COMe)



58

Phenyl-2-*O*-benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-1-thio-β-D-glycopyranosid

5.08 g (12.32 mmol) Phenyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-1-thio-β-D-glycopyranosid **56** werden in 60 mL Pyridin gelöst und mit 3.45 mL (14.78 mmol) TBDPSCI versetzt und 20 h bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wird der Rückstand mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1 bis 3:1) gereinigt. Man erhält Phenyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-*tert*butyldiphenylsilyl-1-thio-β-D-glycopyranosid als farblosen Feststoff.

7.8 g (11.9 mmol) Phenyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-*tert*butyldiphenylsilyl-1-thio-β-D-glycopyranosid werden nach AAV 4 mit Benzylbromid umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 7:1 bis 4:1) erhält man Phenyl-2-*O*-benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-*tert*butyldiphenylsilyl-1-thio-β-D-glycopyranosid als farblosen Feststoff.

7.1g (9.6 mmol) Phenyl-2-*O*-benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-*tert*butyldiphenylsilyl-1-thio-β-D-glycopyranosid werden in 70 mL THF gelöst und mit 10 mL einer 1 M TBAF-Lösung in THF versetzt. Man erhält Phenyl-2-*O*-benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-1-thio-β-D-glycopyranosid **58** als farblosen Feststoff.

Ausbeute 4.6 g (9.12 mmol, 75 %) über drei Stufen

R_f [H/EE (3:1)] = 0.18

ESI-MS: 471.2 (M-OMe⁻)

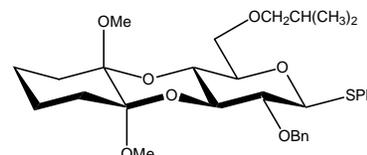
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.60-7.27 (m, 10H, H-Aromaten), 4.86 (d, 1H, J=10.6 Hz, CHH'Ph), 4.76 (d, 1H, J=10.6 Hz, CHH'Ph), 4.69 (d, 1H, J₁₂=9.4 Hz, H-C(1)), 4.06 (dd, 1H, J₂₃=J₃₄=9.8 Hz, H-C(3)), 3.89 (dd, 1H, J₅₆=2.9 Hz, J_{HH'}=12.0 Hz, H-C(6)), 3.85 (dd, 1H, J₃₄=J₄₅=10 Hz, H-C(4)), 3.75 (dd, 1H, J_{HH'}=12 Hz, J_{56'}=4.8 Hz, H'-C(6)), 3.57 (m, 1H, H-C(5)), 3.52 (dd, 1H, J₁₂=J₂₃=9.3 Hz, H-

C(2)), 3.23 (s, 6H, OCH₃), 1.78 (m, 1H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.76 (m, 4H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.56 (m, 2H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.42 (m, 2H, CH₂CH₂C(OMe))

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

138.7, 133.2, 133.1, 129.4, 128.6, 128.3, 128.2 (C-Aromaten), 99.0, 98.9 (-C=O), 87.8 (C(1)), 78.2 (C(5)), 78.1 (C(2)), 75.9 (CH₂Ph), 75.6 (C(3)), 66.9 (C(4)), 62.0 (C(6)), 47.3 (OCH₃), 47.2 (OCH₃), 27.5, 27.3 (CH₂CH₂COMe), 21.8, 21.7 (CH₂CH₂COMe)



59

Phenyl-2-O-benzyl-3,4-O-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-O-isobutyl-1-thio-β-D-glycopyranosid

3.5 g (7 mmol) Phenyl-2-O-benzyl-3,4-O-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-1-thio-β-D-glycopyranosid **58** werden nach AAV 4 mit Isobutylmesylat als Alkylierungsmittel umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 8:1 bis 4:1) erhält man Phenyl-2-O-benzyl-3,4-O-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-O-isobutyl-1-thio-β-D-glycopyranosid **59** als farblosen Feststoff.

Ausbeute 3.68 g (6.6 mmol, 94 %)

R_f [H/EE (4:1)] = 0.68

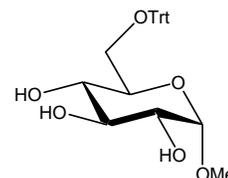
ESI-MS: 591.3 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.60-7.27 (m, 10H, H-Aromaten), 4.81 (d, 1H, J=12.6 Hz, CHH'Ph), 4.71 (d, 1H, J=12.6 Hz, CHH'Ph), 4.62 (d, 1H, J₁₂=12 Hz, H-C(1)), 4.04 (dd, 1H, J₂₃=J₃₄=9.9 Hz, H-C(3)), 3.87 (dd, 1H, J₃₄=J₄₅=9.9 Hz, H-C(4)), 3.69-3.63 (m, 3H, H-C(5), H₂-C(6)), 3.50 (dd, 1H, J₁₂=J₂₃=12 Hz, H-C(2)), 3.26 (m, 2H, CH₂CH(CH₃)₂), 3.24 (s, 3H, OCH₃), 3.22 (s, 3H, OCH₃), 1.85 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.76 (m, 4H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.54 (m, 2H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.41 (m, 1H, CH₂CH₂COMe), 0.93 (d, 3H, J=6.8 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂), 0.92 (d, 3H, J=6.8 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂)

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz, 300K):

138.9, 133.4, 133.2, 129.2, 128.7, 128.5, 128.1 (C-Aromaten), 99.0, 98.9 (OCH_3), 87.5 (C-(1)), 79.0 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 78.2 (C(5)), 77.7 (C(2)), 75.9 (CH_2Ph), 75.8 (C(3)), 69.3 C(6), 66.7 (C(4)), 47.3 (OCH_3), 47.2 (OCH_3), 29.1 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 27.5, 27.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COMe}$), 21.8, 21.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COMe}$), 19.8 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)



139

Methyl-6-*O*-trityl- α -D-glycopyranosid

Die Synthese erfolgt nach AAV 2 aus 6.00 g (30.9 mmol) Methyl- α -D-glycopyranosid. Nach Reinigung durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel DCM/MeOH = 20:1 bis 10:1) verbleibt Methyl-6-*O*-trityl- α -D-glycopyranosid **139** als weißer Schaum.

Ausbeute: 11.5 g (26.4 mmol, 85 %).

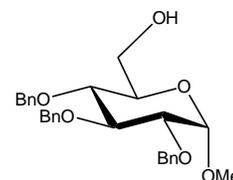
R_f [$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1)] = 0.72

^1H -NMR (DMSO-d_6 , 500 MHz, 300 K):

7.39-7.24 (m, 15H, H-Aromaten), 4.61 (d, 1H, H-C(1)), 3.60 (dd, 1H, H-C(5)), 3.40 (s, 3H, OCH_3), 3.37 (dd, 1H, H-C(3)), 3.25 (dd, 1H, $\text{HH}'\text{-C}(6)$), 3.21 (dd, 1H, H-C(2)), 3.01 (dd, 1H, $\text{HH}'\text{-C}(6)$), 2.96 (dd, 1H, H-C(4))

^{13}C -NMR (DMSO-d_6 , 125 MHz, 300 K):

144.9 (Trityl C-1), 129.2, 128.7, 127.8 (C-Aromaten), 100.5 (C-(1)), 74.5 (C-(3)), 72.8 (C-(2)), 71.8 (C-(5)), 71.6 (C-(4)), 64.7 (C-(6)), 55.0 (OCH_3)



140

Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-glycopyranosid

Die Synthese erfolgt nach AAV 5 ausgehend von 11.3 g (25.9 mmol) Methyl-6-*O*-trityl- α -D-glycopyranosid **139** mit Benzylbromid als Alkylierungsreagenz.

Nach Reinigung durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 8:1 bis 5:1) verbleiben 11.9 g (16.9 mmol) Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-trityl- α -D-glycopyranosid als weißer Feststoff.

11.9 g (16.9 mmol) Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-trityl- α -D-glycopyranosid werden nach AAV 3 umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 2:1 bis 1:2) verbleibt Methyl 2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-glycopyranosid **140** als farbloses Öl.

Ausbeute: 7.01 g (15.1 mmol, 58 % über zwei Stufen).

R_f [H/EE (2:1)] = 0.23

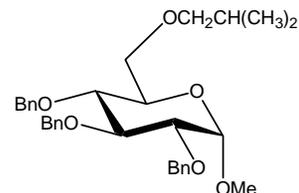
ESI-MS: 487.4 ($M+Na^+$), 484.8 ($1/2(2M+Ca^{2+})$)

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, 300 K):

7.38-7.27 (m, 15H, H-Aromaten), 5.00 (d, 1H, $J=10.9$ Hz, CHH'Ph), 4.90 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, CHH'Ph), 4.85 (d, 1H, $J=10.9$ Hz, CHH'Ph), 4.82 (d, 1H, $J=12.1$ Hz, CHH'Ph), 4.68 (d, 1H, $J=11.9$ Hz, CHH'Ph), 4.65 (d, 1H, $J=10.9$ Hz, CHH'Ph), 4.58 (d, 1H, $J_{12}=3.5$ Hz, H-C(1)), 4.02 (dd, 1H, $J_{23}=J_{34}=9.3$ Hz, H-C(3)), 3.78 (dd, 1H, $J_{HH'}=11.7$ Hz, $J_{56}=2.6$ Hz, HH'-C(6)), 3.70 (dd, 1H, $J_{HH'}=11.8$ Hz, $J_{56}=4.0$ Hz, HH'-C(6)), 3.65 (m, 1H, H-C(5)), 3.54 (dd, 1H, $J_{34}=J_{45}=9.2$ Hz, H-C(4)), 3.51 (dd, 1H, $J_{12}=3.5$ Hz, $J_{23}=7.9$ Hz, H-C(2)), 3.38 (s, 3H, OCH_3)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, 300 K):

139.1, 138.5 (Benzyl C-1), 128.9-128.1 (C-Aromaten), 98.6 (C-(1)), 82.4 (C-(3)), 80.4 (C-(2)), 77.8 (C-(4)), 76.2, 75.5, 73.9 ($\underline{C}H_2Ph$), 71.1 (C-(5)), 62.3 (C-(6)), 55.6 ($O\underline{C}H_3$)



60

Methyl 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl- α -D-glycopyranosid

Die Synthese erfolgt nach AAV 4 ausgehend von 6.98 g (15.0 mmol) Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-glycopyranosid **140**. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 6:1 bis 4:1) verbleibt Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl- α -D-glycopyranosid **61** als farbloses Öl.

Ausbeute: 6.82 g (13.1 mmol, 87 %).

R_f [H/EE (6:1)] = 0.38

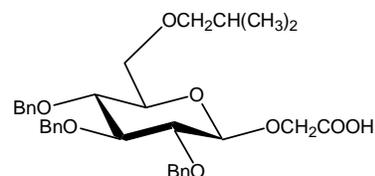
ESI-MS: 541.1 (1/2(2M+Ca²⁺)), 605.4 (M+HCOOH+K⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.38-7.27 (m, 15H, H-Aromaten), 4.99 (d, 1H, J=10.8 Hz, CHH'Ph), 4.90 (d, 1H, J=10.9 Hz, CHH'Ph), 4.84 (d, 1H, J=12.1 Hz, CHH'Ph), 4.81 (d, 1H, J=12.8 Hz, CHH'Ph), 4.64 (d, 1H, H-C(1)), 4.62 (d, 2H, J=10.2 Hz, CHH'Ph), 4.00 (dd, 1H, J₂₃=J₃₄=9.3 Hz, H-C(3)), 3.74-3.60 (m, 3H, H-C(5), HH'-C(6)), H-C(4), HH'-C(6)), 3.56 (dd, 1H, J₁₂=3.5 Hz, J₂₃=9.6 Hz, H-C(2)), 3.39 (s, 3H, OCH₃), 3.33 (dd, 1H, J_{HH'}=8.9 Hz, ³J=6.2 Hz, OCHH'CH(CH₃)₂), 3.11 (dd, 1H, J_{HH'}=8.7 Hz, ³J=5.5 Hz, OCHH'CH(CH₃)₂), 1.91 (m, 1H, OCH₂CH(CH₃)₂), 0.93 (d, 3H, OCH₂CH(CH₃)₂), 0.89 (d, 3H, OCH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K):

139.2, 138.9, 138.6 (Benzyl C-1), 128.6-128.0 (C-Aromaten), 98.6 (C-(1)), 82.6 (C-(3)), 80.3 (C-(2)), 79.0 (OCH₂CH(CH₃)₂), 78.2 (C-(4)), 76.2, 75.5, 73.8 (CH₂Ph), 70.5 (C-(5)), 69.8 (C-(6)), 55.5 (OCH₃), 28.8 (OCH₂CH(CH₃)₂), 20.0 (OCH₂CH(CH₃)₂), 19.7 (OCH₂CH(CH₃)₂)



61

[Carboxymethyl]-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl- β -D-glycopyranosid

Die Synthese erfolgt nach AAV 6 ausgehend von 1.98 g (3.81 mmol) Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl- α -D-glycopyranosid **60**. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie

an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1) erhält man 670 mg 2,3,4-Tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl- α -D-glycopyranosylchlorid als farbloses Öl.

670 mg (1.28 mmol) 2,3,4-Tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl- α -D-glycopyranosylchlorid werden gemäß AAV 7 umgesetzt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 8:1) gereinigt. Es verbleiben 290 mg [Carboxyethylmethyl]-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl- β -D-glycopyranosid als farbloses Öl.

290 mg (0.490 mmol) [Carboxyethylmethyl]-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl- α -D-glycopyranosid werden gemäß AAV 10 umgesetzt und das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Es verbleiben 236 mg [Carboxymethyl]-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl- β -D-glycopyranosid als weißer Feststoff.

Ausbeute: 236 mg (0.419 mmol, 11% über 3 Stufen)

R_f [H/EE (2:1) + 1 Vol.% AcOH] = 0.36

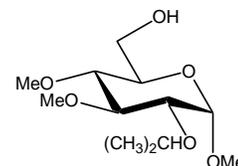
ESI-MS: 587.4 (M+Na⁺), 1167.4 (2M+K⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.35-7.27 (m, 15H, H-Aromaten), 4.90 (d, 1H, J=11.3 Hz, CHH'Ph), 4.88 (d, 1H, J=8.4 Hz, CHH'Ph), 4.85 (d, 1H, J=10.9 Hz, CHH'Ph), 4.84 (d, 1H, J=11.0 Hz, CHH'Ph), 4.81 (d, 1H, J=11.1 Hz, CHH'Ph), 4.64 (d, 1H, J=10.9 Hz, CHH'Ph), 4.47 (d, 1H, J₁₂=7.7 Hz, H-C(1)), 4.43 (d, 1H, J=6.9 Hz, OCHH'COOH), 4.32 (d, 1H, J=6.9 Hz, OCHH'COOH), 3.69-3.65 (m, 4H, H-C(3), H-C(5), HH'-C(6)), 3.55 (m, 1H, H-C(2)), 3.49 (m, 1H, H-C(4)), 3.29 (dd, 1H, ³J=7.1 Hz, J_{HH'}=9.0 Hz, OCHH'CH(CH₃)₂), 3.16 (dd, 1H, ³J=6.3 Hz, J_{HH'}=9.1 Hz, OCHH'CH(CH₃)₂), 1.89 (m, 1H, OCH₂CH(CH₃)₂), 0.94 (d, 3H, J=6.7 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂), 0.92 (d, 3H, J=6.8 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K):

171.1 (CH₂COOH), 138.7, 138.4, 138.2 (Benzyl C-1), 129.1-128.2 (C-Aromaten), 104.5 (C(1)), 84.8 (C(3)), 81.9 (C(2)), 79.1 (OCH₂CH(CH₃)₂), 77.9 (C(5)), 76.1 (C(4)), 75.6 (C(6)), 69.5 (CH₂COOH), 28.8 (OCH₂CH(CH₃)₂), 19.8 (OCH₂CH(CH₃)₂), 19.7 (OCH₂CH(CH₃)₂)

**141****Methyl-2-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid**

4.00 g (8.62 mmol) Methyl-3,4-di-*O*-methyl-6-*O*-trityl- α -D-glycopyranosid **49** werden gemäß AAV 4 mit Isopropylmesylat als Alkylierungsmittel umgesetzt.

Die Reinigung des gelblichen Sirups erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1 bis 1:2). Nach Abziehen des LM verbleibt Methyl-2-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl-6-*O*-trityl- α -D-glycopyranosid als weißer Schaum.

Das erhaltene Zwischenprodukt wird gemäß AAV 3 weiter umgesetzt. Das gelbliche, ölige Rohprodukt wird in wenig Methanol aufgenommen und mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 1.5:1 bis 1:1.5) gereinigt. Nach Abziehen des LM verbleibt Methyl-2-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **141** als farbloses Öl.

Ausbeute: 776 mg (2.94 mmol, 34 % über zwei Stufen).

R_f [H/EE (1:2)] = 0.39

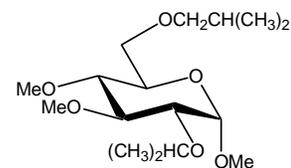
ESI-MS: 287.3 ($M+Na^+$), 284.5 ($1/2(2M+Ca^{2+})$)

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, 300 K):

4.66 (d, 1H, $J_{12}=3.6$ Hz, H-C(1)), 3.82 (dd, 1H, $J_{HH'}=11.7$ Hz, $J_{56}=3.0$ Hz, HH'-C(6)), 3.78 (m, 1H, $J=6.1$ Hz, $OCH(CH_3)_2$), 3.73 (dd, 1H, $J_{HH'}=11.7$ Hz, $J_{56}=4.2$ Hz, HH'-C(6)), 3.64 (s, 3H, OCH_3), 3.56 (s, 3H, OCH_3), 3.54 (m, 1H, H-C(5)), 3.51 (dd, 1H, $J_{23}=9.3$ Hz, $J_{34}=9.2$ Hz, H-C(3)), 3.39 (s, 3H, OCH_3), 3.29 (dd, 1H, $J_{12}=3.6$ Hz, $J_{23}=9.6$ Hz, H-C(2)), 3.14 (dd, 1H, $J_{34}=9.4$ Hz, $J_{45}=9.1$ Hz, H-C(4)), 1.24 (d, 3H, $J=6.1$ Hz, $OCH(CH_3)_2$), 1.18 (d, 3H, $^3J=6.1$ Hz, $OCH(CH_3)_2$)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, 300 K):

99.5 (C-(1)), 83.7 (C-(3)), 80.2 (C-(4)), 79.2 (C-(2)), 73.6 ($OCH(CH_3)_2$), 70.9 (C-(5)), 62.5 (C-(6)), 61.5, 60.9, 55.6 (OCH_3), 23.4 ($OCH(CH_3)_2$), 23.1 ($OCH(CH_3)_2$)



62

Methyl-2-*O*-isopropyl-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid

746 mg (2.82 mmol) Methyl-2-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **141** werden nach AAV 4 mit Isobutylmesylat als Alkylierungsmittel umgesetzt. Die Reinigung des zähflüssigen, bräunlichen Rohprodukts erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 3:1). Nach Abziehen des LM verbleibt Methyl-6-*O*-isobutyl-2-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **62** als farbloses Öl.

Ausbeute: 721 mg (2.25 mmol, 80 %).

R_f [H/EE (2:1)] = 0.57

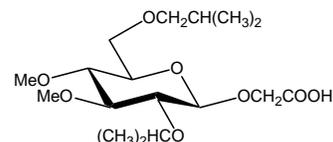
ESI-MS: 343.4 ($M+Na^+$), 340.7 ($1/2(2M+Ca^{2+})$)

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, 300 K):

4.69 (d, 1H, $J_{12}=3.6$ Hz, H-C(1)), 3.76 (m, 1H, $^3J=6.1$ Hz, OCH(CH₃)₂), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 3.61-3.56 (m, 3H, H-C(5), H₂-C(6)), 3.54 (s, 3H, OCH₃), 3.46 (dd, 1H, $J_{23}=J_{34}=9.3$ Hz, H-C(3)), 3.38 (s, 3H, OCH₃), 3.35 (dd, 1H, $J_{12}=3.6$ Hz, $J_{23}=9.4$ Hz, H-C(2)), 3.24 (dd, 1H, $J_{34}=J_{45}=9.3$ Hz, H-C(4)), 3.15 (dd, 2H, OCH₂CH(CH₃)₂), 1.92 (m, 1H, OCH₂CH(CH₃)₂), 1.22 (d, 3H, OCH(CH₃)₂), 1.17 (d, 3H, OCH(CH₃)₂), 0.93 (d, 3H, OCH₂CH(CH₃)₂), 0.89 (d, 3H, OCH₂CH(CH₃)₂)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, 300 K):

99.4 (C-(1)), 84.0 (C-(3)), 79.9 (C-(4)), 79.04 (C-(2)), 78.97 (OCH₂CH(CH₃)₂), 73.5 (OCH(CH₃)₂), 70.3 (C-(5)), 69.8 (C-(6)), 61.5 (OCH₃), 60.8 (OCH₃), 55.5 (OCH₃), 28.8 (OCH₂CH(CH₃)₂), 22.7, 22.4 (CH(CH₃)₂), 19.9, 19.7 (OCH₂CH(CH₃)₂)



64

[Carboxymethyl]-2-*O*-isopropyl-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid

400 mg (1.24 mmol) Methyl-6-*O*-isobutyl-2-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **62** werden nach AAV 6 umgesetzt. Allerdings wird die HCl gesättigte Lösung über Nacht bei RT aufbewahrt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1) erhält man 260 mg (0.80 mmol, 64 %) 6-*O*-isobutyl-2-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosylchlorid als farbloses Öl.

230 mg (0.71 mmol) 6-*O*-isobutyl-2-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosylchlorid werden gemäß AAV 7 umgesetzt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1) gereinigt. Es verbleiben 152 mg (0.74 mmol, 56 %) [Carboxyethylmethyl]-6-*O*-isobutyl-2-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid als farbloses Öl.

100 mg (0.42 mmol) [Carboxyethylmethyl]-6-*O*-isobutyl-2-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid werden gemäß AAV 10 umgesetzt (quantitativ) und ein Teil des Rohprodukts mittels HPLC gereinigt. Es verbleibt [Carboxylmethyl]-6-*O*-isobutyl-2-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid **64** als farbloses Öl.

R_f [H/EE (3:1) + 2 Vol.% AcOH] = 0.57

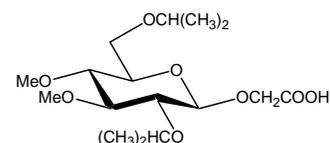
ESI-MS: 387.2 [M+Na]⁺, 389.3 [M+K]⁺

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz, 300 K):

4.38 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CO}_2\text{H}$), 4.26 (d, 1H, $J_{12}=7.5$ Hz, H-C(1)), 4.08 (m, 1H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}(\text{CH}_3)_2$), 3.69-3.49 (m, 2H, H₂-C(6)), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 3.55 (s, 3H, OCH₃), 3.39-3.09 (m, 6H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}$, H-C(2), H-C(3), H-C(4), H-C(5)), 1.20 (m, 6H, $\text{CH}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$)

¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz, 300K):

171.2 (COOH), 104.2 (C-(1)), 87.1 (C-(3)), 79.8 (C-(2)), 79.0 (C-(4)), 78.8 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 75.7 (C(5)), 74.3 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}(\text{CH}_3)_2$), 69.5 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CO}_2\text{H}$), 68.5 (C(6)), 61.6 (O $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 60.8 (O $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 28.7 ($\text{CH}_2\text{CH}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$), 22.8, 22.6 ($\text{CH}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$), 19.8, 19.6 ($\text{CH}_2\text{CH}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$)



65

[Carboxylmethyl]-2,6-di-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid

1.00 g (4.50 mmol) Methyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **48** werden nach AAV 4 umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 2:1 bis 1:1) erhält man Methyl-2,6-di-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **63** als farbloses Öl. Das erhaltene Zwischenprodukt wird gemäß AAV 6 umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 3:1 bis 1:1) erhält man 363 mg (26% über zwei Stufen) 2,6-Di-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosylchlorid als farbloses Öl.

500 mg (1.61 mmol) 2,6-Di-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosylchlorid werden gemäß AAV 7 umgesetzt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 9:2) gereinigt. Es verbleiben 280 mg (0.74 mmol, 64 %) [Carboxyethylmethyl]-2,6-di-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid als farbloses Öl.

180 mg (0.42 mmol) [Carboxyethylmethyl]-2,6-di-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid werden gemäß AAV 10 umgesetzt (quantitativ) und ein Teil des Rohprodukts mittels HPLC gereinigt. Es verbleibt [Carboxylmethyl]-2-*O*-benzyl-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid **65** als farbloses Öl.

R_f [H/EE (1:2) + 2 Vol.% AcOH] = 0.48

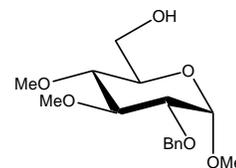
ESI-MS: 373.2 [M+Na]⁺, 389.3 [M+K]⁺.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz, 300 K):

4.38 (d, 1H, J=17.1 Hz, CHH'CO₂H), 4.29 (d, 1H, J=17.1 Hz, CHH''CO₂H), 4.26 (d, 1H, J₁₂=7.5 Hz, H-C(1)), 4.08 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.70-3.49 (m, 2H, H-C(6), CH(CH₃)₂), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 3.55 (s, 3H, OCH₃), 3.37-3.12 (m, 4H, H-C(2), H-C(3), H-C(4), H-C(5)), 1.20 (m, 6H, CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz, 300K):

171.2 (COOH), 104.4 (C-(1)), 87.1 (C (3)), 79.9 (C-(2)), 78.8 (C-(4)), 75.6 (C(5)), 74.3 (CH(CH₃)₂), 72.8 (CH(CH₃)₂), 68.8 (CH₂CO₂H), 68.8 (C(6)), 61.6 (OCH₃), 60.9 (OCH₃), 22.8, 22.7, 22.4, 22.2 (CH(CH₃)₂)



142

Methyl-2-*O*-benzyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid

Die Synthese erfolgt nach AAV 5 ausgehend von 4.64 g (10.0 mmol) Methyl-3,4-di-*O*-methyl-6-*O*-trityl- α -D-glycopyranosid **49**.

Die Reinigung des öligen, gelblichen Rohprodukts erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 7:1 bis 2:1). Nach Abziehen des LM verbleibt Methyl-2-*O*-benzyl-3,4-di-*O*-methyl-6-*O*-trityl-1- α -D-glycopyranosid als weißer Schaum.

Das erhaltene Zwischenprodukt wird gemäß AAV 2 umgesetzt. Die Reinigung des öligen, gelblichen Rohprodukts erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 1:1 bis 1:2). Nach Abziehen des LM verbleibt Methyl-2-*O*-benzyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid als weißer Feststoff.

Ausbeute: 4.37 g (8.4 mmol, 84 % über zwei Stufen).

R_f [H/EE (1:2)] = 0.53

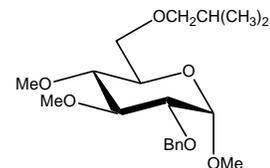
ESI-MS: 335.3 (M+Na⁺), 352.4 (M+K⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.35-7.26 (m, 5H, H-Aromaten), 4.80 (d, 1H, J=12.2 Hz, CHH'Ph), 4.65 (d, 1H, J=12.2 Hz, CHH'Ph), 4.54 (d, 1H, J₁₂=3.4 Hz, H-C(1)), 3.80 (dd, 1H, J_{66'}=11.6 Hz, J₅₆<1 Hz, H-C(6)), 3.70 (dd, 1H, J_{66'}=11.6 Hz, J₅₆=3.9 Hz, H'-C(6)), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.62-3.53 (m, 2H, H-C(5), H-C(3)), 3.57 (s, 3H, OCH₃), 3.36 (m, 1H, H-C(2)), 3.39 (s, 3H, OCH₃), 3.14 (dd, J₁₂=J₂₃=9.5 Hz, H-C(2))

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

138.7 (Benzyl C-1), 128.8, 128.4, 128.3 (C-Aromaten), 98.6 (C-(1)), 83.9 (C-(3)), 80.2 (C-(4)), 80.0 (C-(4)), 73.8 (CH₂Ph), 70.9 (C-(5)), 62.4 (C-(6)), 61.4 (OCH₃), 60.9 (OCH₃), 55.6 (OCH₃)

**66****Methyl-2-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid**

4 g (12.8 mmol) Methyl-2-*O*-benzyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **142** werden nach AAV 4 mit Isobutylmesylat als Alkylierungsmittel umgesetzt. Die Reinigung des öligen, gelblichen Rohprodukts erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 6:1 bis 3:1). Nach Abziehen des LM verbleibt Methyl-2-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **66** als farbloses Öl.

Ausbeute: 3.73 g (10.1 mmol, 79 %).

R_f [H/EE (3:1)] = 0.60

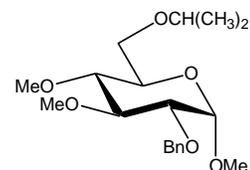
ESI-MS: 391.3 (M+Na⁺), 388.7 (1/2(2M+Ca²⁺))

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.37-7.27 (m, 5H, H-Aromaten), 4.79 (d, 1H, J=12.2 Hz, CHH'Ph), 4.63 (d, 1H, J=12.2 Hz, CHH'Ph), 4.57 (d, 1H, J₁₂=3.6 Hz, H-C(1)), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 3.60-3.54 (m, 7H, H-C(3), H-C(5), H₂-C(6), OCH₃), 3.39 (dd, 1H, J₁₂=3.6 Hz, J₂₃=9.5 Hz, H-C(2)), 3.35 (s, 3H, OCH₃), 3.32 (dd, 1H, J_{HH}'=9.1 Hz, ³J_{HH}'=6.2 Hz, CH₂CH(CH₃)₂), 3.21 (dd, 1H, J₃₄=J₄₅=9.2 Hz, H-C(4)), 3.12 (dd, 1H, J_{HH}'=9.1 Hz, ³J_{HH}'=7.6 Hz CH₂CH(CH₃)₂), 1.91 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂) 0.92 (d, 3H, J=6.6 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂), 0.88 (d, 3H, J=6.6 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

138.8 (Benzyl C-1), 128.8, 128.4, 127.2 (C-Aromaten), 98.6 (C-(1)), 84.2 (C-(3)), 79.9 (C(4)), 79.9 (C-(4)), 79.0 (CH₂CH(CH₃)₂), 73.7 (CH₂Ph), 70.4 (C(5)), 69.8 (C-(6)), 61.5 (OCH₃), 60.8 (OCH₃), 55.5 (OCH₃), 28.8 (CH₂CH(CH₃)₂), 20.1 (CH₂CH(CH₃)₂), 19.8 (CH₂CH(CH₃)₂)



67**Methyl-2-*O*-benzyl-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid**

1 g (3.2 mmol) Methyl-2-*O*-benzyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **142** werden nach AAV 4 mit Isopropylmesylat als Alkylierungsmittel umgesetzt. Die Reinigung des öligen, gelblichen Rohprodukts erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 6:1 bis 2:1). Nach Abziehen des LM verbleibt Methyl-2-*O*-benzyl-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **67** als farbloses Öl.

Ausbeute: 1.08 g (3.1 mmol, 95 %).

R_f [H/EE (3:1)] = 0.38

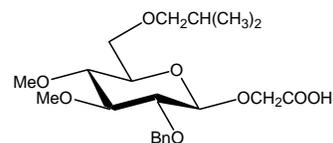
ESI-MS: 377.3 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.37-7.27 (m, 5H, H-Aromaten), 4.80 (d, 1H, J=12.2 Hz, CHH'Ph), 4.63 (d, 1H, J=12.2 Hz, CHH''Ph), 4.57 (d, 1H, J₁₂=3.6 Hz, H-C(1)), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.65-3.55 (m, 8H, H-C(3), H-C(5), H₂-C(6), OCH(CH₃)₂, OCH₃), 3.40 (dd, 1H, J₁₂=3.6 Hz, J₂₃=9.6 Hz, H-C(2)), 3.35 (s, 3H, OCH₃), 3.24 (dd, 1H, J₃₄=J₄₅=9.0 Hz, H-C(4)), 1.18 (d, 3H, J=6.5 Hz, OCH(CH₃)₂), 1.17 (d, 3H, J=6.5 Hz, OCH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

138.8 (Benzyl C-1), 128.8, 128.4, 128.2 (C-Aromaten), 98.6 (C(1)), 84.3 (C-(3)), 79.8 (C-(2)), 79.7 (C-(4)), 73.7 (CH₂Ph), 72.8 (CH(CH₃)₂), 70.4 (C-(5)), 66.9 (C-(6)), 61.4 (OCH₃), 60.8 (OCH₃), 55.5 (OCH₃), 22.6, 22.2 (CH(CH₃)₂)

**68****[Carboxymethyl]-2-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid**

700 mg (1.90 mmol) Methyl-6-*O*-isobutyl-2-*O*-benzyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **66** werden nach AAV 6 umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-

Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1) erhält man 250 mg (0.67 mmol, 35 % Ausbeute) 2-*O*-Benzyl-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosylchlorid als farbloses Öl.

220 mg (0.62 mmol) 2-*O*-Benzyl-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosylchlorid werden gemäß AAV 7 umgesetzt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1) gereinigt. Es verbleiben 160 mg (0.36 mmol, 59 %) [Carboxyethylmethyl]-6-*O*-isobutyl-2-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid als farbloses Öl.

90 mg (0.20 mmol) [Carboxyethylmethyl]-2-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid werden gemäß AAV 10 umgesetzt und ein Teil des Rohprodukts mittels HPLC gereinigt. Es verbleibt [Carboxymethyl]-2-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid **68** als farbloses Öl.

R_f [H/EE (3:1) + 2 Vol.% AcOH] = 0.32

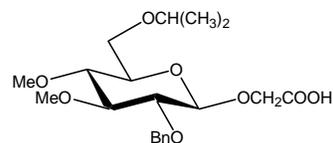
ESI-MS: 435.4 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.35-7.25 (m, 5H, H-Aromaten), 4.88 (d, J=11.1 Hz, CHH'Ph), 4.78 (d, 1H, J=11.1 Hz, CHH'Ph), 4.40 (d, 1H, J₁₂=7.8 Hz, H-C(1)), 4.38 (d, 1H, J=16.9 Hz, CHH'CO₂H), 4.31 (d, 1H, J=16.9 Hz, CHH'CO₂H), 3.70-3.64 (m, 1H, H-C(6)), 3.65 ((s, 3H, OCH₃), 3.60 (dd, 1H, J_{66'}=9.1 Hz, J₅₆=4.5 Hz), 3.55 (s, 3H, OCH₃), 3.40-3.23 (m, 5H, H-C(2), H-C(3), H-C(4), H-C(5), CHH'CH(CH₃)₂), 3.18 (dd, 1H, J_{HH'}=9.1 Hz, ³J=7.1 Hz), 1.91 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂) 0.91 (d, 3H, J=6.1 Hz, CH(CH₃)₂), 0.89 (d, 3H, J=6.1 Hz, CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

171.8 (COOH), 138.2 (Benzyl C-1), 128.8, 128.6, 128.3 (C-Aromaten), 104.1 (C-(1)), 86.7 (C(3)), 81.5 (C-(2)), 79.7 (C-(4)), 79.0 (CH₂CH(CH₃)₂), 75.5 (C(5)), 75.3 (CH₂Ph), 69.6 (C(6)), 67.9 (CH₂CO₂H), 61.5 (OCH₃), 60.9 (OCH₃), 28.7 (CH₂CH(CH₃)₂), 19.8, 19.6 (CH₂CH(CH₃)₂)



[Carboxylmethyl]-2-*O*-benzyl-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid

1.4 g (3.95 mmol) Methyl-6-*O*-isopropyl-2-*O*-benzyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **67** werden nach AAV 6 umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1 bis 3:1) erhält man 360 mg (1 mmol, 26 % Ausbeute) 2-*O*-Benzyl-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosylchlorid als farbloses Öl.

185 mg (0.51 mmol) 2-*O*-Benzyl-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosylchlorid werden gemäß AAV 7 umgesetzt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 4:1) gereinigt. Es verbleiben 190 mg (0.37 mmol, 73 %) [Carboxyethylmethyl]-2-*O*-benzyl-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid als farbloses Öl.

115 mg (0.27 mmol) [Carboxyethylmethyl]-2-*O*-benzyl-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid werden gemäß AAV 10 umgesetzt und ein Teil des Rohprodukts mittels HPLC gereinigt. Es verbleibt [Carboxylmethyl]-2-*O*-benzyl-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid **69** als farbloses Öl.

R_f [H/EE (3:1) + 2 Vol.% AcOH] = 0.47

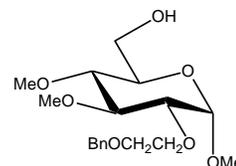
ESI-MS: 421.3 (M+Na⁺), 835.3 (2M+K⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.38-7.26 (m, 5H, H-Aromaten), 4.88 (d, J=11.1 Hz, CHH'Ph), 4.78 (d, 1H, J=11.1 Hz, CHH'Ph), 4.41 (d, 1H, J_{1,2}=7.7 Hz, H-C-(1)), 4.39 (d, 1H, J=16.8 Hz, CHH'CO₂H), 4.30 (d, 1H, J=16.8 Hz, CHH'CO₂H), 3.71 (dd, 1H, J_{HH'}=10.5 Hz, J₅₆=1.9 Hz, H-C(6)), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 3.65-3.61 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.56 (m, 1H, H-C(6)), 3.55 (s, 3H, OCH₃), 3.39-3.36 (m, 2H, H-C(2), H-C(5)), 3.29 (dd, 1H, J₂₃=J₃₄=11.8 Hz, H-C(3)), 3.23 (dd, 1H, J₃₄=J₄₅=11.8 Hz, H-C(4)), 1.18 (d, 3H, J=6.1 Hz, CH(CH₃)₂), 1.18 (d, 3H, J=6.1 Hz, CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

171.6 (COOH), 138.6 (Benzyl C-1), 129.3, 128.8, 128.2 (C-Aromaten), 104.3 (C-(1)), 86.7 (C(3)), 81.5 (C-(2)), 79.9 (C-(4)), 75.5 (C(5)), 75.4 (CH₂Ph), 72.8 (CH(CH₃)₂), 68.1 (CH₂CO₂H), 67.1 (C(6)), 61.5 (OCH₃), 60.9 (OCH₃), 22.3 (CH(CH₃)₂), 22.2 (CH(CH₃)₂)

**143****Methyl-2-O-[2-hydroxyethyl]-3,4-di-O-methyl- α -D-glycopyranosid**

4.5 g (9.7 mmol) Methyl-3,4-di-O-methyl-6-O-trityl- α -D-glycopyranosid **49** werden nach AAV 4 mit Bromethyl-2-benzylether als Alkylierungsmittel umgesetzt. Nach Reinigung des gelblichen Sirups mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 7:1 bis 1:1) verbleibt Methyl-2-O-[2-benzyloxyethyl]-3,4-di-O-methyl-6-O-trityl- α -D-glycopyranosid als weißer Schaum.

Das erhaltene Zwischenprodukt wird gemäß AAV 3 weiter umgesetzt. Das gelbliche, ölige Rohprodukt wird mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 3:2 bis 1:8) gereinigt. Nach Abziehen des LM verbleibt Methyl 2-O-[2-benzyloxyethyl]-3,4-di-O-methyl- α -D-glycopyranosid **143** als farbloser Feststoff.

Ausbeute: 2.75 g (7.72 mmol, 80 % über zwei Stufen).

R_f [H/EE (1:2)] = 0.25

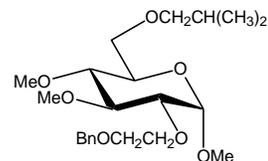
ESI-MS: 379.3 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.32-7.25 (m, 5H, H-Aromaten), 4.76 (d, 1H, $J_{12}=3.4$ Hz, H-C(1)), 4.55 (d, 1H, $J=12$ Hz, CHH'Ph), 4.54 (d, 1H, $J=12$ Hz, CHH''Ph), 3.84-3.78 (m, 3H, OCH₂CHH'OBn, H-C(6)), 3.71-3.62 (m, 3H, OCH₂CH₂OBn, H'-C(6)), 3.60 (s, 3H, OCH₃), 3.54 (s, 3H, OCH₃), 3.55-3.49 (m, 2H, H-C(3), H-C(5)), 3.36 (s, 3H, OCH₃), 3.33 (dd, 1H, $J_{12}=3.4$ Hz, $J_{23}=9.9$ Hz, H-C(2)), 3.11 (dd, 1H, $J_{34}=J_{45}=9.9$ Hz, H-C(4))

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

138.7 (Benzyl C-1), 128.8, 128.1, 128.0 (C-Aromaten), 98.5 (C-(1)), 83.8 (C(3)), 81.6 (C-(2)), 80.1 (C-(4)), 73.6 (CH₂Ph), 71.3 (CH₂CH₂OBn), 70.9 (C-(5)), 70.3 (CH₂CH₂OBn), 62.4 (C-(6)), 61.3 (OCH₃), 60.9 (OCH₃), 55.4 (OCH₃)

**70****Methyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-3,4-di-*O*-methyl-6-*O*-isobutyl- α -D-glycopyranosid**

910 mg (2.6 mmol) Methyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid werden **143** nach AAV 4 mit Isobutylmesylat als Alkylierungsmittel umgesetzt. Die Reinigung des öligen, gelblichen Rohprodukts erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 3:1). Nach Abziehen des LM verbleibt Methyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **70** als farbloses Öl.

Ausbeute: 990 mg (2.4 mmol, 94 %).

R_f [H/EE (2:1)] = 0.57

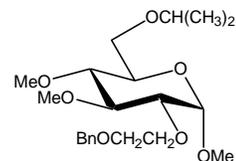
ESI-MS: 435.3 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.37-7.25 (m, 5H, H-Aromaten), 4.83 (d, 1H, $J_{12}=3.6$ Hz, H-C-(1)), 4.60 (d, 1H, $J=12$ Hz, CHH'Ph), 4.56 (d, 1H, $J=12$ Hz, CHH'Ph), 3.84 (m, 3H, OCH₂CHH'OBn), 3.66 (m, 1H, OCH₂CHH'OBn), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 3.61 (m, 1H, H-C-(6), H-C(5)), 3.57 (m, 1H, H'-C-(6)), 3.55 (s, 3H, OCH₃), 3.53 (dd, 1H, $J_{34}=J_{32}=9.1$ Hz, H-C-(3)), 3.40 (m, 1H, H-C-(2)), 3.39 (s, 3H, OCH₃), 3.35 (m, 1H, OCHH'CH(CH₃)₂), 3.24 (dd, 1H, $J_{34}=J_{45}=9.3$ Hz, H-C-(4)), 3.15 (dd, 1H, $J_{\text{HCH}}=7.3$ Hz, $J_{\text{HH}'}=8.9$ Hz, -OCHH'CH(CH₃)₂), 1.94 (m, 1H, -OCH₂CH(CH₃)₂), 0.95 (d, 3H, $J=6.7$ Hz, -OCH₂CH(CH₃)₂), 0.92 (d, 3H, $J=6.7$ Hz, -OCH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

138.7 (Benzyl C-1), 128.7, 128.1, 127.9 (C-Aromaten), 98.4 (C-(1)), 84.0 (C-(3)), 81.5 (C-(2)), 79.9 (C-(4)), 79.0 (CH₂CH(CH₃)₂), 73.6 (CH₂Ph), 71.2 (CH₂CH₂OBn), 70.4 (C-(5)), 70.1 (CH₂CH₂OBn), 69.9 (C-(6)), 61.3 (OCH₃), 60.8 (OCH₃), 55.4 (OCH₃), 28.8 (CH₂CH(CH₃)₂), 19.9, 19.7 (CH₂CH(CH₃)₂)

**71****Methyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-3,4-di-*O*-methyl-6-*O*-isopropyl- α -D-glycopyranosid**

1.4 g (3.9 mmol) Methyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **143** werden nach AAV 4 mit Isopropylmesylat als Alkylierungsmittel umgesetzt. Die Reinigung des öligen, gelblichen Rohprodukts erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 3:1). Nach Abziehen des LM verbleibt Methyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **71** als farbloses Öl.
Ausbeute: 990 mg (2.4 mmol, 94 %).

R_f [H/EE (1:1)] = 0.62

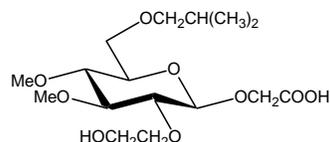
ESI-MS: 421.4 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.31-7.24 (m, 5H, H-Aromaten), 4.78 (d, 1H, $J_{12}=3.5$ Hz, H-C(1)), 4.55 (d, 1H, $J=12$ Hz, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}\text{'Ph}$), 4.52 (d, 1H, $J=12$ Hz, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}\text{'Ph}$), 3.84-3.77 (m, 2H, $\underline{\text{O}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{OBn}$), 3.66-3.61 (m, 7H, $\underline{\text{O}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{OBn}$, H-C(3), H-C(5), H₂-C(6), $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}(\text{CH}_3)_2$), 3.62 (s, 3H, $\underline{\text{O}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 3.54 (s, 3H, $\underline{\text{O}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 3.37 (s, 3H, $\underline{\text{O}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 3.39-3.36 (m, 1H, H-C(2)), 3.24 (dd, 1H, $J_{34}=J_{45}=9.3$ Hz, H-C(4)), 1.18 (d, 6H, $J=6.1$ Hz, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

138.7 (Benzyl C-1), 128.3, 127.7, 127.5 (C-Aromaten), 98.1 (C-(1)), 83.7 (C-(3)), 81.2 (C-(2)), 79.5 (C-(4)), 73.2 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$), 72.3 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}(\text{CH}_3)_2$), 70.8 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{OBn}$), 70.3 (C-(5)), 69.8 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{OBn}$), 66.8 (C-(6)), 60.8 ($\underline{\text{O}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 60.3 ($\underline{\text{O}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 55.0 ($\underline{\text{O}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 22.1 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$), 21.9 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}(\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3)_2$).



72

[Carboxymethyl]-6-*O*-isobutyl-2-*O*-[2-hydroxyethyl]-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid

910 mg (2.21 mmol) Methyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **70** werden nach AAV 6 umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1) erhält man 360 mg (0.86 mmol, 40 % Ausbeute) 2-*O*-[2-Benzyloxyethyl]-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosylchlorid als farbloses Öl.

250 mg (0.60 mmol) 2-*O*-[2-Benzyloxyethyl]-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosylchlorid werden gemäß AAV 7 umgesetzt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 4:1) gereinigt. Es verbleiben 146 mg (0.36 mmol, 52 %) [Carboxyethylmethyl]-6-*O*-isobutyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid als farbloses Öl.

130 mg (0.27 mmol) [Carboxyethylmethyl]-2-*O*-[2-hydroxyethyl]-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid werden gemäß AAV 10 umgesetzt (quantitativ) und ein Teil des Rohprodukts mittels HPLC gereinigt. Es verbleibt [Carboxymethyl]-2-*O*-benzyl-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid als farbloses Öl.

35 mg (0.072 mmol) [Carboxymethyl]-2-*O*-[2-hydroxyethyl]-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid werden nach AAV 1 hydriert und das erhaltene Rohprodukt anschließend mittels HPLC gereinigt. Es verbleibt [Carboxymethyl]-2-*O*-[2-hydroxyethyl]-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid **72** als farbloses Öl.

R_f [CHCl₃:MeOH (6:1)] = 0.11

ESI-MS: 389.3 (M+Na⁺)

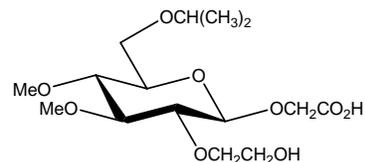
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

4.35 (d, J=17.1 Hz, OCHH'CO₂H), 4.34 (d, 1H, J₁₂=8.7 Hz, H-C(1)), 4.32 (d, 1H, J=17.1 Hz, OCHH'CO₂H), 3.94 (m, 1H, CH₂CH₂OH), 3.87 (m, 1H, CH₂CH₂OH), 3.81 (m, 1H, CH₂CH₂OH), 3.73 (m, 1H, CH₂CH₂OH), 3.70-3.66 (m, 1H, H-C(6)), 3.66 (s, 3H, OCH₃),

3.62 (dd, 1H, $J_{66'}=10.9$ Hz, $J_{56}=4.7$ Hz), 3.54 (s, 3H, OCH₃), 3.35-3.30 (m, 2H, CH₂CH(CH₃)₂, H-C(5)), 3.27-3.18 (m, 4H, H-C(2), H-C(3), H-C(4), CH₂CH(CH₃)₂), 1.90 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 0.92 (d, 3H, $J=6.5$ Hz, CH₂CH(CH₃)₂), 0.90 (d, 3H, $J=6.5$ Hz, CH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

172.1 (COOH) 102.8 (C-(1)), 87.0 (C-(3)), 81.9 (C-(2)), 79.9 (C-(4)), 79.1 (CH₂CH(CH₃)₂), 75.3 (C-(5)), 74.3 (CH₂CH₂OH), 69.8 (C-(6)), 66.2 (CH₂CO₂H), 62.2 (CH₂CH₂OH), 61.5 (OCH₃), 60.9 (OCH₃), 28.7 (CH₂CH(CH₃)₂), 19.8, 19.6 (CH₂CH(CH₃)₂).



73

[Carboxymethyl]-2-*O*-(2-hydroxyethyl)-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl-β-*D*-glycopyranosid

724 mg (1.81 mmol) Methyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl-α-*D*-glycopyranosid **71** werden nach AAV 6 umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1) erhält man 262 mg (0.65 mmol, 36 % Ausbeute) 6-*O*-isopropyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-3,4-di-*O*-methyl-α-*D*-glycopyranosylchlorid als farbloses Öl.

170 mg (0.42 mmol) 2-*O*-[2-Benzyloxyethyl]-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl-α-*D*-glycopyranosylchlorid werden gemäß AAV 7 umgesetzt und das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 4:1) gereinigt. Es verbleiben 115 mg (0.25 mmol, 59 %) [Carboxyethylmethyl]-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl-β-*D*-glycopyranosid als farbloses Öl.

70 mg (0.15 mmol) [Carboxyethylmethyl]-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl-β-*D*-glycopyranosid werden gemäß AAV 10 umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 1:1, 1% AcOH) gereinigt. Es verbleibt [Carboxymethyl]-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl-β-*D*-glycopyranosid als farbloses Öl.

35 mg (0.08 mmol) [Carboxymethyl]-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl-β-*D*-glycopyranosid werden nach AAV 1 hydriert und das erhaltene Rohprodukt

anschließend mittels HPLC gereinigt. Es verbleibt [Carboxylmethyl]-2-*O*-[2-hydroxyethyl]-6-*O*-isopropyl-3,4-di-*O*-methyl- β -D-glycopyranosid **73** als farbloses Öl (quantitativ). Ein Teil des erhaltenen Rohprodukts wird schließlich mittels HPLC gereinigt.

$$R_f [\text{CHCl}_3:\text{MeOH}] = 6:1 = 0.10$$

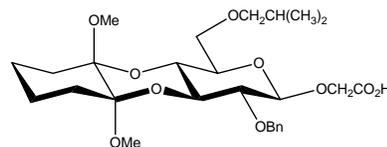
ESI-MS: 375.3 [M+Na]⁺

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

4.34 (d, J=17.1 Hz, OCHH'CO₂H), 4.32 (d, 1H, J₁₂=8.7 Hz, H-C(1)), 4.32 (d, 1H, J=17.1 Hz, OCHH'CO₂H), 3.92 (m, 1H, CH₂CH₂OH), 3.86 (m, 1H, CH₂CH₂OH), 3.80 (m, 1H, CH₂CH₂OH), 3.73 (m, 1H, CH₂CH₂OH), 3.70-3.65 (m, 2H, CH(CH₃)₂, H-C(6)), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 3.62 (dd, 1H, J_{66'}=10.9 Hz, J₅₆=4.7 Hz, H-C(6)), 3.54 (s, 3H, OCH₃), 3.35-3.30 (m, 1H, H-C(5)), 3.27-3.18 (m, 3H, H-C(2), H-C(3), H-C(4)), 1.18 (m, 6H, CH(CH₃)₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

172.3 (COOH) 102.9 (C-(1)), 87.0 (C-(3)), 81.8 (C-(2)), 80.1 (C-(4)), 75.3 (C-(5)), 74.4 (CH₂CH₂OH), 72.9 (CH(CH₃)₂), 67.2 (C-(6)), 66.4 (CH₂CO₂H), 62.2 (CH₂CH₂OH), 61.4 (OCH₃), 60.7 (OCH₃), 22.4, 22.2 (CH(CH₃)₂).



76

[Carboxylmethyl]-2-*O*-benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-isobutyl- β -D-glycopyranosid

400 mg (0.72 mmol) Phenyl-2-*O*-benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-isobutyl-1-thio- β -D-glycopyranosid **59** werden nach AAV 9 umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung nach AAV 7 weiter umgesetzt und anschließend mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1) gereinigt. Der Ester wird abschließend nach AAV 10 hydrolysiert und mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel H/EE = 1:1, 1 Vol.% AcOH). Es verbleibt [Carboxylmethyl]-2-*O*-benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-isobutyl- β -D-Glycopyranosid **76** als weißer Feststoff. Ein Teil der erhaltenen Verbindung wird mittels HPLC gereinigt.

Ausbeute 147 mg (0.28 mmol, 39 %) über drei Stufen.

R_f [H/EE (1:1), 1 Vol.% AcOH] = 0.38

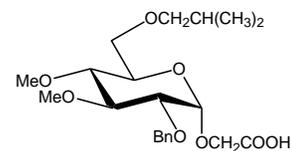
ESI-MS: 493.3 (M-OMe)⁺, 547.4 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.36-7.29 (m, 5H, H-Aromaten), 4.93 (d, 1H, J=11.2 Hz, CHH'Ph), 4.82 (d, 1H, J=11.2 Hz, CHH'Ph), 4.44 (d, 1H, J_{1,2}=11.4 Hz, H-C(1)), 4.39 (d, 1H, J=17.3 Hz, CHH'COOH), 4.32 (d, 1H, J=17.0 Hz, CHH'COOH), 3.99 (dd, 1H, J₂₃=J₃₄=10.0 Hz, H-C(3)), 3.88 (m, 1H, H-C(4)), 3.66-3.63 (m, 3H, H₂-C(5)), H-C(6)), 3.60 (dd, 1H, J₁₂=11.4 Hz J₂₃=10.0 Hz, H-C(2)), 3.25 (s, 3H, OCH₃), 3.23 (s, 3H, OCH₃), 3.26-3.22 (m, 2H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.86 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.77 (m, 4H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.57 (m, 2H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.43 (m, 1H, CH₂CH₂COMe), 0.89 (d, 6H, J=6.8 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

171.5 (COOH), 137.8, 128.9, 128.5, 128.4, (C-Aromaten), 104.6 (C-(1)), 99.0, 99.0 (OCH₃), , 79.2 (CH₂CH(CH₃)₂), 78.6 (C(2)), 75.5 (CH₂Ph), 74.6 (C(5)), 73.5 (C(3)), 68.9 (C(6)), 68.6 (CH₂COOH), 66.5 (C(4)), 47.4 (OCH₃), 47.3 (OCH₃), 28.7 (CH₂CH(CH₃)₂)), 27.5, 27.3 (CH₂CH₂COMe), 21.8, 21.7 (CH₂CH₂COMe), 19.7 (CH₂CH(CH₃)₂)



79

[Carboxymethyl]-2-O-benzyl-6-O-isobutyl-3,4-di-O-methyl- α -D-glycopyranosid

Die Synthese erfolgt nach AAV 8 ausgehend von 4.7 g (12.7 mmol) Methyl-2-O-benzyl-6-O-isobutyl-3,4-di-O-methyl- α -D-glycopyranosid **66**. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 4:1) erhält man 3.7 g eines Anomerengemisches von 2-O-Benzyl-6-O-isobutyl-3,4-di-O-methyl-D-glycopyranose **77** als farbloses Öl (Ausbeute: 83%).

500 mg (1.41 mmol) 2-O-Benzyl-6-O-isobutyl-3,4-di-O-methyl-D-glycopyranose **77** werden in 7 mL abs. DCM gelöst und mit 0.7 mL (7 mmol) Trichloracetonitril versetzt. Nach Zugabe von 0.7 g frisch geglühtem und zermörsertem K₂CO₃ wird 3 h bei RT gerührt.

Zur Aufarbeitung wird die Lösung über Kieselgur filtriert und das LM im Vakuum abgezogen. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 6:1, 1 Vol.% Triethylamin) verbleiben 473 mg eines Anomerengemisches ($\alpha:\beta=1:8$) 2-*O*-Benzyl-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl-D-glycopyranosyl-trichloracetimidat (Ausbeute: 67 %).

300 mg (0.60 mmol) 2-*O*-Benzyl-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl-D-glycopyranosyl-trichloracetimidat werden in 5.7 mL abs. Dioxan gelöst. Anschließend werden 186 μ L (1.8 mmol) Glykolsäureethylester hinzugegeben und 5.5 μ L (0.031 mmol) Trimethylsilyltriflat in 5 mL abs. Dioxan zugetropft und 45 min bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM und Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 4:1) verbleiben 272 mg eines Anomerengemisches ($\alpha:\beta = 7:1$) von [Ethyloxycarboxymethyl]-2-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid (Ausbeute: 82 %).

Anschließend wird der Ester nach AAV 10 verseift (quantitativ) und ein Teil davon mittels HPLC gereinigt. Es verbleibt [Carboxylmethyl]-2-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid als farbloses Öl **79**.

R_f [H/EE (3:1) + 2 Vol.% AcOH] = 0.38

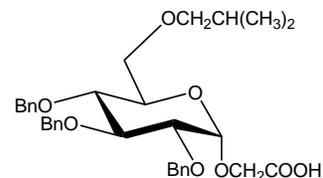
ESI-MS: 435.4 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.37-7.34 (m, 5H, H-Aromaten), 4.88 (d, J=11.7 Hz, CHH'Ph), 4.74 (d, 1H, J=11.6 Hz, CHH'Ph), 4.68 (d, 1H, J₁₂=3.8 Hz, H-C(1)), 4.27 (d, 1H, J=16.8 Hz, OCHH'CO₂H), 4.14 (d, 1H, J=16.8 Hz, OCHH'CO₂H), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.68-3.65 (m, 1H, H-C(5)), 3.64-3.58 (m, 3H, H-C(3), H₂-C(6)), 3.56 (s, 3H, OCH₃), 3.48 (dd, 1H, J₁₂=3.8 Hz, J₂₃=9.6 Hz, H-C(2)), 3.27 (dd, 1H, J₃₄=J₄₅=11.8 Hz, H-C(4)), 3.32 (dd, 1H, J_{AB}=9.3 Hz, J_{AM}=6.1 Hz CH₂CH(CH₃)₂), 3.14 (dd, 1H, J_{AB}=9.3 Hz, J_{AM}=7.5 Hz CH₂CH(CH₃)₂), 1.90 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 0.92 (d, 3H, J=6.7 Hz, CH₂CH(CH₃)₂), 0.92 (d, 3H, J=6.7 Hz, CH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

172.8 (COOH), 137.5 (Benzyl C-1), 129.0, 128.9, 128.7 (C-Aromaten), 99.2 (C-(1)), 84.1 (C(3)), 79.6 (C-(4)), 79.0 (CH₂CH(CH₃)₂), 78.6 (C-(2)), 74.4 (CH₂Ph), 71.6 (C-(5)), 69.4 (C-(6)), 65.8 (CH₂COOH), 61.5 (OCH₃), 60.9 (OCH₃), 28.7 (CH₂CH(CH₃)₂), 19.9 (CH₂CH(CH₃)₂), 19.6 (CH₂CH(CH₃)₂)



80

[Carboxymethyl]-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl- α -D-glycopyranosid

Die Synthese erfolgt nach AAV 8 ausgehend von 2 g (3.84 mmol) Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl- α -D-glycopyranosid **60**. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 4:1) erhält man 1.3 g eines Anomerengemisches von 2,3,4-Tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl-D-glycopyranose **78** als farbloses Öl (Ausbeute: 67%).

500 mg (1 mmol) 2,3,4-Tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl-D-glycopyranose **78** werden in 5 mL abs. DCM gelöst und mit 0.5 mL (5 mmol) Trichloracetonitril versetzt. Nach Zugabe von 0.5 g frisch geglühtem und zermörsertem K_2CO_3 wird 3 h bei RT gerührt.

Zur Aufarbeitung wird die Lösung über Kieselgur filtriert und das LM im Vakuum abgezogen. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 7:1, 1 Vol.% Triethylamin) verbleiben 290 mg 2,3,4-Tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl- β -D-glycopyranosyl-trichloracetimidat (Ausbeute: 49%).

220 mg (0.34 mmol) 2,3,4-Tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl- β -D-glycopyranosyl-trichloracetimidat werden in 3 mL abs. Dioxan gelöst. Anschließend werden 100 μ L (1.0 mmol) Glykolsäureethylester hinzugegeben und 3 μ L (0.017 mmol) Trimethylsilyltriflat in 5 mL abs. Dioxan zugetropft und 45 min bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM und Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 4:1) verbleiben 143 mg eines Anomerengemisches von [Ethyloxycarboxymethyl]-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-isobutyl- α -D-glycopyranosid (α : β = 4:1).

Anschließend wird der Ester nach AAV 10 verseift und ein Teil mittels HPLC gereinigt.

R_f [H/EE (2:1) + 1 Vol.% AcOH] = 0.36

ESI-MS: 587.4 ($M+Na^+$), 1167.4 ($2M+K^+$)

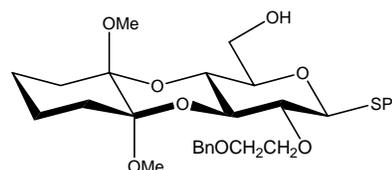
1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, 300 K):

7.32-7.26 (m, 15H, H-Aromaten), 4.93 (d, 1H, $J=10.2$ Hz, CHH'Ph), 4.90 (d, 1H, $J=10.2$ Hz, CHH'Ph), 4.88 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, CHH'Ph), 4.87 (d, 1H, $J=11.6$ Hz, CHH'Ph), 4.74 (d, 1H,

$J=11.6$ Hz, CHH'Ph), 4.71 (d, 1H, $J_{12}=3.7$ Hz, H-C(1)), 4.65 (d, 1H, $J=11.0$ Hz, CHH'Ph), 4.30 (d, 1H, $J=17.1$ Hz, OCHH'COOH), 4.14 (d, 1H, $J=17.1$ Hz, OCHH'COOH), 4.01 (dd, 1H, $J_{23}=J_{34}=9.3$ Hz, H-C(3)), 3.82 (m, 1H, H-C(5)), 3.70-3.58 (m, 4H, H-C(2), H-C(3), H₂-C(6)), 3.31 (dd, 1H, $^3J=6.1$ Hz, $J_{HH'}=9.1$ Hz, OCHH'CH(CH₃)₂), 3.12 (dd, 1H, $^3J=7.4$ Hz, $J_{HH'}=9.1$ Hz, OCHH'CH(CH₃)₂), 1.89 (m, 1H, OCH₂CH(CH₃)₂), 0.93 (d, 3H, $J=6.7$ Hz, OCH₂CH(CH₃)₂), 0.91 (d, 3H, $J=6.8$ Hz, OCH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K):

171.1 (CH₂COOH), 138.7, 138.4, 138.2 (Benzyl C-1), 129.1-128.0 (C-Aromaten), 100.2 (C-(1)), 82.4 (C-(3)), 79.0 (C-(2)), 79.0 (OCH₂CH(CH₃)₂), 78.1 (C-(4)), 76.1, 75.4, 74.9 (CH₂Ph), 72.0 (C-(5)), 69.5 (C-(6)), 66.6 (CH₂COOH), 28.8 (OCH₂CH(CH₃)₂), 19.9 (OCH₂CH(CH₃)₂), 19.6 (OCH₂CH(CH₃)₂)



81

Phenyl-2-O-[2-benzyloxyethyl]-3,4-O-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-1-thio-β-D-glycopyranosid

5.8 g (14.1 mmol) Phenyl-3,4-O-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-1-thio-β-D-glycopyranosid **56** werden in 60 mL Pyridin gelöst und mit 3.94 mL (16.8 mmol) TBDPSCI versetzt und 20 h bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wird der Rückstand mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1 bis 3:1) gereinigt. Man erhält 8.9 g Phenyl-3,4-O-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-O-*tert*butyldiphenylsilyl-1-thio-β-D-glycopyranosid als farblosen Feststoff (97 % Ausbeute).

4.5 g (6.9 mmol) Phenyl-3,4-O-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-O-*tert*butyldiphenylsilyl-1-thio-β-D-glycopyranosid werden nach AAV 4 mit Bromethyl-2-benzylether umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 6:1 bis 1:1) erhält man 3.8 g Phenyl-2-O-[2-benzyloxyethyl]-3,4-O-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-O-*tert*butyldiphenylsilyl-1-thio-β-D-glycopyranosid als farblosen Feststoff (70 % Ausbeute).

5.7 g (7.3 mmol) Phenyl-2-O-[2-benzyloxyethyl]-3,4-O-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-O-*tert*butyldiphenylsilyl-1-thio-β-D-glycopyranosid werden in 30 mL THF gelöst und

mit 10.7 mL einer 1 M TBAF-Lösung in THF versetzt. Man erhält 3.4 g Phenyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-1-thio- β -D-glycopyranosid **81** als farblosen Feststoff (88 % Ausbeute)

R_f [H/EE (3:1)] = 0.08

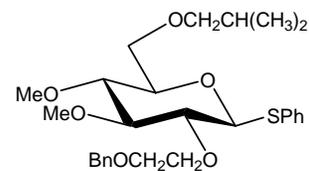
ESI-MS: 515.3 (M-OMe⁻), 569.4 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.50-7.27 (m, 10H, H-Aromaten), 4.66 (d, 1H, $J_{12}=9.4$ Hz, H-C(1)), 4.60 (s, 2H, CH₂Ph), 4.00 (m, 2H, OCHH'CH₂, H-C(3)), 3.93-3.86 (m, 2H, H-C(6), OCHH'CH₂), 3.81 (dd, 1H, $J_{34}=J_{45}=10.0$ Hz, H-C(4)), 3.74-3.67 (m, 3H, OCHH'CH₂, H-C(6)), 3.56 (m, 1H, H-C(5)), 3.36 (dd, 1H, $J_{12}=J_{23}=9.4$ Hz, H-C(2)), 3.21 (s, 6H, OCH₃), 1.78 (m, 1H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.76 (m, 4H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.56 (m, 2H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.42 (m, 2H, CH₂CH₂C(OMe))

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

138.7, 133.3, 132.9, 129.3, 128.2, 128.0, 127.8 (C-Aromaten), 99.0, 98.9 (-COCH₃), 87.8 (C(1)), 78.3 (C(2)), 78.1 (C(5)), 75.4 (C(3)), 73.4 (CH₂Ph), 72.8 (CH₂CH₂OBn), 70.1 (CH₂CH₂OBn), 66.9 C(4), 62.0 (C(6)), 47.3 (OCH₃), 47.2 (OCH₃), 27.5, 27.3 (CH₂CH₂COMe), 21.8, 21.7 (CH₂CH₂COMe)



83

Phenyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl-1-thio- β -D-glycopyranosid

7.9 g (14.4 mmol) Phenyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-1-thio- β -D-glycopyranosid **81** werden nach AAV 4 mit Isobutylmesylat als Alkylierungsreagens umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 4:1 bis 2:1) erhält man 7.9 g Phenyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-isobutyl-1-thio- β -D-glycopyranosid als farblosen Feststoff (85 % Ausbeute).

5.7 g (7.3 mmol) Phenyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-isobutyl-1-thio- β -D-glycopyranosid werden in 100 mL TFA, 10 mL DCM und 2.5 mL Wasser gelöst und 20 min bei RT gerührt. Man rotiert die Lösung bis zur Trockene und reinigt den Rückstand anschließend mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 2:1 bis 1:1). Man erhält 4.1 g Phenyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isobutyl-1-thio- β -D-glycopyranosid als farblosen Feststoff (76 % Ausbeute).

2.3 g (5.0 mmol) Phenyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isobutyl-1-thio- β -D-glycopyranosid **82** werden nach AAV 4 mit Dimethylsulfat als Alkylierungsreagens umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 4:1 bis 2:1) erhält man 2.2 g Phenyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl-1-thio- β -D-glycopyranosid **83** als farbloses Öl.

R_f [H/EE (2:1)] = 0.55

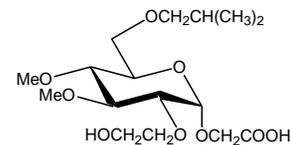
ESI-MS: 513.4 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.37-7.24 (m, 10H, H-Aromaten), 4.60 (s, 2H, CH₂Ph), 4.54 (d, 1H, J₁₂=9.6 Hz, H-C(1)), 4.00-3.88 (m, 2H, OCH₂CH₂), 3.68-3.54 (m, 3H, OCH₂CH₂, CHH'CH, H-C(6)), 3.65, 3.55 (s, 6H, 2xOCH₃), 3.32-3.21 (m, 7H, H-C(2), H-C(3), H-C(4), H-C(5), H₂-C(6), CHH'CH), 1.88 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 0.93 (m, 6H, CH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

132.2, 129.2, 128.7, 128.1, 127.9, 127.7 (C-Aromaten), 88.9 (C-(3)), 87.6 (C-(1)), 81.8 (C-(2)), 80.0 (C-(4)), 79.4 (C-(6)), 78.9 (C-(5)), 73.4 (CH₂Ph), 72.8 (CH₂CH₂OBn), 70.2 (CH₂CH₂OBn), 61.5 (OCH₃), 60.9 (OCH₃), 29.0 (CH(CH₃)₂), 19.8 (CH(CH₃)₂)



84

[Carboxymethyl]-2-*O*-[2-hydroxyethyl]-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid

500 mg (1.02 mmol) Phenyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl-1-thio- β -D-glycopyranosid **83** werden in 5 mL DCM und 5 mL Glykolsäureethylester gelöst. Bei 0 °C werden 46 μ L Br₂ zugegeben und für 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend gibt man ges. wässrige NaHSO₃ zu, zieht das LM ab und reinigt das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 4:1).

Das erhaltene Produkt wird nach AAV 10 umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 1:1 bis 1:3, 1 Vol.% AcOH) gereinigt. Man erhält 221 mg eines Anomerengemisches (α : β =4:1) von Carboxymethyl-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid (Ausbeute über zwei Stufen 48 %).

85 mg Carboxymethyl]-2-*O*-[2-benzyloxyethyl]-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid werden nach AAV 1 umgesetzt. Ein Teil des erhaltenen Rohprodukts wird mittels HPLC gereinigt. [Carboxymethyl]-2-*O*-[2-hydroxyethyl]-6-*O*-isobutyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glycopyranosid **84** verbleibt als farbloses Öl.

R_f [H/EE (1:1) + 2 Vol.% AcOH] = 0.23

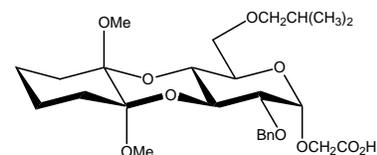
ESI-MS: 389.3 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

4.96 (d, 1H, J₁₂=3.6 Hz, H-C(1)), 4.39 (d, J=17.4 Hz, OCHH'CO₂H), 4.24 (d, 1H, J=17.4 Hz, OCHH'CO₂H), 3.90 (m, 1H, CH₂CH₂OH), 3.84-3.79 (m, 3H, CH₂CH₂OH), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.68-3.55 (m, 4H, H-C(3), H-C(5), H₂-C(6)), 3.55 (s, 3H, OCH₃), 3.46 (dd, 1H, J₁₂=3.6 Hz, J₂₃=9.7 Hz, H-C(2)), 3.34 (dd, 1H, J_{HH'}=9.1 Hz, ³J=6.1 Hz CH₂CH(CH₃)₂), 3.29 (dd, 1H, J₃₄=J₄₅=9.4 Hz, H-C(4)), 3.14 (dd, 1H, J_{HH'}=9.1 Hz, ³J=8.9 Hz CH₂CH(CH₃)₂), 1.92 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 0.93 (d, 3H, J=6.5 Hz, CH₂CH(CH₃)₂), 0.91 (d, 3H, J=6.5 Hz, CH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

98.6 (C-(1)), 83.8 (C-(3)), 80.9 (C-(2)), 79.8 (C-(4)), 79.0 (CH₂CH(CH₃)₂), 74.4 (CH₂CH₂OH), 71.7 (C-(5)), 69.3 (CH₂Ph), 65.2 (CH₂CO₂H), 62.6 (CH₂CH₂OH), 61.5 (OCH₃), 60.9 (OCH₃), 28.8 (CH₂CH(CH₃)₂), 19.9, 19.7 (CH₂CH(CH₃)₂)



85

[Carboxymethyl]-2-*O*-benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-isobutyl- α -D-glycopyranosid

250 mg (0.45 mmol) Phenyl-2-*O*-benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-isobutyl-1-thio- β -D-glycopyranosid werden in 3 mL DCM und 3 mL Glykolsäureethylester gelöst. Bei 0 °C werden 20 μ L Br₂ zugegeben und für 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend gibt man ges. wässrige NaHSO₃ zu, zieht das LM ab und reinigt das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 7:1).

Das erhaltene Produkt wird nach AAV 10 umgesetzt und mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1 bis 2:1, 1 Vol.% AcOH) gereinigt. Man erhält 86 mg [Carboxymethyl]-2-*O*-benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-isobutyl- α -D-glycopyranosid in Form eines farblosen Feststoffes. (Ausbeute über zwei Stufen 37 %). Ein Teil der erhaltenen Verbindung wird mittels HPLC gereinigt.

R_f [H/EE (2:1), 1 Vol.% AcOH] = 0.16

ESI-MS: 493.3 (M-OMe⁻), 547.4 (M+Na⁺)

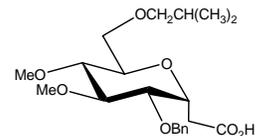
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.36-7.33 (m, 5H, H-Aromaten), 4.99 (d, 1H, J=11.4 Hz, CHH'Ph), 4.78 (d, 1H, J_{1,2}=3.9 Hz, H-C(1)), 4.75 (d, 1H, J=11.4 Hz, CHH'Ph), 4.36 (dd, 1H, J₂₃=J₃₄=9.9 Hz, H-C(3)), 4.29 (d, 1H, J=17.3 Hz, CHH'COOH), 4.16 (d, 1H, J=17.3 Hz, CHH'COOH), 3.94 (m, 1H, H-C(5)), 3.90 (dd, 1H, J₃₄=J₄₅=12 Hz, H-C(4)), 3.76 (dd, 1H, J₁₂=3.9 Hz J₂₃=10.1 Hz, H-C(2)), 3.66 (dd, 1H, J_{HH'}=10.1 Hz, J_{5,6}=4.0 Hz, H-C(6)), 3.58 (dd, 1H, J_{HH'}=10.1 Hz, J_{5,6'}=1.2 Hz, H'-C(6)), 3.27 (s, 3H, OCH₃), 3.23 (s, 3H, OCH₃), 3.28-3.18 (m, 2H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.86 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.77 (m, 4H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.57 (m, 2H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.43 (m, 1H, CH₂CH₂COMe), 0.93 (d, 3H, J=6.8 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂), 0.92 (d, 3H, J=6.8 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

171.8 (COOH), 137.3, 129.0, 128.9, 128.8, (C-Aromaten), 100.4 (C-(1)), 99.1, 99.0 (OCH₃), , 79.2 (CH₂CH(CH₃)₂), 76.0 (C(2)), 75.2 (CH₂Ph), 71.2 (C(3)), 70.6 (C(5)), 68.6 C(6)), 67.0

($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{COOH}$), 66.5 (C(4)), 47.4 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 47.3 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 28.7 ($\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{C}\underline{\text{H}}(\text{C}\underline{\text{H}}_3)_2$), 27.5, 27.3 ($\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{COMe}$), 21.8, 21.7 ($\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{COMe}$), 19.7 ($\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{C}\underline{\text{H}}(\text{C}\underline{\text{H}}_3)_2$)



91

2-O-Benzyl-6-O-isobutyl-3,4-di-O-methyl- α -D-glycopyranosyl-essigsäure

52 mg (12.7 mmol) 2-O-Benzyl-6-O-isobutyl-3,4-di-O-methyl- α -D-glycopyranosyl-essigsäuremethylester werden nach AAV 10 umgesetzt und anschließend mittels HPLC gereinigt. Man erhält 2-O-Benzyl-6-O-isobutyl-3,4-di-O-methyl- α -D-glycopyranosyl-essigsäure **91** als farblosen Feststoff.

Ausbeute 42 mg (10.5 mmol, 83 %)

R_f [H/EE (3:1), 1 Vol.% AcOH] = 0.43

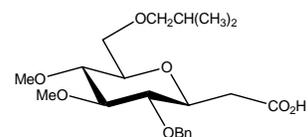
ESI-MS: 419.3 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.32-7.26 (m, 5H, H-Aromaten), 4.67 (d, 1H, J=11.6 Hz, $\text{C}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}'\text{Ph}$), 4.60 (d, 1H, J=11.6 Hz, $\text{C}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}'\text{Ph}$), 4.51 (m, 1H, H-C(1)), 3.60 (s, 1H, OCH₃), 3.52 (s, 3H, OCH₃), 3.60-3.52 (m, 4H, H-C(2), H-C(5), H₂-C(6)), 3.31-3.27 (m, 2H, H-C(3), $\text{C}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}'\text{CH}$), 3.21 (dd, 1H, J_{3,4}=J_{4,5}=8.8 Hz, H-C(4)), 3.08 (dd, 1H, J_{HH'}}=J_{HCH}}=8.7 Hz, $\text{C}\underline{\text{H}}\underline{\text{H}}'\text{CH}$), 2.69 (m, 2H, CH₂COOH), 1.87 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 0.88 (d, 6H, J=6.7 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂), 0.85 (d, 6H, J=6.7 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

174.5 (COOH), 137.8, 128.5, 127.9, 127.8 (C-Aromaten), 83.6 (C(3)), 79.2 (C(4)), 78.5 ($\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{C}\underline{\text{H}}(\text{C}\underline{\text{H}}_3)_2$), 78.2 (C(2)), 73.3 ($\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{Ph}$), 72.1 (C(5)), 70.9 (C(1)), 69.4 (C(6)), 60.7 (OCH₃), 60.4 (OCH₃), 32.0 ($\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{COOH}$), 28.3 ($\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{C}\underline{\text{H}}(\text{C}\underline{\text{H}}_3)_2$), 19.5, 19.3 ($\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{C}\underline{\text{H}}(\text{C}\underline{\text{H}}_3)_2$)



92

2-O-Benzyl-6-O-isobutyl-3,4-di-O-methyl-β-D-glycopyranosyl-essigsäure

500 mg (1.41 mmol) Methyl-6-O-isobutyl-2-O-benzyl-3,4-di-O-methyl-D-glycopyranose **77** werden in 8 mL abs. Benzol gelöst. Anschließend werden 0.65 mL (7.07 mmol) Bromessigsäuremethylester, 1.73 mL (7.52 mmol) Tributylphosphin (Erwärmung) und 4.78 g Zink zugegeben und die Lösung 24 h lang unter Rückfluss erhitzt.

Anschließend wird über Kieselgel filtriert und das erhaltene Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel H/EE = 7:1 bis 5:1). Man erhält 445 mg eines Anomerengemisches ($\alpha:\beta = 1:5.5$) von 2-O-Benzyl-6-O-isobutyl-3,4-di-O-methyl-D-glycopyranosyl-essigsäuremethylester (Ausbeute 77 %).

Die obige Verbindung wird nach AAV 10 umgesetzt (quantitativ) und ein Teil davon anschließend mittels HPLC gereinigt. Man erhält 2-O-Benzyl-6-O-isobutyl-3,4-di-O-methyl-β-D-glycopyranosyl-essigsäure **92** als farblosen Feststoff.

R_f [H/EE (3:1), 1 Vol.% AcOH] = 0.43

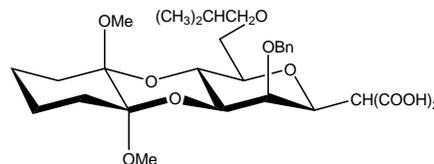
ESI-MS: 419.3 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.35-7.27 (m, 5H, H-Aromaten), 4.87 (d, 1H, J=10.9 Hz, CHH'Ph), 4.59 (d, 1H, J=10.9 CHH'Ph), 3.66 (s, 1H, OCH₃), 3.54 (s, 3H, OCH₃), 3.66-3.52 (m, 3H, H-C(1), H₂-C(6)), 3.31-3.12 (m, 6H, H-C(2), H-C(3), H-C(4), H-C(5), CH₂CH), 2.73 (dd, 1H, J_{HH'}=16.0 Hz, J_{1,CHH'}=3.5 Hz, CHH'COOH), 2.46 (dd, 1H, J_{HH'}=16.0 Hz, J_{1,CHH'}=8.3 Hz, CHH'COOH), 1.85 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 0.88 (d, 6H, J=6.7 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂), 0.86 (d, 6H, J=6.7 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

173.9 (COOH), 138.0, 128.5, 128.1, 128.0, (C-Aromaten), 88.9 (C(3)), 80.6 (C(2)), 80.1 (C(4)), 78.8 (C(5)), 78.5 (CH₂CH(CH₃)₂), 75.1 (C(1)), 75.1 (CH₂Ph), 69.4 (C(6)), 61.0 (OCH₃), 60.5 (OCH₃), 37.0 (CH₂COOH), 28.3 (CH₂CH(CH₃)₂), 19.4, 19.3 (CH₂CH(CH₃)₂)



95

2-(2-*O*-Benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-isobutyl- β -D-mannopyranosyl-Malonsäure

350 mg Natrium werden in 45 mL Malonsäurediethylester gelöst und zu 470 mg (0.89 mmol) getrocknetem 2-(2-*O*-benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-isobutyl- β -D-mannopyranosylbromid **94** gegeben. Die Reaktion läuft 48 h lang bei 90 °C. Anschließend wird die Lösung über Kieselgel filtriert und mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 12:1 bis 6:1) gereinigt. Man erhält 370 mg 2-(2-*O*-Benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-isobutyl- β -D-mannopyranosyl-malonsäurediethylester (Ausbeute 71 %). Der Ester wird nach AAV hydrolysiert und ein Teil der erhaltenen Verbindung mittels HPLC gereinigt.

R_f [H/EE (1:1), 1 Vol.% AcOH] = 0.2

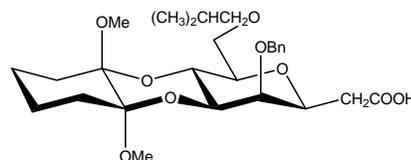
ESI-MS: 521.3 (M-OMe)⁺, 575.4 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.33-7.27 (m, 5H, H-Aromaten), 5.00 (d, 1H, J=10.5 Hz, CHH'Ph), 4.57 (m, 1H, H-C(1)), 4.52 (d, 1H, J=10.5 Hz, CHH'Ph), 4.45 (dd, 1H, J_{3,4}=J_{4,5}=10.3 Hz, H-C(4)), 3.99 (dd, 1H, J_{2,3}=2.2 Hz, J_{3,4}=10.3 Hz H-C(3)), 3.96 (m, 1H, H-C(2)), 3.72 (m, 1H, H-C(5)), 3.66 (dd, 1H, J_{5,6}=2.9 Hz, J_{6,6'}=10.5 Hz H-C(6)), 3.58 (dd, 1H, J_{5,6'}=2.4 Hz, J_{6,6'}=10.5 Hz, H-C(6')), 3.55 (d, 1H, J_{1,CH}=5.7 Hz, CH(CO₂H)₂), 3.23 (s, 3H, OCH₃), 3.17 (s, 3H, OCH₃), 3.22-3.14 (m, 2H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.80 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.80-1.66 (m, 4H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.52 (m, 2H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.38 (m, 1H, CH₂CH₂COMe), 0.82 (d, 6H, J=6.7 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

167.6 (2*COOH), 137.0, 128.8, 128.2, 127.9 (C-Aromaten), 98.8, 98.5 (OCH₃), 78.5 (CH₂CH(CH₃)₂), 78.0 (C(5)), 77.1 (C(1)), 74.3 (CH₂Ph), 73.6 (C(2)), 72.4 (C(3)), 67.3 (C(6)), 62.5 (C(4)), 48.2 (CH(COOH)₂), 47.1(CH₃), 46.8 (OCH₃), 28.4 (CH₂CH(CH₃)₂), 27.1, 27.0 (CH₂CH₂COMe), 21.4, 21.3 (CH₂CH₂COMe), 19.1 (CH₂CH(CH₃)₂)



97

2-(2-*O*-benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-isobutyl- β -D-mannopyranosyl-Essigsäure

25 mg (0.045 mmol) 2-(2-*O*-Benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-isobutyl- β -D-mannopyranosyl-malonsäure **95** werden in 8 mL Essigsäure gelöst und für 90 min bei 92 °C gerührt. Das LM wird abgezogen und der Rückstand mittels HPLC gereinigt.

Man erhält 2-(2-*O*-Benzyl-3,4-*O*-[1,2-dimethoxycyclohexan-1,1-diyl]-6-*O*-isobutyl- β -D-mannopyranosyl-essigsäure als farblosen Feststoff neben etwa gleichen Mengen an nicht umgesetzten Edukt.

Ausbeute 8 mg (0.014 mmol, 35%)

R_f [H/EE (1:1), 1 Vol.% AcOH] = 0.25

ESI-MS: 477.4 (M-OMe)⁺, 531.6 (M+Na⁺)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.33-7.26 (m, 5H, H-Aromaten), 5.00 (d, 1H, J=11.1 Hz, CHH'Ph), 4.52 (d, 1H, J=11.1 Hz, CHH'Ph), 4.21 (dd, 1H, J_{3,4}=J_{4,5}=10.2 Hz, H-C(4)), 3.96 (dd, 1H, J_{2,3}=2.1 Hz, J_{3,4}=10.2 Hz H-C(3)), 3.88 (t, 1H, H-C(1)), 3.69-3.65 (m, 3H, H-C(6), H-C(5), H-C(2)), 3.55 (dd, 1H, J_{5,6}'=7.1 Hz, J_{6,6}'=10.8 Hz, H-C(6)), 3.22 (s, 3H, OCH₃), 3.19 (s, 3H, OCH₃), 3.22-3.14 (m, 2H, CH₂CH(CH₃)₂), 2.77 (dd, 1H, J_{1,CH}'=7.2 Hz, J_{HH}'=16.6 Hz CHH'CO₂H₂), 2.54 (dd, 1H, J_{1,CH}'=5.3 Hz, J_{HH}'=16.6 Hz, CHH'CO₂H), 1.80 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.80-1.66 (m, 4H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.52 (m, 2H, CH₂CH₂C(OMe)), 1.38 (m, 1H, CH₂CH₂COMe), 0.82 (d, 6H, J=6.7 Hz, OCH₂CH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

173.8 (COOH), 137.9, 128.9, 128.3, 127.8 (C-Aromaten), 98.7, 98.5 (OCH₃), 78.6 (CH₂CH(CH₃)₂), 78.2 (C(5)), 74.9 (C(1)), 74.8 (C(2)), 74.0 (CH₂Ph), 73.7 (C(3)), 69.4 (C(6)), 64.6 (C(4)), 46.9 OCH₃), 46.8 (OCH₃), 36.1 (CH₂COOH), 28.2 (CH₂CH(CH₃)₂), 27.1, 27.0 (CH₂CH₂COMe), 21.4, 21.3 (CH₂CH₂COMe), 19.2 (CH₂CH(CH₃)₂)

9.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften für Adhäsionsassays mit $\alpha 4$ -Integrin exprimierenden Zellen^[102]

Adhäsionspuffer

Der Adhäsionspuffer besteht aus Click's RPMI Medium, 1 % BSA, 1.0 mM MgCl₂ und 1.0 mM CaCl₂

Tris Buffer Saline (TBS-Puffer) für die Integrin-Stimulation mit Mn²⁺-Ionen

Der 1x TBS-Puffer besteht aus Tris (14 mM), NaCl (137 mM) und KCl (2.7 mM), Glucose (2 mM) und Mn²⁺ (1mM).

Medium für 38C13B1- und 38C13B7- Zellen

Click's RPMI-Medium (2.5 L) werden mit FCS (35 mL), Glutamin (5 mL) und β -Mercaptoethanol (1000 X, 0.5 mL) versetzt.

Medium für Jurkat-Zellen

Click's RPMI-Medium (2.5 L) werden mit FCS (35 mL) und Glutamin (5 mL) versetzt.

38C13B7-Zellen

B Zell-Lymphom aus der C3H/He Maus, infiziert mit L β 7SN Virus und mit G418 selektiert.

38C13B1- und 38C13B7-Zellen in Kultur

Täglich wird ca. $\frac{2}{3}$ der Zelllösung abgesaugt und wieder mit neuem Medium aufgefüllt. Die Zellkulturen werden in einem Wärmeschrank bei 37 °C aufbewahrt.

Beschichtung der Mikrotiterplatten mit VCAM

Es wird eine rhVCAM-1 Stammlösung (75 μ L, 0.5 μ g/ μ L) mit PBS (12.5 mL) verdünnt und auf eine 96-iger Mikrotiterplatte aufgetragen (0.3 μ g rhVCAM in 100 μ L PBS pro *well*). Die Mikrotiterplatte wird über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Beschichtung der Mikrotiterplatten mit MAdCAM-1

Es wird eine *donkey α human* IgG-Stammlösung (48 μ L, 1.3 μ g/ μ L) mit PBS (12.5 mL) verdünnt und auf eine 96-iger Mikrotiterplatte aufgetragen (0.5 μ g *donkey α human* IgG in 100 μ L PBS pro *well*). Die Mikrotiterplatte wird über Nacht bei 4 °C inkubiert.. Anschließend wäscht man die Platte mit Adhäsionspuffer (1 x 100 μ L/*well*) und inkubiert sie 30 min bei RT mit MAdCAM-1 Überstand (je nach Konzentration des MAdCAM-1 Überstands 100-150 μ L/*well*).

Zellbasierter Adhäsionsassay für $\alpha 4$ -Integrin-exprimierende Zellen

Es wurden folgende Adhäsionsassays durchgeführt: 38C13 β 7-Zellen auf MAdCAM-1 beschichteten Platten, 38C13 β 7-Zellen auf VCAM-1 beschichteten Platten und Jurkat-Zellen auf VCAM-1 beschichteten Platten.

Vorbereitung der Mikrotiterplatten:

Die mit VCAM-1 oder MAdCAM-1 beschichteten Mikrotiterplatten wurden mit Adhäsionspuffer gewaschen (1 x 100 μ L/well) und anschließend mit Adhäsionspuffer für 1 h bei RT blockiert.

Vorbereitung der Zellen:

Die entsprechende Zellsuspension (12.5 mL) wurde 3 min bei 1500 Upm zentrifugiert, mit PBS (1 x 5 mL) gewaschen und abermals 3 min bei 1500 Upm zentrifugiert. Man resuspendierte die Zellen in Adhäsionspuffer (3 mL) und inkubierte die Zellsuspension 30 min bei 37 °C mit einem Fluoreszenzfarbstoff (H33342, 6 μ L). Die Zellsuspension wurde 3 min bei 1500 Upm zentrifugiert, mit PBS/1 mM EDTA (5 mL) gewaschen, bei 1500 Upm für 3 min zentrifugiert und in PBS (10 mL) resuspendiert. Nach dem Zählen der Zellen wurden diese abermals 3 min bei 1500 Upm zentrifugiert und in einer entsprechenden Menge Adhäsionspuffer gelöst (ca. $8 \cdot 10^5$ Zellen/mL).

Durchführung des Adhäsionsassays:

Die Zellsuspension (350 μ L, ca. $8 \cdot 10^5$ Zellen/mL) wurde mit der entsprechenden Substanz (3.5 μ L aus der Stammlösung, 1 mg/10 μ L DMSO) 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf die Platte aufgetragen (3 x je 100 μ L). Man zentrifugierte die Mikrotiterplatten für 10 min bei 15 g und analysierte sie im Fluorimeter. Die Mikrotiterplatten wurden 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, unter dem Mikroskop auf ausgefallene Verbindungen untersucht, in ein PBS-Bad eingetaucht und anschließend mit einer Klebefolie die einzelnen *wells* abgeklebt. Die Mikrotiterplatte wurde invers 10 min bei 50 g zentrifugiert. Von der invertierten Platte zog man die Klebefolie ab und drückte sie auf einem Zellstoffpapier aus. Die immer noch invertierte Mikrotiterplatte wurde mit einer Pasteur-Pipette ausgesaugt. Die Mikrotiterplatte wurde nun wieder umgedreht, mit Adhäsionspuffer befüllt (100 μ L/well) und im Fluorimeter vermessen. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel[®].

9.5 Synthese von oligomeren SST-Analoga

9.5.1 Synthese der Bausteine

Die Zyklopeptide **114**, **117** und **118** wurden durch kombinierte Fesphasen-Lösungssynthese hergestellt. Nach AAV 11, 12, 14, 15 und 16 wird das lineare Peptid aufgebaut und anschließend nach AAV 20 b zyklisiert. Bei dem am *N*-terminus mit Aminoxyessigsäure verlängertem Octapeptid ist bei der Abspaltung vom Harz und bei der Zyklisierung auf die Verwendung von Lösungsmittel der HPLC-Qualität zu achten.

114

***cyclo*[2,7]-AoxAc-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH**

$C_{51}H_{67}N_{11}O_{14}S_2$: 1121.43 g/mol

HPLC (10-50 % in 30 min.) $R_t = 19.4$ min; **ESI-MS**: m/z 1122.5 $[M+H]^+$, 562.1 $[(M+2H)/2]^{2+}$.

117

***cyclo*[2,7]-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH**

$C_{49}H_{64}N_{10}O_{11}S_2$: 1032.42 g/mol

HPLC (10-50 % in 30 min.) $R_t = 19.4$ min; **ESI-MS**: m/z 1122.5 $[M+H]^+$, 562.1 $[(M+2H)/2]^{2+}$.

118

***cyclo*[2,7]-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH**

$C_{49}H_{64}N_{10}O_{12}S_2$: 1048.41 g/mol

HPLC (10-50 % in 30 min.) $R_t = 19.4$ min; **ESI-MS**: m/z 1122.5 $[M+H]^+$, 562.1 $[(M+2H)/2]^{2+}$.

Verzweigungseinheiten

Die Verzweigungseinheiten wurden durch kombinierte Fesphasen-Lösungssynthese hergestellt. Zunächst wurden die linear verzweigten Peptide mit *N*-terminalen Serin nach AAV 11, 12, 14, 15 und 16 aufgebaut und anschließend nach AAV 19 zu den Aldehyden

oxidiert. Die Aldehyde wurden mittels HPLC gereinigt und nach Lyophilisieren innerhalb von 24 h für die nächste Synthese eingesetzt.

O=CH-CO-HEGAS-OH

C₁₆H₂₉NO₁₀: 395.18 g/mol

ESI-MS: *m/z* 396.3 [M+H]⁺, 418.4 [M+Na]⁺, 434.4 [M+K]⁺.

[O=CH-CO-ADO-]₂-D-Lys-D-Asp-OH

C₂₆H₄₁N₅O₁₅: 663.26 g/mol

ESI-MS: *m/z* 664.6 [M+H]⁺, 686.6 [M+Na]⁺, 702.3 [M+K]⁺.

[O=CH-CO-HEGAS-]₂-D-Lys-OH

C₃₈H₆₈N₄O₂₀: 900.44

ESI-MS: *m/z* 901.5 [M+H]⁺, 923.6 [M+Na]⁺, 939.5 [M+K]⁺.

[O=CH-CO-HEGAS-]₂-D-Lys-D-Asp-OH

C₄₂H₇₃N₅O₂₃: 1015.47 g/mol

ESI-MS: *m/z* 1016.4 [M+H]⁺, 1038.5 [M+Na]⁺, 1054.4 [M+K]⁺.

[O=CH-CO-HEGAS-]₂-D-Lys-Dpr(Aoa)-OH

C₄₈H₈₅N₇O₂₅: 1159.56 g/mol

ESI-MS: *m/z* 1042.5 [M-Boc-H₂O+H]⁺, 1160.3 [M+H]⁺, 1182.4 [M+Na]⁺, 1200.4 [M+K]⁺.

{[O=CH-CO-D-Lys-HEGAS]₂-D-Lys}₂-D-Lys-OH

C₈₂H₁₄₆N₁₀O₄₀: 1910.97 g/mol

ESI-MS: *m/z* 1911.5 [M+H]⁺, 1933.7 [M+Na]⁺, 1949.6 [M+K]⁺.

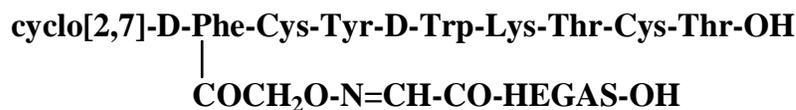
[O=CH-CO-HEGAS-]₂-D-Lys-Lys(DOTA)-OH

C₆₀H₁₀₆N₁₀O₂₈: 1414.72

ESI-MS: *m/z* 708.7 [(M+2H)/2]²⁺, 1415.5 [M+H]⁺, 1437.6 [M+Na]⁺.

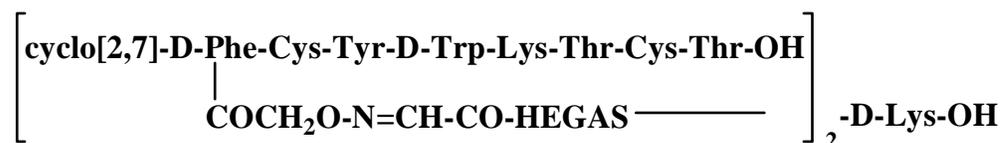
Synthese der oligomeren SST-Analoga

Die obigen Verzweigungseinheiten wurden mit *cyclo*[2,7]-AoxAc-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr **118** nach AAV 18 umgesetzt und anschließend mittels HPLC gereinigt. Die Detektion erfolgte mit den Wellenlängen 254 und 220 nm.

119

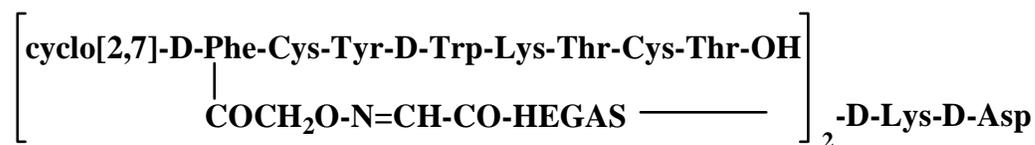
$\text{C}_{67}\text{H}_{94}\text{N}_{12}\text{O}_{23}\text{S}_2$: 1498.6 g/mol

HPLC (10-60 % in 30 min) $R_t = 19.49$ min; **ESI-MS**: m/z 1499.6 $[\text{M}+\text{H}^+]$, 1521.4 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$.

120

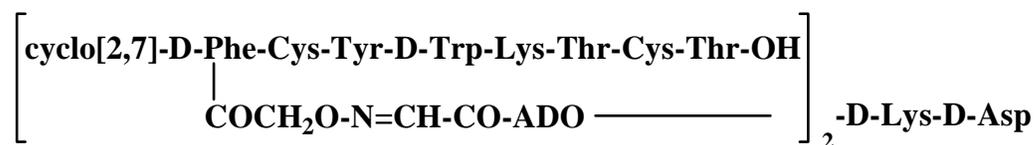
$\text{C}_{140}\text{H}_{198}\text{N}_{26}\text{O}_{46}\text{S}_4$: 3107.28 g/mol

HPLC (10-60 % in 30 min.) $R_t = 21.45$ min; **ESI-MS**: m/z 1555.2 $[(\text{M}+2\text{H})/2]^{2+}$, 1050.1 $[(\text{M}+2\text{H}+\text{K})/3]^{3+}$, 1044.7 $[(\text{M}+2\text{H}+\text{Na})/3]^{3+}$, 1037.5 $[(\text{M}+3\text{H})/3]^{3+}$. **MALDI-MS**: m/z 3110.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

121

$\text{C}_{144}\text{H}_{203}\text{N}_{27}\text{O}_{49}\text{S}_4$: 3222.31 g/mol

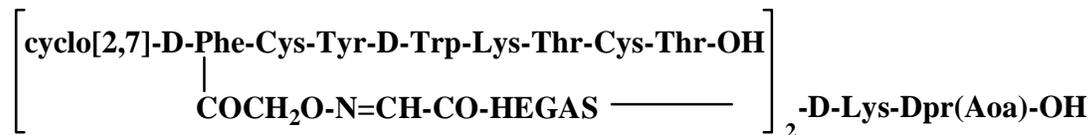
HPLC (10-60 % in 30 min.) $R_t = 21.10$ min; **ESI-MS**: m/z 1612.6 $[(\text{M}+\text{H})/2]^{2+}$, 1083.0 $[(\text{M}+\text{Na}+2\text{H})/3]^{3+}$, 1075.6 $[(\text{M}+3\text{H})/3]^{3+}$.

122

$\text{C}_{128}\text{H}_{171}\text{N}_{27}\text{O}_{41}\text{S}_4$: 2870.10 g/mol

HPLC (10-60 % in 30 min) $R_t = 20.56$ min; **ESI-MS**: m/z 1436.5 [(M+2H)/2]²⁺, 970.9 [(M+2H+K)/3]³⁺, 965.6 [(M+2H+Na)/3]³⁺, 958.2 [(M+3H)/3]³⁺.

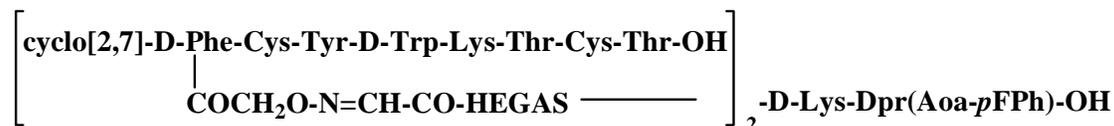
123



$C_{150}H_{215}N_{29}O_{51}S_4$: 3366.4

HPLC (10-60 % in 30 min.) $R_t = 22.55$ min; **ESI-MS**: m/z 1684.3 [(M+2H)/2]²⁺, 1090.1 [(M-BOC+3H)/3]³⁺.

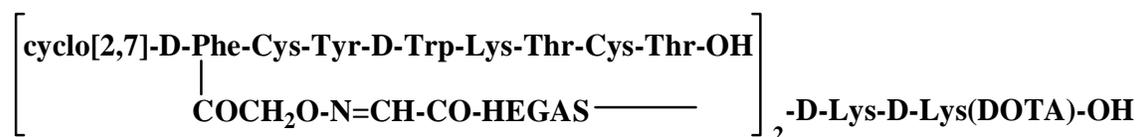
124



$C_{152}H_{210}FN_{29}O_{49}S_4$: 3372.5 g/mol

HPLC (10-60 % in 30 min.) $R_t = 23.52$ min; **ESI-MS**: m/z 1687.5 [(M+2H)/2]²⁺, 1125.7 [(M+3H)/3]²⁺, 1133.0 [(M+Na+2H)/3]³⁺.

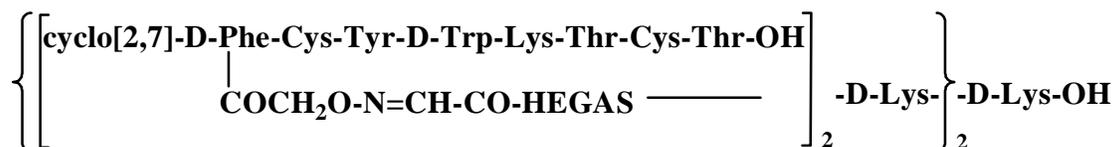
125



$C_{162}H_{236}N_{32}O_{54}S_4$: 3621,56

HPLC (10-50 % in 30 min.) $R_t = 23.55$ min; **ESI-MS**: m/z 1812.8 [(m+2H)/2]²⁺ 1208.7 [(M+3H)/3]³⁺, 1215.9 [(M+2H+Na)/3]³⁺.

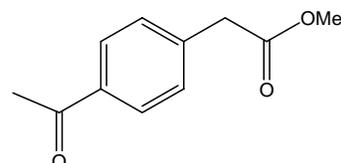
126



$C_{286}H_{406}N_{54}O_{92}S_8$: 6324.65 g/mol

HPLC (10-50 % in 30 min.) $R_t = 26.56$ min; **ESI-MS**: m/z 1582.2 $[(M+4H)/4]^{4+}$, 1601.8 $[(M+2H+2K)/4]^{4+}$. **MALDI-MS**: m/z 6330.8 $[M+H]^+$.

9.6 Synthese von DOTA-Derivaten



132

4-Acetyl-phenyl-essigsäuremethylester

Zu einer Suspension bestehend aus 16.8 mg (0.075 mmol) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, 68 mg (0.223 mmol) Tris(o-tolyl)phosphin, 0.23 mL (2.5 mmol) Bromessigsäuremethylester und 1.73 g (12.5 mmol) K_2CO_3 in 8 mL THF unter Argon werden innerhalb von 30 min bei RT 492 mg (3.0 mmol) 4-Acetyl-phenyl-boronsäure in 8 mL THF und 0.11 ml (6 mmol) Wasser zugegeben. Der Ansatz wird über Nacht bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Suspension zwischen Wasser und EE verteilt und mehrfach mit EE extrahiert. Anschließend wird die Lösung über Kieselgel filtriert und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Reinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1 bis 2:1). Man erhält 4-Acetyl-phenyl-essigsäuremethylester als gelblichen Feststoff

Ausbeute 147 mg (0.78 mmol, 31 %)

R_f [H/EE (4:1)] = 0.45

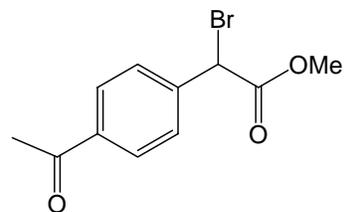
ESI-MS: 193.1 (M+H⁺)

¹H-NMR (CDCl_3 , 250 MHz, 300 K):

7.95 (d, 2H, J=7.25 Hz, H-Aromaten), 7.41 (d, 2H, J=7.25 Hz, H-Aromaten), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (s, 2H, CH₂), 2.63 (s, 3H, COCH₃)

¹³C-NMR (CDCl_3 , 125 MHz, 300K):

197.7 (CH₃C=O), 171.2 (CO₂CH₃), 139.3 136.1, 129.6, 128.7 (C-Aromaten), 52.2 (CO₂CH₃), 41.1 (AcPhCH₂Br-), 26.6 (CH₃CO)

**133****(RS)-4-Acetyl-phenyl-bromessigsäuremethylester**

50 mg (0.26 mmol) 4-Acetyl-phenyl-essigsäuremethylester **132**, 102 mg (0.57 mmol) N-Bromsuccinimid und 9 mg (0.55 mmol) AIBN werden in 5 mL CCl₄ gelöst und 3 h unter Rückfluss erhitzt. Die Suspension wird über Kieselgel filtriert und anschließend mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 5:1 bis 2:1) gereinigt. Man erhält 4-Acetyl-phenyl-bromessigsäuremethylester als gelbliches Öl
Ausbeute 53 mg (0.20 mmol, 76 %).

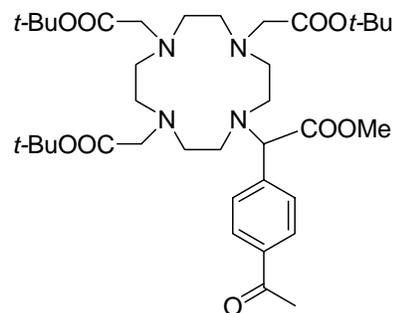
R_f [H/EE (4:1)] = 0.52

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.97 (d, 2H, J=7.5 Hz, H-Aromaten), 7.67 (d, 2H, J=7.5 Hz, H-Aromaten), 5.40 (s, 1H, CHBr), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 2.62 (s, 3H, COCH₃)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

197.3 (CH₃CO), 168.3 (CO₂CH₃), 140.5, 137.6, 129.6, 128.8 (C-Aromaten), 53.6 (CO₂CH₃), 45.4 (AcPhCHBr-), 26.7 (CH₃CO)

**129****1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-4,7,10-tert-butylester-1-(4-Acetyl-phenyl)-essigsäuremethylester**

Zu 12.3 mg (0.07 mmol) 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan (Cyclen) und 10 mg K_2CO_3 in 1 mL DMF werden 10 mg (0.09 mmol) 4-Acetyl-phenyl-bromessigsäuremethylester **133** in 2 mL DMF zugegeben. Es wird 3 h bei RT gerührt und anschließend werden 25 mg K_2CO_3 und 34 μ L (0.23 mmol) Bromessigsäure-*tert*butylester zugegeben und nochmals für 3 h bei RT gerührt. Anschließend wird das LM entfernt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel DCM/MeOH = 20:1) gereinigt. Man erhält 18 mg 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-4,7,10-*tert*-butylester-1-(4-Acetyl-phenyl)-essigsäuremethylester **129** und weitere leicht verunreinigte Fraktionen, die anschließend mittels HPLC gereinigt wurden. Insgesamt wurden 0.043 mmol 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-4,7,10-*tert*-butylester-1-(4-Acetyl-phenyl)-essigsäuremethylester erhalten. (Ausbeute: 60%)

R_f [DCM/MeOH (15:1)] = 0.43

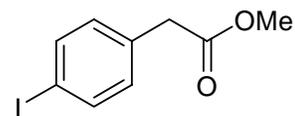
ESI-MS: 705.4 ($M+H^+$), 727.4 ($M+Na^+$)

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, 300 K):

7.93 (d, 2H, $J=7.4$ Hz, H-Aromaten), 7.15 (d, 2H, $J=7.4$ Hz, H-Aromaten), 4.73 (s, 1H, $\underline{C}HCO_2Me$), 3.70 (s, 3H, $CO_2\underline{C}H_3$), 3.5-1.7 (m, 22 H, $4x(\underline{C}H_2)_2N$, $3x\underline{C}H_2CO_2tBu$), 2.61 (s, 3H, $CO\underline{C}H_3$), 1.45 (s, 27 H, $3xCO_2C(\underline{C}H_3)_3$)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, 300K):

197.9 ($\underline{C}H_3CO$), 175.1, 174.2, 173.7 173.4 ($4xCO_2R$), 137.4, 137.3, 130.7, 128.8 (C-Aromaten), 82.9, 82.5, 82.4 ($3x\underline{C}(\underline{C}H_3)_3$), 65.3 ($\underline{C}HCO_2Me$), 56.5, 56.2, 56.1, 56.0, 53.3, 52.9, 52.8, 49.3, 48.8, 48.6, 48.5, 45.4 ($4x(\underline{C}H_2)_2N$, $3x\underline{C}H_2CO_2tBu$, $CO_2\underline{C}H_3$), 28.2 $3xCO_2C(\underline{C}H_3)_3$, 27.1 ($\underline{C}H_3CO$)



135

4-Iod-phenylessigsäuremethylester^[284]

1.1g (4.2 mmol) 4-Iod-phenylessigsäure werden in 40 mL abs. MeOH gelöst und 0.4 mL konz. Schwefelsäure zugegeben. Die Lösung wird 16 h bei RT gerührt und anschließend mit ges. $NaHCO_3$ -Lösung neutralisiert. Die wässrige Phase wird mehrmals mit EE extrahiert und

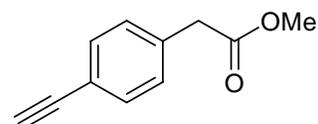
die vereinigten organischen Phasen über Kieselgel filtriert, über Na₂SO₄ getrocknet und das LM entfernt. Es verbleibt 4-Iodphenylessigsäuremethylester **135** als farblose Flüssigkeit.

Ausbeute 1.08 g (3.91 mmol, 93%)

R_f [H/EE (4:1)] = 0.57

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.67 (d, 2H, J=8.4 Hz), 7.05 (d, 2H, J=8.4 Hz), 3.72 (s, 3H), 3.59 (s, 2H)



136

4-Ethynyl-phenyl-essigsäuremethylester^[284]

500 mg (1.81 mmol) 4-Iodphenylessigsäuremethylester **135** und 380 μL (2.75 mmol) Trimethylsilyl-acetylen werden in 5 mL abs. Acetonitril gelöst. Unter Argon werden bei 0 °C 596 μL (4.3 mmol) Triethylamin, 162 mg (0.14 mmol) Tetrakis(triphenylphosphin)-Pd(0) und 250 mg (1.3 mmol) CuI zugegeben. Zunächst wird 30 min bei 0 °C gerührt und anschließend noch 3 h bei RT. Die Lösung wird nach verdünnen mit Hexan über Kieselgel filtriert und mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 11:1) gereinigt. Das erhaltene Zwischenprodukt wird in 10 mL THF gelöst, mit 1.1 eq Tetrabutylammoniumfluorid versetzt und für 30 min bei RT gerührt. Nach Abziehen des LM wird mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel H/EE = 11:1) gereinigt. Man erhält 4-Ethynyl-phenyl-essigsäuremethylester **136** als gelbliches Öl.

Ausbeute 204 mg (1.18 mmol, 65 %)

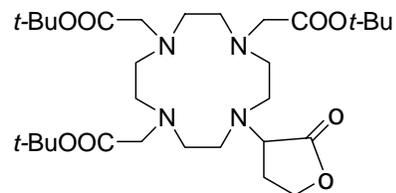
R_f [H/EE (4:1)] = 0.32

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K):

7.48 (d, 2H, J=8.3 Hz, H-Aromaten), 7.27 (d, 2H, J=8.3 Hz, H-Aromaten), 3.72 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.65 (s, 2H, CH₂CO₂), 3.09 (s, 1H, CCH)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300K):

171.5 (CO₂CH₃), 134.7, 132.3, 129.3, 121.1 (C-Aromaten), 83.4 (PhCCH), 77.3 (PhCCH), 52.2 (CO₂CH₃), 41.0 (PhCH₂)



138

2-[1-(1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-4,7,10-*tert*-butylester)]- γ -butyrolacton

Zu 60 mg (0.35 mmol) 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan (Cyclen) und 48 mg K_2CO_3 in 10 mL DMF werden 36 μ L (0.46 mmol) α -Brom- γ -butyrolacton zugegeben. Es wird 12 h bei RT gerührt und anschließend werden 152 μ L (1.15 mmol) Bromessigsäure-*tert*butylester zugegeben und nochmals für 3 h bei RT gerührt. Anschließend wird das LM entfernt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel DCM/MeOH = 30:1) gereinigt. Man erhält 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-4,7,10-*tert*-butylester-1-(4-Acetylphenyl)-essigsäuremethylester **129** weißen Feststoff.

Ausbeute 85 mg (0.14, 41 %)

R_f [DCM/MeOH (15:1)] = 0.31

ESI-MS: 599.4 ($M+H^+$), 621.4 ($M+Na^+$)

1H -NMR ($CDCl_3$, 250 MHz, 300 K):

4.52 (t, 3H, CH_2CH), 4.0-4.08 (m, 2H, OCH_2CH_2), 3.48-2.08 (m, 24 H, $4x(CH_2)_2N$, $3xCH_2CO_2tBu$, OCH_2CH_2CH), 1.46 (s, 27 H, $3xCO_2C(CH_3)_3$)

10 ANHANG

Tab. 10.1: pK_D -Werte von oligomeren SST-Analoga an isolierten Membranen von CCL-39 Fibroblasten.

Verbindung	pK_D	pK_D	pK_D	pK_D	pK_D
	hSSTR-1	hSSTR-2	hSSTR-3	hSSTR-4	hSSTR-5
117	5.58±0.17	8.96±0.07	7.37±0.02	6.65±0.05	7.63±0.02
118	<6	9.02±0.13	6.50±0.09	6.92±0.05	7.30±0.01
119	<6	7.90±0.06	5.53±0.22	5.84±0.02	6.47±0.11
120	<6	8.19±0.06	5.54±0.18	6.27±0.16	6.61±0.06
121	<6	8.10±0.04	5.43±0.20	6.28±0.13	6.55±0.08
122	<6	8.01±0.10	5.57±0.13	6.41±0.13	6.49±0.10
124	<6	8.10±0.07	5.42±0.17	6.08±0.04	6.48±0.09
126	<6	8.18±0.06	5.62±0.17	6.22±0.05	6.71±0.02

11 LITERATUR

- [1] F. Sörgel, C. Landersdorfer, J. Bulitta, B. Keppler, *Nachrichten aus der Chemie* **2004**, 52, 755-884.
- [2] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, 23, 3-25.
- [3] H. Kubinyi, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 665-668.
- [4] W. P. Walters, A. Murcko, M. A. Murcko, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 384-387.
- [5] C. Hansch, P. P. Maloney, T. Fujita, R. M. Muir, *Nature* **1962**, 194, 178-180.
- [6] C. Hansch, T. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 1616-1626.
- [7] A. K. Ghose, G. M. Crippen, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1987**, 27, 21-35.
- [8] M. F. Hebert, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, 27, 201-214.
- [9] P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3714-3717.
- [10] G. Cruciani, M. Pastor, W. Guba, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, 11 Suppl 2, S29-39.
- [11] D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2615-2623.
- [12] D. C. Rees, M. Congreve, C. W. Murray, R. Carr, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 660-672.
- [13] H. J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Verlag, Heidelberg, **1996**.
- [14] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, 69, 11-25.
- [15] J. W. Tamkun, D. W. DeSimone, D. Fonda, R. S. Patel, C. Buck, A. F. Horwitz, R. O. Hynes, *Cell* **1986**, 46, 271-282.
- [16] E. M. Erb, K. Tangemann, B. Bohrmann, B. Muller, J. Engel, *Biochemistry* **1997**, 36, 7395-7402.
- [17] S. K. Akiyama, E. Hasegawa, T. Hasegawa, K. M. Yamada, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 13256-13260.
- [18] G. P. Curley, H. Blum, M. J. Humphries, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, 56, 427-441.
- [19] A. T. Fazleabas, J. J. Kim, *Science* **2003**, 299, 355-356.
- [20] A. G. Arroyo, J. T. Yang, H. Rayburn, R. O. Hynes, *Immunity* **1999**, 11, 555-566.
- [21] H. Jin, J. Varner, *Brit. J. Cancer* **2004**, 90, 561-565.
- [22] H. Kikkawa, M. Kaihou, N. Horaguchi, T. Uchida, H. Imafuku, A. Takiguchi, Y. Yamazaki, C. Koike, R. Kuruto, T. Kakiuchi, H. Tsukada, Y. Takada, N. Matsuura, N. Oku, *Clin. Exp. Metastasis* **2002**, 19, 717-725.
- [23] P. F. Bray, *Thrombosis and Haemostasis* **1999**, 82, 337-344.
- [24] M. Chorev, R. Dresnerpollack, Y. Eshel, M. Rosenblatt, *Biopolymers* **1995**, 37, 367 - 375.
- [25] D. A. Hamerski, S. A. Santoro, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **1999**, 8, 9 - 14.
- [26] M. J. Humphries, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 311-340.
- [27] C. M. Isacke, M. A. Horton, in *The Adhesion Molecule FactsBook*, 2 ed., Academic Press, San Diego, **2000**, pp. 149-211.
- [28] J. A. Eble, in *Integrin-Ligand Interaction* (Eds.: J. A. Eble, K. Kühn), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 1-40.
- [29] J. Samanen, Z. Jonak, D. Rieman, T. L. Yue, *Curr. Pharmaceutical Design* **1997**, 3, 545-584.
- [30] M. Pfaff, in *Integrin-Ligand Interaction* (Ed.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 101-121.

- [31] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697-715.
- [32] R. O. Hynes, *Cell* **2002**, *110*, 673-687.
- [33] J.-P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2001**, *294*, 339-345.
- [34] L. Marinelli, K. E. Gottschalk, A. Meyer, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4166-4177.
- [35] B. P. Feuston, J. C. Culberson, G. D. Hartman, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5316-5325.
- [36] M. J. Humphries, P. A. McEwan, S. J. Barton, P. A. Buckley, J. Bella, A. P. Mould, *Trends Biochem.Sci.* **2003**, *28*, 313-320.
- [37] J. Bella, H. M. Berman, *Structure* **2000**, *8*, R121 - R126.
- [38] K. E. Gottschalk, R. Günther, H. Kessler, *Chembiochem* **2002**, *5*, 470-473.
- [39] K. E. Gottschalk, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 3767-3774.
- [40] N. Beglova, S. C. Blacklow, J. Takagi, T. A. Springer, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 282-287.
- [41] J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, *296*, 151-155.
- [42] T. A. Springer, *Nature* **1990**, *346*, 425-434.
- [43] T. A. Springer, *Cell* **1994**, *76*, 301-314.
- [44] V. Grabovsky, S. Feigelson, C. Chen, D. A. Bleijs, A. Peled, G. Cinamon, F. Baleux, F. Arenzana-Seisdedos, T. Lapidot, Y. van Kooyk, R. R. Lobb, R. Alon, *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 495-505.
- [45] A. J. Grant, P. F. Lalor, S. G. Hubscher, M. Briskin, D. H. Adams, *Hepatology* **2001**, *33*, 1065-1072.
- [46] K. J. Hillan, K. E. Hagler, R. N. MacSween, A. M. Ryan, M. E. Renz, H. H. Chiu, R. K. Ferrier, G. L. Bird, A. P. Dhillon, L. D. Ferrell, S. Fong, *Liver* **1999**, *19*, 509-518.
- [47] W. J. Metzger, *Springer Semin. Immunopathol.* **1995**, *16*, 467-478.
- [48] H. L. Montrull, C. I. Meirovich, A. M. Strusberg, N. Y. Brizuela, *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* **1997**, *47*, 237-244.
- [49] G. Kilger, B. Holzmann, *J. Mol. Med.-Jmm.* **1995**, *73*, 347-354.
- [50] G. X. Yang, W. K. Hagmann, *Medicinal Research Reviews* **2003**, *23*, 369-392.
- [51] L. L. Chen, A. Whitty, R. R. Lobb, S. P. Adams, R. B. Pepinsky, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 13167-13175.
- [52] N. Wagner, J. Lohler, E. J. Kunkel, K. Ley, E. Leung, G. Krissansen, K. Rajewsky, W. Muller, *Nature* **1996**, *382*, 366-370.
- [53] K. J. Bayless, G. A. Meininger, J. M. Scholtz, G. E. Davis, *J. Cell Sci.* **1998**, *111* (Pt 9), 1165-1174.
- [54] K. J. Bayless, G. E. Davis, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 13483-13489.
- [55] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30-33.
- [56] A. Komoriya, L. J. Green, M. Mervic, S. S. Yamada, K. M. Yamada, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15075-15079.
- [57] E. M. Connor, M. J. Eppihimer, Z. Morise, D. N. Granger, M. B. Grisham, *J. Leukocyte Biol.* **1999**, *65*, 349-355.
- [58] R. H. Vonderheide, T. F. Tedder, T. A. Springer, D. E. Staunton, *J. Cell Biol.* **1994**, *125*, 215-222.
- [59] L. Osborn, C. Vassallo, C. D. Benjamin, *J. Exp. Med.* **1992**, *176*, 99-107.
- [60] J. L. Viney, S. Jones, H. H. Chiu, B. Lagrimas, M. E. Renz, L. G. Presta, D. Jackson, K. J. Hillan, S. Lew, S. Fong, *J. Immunol.* **1996**, *157*, 2488-2497.
- [61] M. J. Briskin, L. Rott, E. C. Butcher, *J. Immunol.* **1996**, *156*, 719-726.
- [62] J. H. Wang, R. B. Pepinsky, T. Stehle, J. H. Liu, M. Karpusas, B. Browning, L. Osborn, *Proc. Natl Acad. .Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 5714-5718.

- [63] E. Y. Jones, K. Harlos, M. J. Bottomley, R. C. Robinson, P. C. Driscoll, R. M. Edwards, J. M. Clements, T. J. Dudgeon, D. I. Stuart, *Nature* **1995**, *373*, 539-544.
- [64] J. Dando, K. W. Wilkinson, S. Ortlepp, D. J. King, R. L. Brady, *Acta Cryst. D* **2002**, *58*, 233-241.
- [65] K. Tan, J. M. Casasnovas, J. H. Liu, M. J. Briskin, T. A. Springer, J. H. Wang, *Structure* **1998**, *6*, 793-801.
- [66] J. M. Drazen, E. Israel, P. M. O'Byrne, *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 197-206.
- [67] G. A. Fitzgerald, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 879-890.
- [68] M. Feldmann, P. Charles, P. Taylor, R. N. Maini, *Sem. in Immunopathology* **1998**, *20*, 211-228.
- [69] J. W. Tilley, A. Sidduri, *Drugs of the Future* **2001**, *26*, 985-998.
- [70] H. Yusuf-Makagiansar, M. E. Anderson, T. V. Yakovleva, J. S. Murray, T. J. Siahaan, *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 146-167.
- [71] U. H. von Andrian, B. Engelhardt, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 68-72.
- [72] P. Vanderslice, R. J. Biediger, D. G. Woodside, K. L. Berens, G. W. Holland, R. A. F. Dixon, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **2004**, *17*, 1-10.
- [73] W. J. Sandborn, T. A. Yednock, *Am. J. Gastroenterology* **2003**, *98*, 2372-2382.
- [74] P. Drillenburger, R. vanderVoort, G. Koopman, B. Dragosics, J. vanKrieken, P. Kluin, J. Meenan, A. I. Lazarovits, T. Radaszkiewicz, S. T. Pals, *Am. J. Pathology* **1997**, *150*, 919-927.
- [75] B. Holzmann, U. Gossler, M. Bittner, in *Leukocyte Integrins in the Immune System and Malignant Disease, Vol. 231*, **1998**, pp. 125-141.
- [76] M. R. Arkin, J. A. Wells, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 301-317.
- [77] P. Vanderslice, K. Ren, J. K. Revelle, D. C. Kim, D. Scott, R. J. Bjercke, E. T. Yeh, P. J. Beck, T. P. Kogan, *J. Immunol.* **1997**, *158*, 1710-1718.
- [78] K.-C. Lin, A. C. Castro, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 453-457.
- [79] D. Y. Jackson, *Curr. Pharmaceutical Design* **2002**, *8*, 1229-1253.
- [80] D. Gottschling, J. Boer, L. Marinelli, G. Voll, M. Haupt, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler, *Chembiochem* **2002**, *3*, 575-578.
- [81] D. Gottschling, J. Boer, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2002**, *41*, 3007-3011.
- [82] W. M. Abraham, A. Ahmed, M. W. Sielczak, M. Narita, T. Arrhenius, M. J. Elices, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1997**, *156*, 696-703.
- [83] A. B. Dyatkin, W. J. Hoekstra, W. A. Kinney, M. Kontoyianni, R. J. Santulli, E. S. Kimball, M. C. Fisher, S. M. Prouty, W. M. Abraham, P. Andrade-Gordon, D. J. Hlasta, W. He, P. J. Hornby, B. P. Damiano, B. E. Maryanoff, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 591-596.
- [84] T. M. Kamenecka, Y. J. Park, L. S. Lin, S. de Laszlo, E. D. McCauley, G. Van Riper, L. Egger, U. Kidambi, R. A. Mumford, S. Tong, W. Tang, A. Colletti, Y. Teffera, R. Stearns, M. MacCoss, J. A. Schmidt, W. K. Hagmann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2323-2326.
- [85] P. S. Farmer, in *Drug Design* (Ed.: E. J. Ariens), Academic Press, New York, **1980**, pp. 119-143.
- [86] R. Hirschmann, P. A. Sprengeler, T. Kawasaki, J. W. Leahy, W. C. Shakespeare, A. B. Smith, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3665-3676.
- [87] J. Ohkanda, J. W. Lockman, M. A. Kothare, Y. M. Qian, M. A. Blaskovich, S. M. Sebt, A. D. Hamilton, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 177-188.
- [88] G. T. Le, G. Abbenante, B. Becker, M. Grathwohl, J. Halliday, G. Tometzki, J. Zuegg, W. Meutermans, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 701-709.
- [89] R. Hirschmann, K. C. Nicolaou, S. Pietranico, E. M. Leahy, J. Salvino, B. Arison, M. A. Cichy, P. G. Spoors, W. C. Shakespeare, P. A. Sprengeler, P. Hamley, A. B. Smith,

- T. Reisine, K. Raynor, L. Maechler, C. Donaldson, W. Vale, R. M. Freidinger, M. R. Cascieri, C. D. Strader, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12550-12568.
- [90] R. Hirschmann, K. C. Nicolaou, S. Pietranico, J. Salvino, E. M. Leahy, P. A. Sprengeler, G. Furst, A. B. Smith, C. D. Strader, M. A. Cascieri, M. R. Candelore, C. Donaldson, W. Vale, L. Maechler, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9217-9218.
- [91] R. Hirschmann, J. Hynes, M. A. Cichy-Knight, R. D. van Rijn, P. A. Sprengeler, P. G. Spoor, W. C. Shakespeare, S. Pietranico-Cole, J. Barbosa, J. Liu, W. Q. Yao, S. Rohrer, A. B. Smith, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1382-1391.
- [92] K. C. Nicolaou, J. I. Trujillo, K. Chibale, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 8751-8778.
- [93] J. Wermuth, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1328 - 1335.
- [94] N. Moitessier, S. Dufour, F. Chretien, J. P. Thiery, B. Maigret, Y. Chapleur, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 511-523.
- [95] P. V. Murphy, J. L. O'Brien, L. J. Gorey-Feret, A. B. Smith, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2259-2271.
- [96] F. Chery, P. V. Murphy, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2067-2069.
- [97] M. J. Sofia, R. Hunter, T. Y. Chan, A. Vaughan, R. Dulina, H. Wang, D. Gange, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2802-2803.
- [98] T. Opatz, C. Kallus, T. Wunberg, W. Schmidt, S. Henke, H. Kunz, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2089-2110.
- [99] T. Opatz, C. Kallus, T. Wunberg, W. Schmidt, S. Henke, H. Kunz, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1527-1536.
- [100] U. Hunger, J. Ohnsmann, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 1104-1107.
- [101] C. H. Wong, X. S. Ye, Z. Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7137-7138.
- [102] J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, M. Semmrich, B. Holzmann, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2586-2592.
- [103] J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3988-3991.
- [104] E. Locardi, J. Boer, A. Modlinger, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5752-5762.
- [105] J. R. Porter, S. C. Archibald, J. A. Brown, K. Childs, D. Critchley, J. C. Head, T. A. H. Parton, M. K. Robinson, A. Shock, R. J. Taylor, G. J. Warreallow, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 805-808.
- [106] G. C. B. Harriman, C. F. Schwender, D. Gallant, N. A. Cochran, M. J. Briskin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1497-1499.
- [107] H. P. Qin, T. B. Grindley, *J. Carbohydrate Chem.* **1994**, *13*, 475-490.
- [108] S. V. Ley, H. W. M. Priepke, S. L. Warriner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2290-2292.
- [109] K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, F. DeRoose, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 449-450.
- [110] A. M. Kolodziejczyk, M. Manning, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1944-1946.
- [111] W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 957.
- [112] K. Bock, C. Pedersen, *J. Chem. Soc. Perk. T 2* **1974**, 293-299.
- [113] R. R. Schmidt, W. Kinzy, in *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.*, Vol. 50, **1994**, pp. 21-123.
- [114] K. Jansson, G. Noori, G. Magnusson, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3181-3185.
- [115] L. Dheilly, C. Frechou, D. Beaupere, R. Uzan, G. Demailly, *Carbohydrate Res.* **1992**, *224*, 301-306.
- [116] S. Hanessian, A. G. Pernet, *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 1266-1279.
- [117] H. N. Shroff, C. F. Schwender, A. D. Baxter, F. Brookfield, L. J. Payne, N. A. Cochran, D. L. Gallant, M. J. Briskin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1601-1606.

- [118] M. V. Knopp, H. von Tengg-Kobligk, P. L. Choyke, *Mol. Cancer Ther.* **2003**, 2, 419-426.
- [119] D. Artemov, *J. Cell Biochem.* **2003**, 90, 518-524.
- [120] V. Ntziachristos, C. H. Tung, C. Bremer, R. Weissleder, *Nat. Med.* **2002**, 8, 757-760.
- [121] M. Rudin, R. Weissleder, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 123-131.
- [122] W. A. Weber, N. Avril, M. Schwaiger, *Strahlenther. Onkol.* **1999**, 175, 356-373.
- [123] Z. Keidar, O. Israel, Y. Krausz, *Semin. Nucl. Med.* **2003**, 33, 205-218.
- [124] D. E. Milenic, E. D. Brady, M. W. Brechbiel, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 488-499.
- [125] C. Emmanouilides, *Semin. Oncol.* **2003**, 30, 531-544.
- [126] O. H. Aina, T. C. Sroka, M. L. Chen, K. S. Lam, *Biopolymers* **2002**, 66, 184-199.
- [127] R. E. Weiner, M. L. Thakur, *Appl. Radiat. Isot.* **2002**, 57, 749-763.
- [128] J. Fichna, A. Janecka, *Bioconjug. Chem.* **2003**, 14, 3-17.
- [129] J. A. Katzenellenbogen, *J. Nucl. Med.* **1995**, 36, S8-S13.
- [130] H. Anderson, P. Price, *Eur. J. Cancer* **2000**, 36, 2028-2035.
- [131] P. Rigo, P. Paulus, B. J. Kaschten, R. Hustinx, T. Bury, G. Jerusalem, T. Benoit, J. Foidart-Willems, *Eur. J. Nucl. Med.* **1996**, 23, 1641-1674.
- [132] M. Glaser, S. K. Luthra, F. Brady, *Int. J. Oncol.* **2003**, 22, 253-267.
- [133] L. Varagnolo, M. P. Stokkel, U. Mazzi, E. K. Pauwels, *Nucl. Med. Biol.* **2000**, 27, 103-112.
- [134] H. Lundqvist, V. Tolmachev, *Biopolymers* **2002**, 66, 381-392.
- [135] E. P. Krenning, D. J. Kwekkeboom, W. H. Bakker, W. A. Breeman, P. P. Kooij, H. Y. Oei, M. van Hagen, P. T. Postema, M. de Jong, J. C. Reubi, et al., *Eur. J. Nucl. Med.* **1993**, 20, 716-731.
- [136] M. Gotthardt, M. Fischer, I. Naeher, J. B. Holz, H. Jungclas, H. W. Fritsch, M. Behe, B. Goke, K. Joseph, T. M. Behr, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2002**, 29, 597-606.
- [137] T. M. Behr, M. P. Behe, *Semin. Nucl. Med.* **2002**, 32, 97-109.
- [138] E. Garcia-Garayoa, P. Blauenstein, M. Bruehlmeier, A. Blanc, K. Iterbeke, P. Conrath, D. Tourwe, P. A. Schubiger, *J. Nucl. Med.* **2002**, 43, 374-383.
- [139] F. Orlandi, P. Caraci, A. Mussa, E. Saggiorato, G. Pancani, A. Angeli, *Endocr. Relat. Cancer* **2001**, 8, 135-147.
- [140] M. de Jong, W. A. Breeman, B. F. Bernard, W. H. Bakker, M. Schaar, A. van Gameren, J. E. Bugaj, J. Erion, M. Schmidt, A. Srinivasan, E. P. Krenning, *Int. J. Cancer* **2001**, 92, 628-633.
- [141] O. Ugur, P. J. Kothari, R. D. Finn, P. Zanzonico, S. Ruan, I. Guenther, H. R. Maecke, S. M. Larson, *Nucl. Med. Biol.* **2002**, 29, 147-157.
- [142] J. Carlsson, E. Forssell Aronsson, S. O. Hietala, T. Stigbrand, J. Tennvall, *Radiother. Oncol.* **2003**, 66, 107-117.
- [143] B. M. Tashtoush, A. A. Traboulsi, L. Dittert, A. A. Hussain, *Anal. Biochem.* **2001**, 288, 16-21.
- [144] P. J. Fraker, J. C. Speck, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1978**, 80, 849-857.
- [145] W. H. Oldendorf, *Am. J. Physiol.* **1973**, 224, 967-969.
- [146] A. A. Wilson, R. F. Dannals, H. T. Ravert, J. J. Frost, H. N. Wagner Jr., *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1057-1062.
- [147] G. Vaidyanathan, D. J. Affleck, J. Li, P. Welsh, M. R. Zalutsky, *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, 428-438.
- [148] G. Espuna, G. Arsequell, G. Valencia, J. Barluenga, J. M. Alvarez-Gutierrez, A. Ballesteros, J. M. Gonzalez, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2004**, 43, 325-329.
- [149] M. Ogawa, K. Hatano, S. Oishi, Y. Kawasumi, N. Fujii, M. Kawaguchi, R. Doi, M. Imamura, M. Yamamoto, K. Ajito, T. Mukai, H. Saji, K. Ito, *Nucl. Med. Biol.* **2003**, 30, 1-9.

- [150] R. Haubner, H.-J. Wester, W. A. Weber, C. Mang, S. I. Ziegler, S. L. Goodman, R. Senekowitsch-Schmidtke, H. Kessler, M. Schwaiger, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1781-1785.
- [151] D. S. Wilbur, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 433-470.
- [152] T. Poethko, M. Schottelius, G. Thumshirn, U. Hersel, M. Herz, G. Henriksen, H. Kessler, M. Schwaiger, H. J. Wester, *J. Nucl. Med.* **2004**, *45*, 892-902.
- [153] S. Liu, D. S. Edwards, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 7-34.
- [154] M. W. Brechbiel, O. A. Gansow, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 187-194.
- [155] Y. H. Jang, M. Blanco, S. Dasgupta, D. A. Keire, J. E. Shively, W. A. Goddard, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6142-6151.
- [156] M. Li, C. F. Meares, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 275-283.
- [157] T. J. McMurry, M. Brechbiel, K. Kumar, O. A. Gansow, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 108-117.
- [158] K. P. Eisenwiener, P. Powell, H. R. Mäcke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2133-2135.
- [159] M. Oliver, M. R. Jorgensen, A. D. Miller, *Synlett* **2004**, 453-456.
- [160] L. M. De Leon-Rodriguez, Z. Kovacs, G. R. Dieckmann, A. D. Sherry, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1149-1155.
- [161] N. Delesque, L. Buscail, J. P. Esteve, N. Saint-Laurent, C. Muller, G. Weckbecker, C. Bruns, N. Vaysse, C. Susini, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 956-962.
- [162] S. Reichlin, *N. Engl. J. Med.* **1983**, *309*, 1556-1563.
- [163] S. Reichlin, *N. Engl. J. Med.* **1983**, *309*, 1495-1501.
- [164] P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, R. Guillemin, *Science* **1973**, *179*, 77-79.
- [165] R. Benoit, F. Esch, H. P. Bennett, N. Ling, M. Ravazzola, L. Orci, E. J. Mufson, *Metabolism* **1990**, *39*, 22-25.
- [166] Y. C. Patel, *Front. Neuroendocrinol.* **1999**, *20*, 157-198.
- [167] G. Weckbecker, I. Lewis, R. Albert, H. A. Schmid, D. Hoyer, C. Bruns, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 999-1017.
- [168] K. Davidson, G. E. Gillies, *Brain. Res.* **1993**, *624*, 75-84.
- [169] G. Gillies, *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 87-95.
- [170] W. Meyerhof, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1998**, *133*, 55-108.
- [171] J. C. Reubi, B. Waser, J. C. Schaer, J. A. Laissue, *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, *28*, 836-846.
- [172] J. C. Reubi, J. C. Schaer, B. Waser, G. Mengod, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 3455-3459.
- [173] I. Virgolini, T. Pangerl, C. Bischof, P. Smith-Jones, M. Peck-Radosavljevic, *Eur. J. Clin. Invest.* **1997**, *27*, 645-647.
- [174] P. Jais, B. Terris, P. Ruszniewski, M. LeRomancer, F. Reyl-Desmars, C. Vissuzaine, G. Cadiot, M. Mignon, M. J. Lewin, *Eur. J. Clin. Invest.* **1997**, *27*, 639-644.
- [175] D. Liu, G. Martino, M. Thangaraju, M. Sharma, F. Halwani, S. H. Shen, Y. C. Patel, C. B. Srikant, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9244-9250.
- [176] C. B. Srikant, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *209*, 400-406.
- [177] G. Weckbecker, F. Raulf, L. Tolcsvai, C. Bruns, *Digestion* **1996**, *57 Suppl 1*, 22-28.
- [178] Z. Csaba, V. Bernard, L. Helboe, M. T. Bluet-Pajot, B. Bloch, J. Epelbaum, P. Dournaud, *Mol. Cell Neurosci.* **2001**, *17*, 646-661.
- [179] L. J. Hofland, S. W. Lamberts, *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 28-47.
- [180] R. C. Patel, U. Kumar, D. C. Lamb, J. S. Eid, M. Rocheville, M. Grant, A. Rani, T. Hazlett, S. C. Patel, E. Gratton, Y. C. Patel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 3294-3299.
- [181] M. Rocheville, D. C. Lange, U. Kumar, R. Sasi, R. C. Patel, Y. C. Patel, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 7862-7869.

- [182] B. O. Boehm, *Expert Opin. Investig. Drugs* **2003**, *12*, 1501-1509.
- [183] A. Fioravanti, M. Govoni, G. La Montagna, G. Perpignano, G. Tirri, F. Trotta, A. Bogliolo, A. Ciocci, M. T. Mauceri, R. Marcolongo, *Drugs Exp. Clin. Res.* **1995**, *21*, 97-103.
- [184] W. W. de Herder, S. W. Lamberts, *Endocrine* **2003**, *20*, 285-290.
- [185] Y. C. Patel, T. Wheatley, *Endocrinology* **1983**, *112*, 220-225.
- [186] S. Froidevaux, A. N. Eberle, *Biopolymers* **2002**, *66*, 161-183.
- [187] W. Bauer, U. Briner, W. Doepfner, R. Haller, R. Huguenin, P. Marbach, T. J. Petcher, Pless, *Life. Sci.* **1982**, *31*, 1133-1140.
- [188] R. Z. Cai, T. Karashima, J. Guoth, B. Szoke, D. Olsen, A. V. Schally, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 2502-2506.
- [189] S. W. Lamberts, W. H. Bakker, J. C. Reubi, E. P. Krenning, *N. Engl. J. Med.* **1990**, *323*, 1246-1249.
- [190] T. M. Behr, D. M. Goldenberg, W. Becker, *Eur. J. Nucl. Med.* **1998**, *25*, 201-212.
- [191] M. de Jong, W. A. Breeman, W. H. Bakker, P. P. Kooij, B. F. Bernard, L. J. Hofland, T. J. Visser, A. Srinivasan, M. A. Schmidt, J. L. Erion, J. E. Bugaj, H. R. Macke, E. P. Krenning, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 437-441.
- [192] J. S. Lewis, M. R. Lewis, A. Srinivasan, M. A. Schmidt, J. Wang, C. J. Anderson, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1341-1347.
- [193] H. J. Wester, M. Schottelius, T. Poethko, K. Bruus-Jensen, M. Schwaiger, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2004**, *19*, 231-244.
- [194] M. Schottelius, H. J. Wester, J. C. Reubi, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Schwaiger, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1021-1030.
- [195] H. J. Wester, M. Schottelius, K. Scheidhauer, J. C. Reubi, I. Wolf, M. Schwaiger, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2002**, *29*, 28-38.
- [196] M. De Jong, R. Valkema, F. Jamar, L. K. Kvols, D. J. Kwekkeboom, W. A. Breeman, W. H. Bakker, C. Smith, S. Pauwels, E. P. Krenning, *Semin. Nucl. Med.* **2002**, *32*, 133-140.
- [197] D. J. Kwekkeboom, W. H. Bakker, B. L. Kam, J. J. Teunissen, P. P. Kooij, W. W. de Herder, R. A. Feelders, C. H. van Eijck, M. de Jong, A. Srinivasan, J. L. Erion, E. P. Krenning, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30*, 417-422.
- [198] W. A. Breeman, K. van der Wansem, B. F. Bernard, A. van Gameren, J. L. Erion, T. J. Visser, E. P. Krenning, M. de Jong, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30*, 312-315.
- [199] W. Mier, K. A. N. Graham, Q. Wang, S. Kramer, J. Hoffend, M. Eisenhut, U. Haberkorn, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5453-5455.
- [200] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696-703.
- [201] L. L. Kiessling, N. L. Pohl, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 71-77.
- [202] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
- [203] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755-2794.
- [204] J. E. Gestwicki, L. L. Kiessling, *Nature* **2002**, *415*, 81-84.
- [205] J. R. Cochran, L. J. Stern, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 683-696.
- [206] E. K. Woller, M. J. Cloninger, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 7-10.
- [207] G. Maheshwari, G. Brown, D. A. Lauffenburger, A. Wells, L. G. Griffith, *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 1677-1686.
- [208] C. W. Cairo, J. E. Gestwicki, M. Kanai, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1615-1619.
- [209] J. R. Allen, C. R. Harris, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1890-1897.

- [210] R. E. Bruehl, F. Dasgupta, T. R. Katsumoto, J. H. Tan, C. R. Bertozzi, W. Spevak, D. J. Ahn, S. D. Rosen, J. O. Nagy, *Biochemistry* **2001**, *40*, 5964-5974.
- [211] J. D. Reuter, A. Myc, M. M. Hayes, Z. Gan, R. Roy, D. Qin, R. Yin, L. T. Piehler, R. Esfand, D. A. Tomalia, J. R. Baker, Jr., *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 271-278.
- [212] P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669-672.
- [213] R. J. Kok, A. J. Schraa, E. J. Bos, H. E. Moorlag, S. A. Asgeirsdottir, M. Everts, D. K. Meijer, G. Molema, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 128-135.
- [214] H. Kessler, A. Haupt, M. Schudok, in *Peptide Chemistry 1987 (Proc. Jap. Symp. on Peptide Chemistry)* (Eds.: T. Shiba, S. Sakakibara), Protein Research Foundation, Osaka, Japan, **1988**, pp. 627-630.
- [215] H. D. Maynard, S. Y. Okada, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1275-1279.
- [216] H. F. S. E. Stiriba, R. Haag, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1385-1390.
- [217] J. Vagner, H. L. Handl, R. J. Gillies, V. J. Hruby, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 211-215.
- [218] Y. Brandenburger, K. Rose, C. Bagutti, A. N. Eberle, *J. Recept. Signal Transduct. Res* **1999**, *19*, 467-480.
- [219] R. Duncan, F. Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.* **1994**, *27*, 290-306.
- [220] H. Maeda, Y. Matsumura, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1989**, *6*, 193-210.
- [221] R. Haag, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2004**, *43*, 278-282.
- [222] R. Haubner, H. J. Wester, *Curr. Pharmaceutical Design* **2004**, *10*, 1439-1455.
- [223] G. Thumshirn, U. Hersel, H. Kessler, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2717-2725.
- [224] G. Thumshirn, U. Hersel, T. Poethko, F. Rau, R. Haubner, H. Schwaiger, H. J. Wester, H. Kessler, *Biopolymers* **2003**, *71*, pp. 477.
- [225] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-&.
- [226] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3045-&.
- [227] E. Bayer, *Angew. Chem. Int. Edit.* **1991**, *30*, 113-129.
- [228] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-&.
- [229] S. Y. Han, Y. A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- [230] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
- [231] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2024 - 2033.
- [232] L. A. Thompson, J. Ellman, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9333-9335.
- [233] N. A. Solé, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5399-5403.
- [234] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739-2742.
- [235] J. P. Tam, J. Xu, K. D. Eom, *Biopolymers* **2001**, *60*, 194-205.
- [236] P. E. Dawson, S. B. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923-960.
- [237] K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.
- [238] J. Shao, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3893-3899.
- [239] D. Boturyn, J. L. Coll, E. Garanger, M. C. Favrot, P. Dumy, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5730-5739.
- [240] D. Forget, D. Boturyn, E. Defrancq, J. Lhomme, P. Dumy, *Chem.- Eur. J.* **2001**, *7*, 3976-3984.
- [241] O. Renaudet, P. Dumy, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 243-246.
- [242] G. Tuchscherer, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8419-8422.
- [243] G. Tuchscherer, D. Grell, M. Mathieu, M. Mutter, *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 185-194.
- [244] M. Kurth, A. Pelegrin, K. Rose, R. E. Offord, S. Pochon, J. P. Mach, F. Buchegger, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1255-1261.
- [245] F. Wahl, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6861-6864.

- [246] L. E. Canne, A. R. Ferré-D'Amaré, S. K. Burley, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*.
- [247] L. S. Zhang, T. R. Torgerson, X. Y. Liu, S. Timmons, A. D. Colosia, J. Hawiger, J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 9184-9189.
- [248] H. F. Gaertner, K. Rose, R. Cotton, D. Timms, R. Camble, R. E. Offord, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 262-268.
- [249] K. F. Geoghegan, J. G. Stroh, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 138-146.
- [250] K. Sadler, J. P. Tam, *J. Biotechnol.* **2002**, *90*, 195-229.
- [251] Y. Kim, F. W. Zeng, S. C. Zimmerman, *Chem.-Eur. J.* **1999**, *5*, 2133-2138.
- [252] S. J. E. Mulders, Brouwer, A. J., van der Meer, P. G. J., Liskamp, M. J., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 631-634.
- [253] S. J. E. Mulders, Brouwer, A. J., Liskamp, R. M. J., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3085-3088.
- [254] S. R. Chhabra, B. Hothi, D. J. Evans, P. D. White, B. W. Bycroft, W. C. Chan, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1603-1606.
- [255] J. Katajisto, T. Karskela, P. Heinonen, H. Lonnberg, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7995-8001.
- [256] R. D. Glick, P. L. Toogood, D. C. Wiley, J. J. Skehel, J. R. Knowles, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 23660-23669.
- [257] J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 5409-5413.
- [258] P. Veprek, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 203-220.
- [259] F. J. Dekker, N. J. de Mol, J. van Ameijde, M. J. E. Fischer, R. Ruijtenbeek, F. A. M. Redegeld, R. M. J. Liskamp, *Chembiochem* **2002**, *3*, 238-242.
- [260] G. D. Glick, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4701-4703.
- [261] G. Loidl, H. J. Musiol, M. Groll, R. Huber, L. Moroder, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 36-46.
- [262] X. Chen, R. Park, A. H. Shahinian, J. R. Bading, P. S. Conti, *Nucl. Med. Biol.* **2004**, *31*, 11-19.
- [263] J. M. Harris, R. B. Chess, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 214-221.
- [264] D. Boumrah, M. M. Campbell, S. Fenner, R. G. Kinsman, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6977-6992.
- [265] M. Ito, Koyakumar, K., Ohta, T., Takaya, H., *Synthesis* **1995**, *?*, 376-378.
- [266] Y. Yoshida, Sakakura, Y., Aso, N., Okada, S., Tanabe, Y., *Tetrahedron* **1999**, *55*, 2183-2192.
- [267] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- [268] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1973**, *106*, 3626 - 3635.
- [269] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, G. Gillissen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927 - 1930.
- [270] Y. Han, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4307-4312.
- [271] C. Bure, D. Lelievre, A. Delmas, *Rapid Commun. Mass Sp.* **2000**, *14*, 2158-2164.
- [272] J. P. Tam, C. R. Wu, W. Liu, J. W. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6657-6662.
- [273] B. W. Bycroft, W. C. Chan, S. R. Chhabra, N. D. Hone, *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1993**, 778-779.
- [274] C. Grandjean, H. Gras-Masse, O. Melnyk, *Chem.-Eur. J.* **2001**, *7*, 230-239.
- [275] C. Grandjean, V. Santraine, J. S. Fruchart, O. Melnyk, H. Gras-Masse, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 887-892.
- [276] M. Langer, F. Kratz, B. Rothen-Rutishauser, H. Wunderli-Allenspach, A. G. Beck-Sickinger, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1341-1348.
- [277] R. Huisgen, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 613-628.
- [278] R. Huisgen, R. Knorr, L. Mobius, G. Szeimies, *Chem. Ber-Recl.* **1965**, *98*, 4014-&.
- [279] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004-2021.

- [280] B. Khanetsky, D. Dallinger, C. O. Kappe, *J. Comb. Chem., in press* **2004**.
- [281] P. Wu, A. K. Feldman, A. K. Nugent, C. J. Hawker, A. Scheel, B. Voit, J. Pyun, J. M. Frechet, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 3928-3932.
- [282] L. J. Gooßen, *Chem. Comm.* **2001**, 669-670.
- [283] K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 4467-4470.
- [284] S. R. Nagarajan, B. Devadas, M. E. Zupac, S. K. Freeman, D. L. Brown, H. F. Lu, P. P. Mehta, N. S. Kishore, C. A. McWherter, D. P. Getman, J. I. Gordon, J. A. Sikorski, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1422-1438.
- [285] M. Q. Xie, T. S. Widlanski, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4443-4446.
- [286] T. Ogawa, Y. Takahashi, M. Matsui, *Carbohydrate Res.* **1982**, *102*, 207-215.