Neuartige Boronsäurekonjugate zur selektiven Kohlenhydraterkennung

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Falk Wienhold

vorgelegt dem Fachbereich Chemie der



Gießen

Oktober 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Maison

2. Gutachter: Prof. Dr. Richard Göttlich

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen März 2007 und März 2010 am Institut für Organische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen im Arbeitskreis von Prof. Dr. Wolfgang Maison durchgeführt.

Zunächst möchte ich Wolfgang Maison danken für die sehr engagierte und kontinuierliche Betreuung dieser Arbeit, den freundschaftlichen Umgang und viele hilfreiche und lehrreiche Diskussionen.

Ich danke allen Angestellten des Instituts für ihren Beitrag und ihre Unterstützung durch zahlreiche Messungen, Reparaturen, Anfertigungen, Organisation und Ratschläge.

Ein großer Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Maisonetten für ein tolles Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitsschaft und viel Spaß in und neben der Uni. Euch allen wünsche ich weiterhin viel Erfolg und hoffe wir sehen uns wieder!

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Arbeitskreisen des FB08 für den freundschaftlichen Austausch und die Hilfsbereitschaft bedanken. Ein besonderer Dank geht an Herrn Friedhoff für die Betreuung des Fluoeszenzassays, Herrn Koch für die Vermessung der Kristalle und Alexander Beitat für die Berechnung der Strukturen.

Nicht zuletzt möchte ich allen Studenten danken, die mich mit ihren Arbeiten tatkräftig unterstützt haben, darunter Carsten, Christian, Faiza, Karo, Lennart und Verena.

Meiner Familie danke ich, dass sie mir eine so intensive Beschäftigung mit den Naturwissenschaften ermöglicht haben. Es hat mir viel gegeben!

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	absolutiert
Abs	Absorption
arom	aromatisch
ARS	Alizarin red sodium
ber.	berechnet
BPA	Boronphenylalanin
CBM	Carbohydrate-binding module
CHES	*N*-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
ConA	Concanavalin A
COSY	Correlated spectroscopy
CRD	Carbohydrate recognition domain
CT B	Cholera toxin (B-subunit)
DC-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
d.r.	diastereomeric ratio
Em	Emission
Eq	Equivalent
ESI-TOF-MS	Electron spray ionisation time-of-flight mass spectrometry
F	Fluoreszenz
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
GS-1	Lektin von *Griffonia simplicifolia*
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HPA	Helix pomatia agglutinin
HPLC	High pressure liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
ID	Innendurchmesser
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge

LCA	Lektin von *Lens culinaris*
LCMS	Liquid chromatography mass spectrometry
LecA	Lektin von *Pseudomonas aeruginosa*
LecB	Lectin B
Lm.	Lösungsmittel
MBP/MBL	Mannose-binding protein/lectin
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
OXG-RCBH	Oligoxyloglucan reducing end-specific cellobiohydrolase
PBA	Phenylboronic acid
PBS	Phosphate buffer solution
PCR	Polymerase chain reaction
PDB ID	Protein database identification
PG	Protection group
PNA	Peanut agglutinin
PSA	Lektin von *Pisum sativum*
quant.	quantitativ
RSL	Rattlesnake venom lectin
RT	Raumtemperatur
sLe^x	Sialyl Lewis X
SLT B	Shiga-like toxin (B-subunit)
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TF	Thomson-Friedenreich-Antigen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v.l.n.r.	Von links nach rechts
VCC	Vibrio cholerae cytolysin
WGA	Wheat germ agglutinin
wt%	Gewichtsprozent

Inhaltsverzeichnis

0 Abstract 1

1 Einleitung 2

1.1 Die Glycocalyx 2

1.2 Glycotope 3

1.3 Lektine 4

2 Kenntnisstand 10

2.1 Nicht-kovalente Sensoren 10

2.2 Kovalente Sensoren 14

3 Aufgabenstellung 24

4 Ergebnisse und Diskussion 25

4.1 Derivate des Serins 25

4.2 Derivate des Homoserins 35

4.3 Derivate des Hydroxynorvalins 41

4.4 Triazolderivate 42

4.5 Derivate mit Linker 47

4.6 Multivalente Systeme 52

4.7 Bindungsassays 55

5 Zusammenfassung 69

6 Summary 73

7 Ausblick 77

8 Experimenteller Teil 79

8.1 Präparative Reinigung 79

8.2 Analytik 80

8.3 Nach bekannten Vorschriften synthetisierte Produkte: 82

8.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften 82

8.5 Synthese der Serinderivate 84

8.6 Synthese der Homoserinderivate 101

8.7 Synthese der Triazolderivate 106
8.8 Synthese der Linkerderivate 110
8.9 Durchführung des ARS-Assay 119
9 Anhang 121
9.1 Röntgenkristallstrukturdaten 121
9.2 Bindungskonstanten 128
9.3 Ausbeuten und ^{1}H-NMR-Daten der Aldole 46-58 129
9.4 Gefahrstoffe 131
10 Literaturverzeichnis 136

0 Abstract

Due to their enormous informational content, carbohydrates are involved in a wide range of highly selective recognition processes. In particular, glycoconjugates on cell surfaces play an essential role in the immune system, in cell communication, mobility and proliferation. As a consequence, glycotopes, which are characteristic for cancer cells or other pathogens are valuable pharmacological targets and potentially useful for diagnostics and therapy. Carbohydrate binding proteins (lectins) use multivalent interactions to selectively recognise glycotopes on cell surfaces. In contrast, carbohydrate sensing in water by small synthetic molecules still remains problematic.[1] Boronic acids are capable of covalently binding to 1,2- and 1,3-diols in water but affinities and selectivities have been low.[2]

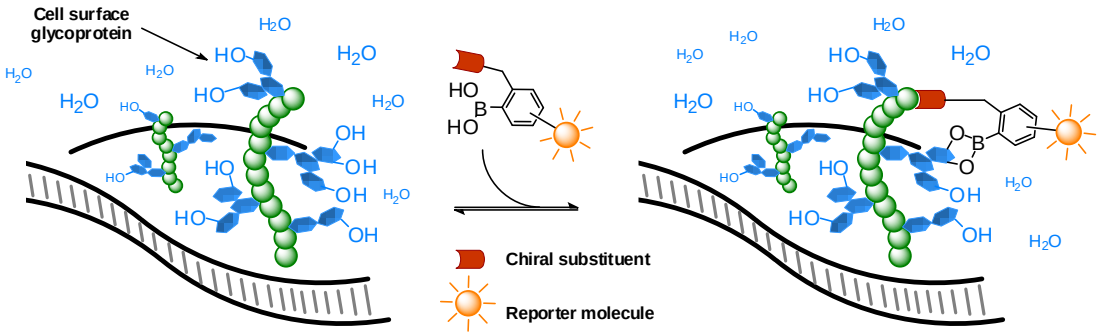


Abbildung 0-1: **Boronic acids are potential sensors for cell surface carbohydrate epitopes.**

In this work novel synthetic pathways were established to build chiral boronic acid conjugates, which display the following features (Abb. 0-2, A):

1. A β-Hydroxy group for increased carbohydrate binding activity.
2. An α-amino acid fragment facilitating the introduction of chiral residues.
3. A linker enabling ligation to a multivalent scaffold, the solid phase or a label.

The synthesised carbohydrate receptors were ligated to multivalent scaffolds, mimicing the lectin binding mode and tested in a fluorescence assay for binding activity (Abb. 0-2, B).

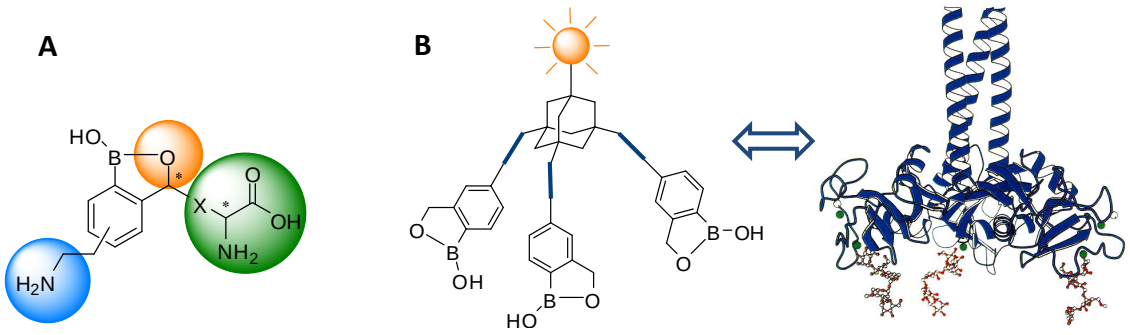


Abbildung 0-2: **A) Receptor design for carbohydrate recognition; B) Multivalent scaffolds for mimicing lectin binding mode as i.e. in the Mannose binding protein (MBP-A).**

1 Einleitung

Kohlenhydrate zählen neben Aminosäuren und Nucleobasen zu den wichtigsten Polymerbausteinen aller lebenden Organismen. In der Natur erfüllen sie eine enorme Vielfalt unterschiedlichster Funktionen, die vom rigiden Gerüstmaterial zum kompakten Energiespeicher und komplexen Informationsträger reichen. Insbesondere letztere Eigenschaft macht sie zu einer unentbehrlichen Komponente in Signal- und Kommunikationsprozessen und einer potenten Zielgruppe für die pharmazeutische Wirkstoffentwicklung.[3-5]

Auf Grund ihrer immensen strukturellen Vielfalt sind Kohlenhydrate in der Lage Informationen äußerst effizient zu codieren.[6] Während sich zwei Aminosäuren A und B lediglich auf zwei Arten verknüpfen lassen (AB und BA), ergibt die Kombination zweier Monosaccharide bereits 20 strukturisomere Disaccharide. So erklärt sich auch die geringe Anzahl an Bausteinen, die die Natur zur Verschlüsselung von Informationen benötigt. Lediglich acht Kohlenhydrate stellen den Hauptanteil der Glycocalyx und damit ein winziger Anteil aller natürlich verfügbaren Zucker (Abbildung 1).[7-8]

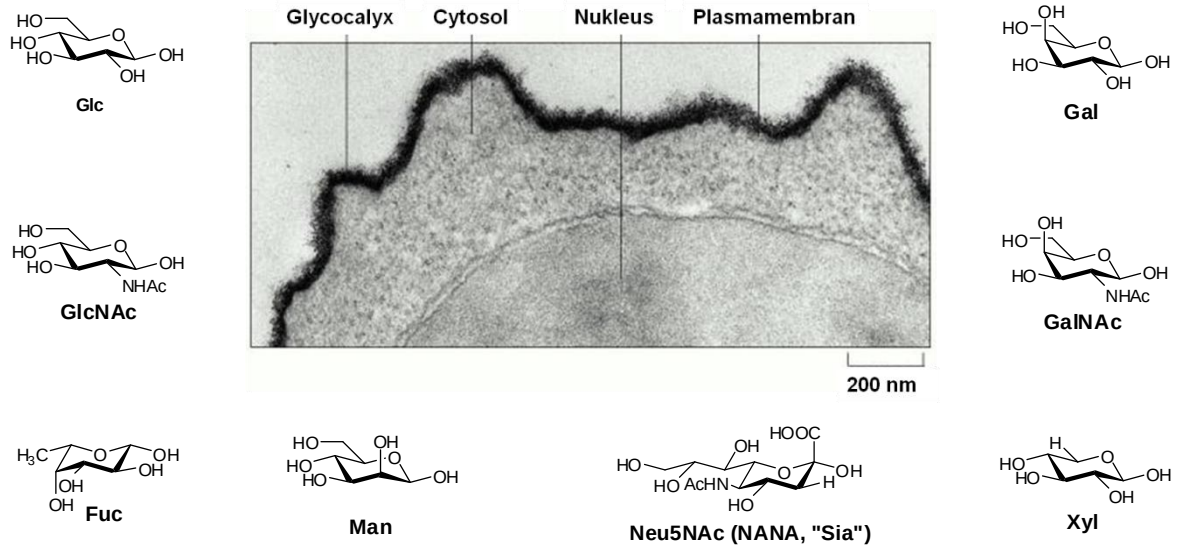


Abbildung 1-1: Darstellung der Glycocalyx mit den häufigsten Bausteinen.[9]

1.1 Die Glycocalyx

Das Glycosylierungsmuster jeder Zelloberfläche, die sog. Glycocalyx, spiegelt Typ, Differenzierungsgrad und Aktivität einer Zelle wieder.[10] Sie besteht aus einer membranständigen und einer sezernierten Schicht, die zusammen eine Stärke von bis zu 500 nm besitzen können.[11-12] Mit dieser riesigen Ausdehnung steht sie in der Interaktion mit externen Botenstoffen und anderen Zellen an erster Stelle. Beide Schichten der Glycocalyx bestehen aus Glycokonjugaten (Glycoproteinen, bzw. Glycolipiden), deren

Kohlenhydratanteil posttranslational durch Glycosyltransferasen aufgebaut und mittels Glycosidasen zurechtgeschnitten wird.[13] Dieser DNA-Templat-freie Biosyntheseweg ermöglicht es Zellen schnell auf Umwelteinflüsse zu reagieren und ihre Oberfläche ständig den Umständen entsprechend anzupassen.[14-15]

1.2 Glycotope

Diese Fähigkeit der Glyco-Adaption gilt auch für Veränderungen innerhalb einer Zelle. So reduziert sich beispielsweise in der Glycocalyx von Erythrocyten im Verlauf der Lebenszeit (ca. 120 Tage) der Anteil endständiger Sialinsäurereste (Neu5NAc, Abbildung 1-1).[16-17] Dieser Zucker bewirkt durch seine Säurefunktionalität eine negative Aufladung der Zelloberfläche und beugt damit einer Verklumpung von Zellen in der Blutbahn vor. Alternde Zellen, die diesen Schutz nicht mehr aufweisen und somit Risikofaktoren darstellen, können anhand der fehlenden Sialinsäurereste (bzw. der zutage tretenden darunterliegenden β-Galactoside) von Kohlenhydrat-bindenden Proteinen erkannt und abgebaut werden.[18-20]

Auch krankhaft veränderte Zellen und Pathogene weisen ein verstärktes Auftreten charakteristischer Kohlenhydrat-Epitope, sog. Glycotope, auf ihrer Zelloberfläche auf. So sind z.B. Oligomannoseeinheiten besonders häufig auf der Zellwand von Bakterien und Viren zu finden, welche dadurch von immunogenen Proteinen erkannt und bekämpft werden können.[21]

Auf der einen Seite wirken sich viele solcher malignen Glycostrukturen negativ auf den Organismus aus, indem sie z.B. die Mobilität von Krebszellen erhöhen,[12,22] Pathogenen die Zellinvasion ermöglichen[23], eine Immunantwort unterdrücken[24] oder in Stoffwechselwege eingreifen.[25] Auf der anderen Seite können sie als Marker für das Immunsystem (z.B. Antikörper) dienen und somit entscheidend zur Bekämpfung der Krankheit beitragen.[26] Inzwischen lassen sich einer wachsenden Zahl von gesunden Zellen[27], Bakterien[28], Viren[24], Pilzen[29], Parasiten[30] und Tumoren[31-36] typische Glycotope zuordnen, die als Marker für Diagnostika oder Therapeutika dienen können. Ein prominentes Beispiel ist das Tetrasaccharid sialyl Lewis x (sLe^x, Abbildung 1-2).[37] Es ist auf fast allen Zelltypen zu finden, kommt jedoch auf inflammatorischen Zellen sowie Tumorzellen durch die veränderte Expression von Glycosyltransferasen in erhöhter Dichte vor.[36-38] In beiden Fällen leitet seine Wechselwirkung mit Kohlenhydrat bindenden Proteinen, sog. Selektinen, einen abbremsenden Rollprozess ein,[39] durch den eine feste, Integrin-vermittelte Zelladhäsion ermöglicht wird.[40] Ein und das gleiche Kohlenhydratepitop unterstützt also auf der einen Seite die Metastasierung von Krebszellen, auf der anderen Seite die Rekrutierung von Leukocyten

am Entzündungsherd.[37] Das detailierte Wissen über die Beschaffenheit der Glycocalyx und die selektive Interaktion mit Zelloberflächenglycotopen sind somit für die Natur wie für den Wissenschaftler Schlüssel zu Diagnose und Therapie einer Vielzahl von Krankheiten.

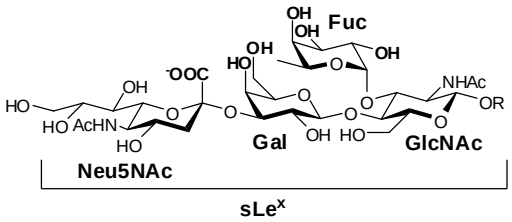


Abbildung 1-2: Das sialyl Lewis x antigen (für die Selektinbindung relevante Gruppen hervorgehoben).[41]

1.3 Lektine

Die Komplexität und Ähnlichkeit von Oligosacchariden erfordert Bindungspartner, die in der Lage sind mit hoher Spezifität und Affinität an Glycotope zu binden und so Zelloberflächeninformationen „auszulesen". Diese wichtige Funktion wird von der großen Familie der Lektine (lat.: *legere* = auswählen, lesen) erfüllt.[42] Zu ihren vielfältigen Aufgaben gehören das Aufspüren von Pathogenen,[43] der Abbau von Serum Glycoproteinen,[44] die Stimulierung der Zellreifung bei Entzündungsprozessen[45] und die Vermittlung in diversen Zell-Zell-Kommunikationswegen.[46] Die Fähigkeit derart komplexe Prozesse zu regulieren verdanken Lektine einigen charakteristischen Strukturelementen, die sie von den sog. Kohlenhydrat-bindenden Modulen (CBM),[47-49] Kohlenhydrat-prozessierenden Enzymen[13] sowie Proteinen des adaptierten Immunsystems[50-51] unterscheiden.

1.3.1 Charakteristika

Zunächst einmal besitzen Lektine keine enzymatische Aktivität. Im Gegensatz zu CBMs, die meist als einzelne oder gestaffelte Domänen in Enzymen auftreten, wirken Lektine lediglich über andere Proteine.[49,52] So kann das Mannose-bindende Protein (MBP) über assoziierte Proteasen einen der drei Komplementwege[a] aktivieren und ist somit ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems.[53] Auch die strukturelle Interaktion der Klassen mit Kohlenhydraten ist verschieden. Da Lektine eine eher passive Erkennungsfunktion von verzweigten Oligosacchariden erfüllen, sind sie nicht, wie z.B. Enzyme, gezwungen das Substrat zu umlagern um Übergangszustände zu stabilisieren.[54] Stattdessen können sie es in seiner natürlichen Form binden und müssen selbst keine großen Konformationsänderungen

[a] Das Komplementsystem ist ein Mechanismus des Immunsystems, der zur Zerstörung einer Zielzelle führt. Je nach Auslöser unterscheidet man den klassischen (Antikörper), den alternativen (spontan) und den Lektin-Weg (MBP). Nach Paul Ehrlich ist das Komplementsystem der ergänzende Teil einer Antikörperantwort.

eingehen. Das ist auch notwendig, da Glycocluster auf der Zelloberfläche oft nur peripher erreichbar sind und nicht viel Raum für sterisch anspruchsvolle Rezeptoren bieten. Lektine sind daher selten globulär, sondern weisen planare oder zyklische Anordnungen ihrer Bindungsdomänen auf, die eine optimale Anpassung an die Zelloberfläche gewährleisten. Die sog. Kohlenhydrat-erkennenden Domänen (CRD) liegen dabei stark exponiert am Rand des Proteins.[55] Diese distanzierte Interaktion mit dem Substrat ermöglicht zwar eine ungehinderte Wechselwirkung mit der Zelloberfläche, führt jedoch auch dazu, dass nur bestimmte OH-Gruppen an den terminalen Zuckern eines Oligosaccharids von meist 10 – 20 Monomeren Länge erkannt werden können. Lektine sind somit selten spezifisch sondern meist nur Typ-selektiv.[56-57] Entsprechend sind die Strukturen der anderen Proteinklassen auf komplementäre Funktionen zugeschnitten. Während Enzyme das Substrat eng umlagern müssen, um eine effektive und spezifische Umsetzung zu ereichen, unterstützen CBMs die Enzymaktivität lediglich durch eher unselektive Kohlenhydratbindung. Sie dienen meist der Verbesserung der Löslichkeit oder Erhöhung der lokalen Dichte des jeweiligen Substrates. Dieses kann aus Polymeroberflächen (A-Typ), linearen Ketten (B-Typ) oder kurzen Oligomeren bestehen (C-Typ, z.B. Antikörper) (Abbildung 1-3).[58] Die Auswirkungen der unterschiedlichen Bindungsmodi lassen sich besonders gut am Influenza Virus erkennen. Sein Eindringen in Wirtszellen erfordert die kooperative Aktion zweier Hüllenproteine, dem Hämagglutinin[b] (ein Lektin) und der Neuraminidase (ein spaltendes Enzym).[59-60] Obwohl beide Proteine mit *N*-Acetyl-Neuraminsäure interagieren, ist die Substrataffinität des Enzyms um den Faktor 10^3 größer.[61]

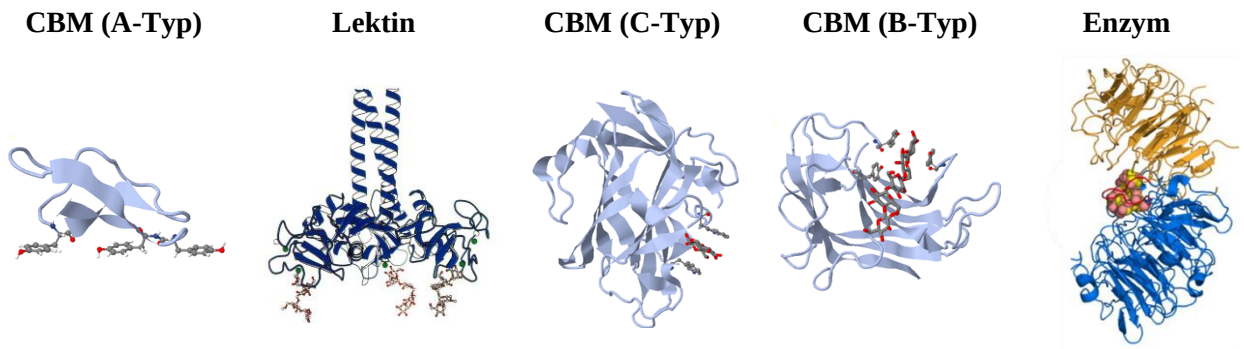


Abbildung 1-3: **Kohlenhydrat-bindende Proteine nach steigender Umlagerung des Substrates (v.l.n.r): Cellobiohydrolase I,[49] MBP-A,[62] Xylanase 10A,[49] Endo-1,4-glucanase C,[49] OXG-RCBH.[63]**

[b] „Agglutinin“ verweist auf die Eigenschaft verschiedener toxischer Lektine, Erythrocyten zu verklumpen. Entsprechende Beobachtungen durch Mitchell (1860) und Stillmark (1888) am Ricin waren erste Hinweise auf eine Lektinaktivität, die Blutgruppen sowie die Basis für Paul Ehrlichs „Maggic Bullet“-Konzept.

1.3.2 Multivalenz

Eine Besonderheit der Lektine ist ihre niedrige Affinität zu monovalenten Bindungsmotiven. Die Dissoziationsskonstanten mit einzelnen Mono- oder Oligosacchariden liegen meist nur im niedrigen millimolaren Bereich ($K_d = 10^{-3} - 10^{-4}$ M), was vor allem auf die starke Konkurenz der umgebenden Wassermoleküle zurückzuführen ist.[64] Dies hat den Vorteil, dass ungewollte Nebenreaktionen mit Substraten im Serum verhindert werden. Wie aber können Lektine ein Substrat erkennen, welches sie nur mit mäßiger Spezifität und noch schlechterer Affinität binden?

1.3.2.1 Affinität

Tatsächlich sind Lektine in der Lage diese Einschränkung zu ihrem Vorteil zu nutzen, und zwar durch das Prinzip der Multivalenz. Darunter versteht man das parallele Vorliegen eines Bindungsepitops in mehreren Kopien. Die multivalente Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor auf Zelloberflächen führt im Regelfall zu einer drastischen Erhöhung der Affinität, die einen Faktor von bis zu 10^7 erreichen kann.[65] Dieses Phänomen lässt sich durch verschiedene Mechanismen der multivalenten Bindung erklären (Abbildung 1-4).

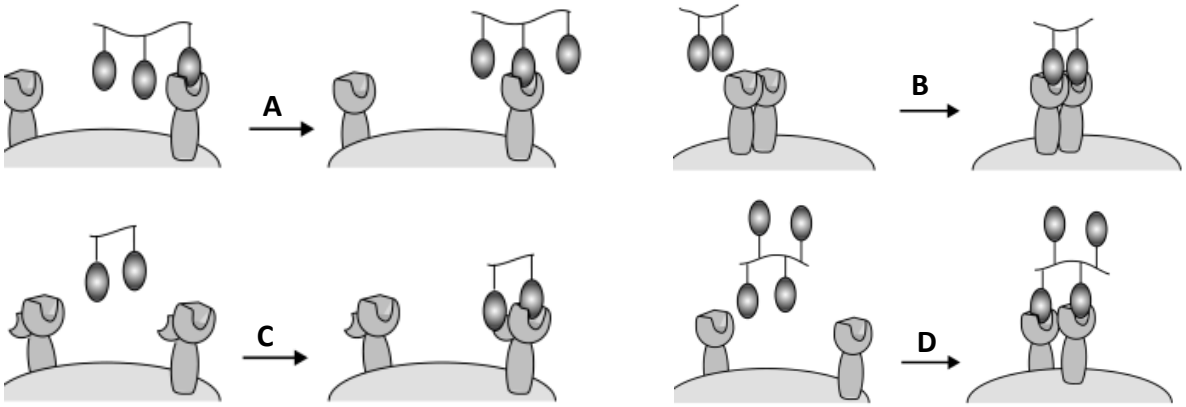


Abbildung 1-4: **Multivalenz erhöht die lokale Dichte der Bindungspartner (A), erleichtert die zusätzliche Besetzung gleicher (B) oder andersartiger (C) Bindungsstellen und organisiert Zelloberflächenproteine in Clustern (D).[66]**

Die lokale Dichte des Bindungspartners ist statistisch erhöht, was die Dissoziationsrate des Oligomers erniedrigt (A). Darüber hinaus wird die zusätzliche Besetzung von benachbarten Bindungsstellen ermöglicht, was sich sowohl auf die Affinität als auch die Selektivität der Bindung auswirken kann. So spielt gerade die kombinierte Interaktion glycosidischer und peptidischer Motive bei Zelladhäsionsprozessen eine wichtige Rolle (B,C).[67] Schließlich besitzen multivalente Bindungspartner die Fähigkeit verschiedene Zellen zu verknüpfen oder einzelne Zelloberflächenproteine in Mikrodomänen zu

organisieren. Dieses Prinzip wird z.B. von Galectinen genutzt, um in Signaltransduktionswegen des Immunsystems Informationen zu vermitteln (D).[68]

Sowohl die CRDs der Lektine als auch die entsprechenden Zelloberflächenglycotope liegen in mehrfacher Hinsicht multivalent vor. Bindungsfähige Kohlenhydrate befinden sich an den Enden eines verzweigten Oligosaccharids, an unterschiedlichen Seitenketten des gemeinsamen Peptidrückgrats sowie auf verschiedenen Membranproteinen (Abbildung 5). Diese multivalente Anordnung von Glycotopen spielt als sog. Clustereffekt in vielen Zell-Zell-Kommunikationsprozessen eine wichtige Rolle und ist eine Voraussetzung für die Initiierung von Zelladhäsionen.[69-71]

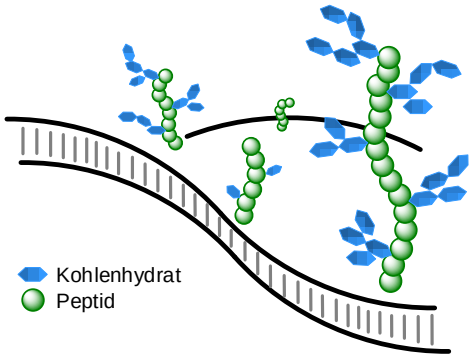


Abbildung 1-5: **Multivalent präsentierte Glycotope auf Zelloberflächen bewirken einen sog. Clustereffekt.**

Lektine liegen in rigiden, symmetrisch organisierten Homo-Oligomeren oder sogar übergeordneten Clustern vor, die über collagenartige Domänen (Collectine) oder die CRDs selbst stabilisiert werden.[72-75] In manchen Fällen liegen die Bindungsdomänen auch innerhalb eines Proteins oligomer vor.[76-77] Die große Bedeutung des Multivalenzprinzips und der Glycocalyx für die interzelluläre Interaktion offenbart sich in der Fülle von oligomeren Lektinen, die verschiedenste Organismen im Laufe der Evolution entwickelt haben (Abbildung 1-6).

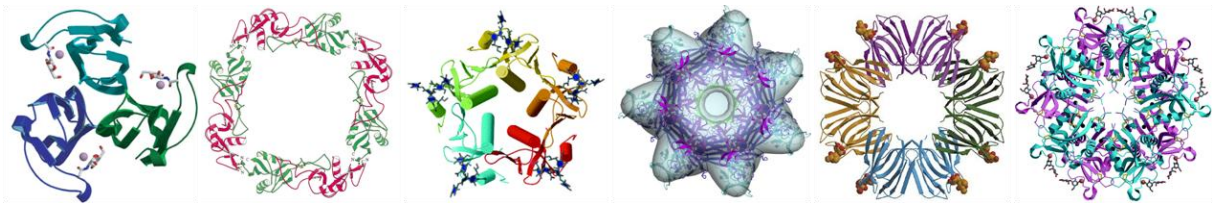


Abbildung 1-6: **Multivalente Lektine (v.l.n.r.): HPA Trimer,[78] Flavocetin A Tetramer,[79] CT B Pentamer,[80] VCC Heptamer,[81] Heltuba Octamer,[82] RSL Decamer.[83]**

1.3.2.2 Selektivität

Multivalenz kann aber auch Einfluss auf die Selektivität einer Bindung haben. Ein multivalenter Rezeptor mit rigidem Grundgerüst kann nur mit Liganden wechselwirken, die

zu dem definierten Abstand seiner Bindungsdomänen passen. Viele Lektine besitzen rigide Strukturen mit definierten Abständen der Bindungsdomänen von 10 – 70 Å[c], die ihnen die Unterscheidung zwischen körpereigenen und fremden Zellen ermöglichen (Abbildung 1-7).[64,84-86] Diese Cluster-Selektivität ist wichtig, da Pathogene nicht nur neue Glycosylierungsmuster aufweisen,[32,35] sondern auch eine Über- und Unterexpression gesunder Glycotope.[36,87-88] Eine wichtige Konsequenz daraus ist die meist schwache immunogene Wirkung von Kohlenhydrat-basierten Impfstoffen. Lösungsansätze liegen hier in der gezielten Pathogenisierung der Antigenstrukturen durch strukturelle Variation, Ligation mit immunogenen Fragmenten oder multivalente Präsentation der Epitope.[89-90]

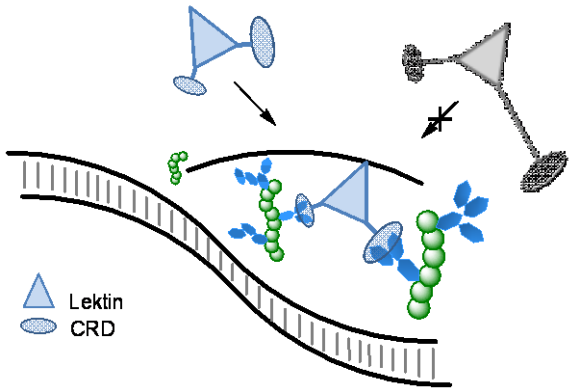


Abbildung 1-7: **Definierte Abstände in Glycoclustern ermöglichen Lektinen die Unterscheidung von gesunden und pathogenen Zellen.**

1.3.3 Die Kohlenhydrat-erkennende Domäne

Wie aber erkennt ein Lektin Zelloberflächenglycoside? Obwohl sich CRD-Homologie in Struktur und Kohlenhydratbindung nicht immer gegenseitig bedingen, weisen die meisten Lektine doch einige Gemeinsamkeiten auf.[91-92] Die Faltungsmuster der meist um die 115 Aminosäuren umfassenden Domäne sind kompakt und oft von β-Faltblättern dominiert, was das Grundgerüst der CRD rigide und brettartig macht. Allein die für die Kohlenhydratbindung benötigten Taschen werden von flexiblen Schleifen gebildet. Die hieran beteiligten Aminosäuren sind vor allem hydrophil (Asn, Gln), negativ geladen (Asp, Glu) und flexibel (Gly), was der Bindungstasche einen saueren Charakter verleiht und selektive Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Oligosaccharid ermöglicht.[21,93] Nur etwa drei bis fünf Aminosäuren sind hier direkt an der Differenzierung der Zucker beteiligt, so dass sich Selektivitäten künstlich manipulieren lassen.[94] Die große Familie der C-Typ Lektine (C für Calcium-abhängig) besitzt darüber hinaus ein in die Bindungstasche integriertes

[c] Abstände und PDB-ID: 13 Å (SLT, 1BOS), 14 Å (WGA, 2UVO), 26 Å (LecA, 1OKO), 30 Å (CT, 3CHB), 40-50 Å (LecB, 1OXC), 45-53 Å (MBP), 51 Å (GS-1, 1HQL), 54-74 Å (PNA, 1QF3), 68 Å (PSA, 1BQP), 70 Å (LCA, 1LES), 72 Å (ConA, 1VAM).

Calciumion.[92] Diese elektrostatische Komplexierung zweier relevanter Kohlenhydrat-funktionalitäten fixiert das Kohlenhydratgerüst und unterstützt somit die Ausbildung differenzierender Wasserstoffbrückenbindungen (Abbildung 1-8). In den meisten Fällen werden diese polaren Wechselwirkungen durch hydrophobe ergänzt, indem Aminosäuren wie Phe, Val, Met oder Trp die unpolare Fläche des Zuckers abschirmen. Insbesondere diese Wechselwirkungen können im wässrigen Medium entscheidend zur Bindungsaffinität beitragen.[95-98]

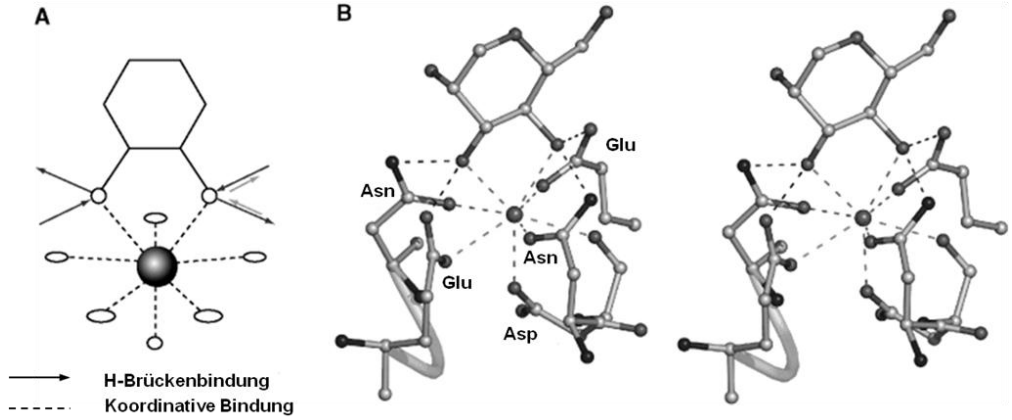


Abbildung 1-8: **Ca^{2+}-abhängige Bindung von Monosacchariden in C-Typ Lektinen (schwarze Pfeile für Mannose-Typ, graue Pfeile für Galactose-Typ; A); Stereoansicht des MBP-A-Komplexes mit Mannose (B).[92]**

Selektive Wasserstoffbrückenbindungen, stabilisierende hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen sowie rigide, multivalente Bindungsdomänen – all diese Faktoren ermöglichen es Lektinen Zelloberflächenglycotope selektiv und mit hoher Affinität zu binden. Eine derart komplexe Sensorik lässt sich mit kleinen Molekülen kaum imitieren. Dennoch ist inzwischen eine selektive Interaktion mit Kohlenhydraten unter physiologischen Bedigungen möglich und damit eine Basis zur Entwicklung von Kohlenhydratsensoren für Zelloberflächen vorhanden.

2 Kenntnisstand

Das wachsende Interesse an Kohlenhydrat-basierten Prozessen hat neben der stetig voranschreitenden molekularbiologischen Aufklärung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen und der verbesserten Oligosaccharidsynthese auch eine Vielzahl synthetischer Kohlenhydratsensoren hervorgebracht.[99-100] Während die Zuckererkennung in organischen Medien mit Calixarenen, Cyclodextrinen, Cyclophanen und ähnlichen Systemen gute Fortschritte machte, ist die Bindung unter physiologischen Bedingungen bis heute problematisch.[101-102]

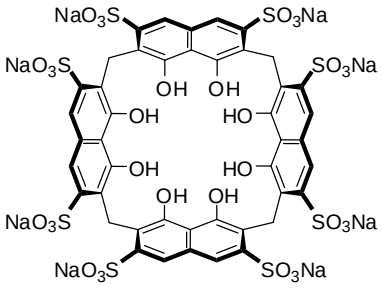
2.1.1.1 Nicht-kovalente Sensoren

Wie bereits erwähnt (Abschnitt 1.3.2) wirken Wassermoleküle als konkurrierende Bindungspartner, die dem Kohlenhydratgerüst in Beweglichkeit und Anzahl weit überlegen sind und somit die Substrataffinität drastisch erniedrigen. Dieser Umstand führte dazu, dass viele Sensoren mit unpolaren Wechselwirkungen als Triebkraft entwickelt wurden, die jedoch häufig schlechte Löslichkeiten aufwiesen. Ein wichtiger Forschungsschwerpunkt der letzten Jahre bestand daher in der Entwicklung effizienter Kompromisse in der Sensorpolarität.

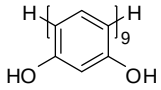
2.1.2 Calixarene

Calixarene (lat.: *calix* = Kelch, Becher) sind zyklische, aromatische Oligomere mit polaren Außenseiten und einem unpolaren Innenraum, der Monosaccharide aufnehmen kann.[103] Systeme wie der Makrozyklus **1** von Poh und Tan weisen zwar eine hinreichende Wasserlöslichkeit auf, können aber nur recht hydrophobe Zucker wie Methyl-α-D-Mannosid schwach komplexieren (K_a = 75 M^{-1}, D_2O).[d,104] Größe und Sperrigkeit der Gerüste dürften zudem eine Interaktion auf Zelloberflächen stark beeinträchtigen. Eine etwas aktuellere Arbeit von Goto *et al.* zeigt jedoch, dass auch offenkettige Oligoresorcinole **2** in der Lage sind in Wasser mit Oligosacchariden zu wechselwirken (K_a = $3.5 \cdot 10^3$ M^{-1}, H_2O, pH = 4.0–5.5).[105]

[d] Bindungskonstanten sind von einer Vielzahl Faktoren abhängig, darunter pH-Wert, Art und Konzentration des Puffers, Lösungsmittel, Temperatur, stöchiometrisches Verhältnis und Bestimmungsmethode. Aus diesem Grund können Affinitätsangaben verschiedener Arbeitsgruppen nur bedingt miteinander verglichen werden.



1

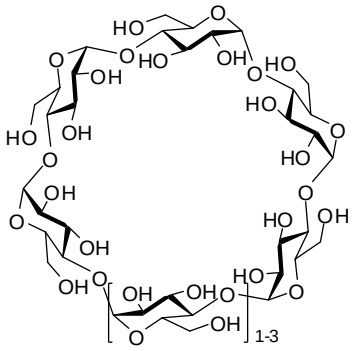


2

Abbildung 2-1: Zyklische und offenkettige Phenole zur Kohlenhydraterkennung.

2.1.3 Cyclodextrine

Zyklische Oligosaccharide vom Typ **3**, sog. Cyclodextrine, wurden neben ihrer erfolgreichen Komplexierung von pharmazeutischen Wirkstoffen auch auf ihre Kohlenhydrat-bindenden Eigenschaften hin untersucht.[106] Diese α-(1,4)-verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten bilden ebenfalls hydrophobe Hohlräume, welche im wässrigen Medium die unpolare Fläche von Zuckern abschirmen und somit komplexieren können. Bindungsstudien zeigten jedoch äußerst geringe Affinitäten zu Monosacchariden von maximal K_a = 6.3 M^{-1} (D-Ribose, PBS, pH 7.0).[107]



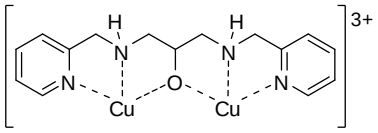
3

Abbildung 2-2 Cyclodextrine wie 3 können Monosaccharide komplexieren.

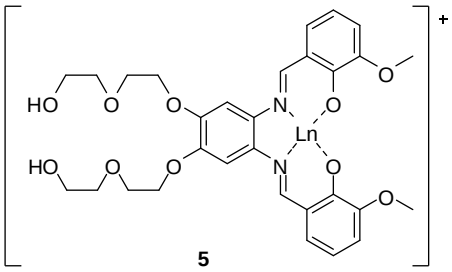
2.1.4 Metallkomplexe

Mit Hinblick auf die weit verbreitete Integration von Calciumionen in Lektinen ist auch die Verwendung von Metallkomplexen als Kohlenhydratsensoren naheliegend. Koordinationsbindungen stellen nicht nur stabile Wechselwirkungen im wässrigen Medium dar, sie sind auch stark abhängig von der Geometrie der Donorliganden und erfüllen damit ein wichtiges Selektivitätskriterium. Der binukleare Kupferkomplex **4** bindet mit guten Affinitäten an reduzierende Furanosen, wenn auch nur unter basischen Bedingungen (K_a = $1 \cdot 10^4$ M^{-1}, CHES-Puffer, pH = 10).[108] Eine signifikante Komplexierung von Oligosacchariden bei pH 7 zeigt dafür der Salophen-Lanthanoid-Komplex **5**.[109] Die nur

zögerliche Weiterentwicklung dieser vielversprechenden Klasse von Kohlenhydratsensoren beruht vor allem auf einer fortwährenden Skepsis gegenüber der Stabilität und Toxizität solcher Verbindungen, die aber nur teilweise begründet ist.[110-111]



4



5

Abbildung 2-3: Metallkomplexe können Kohlenhydrate auch in Wasser binden.

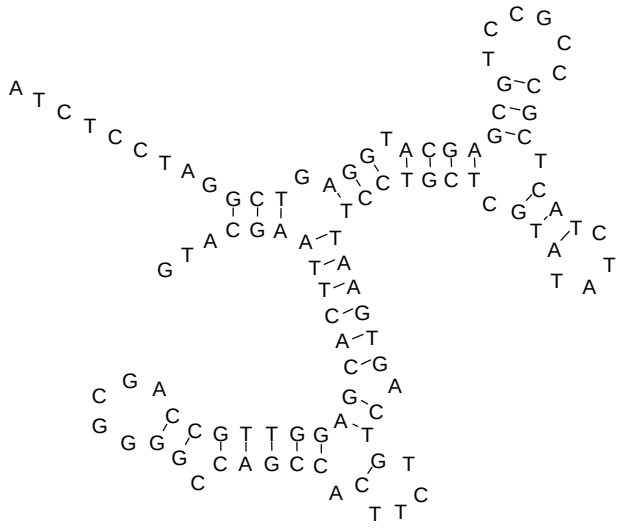
2.1.5 Peptide

Peptide stellen die natürliche Form von Kohlenhydratsensoren dar und bieten sich somit auch für synthetische Ansätze an. Bereits 1997 gelang Quinn *et al*. mit Hilfe von Peptidbibliotheken die Entwicklung Zucker-bindender Dekapentamere, die gute Bindungseigenschaften bzgl. Tumor-assoziierten Disacchariden aufwiesen (K_d = 10-20 µM, 2% Formaldehyd in PBS, pH = 7.4).[112] In einer zweiten Generation von Peptiden konnte die Löslichkeit der sehr unpolaren Consensus-Sequenz Trp-Tyr-Ala-Trp/Phe-Ser-Pro durch Konjugation mit polareren Aminosäuren gesteigert und so auch die Substrataffinität erhöht werden (K_d = 60 nM, 10 mM Tris, pH = 7.5).[113] Der hydrophobe Charakter der bindungsfähigen Sequenz steht in starkem Kontrast zu den eher polaren Aminosäuren der CRDs von Lektinen und unterstreicht die Bedeutung unpolarer Wechselwirkungen im wässrigen Medium für kleine synthetische Moleküle.

2.1.6 Aptamere

Seit den frühen 90er Jahre ist man in der Lage kurze RNA- oder DNA-Sequenzen (25-70 Basen), sog. Aptamere, so zu optimieren, dass sie ein beliebiges Zielsubstrat binden können.[114-116] Im Gegensatz zur kostspieligen biologischen Herstellung von Antikörpern können die dazu notwendigen Stammbibliotheken durch chemische Synthese erzeugt werden. Die Selektion beruht auf dem SELEX-Verfahren (Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung). Dabei wird immer wieder ein Zyklus durchlaufen, in dem das immobilisierte Substrat affine Sequenzen aus der Bibliothek bindet, diese mittels PCR vervielfältigt und anschließend wieder auf das Substrat gegeben werden. Auf diese Weise konnten bereits hochaffine Sensoren wie **6** für Sialyllactose (NeuAc-Gal-Glc, K_d = 4.9 µM, 50 mM Tris, pH 7.6)[117] oder sLe^x (K_d = 85 pM, 50 mM Tris, pH = 7.5)[118]

entwickelt werden. Ein prinzipielles Problem dieses Ansatzes liegt jedoch in der Unmöglichkeit Klone gezielt für bestimmte Motive in einem Molekül zu entwickeln, so dass Selektivitäten zwischen verwandten Substraten oft niedrig ausfallen (s. Abschnitt 2.2.1.3).

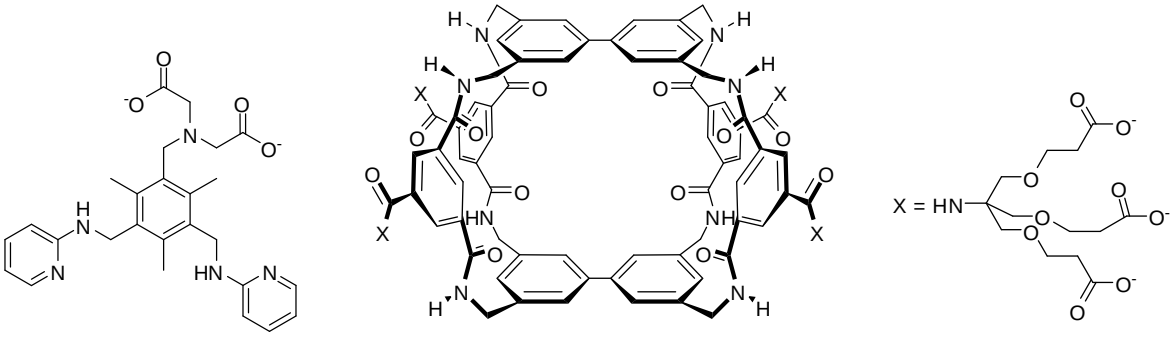


6

Abbildung 2-4: DNA-Aptamer mit hoher Affinität zu Sialyllactose (K_d = 4.9 µM, Tris, pH 7.6).

2.1.7 Podanden

Einige Kohlenhydratsensoren wurden gezielt so konzipiert, dass sie der Polaritätsverteilung in Zuckern entsprechen. Auf Grund der meist äquatorial stehenden OH-Gruppen besitzen Hexosen einen hydrophilen Rand und zwei hydrophobe Flächen oben und unten. Aromatische Systeme, sog. Podanden, bieten die Möglichkeit eine Seite des Zuckers über CH-π-Wechselwirkungen zu komplexieren, während polare Reste selektive Wasserstoffbrücken-bindungen mit den Alkoholfunktionen eingehen können. Eine Reihe solcher Systeme wurde von Mazik *et al.* entwickelt, deren Rezeptor **7** eine hinreichende Wasserlöslichkeit und mäßige Affinitäten zu Disacchariden aufwies (K_a = 305 M^{-1}, Cellobiose, H_2O).[119] Ähnliche Ergebnisse erzielte die Gruppe von Davis mit dem zyklischen Rezeptor **8** (K_a = 630 M^{-1}, *N*-Acetylmethylglucosid, D_2O)[120] und einem noch größeren Folgemodell (K_a = 580 M^{-1}, Cellobiose, D_2O).[121] Diese geräumigen Sensoren sind wie Enzymtaschen gebaut und dadurch in der Lage Lösungsmittelmoleküle bei der Substratbindung auszuschließen. Ihre Komplexierungsfähigkeit ist jedoch auf unpolare Kohlenhydrate mit ausschließlich äquatorialen OH-Gruppen und großer hydrophober Oberfläche beschränkt.



7 **8**

Abbildung 2-5: Podanden wie 7 und 8 können Enzymtaschen imitieren.

Nicht-kovalente Kohlenhydratsensoren haben somit ein prinzipielles Problem, welches ihre Anwendung in der Zelloberflächendiagnostik behindert. Um eine hinreichende Affinität zum Substrat zu erreichen benötigen sie starke hydrophobe Wechselwirkungen mit möglichst großer Oberfläche bei Ligand und Rezeptor. Dies erschwert von vornherein die Bindung wichtiger Zucker der Glycocalyx wie Galactose, Mannose und Fucose, die axiale Gruppen besitzen. Darüber hinaus ist die Wasserlöslichkeit der Systeme grundsätzlich gering. Dies erfordert wiederum eine Vielzahl polarer oder sogar ionischer Gruppen sowie rigide, sperrige Makrozyklen, die eine Selbstkomplexierung der unpolaren Rezeptorflächen verhindern. Beide Eigenschaften stehen einer ungehinderten und selektiven Interaktion mit der Zelloberfläche im Wege. Ein Lösungsansatz besteht daher darin, die Triebkraft der Komplexbildung nicht nur in unpolaren Wechselwirkungen, sondern auch in einer Bindungsknüpfung zu suchen.

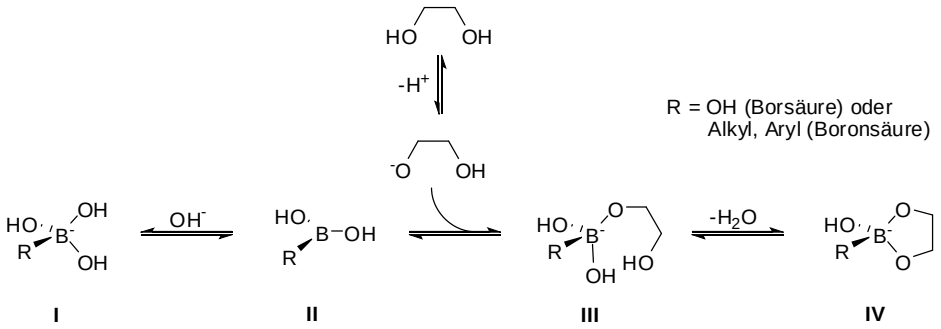
2.2 Kovalente Sensoren

Ein Sensor, der eine kovalente Bindung mit Kohlenhydraten eingehen soll, muss zunächst zwei Kriterien erfüllen: Die erkennende Funktionalität muss hinreichend affin gegenüber Sauerstoff sein und Alkoholfunktionen reversibel binden. Ein solches Profil besitzen die Boronsäuren.

2.2.1 Boronsäuren

Derivate der Borsäure interagieren auf Grund ihres Elektronenmangels mit Alkoholen, Aminen, Carbonsäuren, Fluoriden, Cyaniden und anderen Basen. Diole binden sie kovalent-reversibel unter Bildung der entsprechenden zyklischen Ester **IV** (Schema 2-1).[122] Boronsäuren bieten sich als sensorische Gruppe besonders an, da sie neben einem Bindungsmotiv auch einen Rest tragen, der weitere Aufgaben des Sensors wie Signalisierung oder Spezifizierung erfüllen kann. Sie liegen in wässrigen Medien im Gleichgewicht zwischen einer neutralen, trigonal planaren Form **II** und einer anionischen, tetraedrischen

Form **I** vor. Auf Grund der Beobachtung, dass Boronsäuren im Basischen höhere Affinitäten zu Diolen zeigen, herrscht allgemein die Meinung vor, die anionische Form **I** sei die reaktive Spezies. Diese Annahme konnte in kinetischen Studien widerlegt werden.[123-125] Bei einer Erhöhung des pH-Wertes auf 14 liegt das Gleichgewicht vollständig auf der Seite des Boronations. Da bei diesem pH-Wert die Diolbindung jedoch stark verringert ist, kann **I** als reaktive Spezies ausgeschlossen werden. Das ist auch nachvollziehbar, wenn man bedenkt, dass das Borarom hier kein leeres p-Orbital mehr besitzt und elektronisch abgesättigt ist. Der Grund für eine höhere Reaktivität von Boronsäuren im Basischen ist dagegen in der Acidität des Diols zu finden. Saure Diole wie Catechol (pK_a = 10.0) binden Boronsäuren bereits ab pH 4 unter Bildung der monodentalen Spezies **III**, da sie besser mit den Hydoxidionen des Wassers (pK_a = 15.7) konkurrieren können. Weniger saure Diole wie Ethylenglycol (pK_a = 15.5) weisen dagegen erst ab pH 7 eine Bindungsaktivität auf. Eine ähnliche Reaktivitätsabstufung ist bei Monosacchariden und ihren korrespondierenden Methylpyranosiden zu erkennen.[126] Der Zusatz von Basen erhöht also nicht den Anteil der reaktiven Borspezies, sondern verbessert lediglich die Nucleophilie des Diols. Einen weiteren wichtigen Einfluss auf die Diolbindung hat der Chelateffekt der Spezies **III**. Die räumliche Nähe der ungebundenen Alkoholfunktion gewährleistet die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrücken und eine Kondensation des Komplexes zum zyklischen Ester **IV**.[127] Monoalkohole ohne diese stabilisierende Wechselwirkung zeigen eine deutlich schwächere Veresterung von Boronsäuren.[123]



Schema 2-1: Derivate der Borsäure im Gleichgewicht mit Borsäureestern.

Auf Grund ihrer herausragenden Bindungsfähigkeiten in Wasser sind Boronsäuren die zurzeit am häufigsten genutzte Verbindungsklasse in der niedermolekularen Kohlenhydrat-erkennung. Eine starke Einschränkung ihres Potentials ist jedoch ihre Bevorzugung bestimmter Diole. So zeigen sie eine allgemeine Präferenz von Furanosen gegenüber Pyranosen sowie die folgende Reaktivitätsabstufung:

cis-1,2-Diol > *cis*-1,3-Diol > *trans*-1,3-Diol >> *trans*-1,2-Diol.[128]

Diese intrinsische Selektivität basiert auf unterschiedlichen Abständen der zu bindenden OH-Funktionen und führt zu einer in fast allen Boronsäuren vorhandenen Affinitätsabstufung:

Fructose >> Galactose > Mannose > Fucose >> Glucose

Ein selektives Wahrnehmungsvermögen steht jedoch einer breiten Anwendung von Boronsäuren in der Kohlenhydratsensorik im Wege, zumal Fructosederivate in der Glycocalyx praktisch nicht vorkommen. Es bedarf also weiterer Interaktionen, sei es mit Glycanen oder benachbarten peptidischen Motiven, mit deren Hilfe sich Affinität und Selektivität gezielt steuern lassen (Abbildung 2-6).[129-130] Dies ist auch eine Konsequenz aus der oben beschriebenen Beobachtung, nach der die Diolbindung durch Boronsäuren maßgeblich von der (nicht beeinflussbaren) Acidität der Kohlenhydrate und ihrer Konkurrenzfähigkeit gegenüber Wassermolekülen abhängig ist. Solche unterstützenden Interaktionen mit dem Glycokonjugat können aus hydrophoben Wechselwirkungen, elektrostatischer Anziehung oder Wasserstoffbrückenbindungen bestehen, sollten jedoch eine stereochemische Information besitzen, um das ebenfalls chirale Substrat selektiv zu erkennen. Nach dem gleichen Prinzip erhöht eine Konjugation von peptidischen Substraten mit Boronsäuren die Affinität zum prozessierenden Enzym.[131] Im Folgenden sollen die bisherigen Arbeiten auf diesem Gebiet kurz diskutiert werden. Für eine Übersicht nicht-chiraler Boronsäuren in der Kohlenhydratdiagnostik sei der interessierte Leser auf die regelmäßig erscheinenden Reviews verwiesen.[129,132-134]

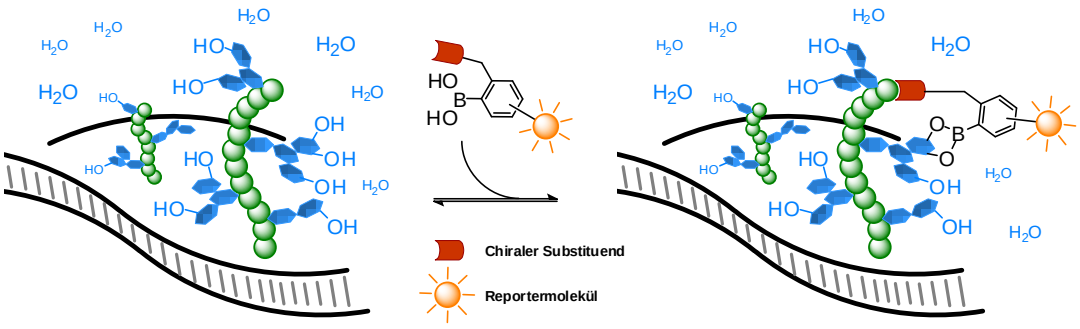


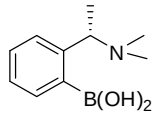
Abbildung 2-6: Boronsäuren als potentielle Sensoren für Zelloberflächenglycotope.

2.2.1.1 Kleine Systeme

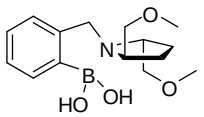
Eine der ersten chiralen Boronsäuren entwickelten Wulff *et al.* 1983 im Zuge ihrer Untersuchungen zum Nachbargruppeneffekt durch *ortho*-ständige Substituenden in Phenylboronsäuren.[e,135-137] Die Verbindung **9** zeigte eine ungewöhnlich starke N-B-Koordination und schnelle Umesterung mit Diolen, wobei der Effekt nicht eindeutig auf

[e] Amine können die Austauschreaktion von Boronsäureestern mit Diolen erheblich beschleunigen. Die Ursache für diesen Effekt sowie sein Einfluss auf die Reaktivität von Boronsäuren sind jedoch bis heute umstritten.

sterische oder elektronische Faktoren zurückgeführt werden konnte. Einen vergleichbaren Aufbau besitzt der Sensor **10** von Anslyn *et al.*, der enantiomere α-Hydroxycarbonäuren mit einer Affinität von 1:2.8 bindet.[138] Leider wurden beide Systeme weder in rein wässrigen Medien, noch auf ihre Fähigkeit isomere Kohlenhydrate zu binden hin getestet.



9



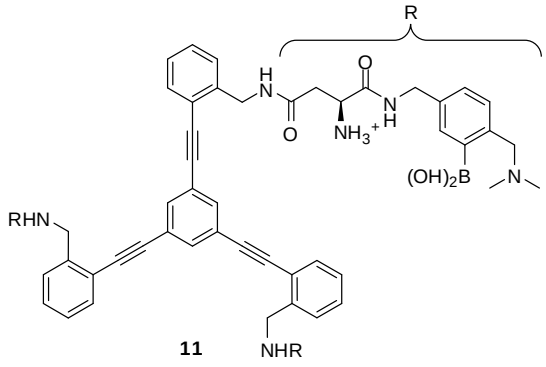
10

Abbildung 2-7: Zwei Boronsäuren des Wulff-Typs mit *ortho*-ständiger Aminfunktion.

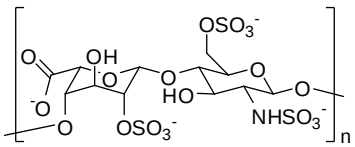
2.2.1.2 Fluorophorkonjugate

Die gängigste Methode zur Untersuchung des Gleichgewichts in Boronsäure-basierten Bindungsstudien ist die Fluoreszenzspektroskopie. Durch die Bindung an ein Diol ändern sich die elektronischen Eigenschaften eines konjugierten Fluorophors und man erhält ein quantifizierbares Signal. Obwohl eine Vielzahl solcher Systeme veröffentlicht wurde, sind bis heute nur eine Handvoll chiraler Systeme mit diesem Prinzip bekannt.

Ein trivalenter Rezeptor **11** zur Konzentrationsbestimmung von Heparin, einem hoch anionischen Polysaccharid, wurde von Anslyn *et al.* entwickelt.[139] Die Assoziationskonstante wurde auf $K_a = 1.4 \cdot 10^8\ M^{-1}$ bestimmt und stellte damit eine deutliche Verbesserung zu einem Vorläufermolekül mit kleinerer Kavität dar (10 mM HEPES-Puffer, pH = 7.4).[140] Darüber hinaus konnte in einem Kompetitionsassay gezeigt werden, dass die Bindung an Heparin reversibel und selektiv gegenüber anderen anionischen Zuckern verläuft.



11



Heparin

Abbildung 2-8: Ein trivalenter Rezeptor zur Bindung von Heparin.

Eine Reihe chiraler Fluorophor-Boronsäurekonjugate für die Erkennung von Alditolen und α-Hydroxycarbonäuren wurde von James *et al.* publiziert.[130,141-143] Davon wies der bivalente Rezeptor **12** mit einer R/S-Selektivität von 1:2000 für D-Mannitol die höchste Diskriminierung zweier enantiomerer Zucker auf. Die monovalente Verbindung **13** dagegen

zeigte praktisch keine Enantioselektivität, so dass die Autoren auf eine rigide, bivalente Bindungstasche als Voraussetzung für eine chirale Differenzierung schlossen (Abbildung 2-9). Der enge Zwischenraum hatte darüber hinaus einen Einfluss auf die Chemoselektivität, da **12** nur offenkettige Alditole mit sechs Hydroxylgruppen gut binden konnte (K_a = 1.2·10^4 M^{-1} für Dulcitol). Der Grund für die geringe Affinität zu Monosacchariden wie Glucose, Fructose, Mannose und Galactose schien jedoch eher in sterischen Wechselwirkungen mit dem chiralen Methylbenzylrest zu liegen. So zeigten die entsprechenden nicht-chiralen Sensoren von Shinkai *et al.* mit 63 M^{-1} (mono) und 4.0·10^3 M^{-1} (di) um den Faktor 10 – 140 höhere Affinitätskonstanten zu D-Glucose (33% MeOH in Pufferlösung, pH = 7.77).[144-145] Der stark hydrophobe Charakter der Sensoren erforderte zudem in allen Bindungsstudien den Zusatz von Methanol, so dass ein Einsatz unter physiologischen Bedingungen vermutlich nicht möglich ist.

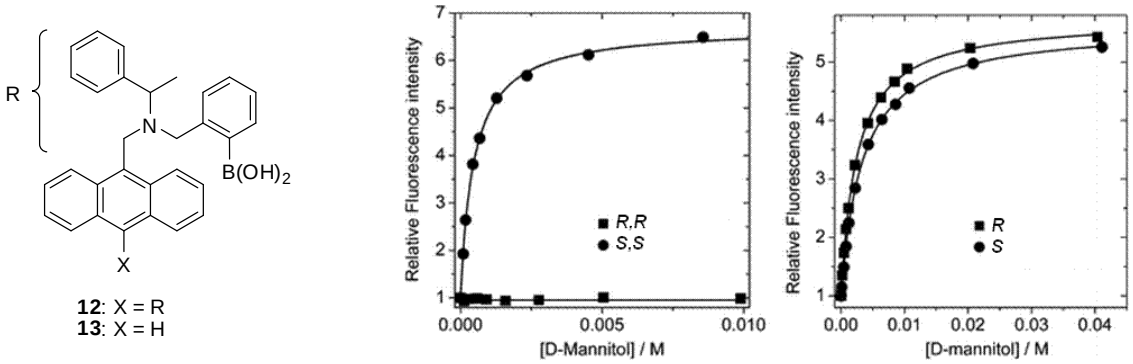


Abbildung 2-9: **Titrationskurven von 12 und 13 mit D-Mannitol (52.1 wt% MeOH in 0.05 M NaCl-Puffer, pH = 8.3).**

Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe von Wang *et al*. Der monovalente Rezeptor **14** zeigte nur mäßige Bindungseigenschaften gegenüber Monosacchariden mit einer maximalen Affinität von K_a = 102 M^{-1} (D-Sorbitol) und einer Selektivität von 1:1.2 (D-Fructose, 0.1 M Phosphatpuffer, pH = 7.4).[146] Der dimerisierte Sensor **15** dagegen besaß eine mindestens achtfach höhere Affinität und war im Gegensatz zu **14** in der Lage auch Di- und Tetrasaccharide zu binden.[147] Die Selektivität war jedoch unverändert gering, was die Autoren auf eine zu hohe Flexibilität des Gerüstes und fehlende Interaktionen mit der Amidgruppe und dem Naphthalinsystem zurückführten.

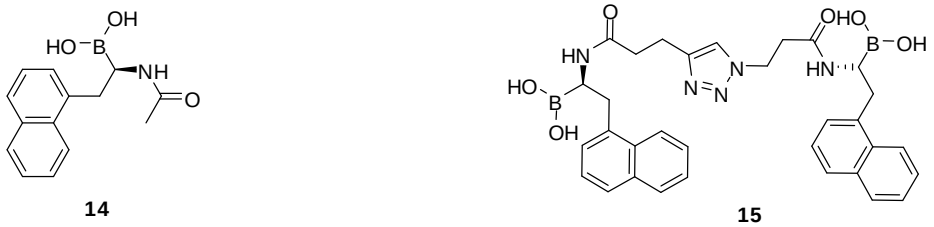


Abbildung 2-10: **Monomere und dimere Form des Kohlenhydratrezeptors 14.**

2.2.1.3 Aptamerkonjugate

Ebenfalls von Wang *et al*. wurden die ersten und bislang einzigen Boronsäure-konjugierten DNA-Aptamere synthetisiert und auf ihre Bindungsfähigkeit hin getestet. Mit Hilfe des modifizierten Thymidinderivates B-TTP (Boronsäure-modifiziertes Thymidin-5‘-triphosphat) **16** isolierten sie nach dem SELEX-Verfahren drei Aptamere, die nachweislich sowohl den Peptid- als auch den Glycananteil von Fibrinogen mit hoher Affinität binden können (K_d = 6.2 nM, Pufferlösung).[148] Leider wiesen die erhaltenen Klone keine übereinstimmende Sequenz auf, so dass weder über die Art der gebundenen Substrate noch über den Bindungsmodus Aussagen erhalten wurden. Dies ist jedoch, wie bereits erwähnt, ein prinzipieller Nachteil von Aptameren (s. Abschnitt 2.1.5).

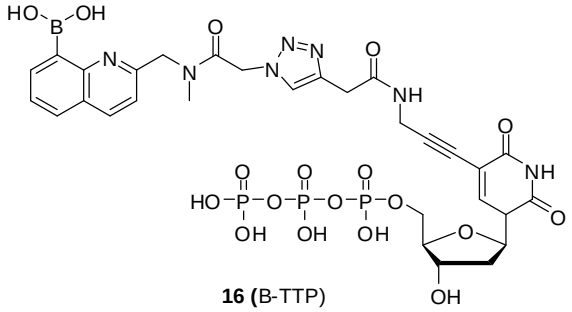


Abbildung 2-11: Boroniertes Thymidinderivat zur Herstellung von DNA-Aptameren.

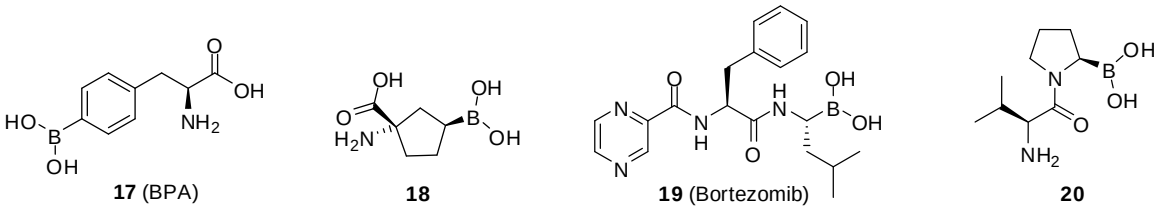
2.2.1.4 Peptidkonjugate

Über die bereits erwähnte peptidische Natur von Lektinen hinaus bieten sich Peptid-Boronsäurekonjugate aus zwei weiteren Gründen für die Wirkstoffforschung an. Zunächst wurde die bereits 1963 von Merrifield entwickelte Festphasensynthese von Peptiden im Laufe der Jahre durch moderne Materialien und Technik zu einem leistungsstarken Verfahren entwickelt, mit dem in kürzester Zeit riesige Substanzbibliotheken aufgebaut werden können.[149] Die Konjugation mit Peptiden ist daher ein sinnvoller Schritt um die strukturelle Vielfalt chiraler Boronsäuren effektiv zu erhöhen und das Spektrum bindungsfähiger Sensoren mit *ab-initio*-Design um zufällig gestaltete Strukturen zu erweitern.

Darüber hinaus haben sich peptidische Boronsäuren bereits in der medizinischen Anwendung bewährt. 1958 entwickelten Snyder *et al.* eine racemische Synthese für *para*-Boronphenylalanin (BPA) **17**, um es in der Krebstherapie einzusetzen.[150] Dieses Tyrosinanalogon legte den Grundstein für die Bor-Neutroneneinfangtherapie und ist bis heute eines der wenigen zugelassenen Reagenzien für diese wichtige Behandlung von Krebserkrankungen.[151] Inzwischen wurden auch anderweitig boronierte Aminosäuren entwickelt und in Studien getestet.[152-153] Dabei zeichneten sich gegenüber BPA vor allem

zyklische Systeme wie **18** durch ein besseres Verteilungsverhältnis in Tumorgewebe und gesundem Gewebe aus.[153]

Ein weiteres medizinisch relevantes Bor-Peptid-Konjugat ist Bortezomib **19** (Velcade). Es wurde 2004 als Medikament gegen multiple Myelome zugelassen und stellte damit die erste neue Behandlungsmöglichkeit für diese Krebserkrankung seit über 10 Jahren dar.[154] Artverwandte Dipeptide wie **20** zeigten ebenfalls Aktivitäten wie hämatopoietische Stimulation oder anti-Tumorwirkung.[155-157] Auch wenn die Interaktion in diesen Fällen nicht mit einem Diol, sondern mit dem katalytischen Serinrest eines Proteasoms stattfindet, erfüllen Boronsäuren damit prinzipiell wichtige Voraussetzungen für eine spätere *in-vivo*-Anwendung von Kohlenhdyratsensoren, darunter Bioverfügbarkeit, Zellgängigkeit und Stabilität.[158]


HO
B
OH
NH2
O
OH
H2N
N
H
H
N
N
O
O
O

Die ersten größeren Konjugatbibliotheken stammten aus der Arbeitsgruppe von Anslyn. Die verzweigte Bibliothek **22** sollte die Unterscheidung verschiedener Proteine und Glycoproteine ermöglichen, im Fall der linearen Pentapeptide **23** die Unterscheidung industriell relevanter Süssmacher.[159-160] Es konnte gezeigt werden, dass eine willkürliche Auswahl von 6-7 Festphasen-gebundener Rezeptoren ausreicht, um mittels kombinierter Bindungsprofile ein beliebiges Substrat unter physiologischen Bedingungen zu charakterisieren (500 µM HEPES-Puffer, pH = 7.4).[161] Aminosäuresequenzen oder Bindungskonstanten wurden daher nicht ermittelt. Mit dieser Methode ließen sich beispielsweise Glycoproteine unterscheiden oder zugesetzte Zucker in Tee identifizieren. Dabei besaßen Boronsäure- und Peptidkomponente beide einen Einfluss auf die Selektivität, auch wenn eine eindeutige Bindung der Boronsäuren an Kohlenhydrate nicht nachgewiesen werden konnte.

Eine andere Peptidbibliothek **24** wurde von Lavigne *et al.* entworfen. Sie verwendeten für ihre kombinatorisch erstellten Oligopeptide lediglich Alanin und Lysinderivate mit ein bis vier Methyleneinheiten in der Seitenkette.[162] Nach vollständiger reduktiver Aminierung der Vorläuferbibliothek mit 2-Formylphenylboronsäure wurden ca. 2 mio Peptidsequenzen erhalten, in denen die Positionen der Boronsäuren nicht nur „horizontal“ entlang des Rückgrades, sondern auch „vertikal“ entlang der Seitenketten variiert war. Wie bereits bei Anslyn *et al.* wurden ausgedehnte Bindungsprofile der immobilisierten Bibliothek gegenüber Fluoreszenz-markierten Glycoproteinen erstellt. Der Assay erwies sich dabei als reversibel und hinreichend charakteristisch für vier getestete Proteine. Polymere ohne Glycananteil wie z.B. Rinderserumalbumin wurden nicht gebunden.

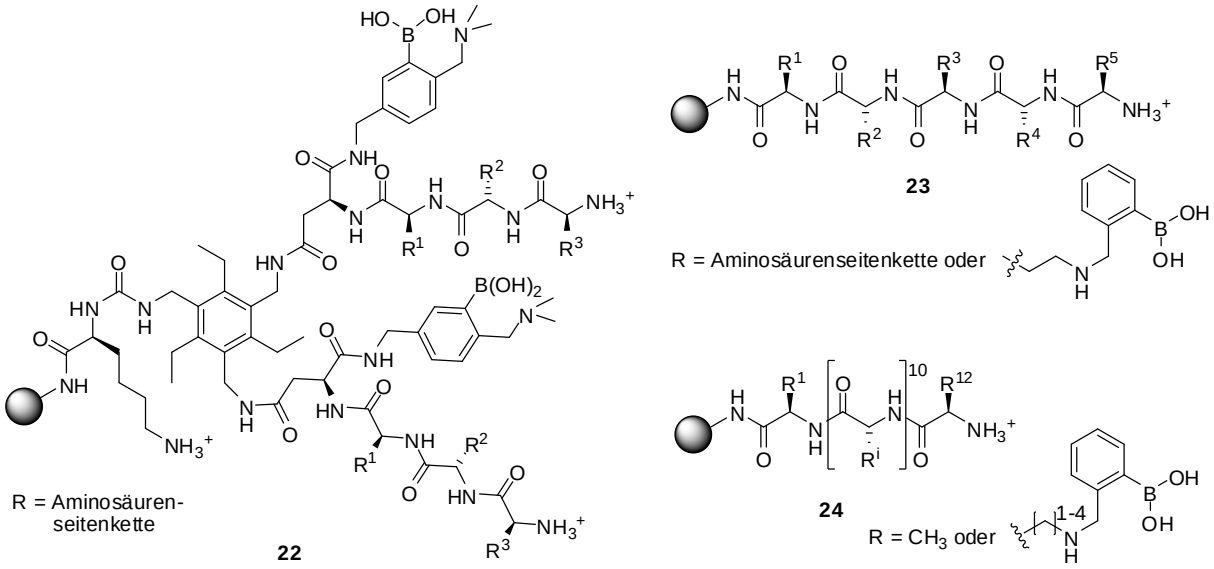


Abbildung 2-14: Verzweigte und lineare boronierte Peptidbibliotheken.

Duggan und Offermann wählten ein kleineres System um die Bindung von Monosacchariden zu untersuchen. Sie synthetisieren zwölf Pentapeptide mit je zwei Einheiten BPA, zwei basischen Aminosäuren (Arginin oder Lysin) und einem Alanin.[163] Die ermittelten Bindungskonstanten lagen zwar nur zwischen 60-5300 M^{-1} (50% MeOH in 50 mM Na_2CO_3-Puffer, pH = 10.7), doch konnten auf Grund der bekannten Sequenzen einige interessante Beobachtungen gemacht werden. Die höchsten Affinitäten wiesen Peptide mit lediglich einer oder keiner Aminosäure zwischen den BPA-Resten auf und gehörten meist zur Arginin-Serie. Die Autoren führten diesen Umstand auf den bei pH 10.7 höheren Protonierungsgrad von Arginin und eine dadurch bessere Stabilisierung des Boronations zurück. Die beste D-/L-Selektivität bei Glucose dagegen zeigte ein Argininpeptid mit einem BPA-Abstand von drei Aminosäuren. Hier lag das Affinitätsverhältnis bei 8.4:1 für D-Glucose. Erstaunlich geringe Affinitäten zeigten Kohlenhydrate, die zusätzliche bindungsfähige Reste aufwiesen wie Sialinsäure oder Nukleotide. Bei ihnen schienen sterische Wechselwirkungen zu überwiegen, da die analogen kleineren Zucker meist besser gebunden wurden. Darüber hinaus gab es in Hinsicht auf die übliche Reaktivitätsabstufung von Boronsäuren (s. Abschnitt 2.2.1) eine besonders interessante Beobachtung. Gleich fünf der synthetisierten Peptide bevorzugten D-Glucose gegenüber D-Fructose und das mit einem Faktor von bis zu 2.1 (BPA-Lys-BPA-Ala-Lys). Eine Untersuchung der hergestellten Verbindungen unter physiologischen Bedingungen steht jedoch noch aus.

Bei der Entwicklung von Kohlenhydratrezeptoren kamen auch Enzymassays zum Einsatz. Hall *et al.* testeten eine Bibliothek aus 400 Tetrapeptiden auf eine Bindung des Thomson-Friedenreich-Antigens (TF, Gal-β-1,3-GalNAc) hin.[164] TF und einige seiner Derivate gelten als sog. Tumormarker, da sie auf Krebszellen in erhöhter Dichte vorkommen.[87] Dabei wurde die Konkurrenzfähigkeit gegenüber Peanut Agglutinin (PNA) gemessen, einem tetrameren Lektin, welches das gleiche Epitop mit einer Affinität von $K_d = 1 \cdot 10^{-7}$ M bindet.[165] Die in der Bibliothek variierten Einheiten bestanden lediglich in einer Aminosäure und der N-terminalen Endgruppe. Beide Komponenten waren bewusst hydrophob gewählt um unpolare Wechselwirkungen mit dem Substrat zu ermöglichen. Als Kohlenhydrat-bindende Gruppen wurden zwei Benzoboroxole verwendet, die über die o.g. Aminosäure getrennt waren. Die affinste Verbindung **25** zeigte einen IC_{50} von 20 µM, woraus eine Dissoziationskonstante von ca. 0.9 mM abgeschätzt wurde (0.01 M PBS mit 4% DMSO, pH = 7.2). Die Tatsache, dass die Konfiguration der zentralen Aminosäure in **25** einen Einfluss von Faktor zehn und das Fehlen der Boroxoleinheiten einen Einfluss von Faktor fünf auf den IC_{50}-Wert hatte, deutet auf einen starken Einfluss hydrophober Wechselwirkungen hin. Darüber hinaus war die

Konkurrenzfähigkeit der analogen Bisphenylboronsäure mit einem IC_{50}-Wert von 54 µM nicht einmal halb so groß, was das Potential der benzylischen Nachbargruppe bestätigte.

Benzoboroxole sind zwar bereits seit Ende der 50er Jahre bekannt, wurden aber erst wesentlich später von Hall *et al*. auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht.[166-167] Sie zeichnen sich gegenüber anderen Phenylboronsäuren durch eine kovalente Bindung zur Nachbargruppe aus, die zu einer verbesserten Löslichkeit und höheren Affinität zu Furanosen und Pyranosen in physiologischen Medien führt. Ein aktuelles Beispiel ist AN2690 **26**, ein Fungizid und Inhibitor der Leucyl-tRNA-Synthetase (LeuRS).[168-169] Dieses fluorierte Benzoboroxol bindet das cis-Diol einer Ribose in AMP und blockiert somit die Proteinbiosynthese. Eine Variation der benzylischen Nachbargruppe oder der Boronsäurefunktion führt zu einem rapiden Abfall der inhibitorischen Aktivität, was die Überlegenheit dieses Verbindungstyps demonstriert. AN2690 befindet sich zurzeit in Phase-III Studien zur Therapie von Onychomykose, einer Pilzerkrankung der Finger- und Zehennägel.

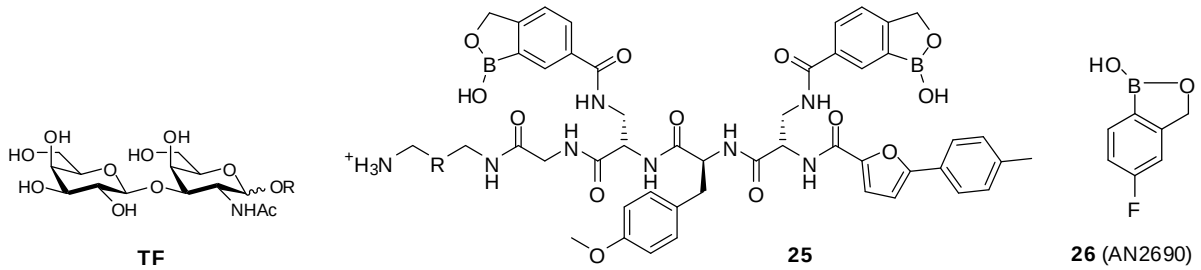


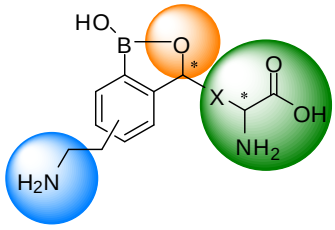
Abbildung 2-15: **Glycotope als Tumormarker: Das Thomson-Friedenreich-Antigen (TF); Kohlenhydratrezeptoren des Hall-Typs, sog. Benzoboroxole.**

Die hier wiedergegebenen Forschungsergebnisse spiegeln das wachsende Interesse und den dringenden Bedarf an neuartigen Kohlenhydratensoren für eine Vielzahl medizinisch und industriell relevanter Anwendungen wieder. Die Arbeitsgruppen von Wang, Anslyn und Lavigne haben gezeigt, dass Boronsäuren nicht nur effektiv in moderne Synthese- und Analyseverfahren integriert werden können, sondern dass sie auch einen wesentlichen Einfluss auf die Interaktion mit Glycokonjugaten haben und somit nützliche Bausteine für die Zelloberflächendiagnostik darstellen. Darüber hinaus geben ihre unidentifizierten Substanzbibliotheken jedoch vergleichsweise wenig strukturelle Informationen über die Erkennung von Kohlenhydraten. Hier zeigt sich der große Nutzen der etwas kleineren, aber systematischeren Studien von Duggan, Hall oder Rock *et al.*, in denen über die Änderung weniger Parameter eine direkte Struktur-Wirkungsbeziehung hergestellt werden konnte.

3 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer Synthesestrategie für neuartige Boronsäuren zur Kohlenhydraterkennung, die sowohl in kleineren Modellstudien, als auch in kombinatorischen Syntheseverfahren eingesetzt werden können. Als Ausgangspunkt bot sich Phenylboronsäure an. Diese Verbindung ist unter physiologischen Bedingungen stabil und bietet durch das rigide aromatische System die Möglichkeit verschiedene Substituenden in definiertem Abstand zueinander einzuführen. Um die gewünschten Funktionen zu erfüllen sollte der Sensor darüber hinaus bestimmte Strukturelemente aufweisen.

1. Benzoboroxole zeigen gegenüber ihren analogen Wulff-Typ-Verbindungen eine stärkere Bindung von Pyranosen und eine bessere Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen. Aus diesem Grund sollte eine zur Boronsäure *ortho*-ständige Methylhydroxygruppe eingeführt werden.
2. Eine konjugationsfähige Funktionalität in Nähe der Boronsäure dient der Kupplung mit chiralen Resten. Da beidseitig *ortho*-substituierte Phenylboronsäuren zur Deboronierung neigen sollte als Anknüpfungspunkt die bereits vorhandene Methylhydroxygruppe genutzt werden. Auf diese Weise würden konjugierte Reste in der Lage sein die Kohlenhydratbindung durch zusätzliche Wechselwirkungen zu differenzieren ohne sterisch mit der Bindungsdomäne zu interferieren. Mit Hinblick auf die leichte Verfügbarkeit von Aminosäuren und ihre Kompatibilität mit der Festphasenchemie sollte über einen möglichst kurzen Linker X ein Glycinrest eingeführt werden. Damit würde der Baustein selbst bereits über zwei chirale Zentren verfügen, über die die Selektivität der Boronsäure steuerbar wäre.
3. Ein weiterer Linker sollte den Baustein mit verschiedenen Anwendungen kompatibel machen. Je nach Entwicklungsstadium des Sensors dient er der Verknüpfung mit der Festphase (Synthese, Analytik), einem multivalenten Grundgerüst (Multimerisierung) oder Reportermolekülen wie Fluorophoren, Radiomarkern, immunogenen Fragmenten, etc. (Analytik, Therapeutik).



Die synthetisierten Bausteine und Konjugate sollten charakterisiert und ihr Potential als Kohlenhydratrezeptoren in Bindungsassays untersucht werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die durchgeführten Synthesen und Versuchsreihen lassen sich in sieben Abschnitte unterteilen. In den folgenden Kapiteln sollen zunächst die Synthesen der Derivate des Serins, des Homoserins, des Hydroxynorvalins und des Triazols diskutiert werden. Anschließend erfolgt die Darstellung der verlinkten Systeme und ihre Kupplung an multivalente Grundgerüste. Zum Schluss werden die Ergebnisse der durchgeführten Bindungsassays vorgestellt.

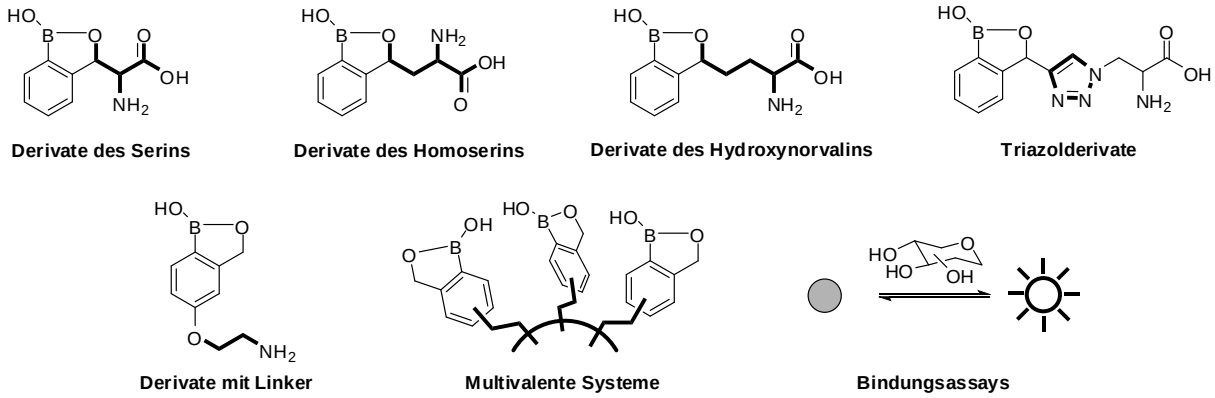
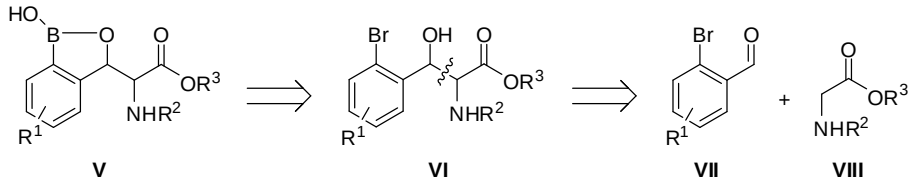


Abbildung 4-1: Kapitelübersicht.

4.1 Derivate des Serins

Das Serin-basierte Gerüst **V** kann retrosynthetisch aus einem beliebigen *ortho*-bromierten Benzaldehyd **VII** und einem Glycinderivat **VIII** aufgebaut werden (Schema 4-1). Das erhaltene Aldol **VI** wird dann durch Halogen-Metall-Austausch und Quenchen mit Borsäureester oder Palladium-katalysierte Umsetzung mit Diboranen in das gewünschte Produkt überführt.

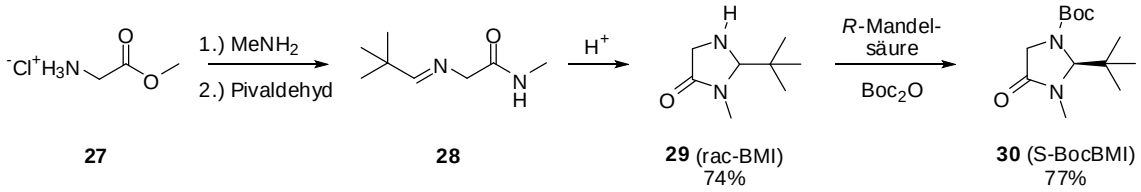


Schema 4-1: Retrosyntheseschema zum Aufbau des Boroxols V.

4.1.1 Herstellung der Edukte

Seebach *et al.* haben eine Vielzahl chiraler Glycinbausteine für die diastereoselektive Synthese nicht-natürlicher Aminosäuren entwickelt.[170] Die Wahl fiel auf BocBMI, da es sich auch im größeren Maßstab schnell und günstig herstellen lässt und beide Enantiomere leicht zugänglich sind (Schema 4-2). Die Synthese erfolgte nach bekannter Vorschrift und ergab

zunächst das ungeschützte BMI als racemisches Gemisch mit 74% Gesamtausbeute (Literaturausbeute 69%).[171] Anschließend erfolgte die Racematspaltung nach etablierter Cokristallisation mit *R*-Mandelsäure, welche später durch Extraktion im Sauren vollständig zurückgewonnen werden konnte. Die dreifach wiederholte Kristallisation ergab *R*-BMI mit einem ee von 96% und einer Ausbeute von 29% (maximale Ausbeute = 50%). Boc-Schützung lieferte das gewünschte Produkt in 77% Ausbeute. Im Gegensatz zu BMI zeigte BocBMI eine exzellente Trennung durch präparative chirale HPLC, so dass weitere Racematspaltungen chromatographisch durchgeführt wurden ($\Delta t_r(R,S)$ = 0.7 min bzw. 8.1 min, 81-97% ee, siehe Chromatogramm 1, Anhang).



Schema 4-2: Synthese des Glycinbausteins BocBMI 30.

Ergänzend zu den bereits vorhandenen Benzaldehyden **31** – **33** wurden zwei weitere Derivate **34** und **35** mit einem Nitril als Linkerfunktion synthetisiert. Diese Gruppe würde sich später nach Bedarf zum Amin oder zum Carboxylat umwandeln lassen und interferiert mit nur sehr wenigen Transformationen.

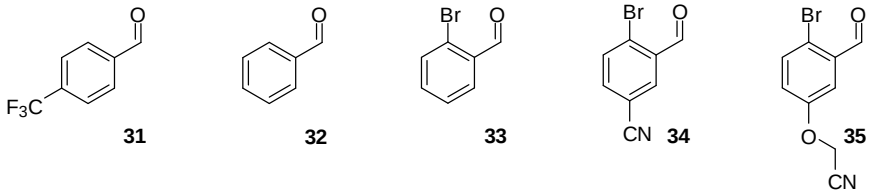
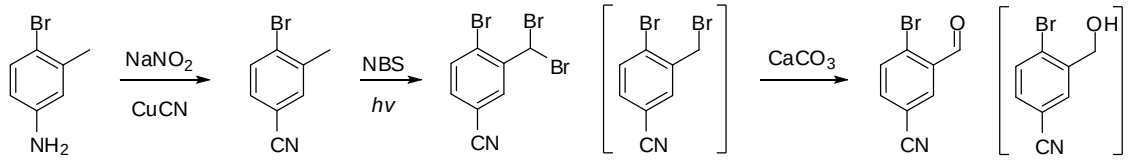


Abbildung 4-2: Benzaldehyde zur Synthese von Boroxolen des Serin-Typs.

Die Herstellung des Benzonitrils **34** erfolgte aus dem Anilin **36** (Schema 4-3). Eine Diazotierung und anschließende Sandmeyerreaktion mit Kupfercyanid wurden nach Vorschrift durchgeführt.[172] Diese Reaktion stellte sich als sehr oxidations- und pH-empfindlich heraus, was sich jedoch auf Grund der damit einhergehenden Farbveränderungen gut verfolgen ließ. Die Isolierung des Nitrils **37** mittels Säulenchromatographie ergab keine zufriedenstellende Reinheit. Stattdessen konnte das Produkt durch Sublimation bei 60 °C erhalten werden, was sich bei größeren Ansätzen jedoch als sehr zeitintensiv gestaltete. Die Ausbeute war mit 48% vergleichbar niedrig wie in der Literatur (45%). Auch die beiden folgenden Schritte waren bereits literaturbekannt.[173] Die radikalische Dibromierung in Benzylstellung zu **38** gelang erst nach Zuhilfenahme einer 300W-Lampe, ohne die

hauptsächlich das monobromierte Zwischenprodukt **39** isoliert wurde.[174] Auf Grund der sehr ähnlichen Retentionsfaktoren der beiden bromierten Verbindungen auf Kieselgel wurde das Gemisch ohne weitere Reinigung hydrolysiert und erst der Aldehyd **34** säulenchromatographisch vom Alkohol **40** getrennt. Auch hier entsprach die Ausbeute von 58% über zwei Stufen dem Literaturwert (60%).



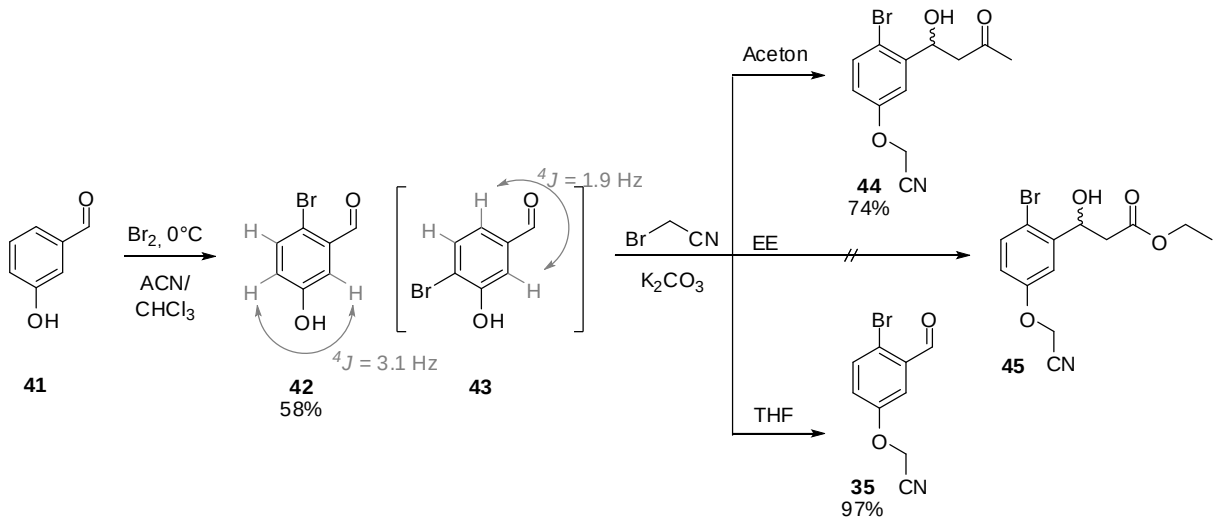
36 **37** 48% **38** **39** **34** 58% **40**

Schema 4-3: Synthese des Benzaldehyds 34.

Die geringe Gesamtausbeute dieser Syntheseroute, sowie die aufwändige und Kupfer-abhängige Herstellung des Benzonitrils **37** führten zur Entwicklung des Phenolderivates **35**, welches in nur zwei Stufen hergestellt werden konnte (Schema 4-4). Die Bromierung des 3-Hydroxybenzaldehyds **41** ergab ein Gemisch zweier Regioisomere **42** und **43**.[f] Beide Verbindungen konnten 2D-NMR-spektroskopisch eindeutig charakterisiert werden (HSQC, HMBC), auch wenn die Spektren auf Grund von Hydratgleichgewichten teilweise sehr komplex waren. Dabei wurde auch festgestellt, dass die ^{4}J-Kopplung über eine Phenolgruppe mit 3.1 Hz deutlich größer ist als die Kopplung über eine Aldehydfunktion (1.9 Hz). Durch Austauschen des Lösungsmittels (MeCN/$CHCl_3$ statt DCM/$CHCl_3$) und Erniedrigen der Temperatur (0 °C statt RT) konnte die Ausbeute an **42** von anfänglich 30% auf 58% erhöht und die Regioselektivität der Reaktion von 49% auf 77% verbessert werden (siehe Chromatogramm 2, Anhang). Ein weiteres Absenken der Temperatur auf -20 °C führte zu keinem besseren Gesamtergebnis, welches insgesamt jedoch mit anderen Synthesevorschriften vergleichbar ist.[175-176] Da eine Trennung der Isomere durch Umkristallisation oder Sublimation nicht möglich war, musste das Produkt durch wiederholte Säulenchromatographie aufwändig gereinigt werden. Für die anschließende Reaktion mit Bromacetonitril wurde zunächst Aceton gewählt, was unbeabsichtigter Weise, aber in guter Ausbeute, zum Aldol **44** führte. Der Versuch, den Ester **45** analog durch Erhitzen in Ethylacetat zu synthetisieren, schlug auf Grund der geringeren Acidität jedoch fehl. Stärkere Basen wie Kaliumtertbutanolat oder Lithiumdiisopropylamid (LDA) führten dagegen zur Abspaltung des Nitrillinkers, so dass diese Syntheseoption verworfen wurde. Eine erneute

[f] Danckwortt beschrieb das Gemisch 1910 als „feine Nadeln in Büschelform, die getrocknet leicht zerstäuben und heftig zum Niesen reizen."

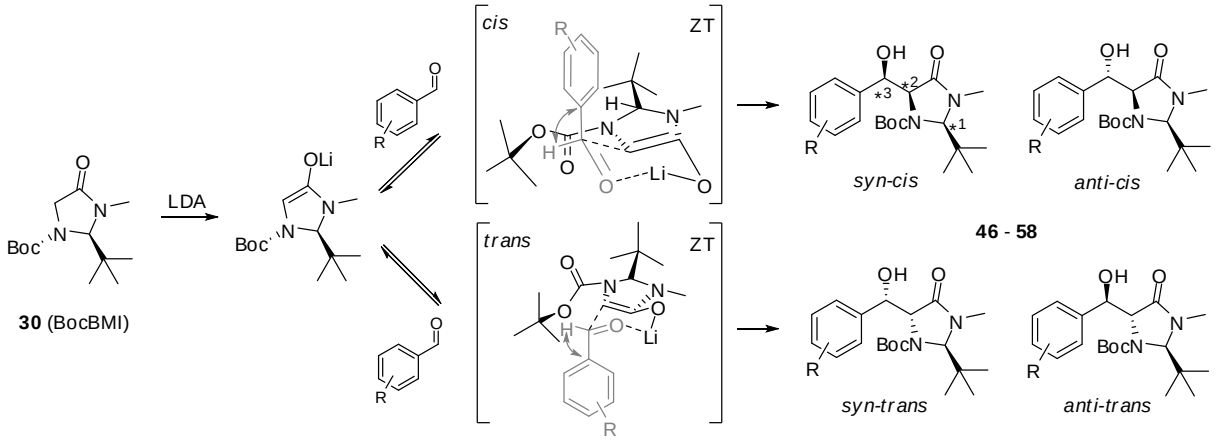
Durchführung in trockenem THF ergab schließlich annähernd quantitativ die gewünschte Verbindung **35**.



Schema 4-4: Synthese des Benzaldehyds 35.

4.1.2 Aldolreaktion

Bei der Verknüpfung von Benzaldehyden mit BocBMI werden zwei neue Stereozentren gebildet (Schema 4-5, $*^2$ und $*^3$). Dies entspricht vier möglichen diastereomeren Produkten, deren Verhältnis von der Konfiguration der *tert*-Butylgruppe ($*^1$), dem Substitutionsmuster am Aromaten (R) und den Reaktionsbedingungen abhängt. Eine tabellarische Übersicht der hergestellten Verbindungen **46 – 58** mit den wichtigsten synthetischen und analytischen Daten befindet sich im Anhang (Kapitel 9.3). Zur Reaktionsoptimierung wurde zunächst nur racemisches BocBMI verwendet, der Übersicht halber ist jedoch immer nur ein Enantiomer abgebildet.



Schema 4-5: Stereochemische Betrachtung der Aldolreaktion.

Im Regelfall wurde bei kinetischer Reaktionsführung vornehmlich das *cis*-Addukt gebildet, bei welchem sich der Aldehyd dem Enolat von der Seite des *tert*-Butylrestes her

nähert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei tiefen Temperaturen die näher am Reaktionszentrum gelegene Boc-Gruppe den entscheidenden sterischen Einfluss besitzt. In der Röntgenkristallstruktur von **58** (Abbildung 4-3A) lässt sich erkennen, dass diese der *tert*-Butylgruppe ausweicht und damit den jeweils entgegengesetzten Halbraum abschirmt. Es werden somit vornehmlich Produkte mit *cis*-Stellung der Reste an $*^1$ und $*^2$ gebildet, wohingegen unter thermodynamischen Bedingungen hauptsächlich die *trans*-Addukte entstehen. Darüber hinaus beeinflusst die Boc-Gruppe auch die Konfiguration von $*^3$. Auf Grund einer starken 1,3-diäquatorialen Wechselwirkung im Zimmermann-Traxler-Übergangszustand (ZT) ist die axiale Position für den Phenylring des Aldehyden energetisch begünstigt und es wird mehr *syn*-Produkt (*threo*) gebildet (Schema 4-5). Diese Anordnung führt tendenziell zu höheren Kopplungskonstanten als die *anti*-Form (*erythro*; siehe Abbildung 4-3B). Die relativen Stereokonfigurationen von $*^3$ und $*^2$ konnten jedoch nicht immer zweifelsfrei ermittelt werden, da der Diederwinkel der beiden Protonen (und damit die ^3J-Kopplungskonstante im ^{1}H-NMR) unterschiedlich stark von anderen Substituenden beeinflusst wurde. Die Bestimmung erfolgte daher anhand einer kombinierten Analyse der diasteromeren Aldole und ihrer Hydrolyseprodukte mittels NMR, HPLC und Röntgendiffraktometrie. Die relative Stellung der Protonen an $*^1$ und $*^2$ konnte allein mit Hilfe von NOESY-Fernkopplungsspektren ermittelt werden.

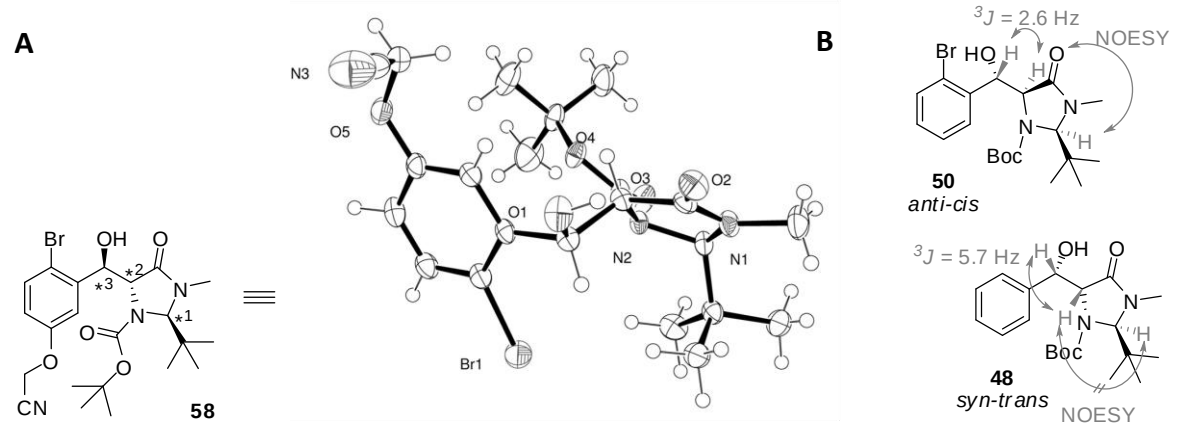
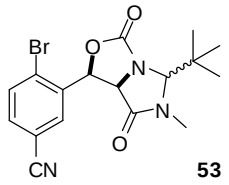


Abbildung 4-3: **A) Röntgenkristallstruktur des Aldols 58**
B) Charakteristische H,H-Nah- und Fernkopplungen der Aldole 50 und 48.

Die erzielten Ausbeuten lagen bei thermodynamischer Reaktionsführung (0-59%) tendenziell niedriger als bei kinetischer Kontrolle (46-87%), was vermutlich auf die hohe Instabilität der lithiierten Intermediate zurückzuführen ist. In beiden Fällen gestaltete sich jedoch die vollständige Produktreinigung mittels Säulenchromatographie als äußerst aufwändig bis unmöglich. Auf Grund der Anzahl und Ähnlichkeit der gebildeten Produkte, sowie teilweise noch vorhandener Edukte und Benzylalkohol, konnten manche Fraktionen nur

anteilig oder in analytischen Mengen isoliert und charakterisiert werden. Der Versuch das Gemisch direkt weiter umzusetzen und erst die geschützten β-Hydroxy-α-aminosäuren zu isolieren (nur noch zwei Produkte mit zwei Stereozentren) misslang. Dazu kam es bei thermodynamischer Reaktionsführung sowie bei Derivaten mit Nitrilfunktion zur vermehrten Bildung von Nebenprodukten wie Verbindung **53**, die die Reinigung zusätzlich erschwerten. Aus diesen Gründen wurde die Reaktionssequenz nur mit einer Verbindung ohne Linkerfunktion fortgesetzt.

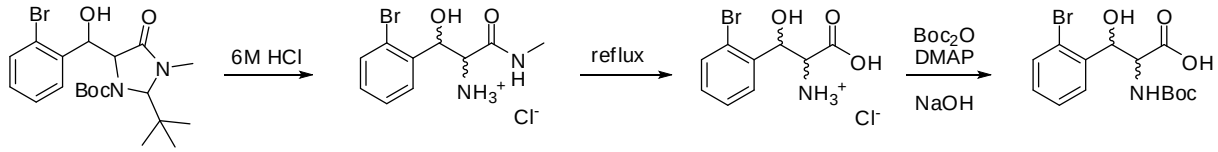


53

Abbildung 4-4: Nebenprodukt bei der Reaktion von BocBMI 30 mit Benzaldehyd 34.

4.1.3 Hydrolyse

Die Hydrolyse des BocBMI wurde mit 6M Salzsäure unter Rückfluss durchgeführt und lief in zwei Stufen ab (Schema 4-6).[177] Bereits das Lösen der Verbindungen führte zur Abspaltung der Boc- und *tert*-Butylgruppe unter Bildung des Methylamids **59**/**60**. Die vollständige Entschützung zu den β-Hydroxy-α-aminosäuren **61**/**62** hingegen dauerte nicht nur deutlich länger, sie verlief bei den beiden *syn*-Derivaten **51** und **52** mit 44 h auch fast doppelt so langsam wie bei der Verbindung **50** mit *anti*-Konfiguration (23 h).



50-52

59: *syn*
60: *anti*

61: *syn*
62: *anti*

63: *syn*, 30-33%
64: *anti*, 37%

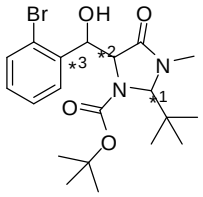
Schema 4-6: Synthese der Boroxolvorläufer 63 und 64.

Darüber hinaus konnten mittels ^{1}H-NMR und HPLC unterschiedliche Grade der Epimerisierung beobachtet werden, die auf ein Gleichgewicht mit achiralen Dehydratationsprodukten zurückzuführen sind (Tabelle 1 und Chromatogramm 3, Anhang). Bemerkenswerter Weise zeigten die beiden *trans*-Derivate **50** und **52** eine wesentlich geringere Tendenz zur Epimerisierung, welche damit bereits vor Abspaltung der *tert*-Butylgruppe eingesetzt haben muss. Nach Boc-Schützung konnten die gewünschten β-Hydroxy-α-aminosäuren **63** und **64** per HPLC getrennt und mit einer Ausbeute von 30-37% über zwei Stufen als feinpuderige, farblose Feststoffe isoliert werden. Auch hier konnte beim *syn*-Derivat eine deutlich größere Kopplungskonstante als bei der anti-Verbindung beobachtet

werden (Abbildung 4-5). Voraussetzung dafür war jedoch die Rotation-einschränkende Boc-Gruppe, da die freien Amine **61** und **62** annähernd identische Kopplungskonstanten aufwiesen.

Tabelle 1: **Epimerisierungsgrad der Aldole 50-52 bei saurer Hydrolyse.**

	$*^3/*^2$	$*^2/*^1$	Zeit	Epimerisierung
50	*anti*	*trans*	23 h	2%
51	*syn*	*cis*	44 h	35%
52	*syn*	*trans*	44 h	7%



50-52

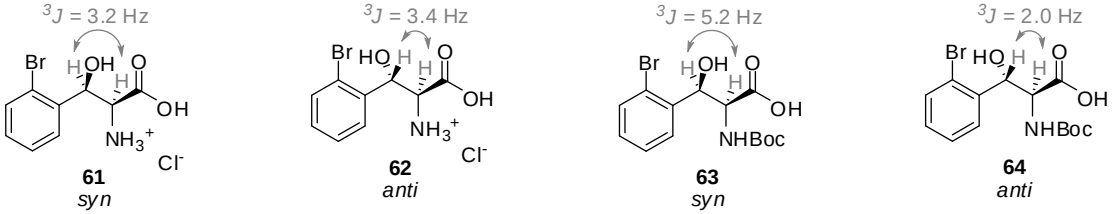
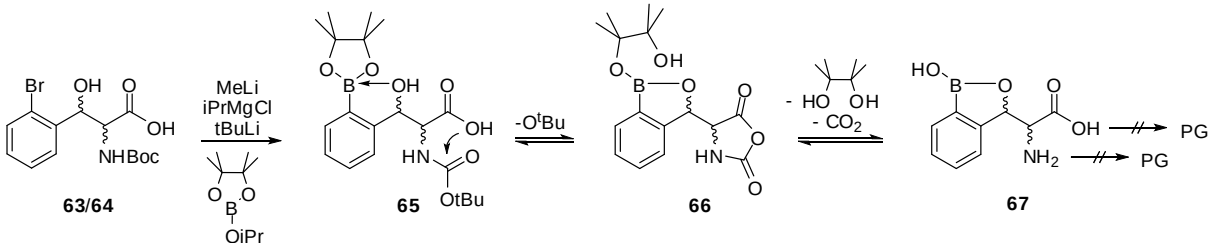


Abbildung 4-5: **Charakteristische H,H-Kopplungen der β-Hydroxy-α-aminosäuren 61-64.**

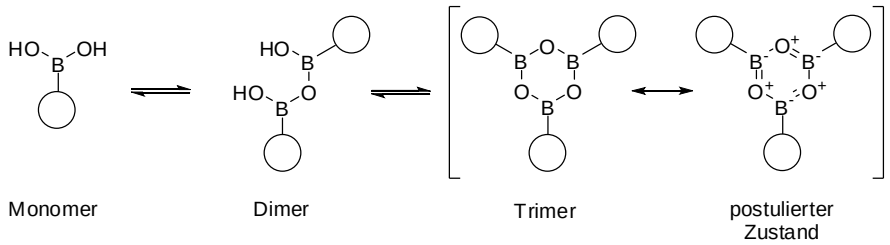
4.1.4 Borierung

Zunächst wurde versucht die C-terminal ungeschützte Verbindung **63**/**64** direkt über Halogen-Metall-Austausch und anschließendes Quenchen mit Borsäureester in das Boroxol **64** zu überführen. Da ein Überschuss an *tert*-Butyllithium nicht geeignet ist acide Protonen zu entfernen, wurde erst mit Methyllithium oder Grignardreagenzien deprotoniert und anschließend der Halogen-Metall-Austausch eingeleitet.[178-179] Die Analyse des Rohproduktes ergab im Regelfall ein komplexes Gemisch, das neben Edukt und Produkt oft auch Zersetzungsprodukte enthielt, in denen das Brom des Eduktes durch ein H oder eine Hydroxygruppe substituiert war (ESI-MS). Die Reinigung der Reaktionsmischung gestaltete sich darüber hinaus schwierig, weil das Produkt unter den gegebenen Reaktionsbedingungen anteilig entschützt wurde. Diese unbeabsichtigte Zersetzung lässt sich auf intramolekulare Angriffe der frei liegenden Hydroxy- und Carboxygruppe zurückführen, die an den jeweils benachbarten elektrophilen Zentren (Bor bzw. Carbamatkohlenstoff) kinetisch günstige 5-Ringzyklisierungen eingehen können (Schema 4-7). Ungeschützte Boronsäuren liegen in organischen Lösungsmitteln zudem meist im Gleichgewicht mit ihren di- oder trimeren Anhydriden (Boroxinen) vor, wodurch die Fraktionsgrenzen bei der chromatographischen Trennung verschwimmen (Schema 4-8). Ein aromatischer Zustand, wie er 1938 von Snyder *et al.* auf Grund der hohen Stabilität des zyklischen Trimers postuliert wurde, besteht nach heutigen Erkenntnissen jedoch nicht.[180-181] Obwohl die Reaktion damit wiederholt zum

gewünschten Produkt **67** geführt hatte, ließen sich die Verbindungen weder mittels Säulenchromatographie, HPLC (Kieselgel, RP18, Aminophase, Diolphase), noch Säure-Base-Extraktion oder Ionenaustauscher analysenrein isolieren. Verschiedene Ansätze das Produkt nachträglich N- oder C-terminal zu schützen, schlugen ebenfalls fehl und mussten schließlich abgebrochen werden.



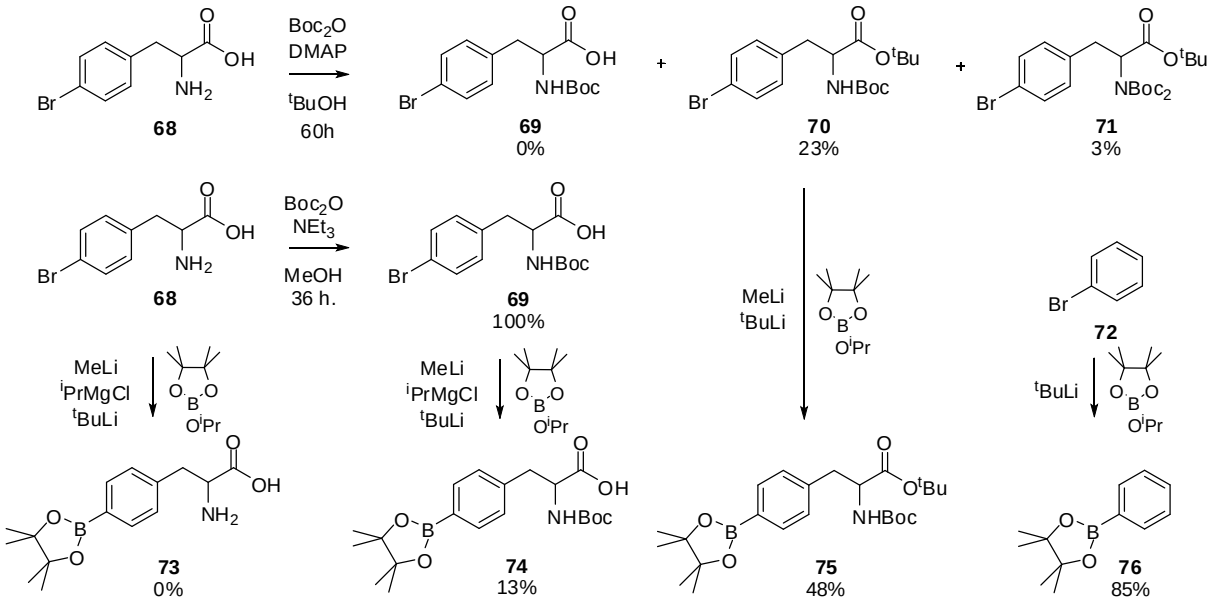
Schema 4-7: Folgeprozesse der Borierung der Boroxolvorläufer 63 und 64.



Schema 4-8: Anhydridbildung bei Boronsäuren.

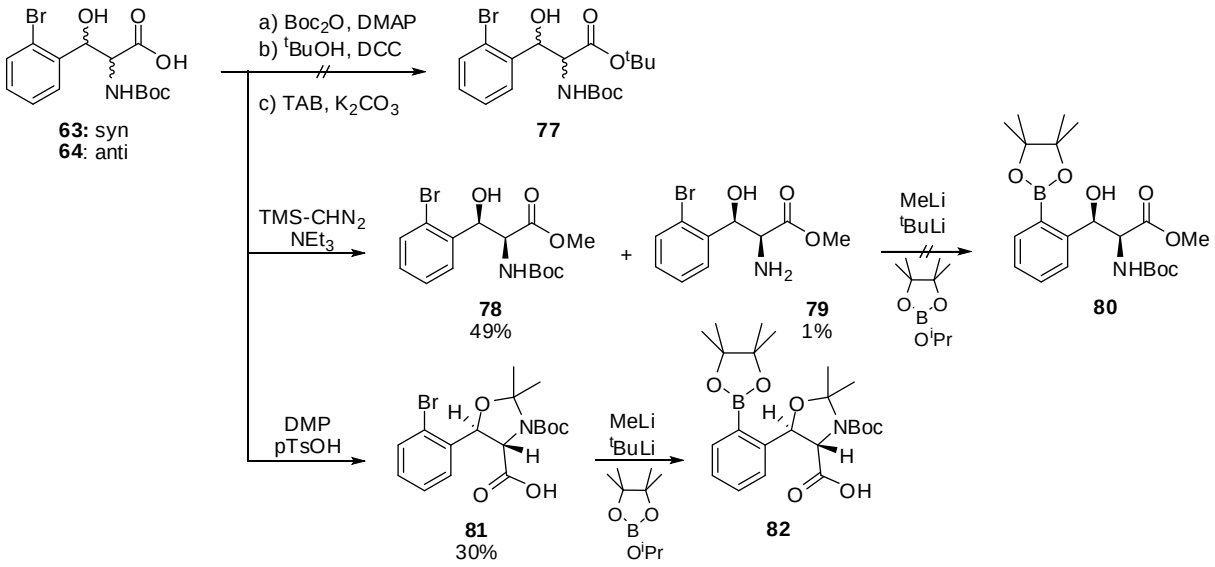
Auf Grund des offensichtlich ineffizienten Reaktionsverlaufs sollten die Synthesebedingungen daraufhin an einer Modellverbindung optimiert werden. Da ein Zusammenhang der Probleme mit aciden Protonen nahe lag, wurde das weniger funktionalisierte und käuflich erwerbbare (D,L)-*para*-Bromphenylalanin **68** gewählt und an C- und N-Terminus geschützt (Schema 4-9). Die gewählte Methode mit Boc_2O und DMAP in *tert*-Butylalkohol ergab zwar ein Gemisch mit schlechten Ausbeuten, dieses ließ sich aber gut per HPLC trennen und lieferte die gewünschte Verbindung **70** in nur einem Schritt.[182] Als weitere Komponenten des Gemisches konnten das Edukt sowie das zweifach Boc-geschützte Nebenprodukt **71** identifiziert werden. Eine Boc-Schützung unter Standardbedingungen ergab quantitativ die C-terminal ungeschützte Verbindung **69** als Vergleichssubstanz. Das Ergebnis der Borierung unter vergleichbaren Bedingungen weist auf einen wesentlichen Einfluss der Carboxylgruppe hin. Obwohl beide Verbindungen komplexe Reaktionsgemische ergaben, war die erzielte Ausbeute bei der C-terminal ungeschützten Verbindung um den Faktor vier schlechter. Hier konnten neben eingesetztem und debromiertem Edukt auch Zersetzungsprodukte ohne *tert*-Butylether oder Pinakol identifiziert werden (ESI-MS). Eine Fortsetzung dieser Tendenz ließ sich mit Hilfe des nicht-aciden Brombenzols **72** nachweisen, welches sich sehr gut in die geschützte Boronsäure **76** überführen ließ. Auf diese Weise

konnte ausgeschlossen werden, dass die eingesetzten Reagenzien und Lösungsmittel die Ausbeuten drastisch verringert hatten. Auf der anderen Seite ließ die Borierung des ungeschützten *para*-Bromphenylalanins **68** keine Bildung von **73** erkennen.



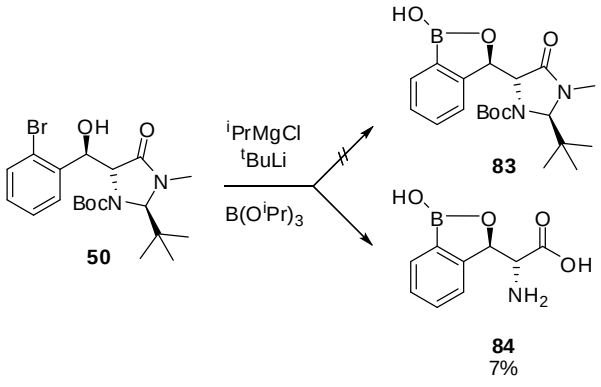
Schema 4-9: Modellversuche zur Borierung von *para*-Bromphenylalanin 68.

Nach dieser erfolgreichen Umsetzung wurde versucht eine geeignete Schutzgruppe für die Verbindungen **63** und **64** zu finden. Mehrere Versuche zur Herstellung des basenstabilen und neben Boc selektiv abspaltbaren *tert*-Butylesters **77** schlugen fehl (Schema 4-10).[183-184] Ersatzweise wurde der Methylester **78** synthetisiert. Diese Schutzgruppe hielt jedoch den drastischen Reaktionsbedingungen nicht stand und führte erneut zu komplexen Reaktionsgemischen. Als alternative Strategie wurde eine Acetalisierung des Aminosäureterminus mit Dimethoxypropan (DMP) verfolgt. Bei diesem Ansatz bestand die Problematik in einer unvermeidlichen Abspaltung der Boc-Gruppe durch die katalytisch zugesetzte Säure. Zwar konnte die Zersetzungsgeschwindigkeit durch Verwenden von *para*-Toluolsulfonsäure (*p*TsOH) anstelle von Bortrifluorid erniedrigt werden, doch liefen präparative Ansätze nie vollständig ab und ergaben durchgehend schlechte Ausbeuten. Von zwei möglichen Regioisomeren wurde nur **81** mit einer maximalen Ausbeute von 30% isoliert. Die mutmaßliche Zuordnung erfolgte dabei auf Grund der Beobachtung, dass sich die Substanz nur im negativen ESI-MS-Modus ionisieren ließ. Auch die Borierung dieser Verbindung ergab großenteils debromierte Zersetzungsprodukte, während die gewünschte Boronsäure **82** lediglich in Spuren massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte.



Schema 4-10: **Schutzgruppenstrategien zur Borierung der Boroxolvorläufer 63 und 64.**

Es zeigte sich, dass das wiederholte Auftreten von Eduktresten und Zersetzungsprodukten bei der Borierung von NH-, OH, oder COOH-aciden Ausgangsverbindungen nicht durch Optimierung der Art, Menge, Reinheit oder Trockenheit der eingesetzten Lösungsmittel und Reagenzien zu beheben war. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Testansatz das Vorläuferaldol **50** umgesetzt, da hier nicht nur, bis auf die OH-Gruppe, alle Funktionalitäten geschützt waren, sondern zusätzlich die CH-Acidität des Aminosäurerückgrades durch das Imidazolidinon herabgesetzt war (Schema 4-11). Dieser Versuch war zuvor nicht unternommen worden, da die resultierende Boronsäure **83** für die anschließende Hydrolyse nicht stabil genug gewesen wäre. An dieser statt entstand jedoch die vollständig entschützte Verbindung **84**, die zwar nur in geringer Ausbeute (50% Edukt, 25% Zersetzungsprodukte), dafür aber in zufriedenstellender Reinheit isoliert und charakterisiert werden konnte. Die Tatsache, dass nur das Imidazolidinon des Produktes hydrolysiert worden war, spricht für einen wesentlichen sterischen oder elektronischen Einfluss des Boroxolrings auf die Reaktivität des BocBMI.

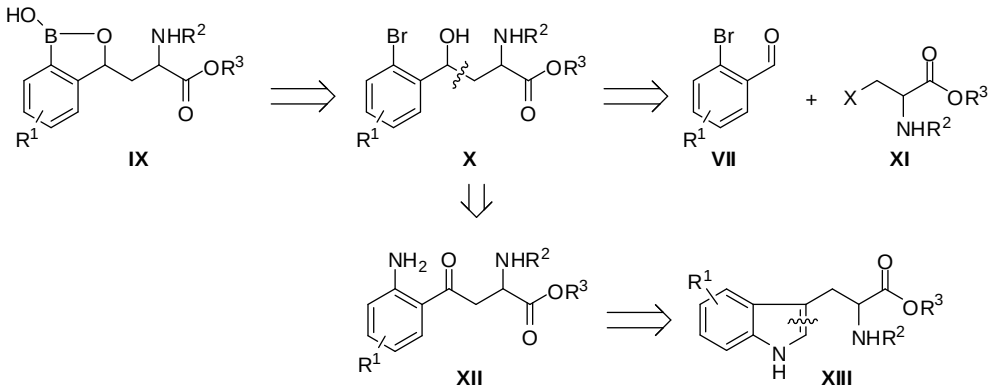


Schema 4-11: **Borierung des Aldols 50.**

Obwohl damit ein äußerst kurzer Zugang von nur zwei Stufen zu neuartigen Peptid-Boroxolkonjugaten mit definierter Konfiguration etabliert war, wies das System mehrere Mängel auf. Der stereochemische Einfluss der *tert*-Butylgruppe hatte sich als kleiner als erwartet herausgestellt und verkomplizierte die Reinigung des Aldols durch Erhöhen der Produktanzahl. Ebenso problematisch war der Nitrillinker, der zu komplexen Gemischen und entsprechend schlechten Ausbeuten führte, besonders beim nichtkonjugierten System **35**. Vor allem aber die unvollständig verlaufende Borierung reduzierte das Potential der entwickelten Syntheseroute enorm. Diese Ineffizienz und eine gewisse Reaktionsträgheit der gebildeten β-Hydroxy-α-aminosäuren deuteten auf eine zu hohe Dichte der Funktionalitäten hin und führten zur Untersuchung der um eine Methyleneinheit verlängerten Derivate, den Homoserinen.

4.2 Derivate des Homoserins

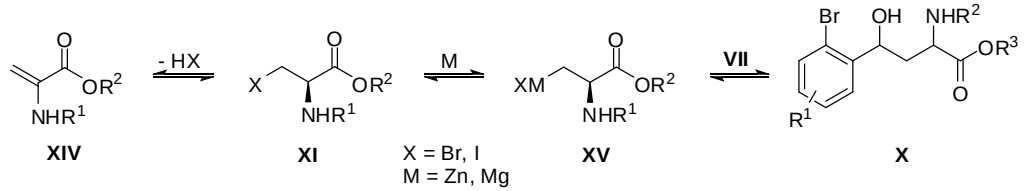
Auch für das Homoserin-assoziierte Boroxol **IX** wurde eine Synthese aus einem bromierten Vorläufer **X** angestrebt (Schema 4-12). Dieser ließ sich retrosynthetisch in unterschiedliche Edukte zerlegen. Die erste Variante bestand in einer metallkatalysierten nucleophilen Addition von halogensubstituierten Serinspezies **XI** an *ortho*-bromierte Benzaldehyde **VII**. Eine etwas längerstufige Alternative stellte die sequenzielle Synthese aus **XII** dar, welches durch Ozonolyse von Tryptophanen **XIII** hergestellt werden kann. Die kommerzielle Verfügbarkeit beider Edukte in beliebiger Konfiguration und mit einer Vielzahl verschiedener Schutzgruppen bot einen schnellen Zugang zu diastereomerenreinen Produkten und ersparte die aufwändige Racematspaltung von BocBMI. Darüber hinaus sorgte das Wegfallen eines zusätzlichen Chiralitätszentrums zu lediglich zwei möglichen Diastereomeren, was die Trennung der Produkte erleichtern sollte.



Schema 4-12: Retrosynthese zum Aufbau des Boroxols IX.

4.2.1 Synthese aus Serin

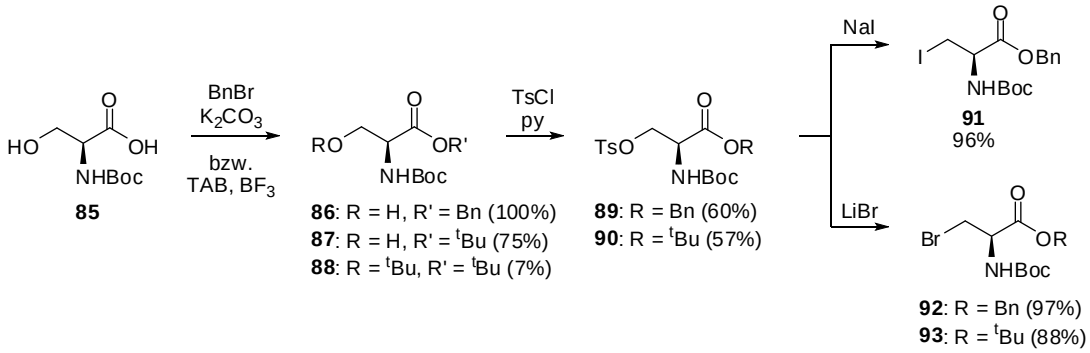
Reaktionen von Serinderivaten als Nucleophile sind in der Literatur selten zu finden. Der Grund dafür liegt in der schnellen Eliminierung von Halogenwasserstoff im Vorläufer **XI** (Schema 4-13). Das resultierende α,β-ungesättigte System **XIV** kann zwar als Ausgangspunkt für Michaeladditionen genutzt werden, es ermöglicht jedoch keine Reaktion mit Elektrophilen in 4-Position. Darüber hinaus besitzt es keine stereochemische Information, die für eine diastereoselektive Reaktion genutzt werden könnte, auch wenn der dirigierende Einfluss der Aminogruppe auf Grund der Flexibilität des Systems als eher gering eingeschätzt wurde. Es galt daher ein Metall zu finden, das nicht zu basisch reagiert, das Serin nach Insertion aber hinreichend für eine Addition an Benzaldehyde aktiviert. Die einzigen bekannten Arbeiten auf diesem Gebiet stammen von Jackson *et al.* und basierten auf einer CH-Aktivierung mit Zink.[185-186] Als alternative Metalle wurden Magnesium und Lithium untersucht.



XIV **XI** **XV** **X**

Schema 4-13: Metallkatalysierte Addition von XI an Benzaldehyde.

Die Synthese der benzylgeschützten Vorläufer **91** – **92** erfolgte nach Vorschrift und ergab die gewünschten Produkte in kristalliner Form mit guter bis sehr guter Ausbeute (Schema 4-14).[186] Lediglich die Tosylierung verlief etwas schlechter, was vermutlich an verunreinigten Reagenzien oder zu langen Reaktionszeiten lag. Auch eine Bromierung mit Kaliumbromid schlug zunächst fehl, was jedoch durch Verwendung des Lithiumsalzes vollständig behoben werden konnte.



85

86: R = H, R' = Bn (100%)
87: R = H, R' = ^{t}Bu (75%)
88: R = ^{t}Bu, R' = ^{t}Bu (7%)

89: R = Bn (60%)
90: R = ^{t}Bu (57%)

91
96%

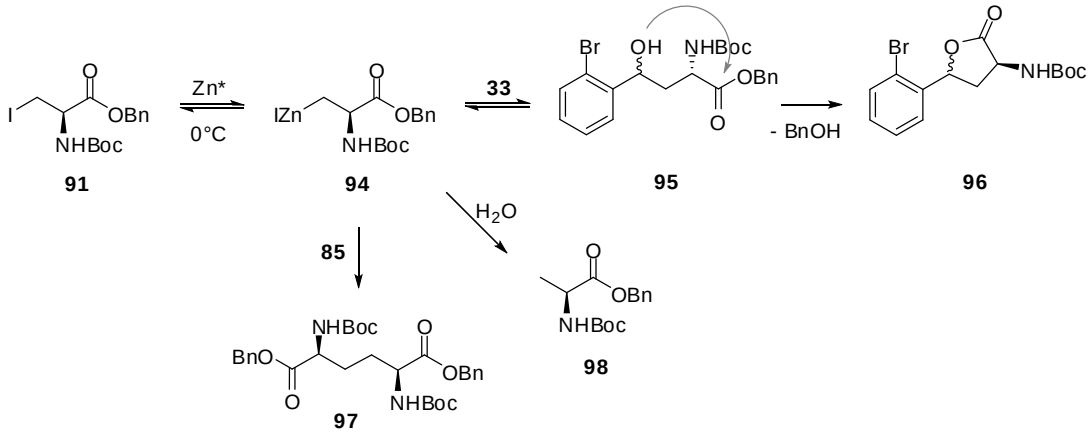
92: R = Bn (97%)
93: R = ^{t}Bu (88%)

Schema 4-14: Synthese der halogensubstituierten Serine 91-93.

Die Darstellung der *tert*-Butylester gestaltete sich dagegen schwieriger. Erst die Verwendung von Trichloracetimidsäure-*tert*-butylester (TAB) führte zum Zwischenprodukt

87, wobei als Nebenprodukt der *tert*-Butylether **88** entstand. Eine Tosylierung mit anschließender nucleophiler Substitution mit Lithiumbromid ergab aber auch hier den gewünschten Vorläufer **93**.

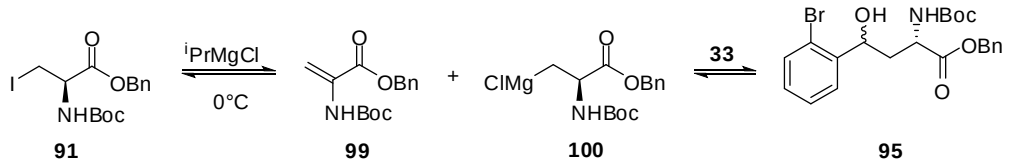
Das elementare Zink wurde als feines Pulver eingesetzt und mit zwei unterschiedlichen Methoden aktiviert.[185] Sowohl wiederholtes Ausheizen des evakuierten Gefäßes mit Iod als auch ein Erhitzen der DMF-Lösung mit Dibromethan führten zur vollständigen Insertion und zeigten keine Anzeichen des Dehydroalanins **XIV** (ESI-MS; Schema 4-15). Das Versetzen mit frisch destilliertem Benzaldehyd bei 0 °C führte jedoch großenteils nicht zur gewünschten Verbindung **95** bzw. dem Homoserinlacton **96**, sondern ergab ein Gemisch aus dem Homokupplungsprodukt **97** und dem Hydrolyseprodukt **98**. Dies sprach für Feuchtigkeit im System oder eine zu langsame Reaktion mit dem Aldehyd. Eine Verwendung von absolutiertem THF ergab keine Besserung und führte wie zuvor zum Hydrolyseprodukt **98**. Durch eine von 90 auf 0 – 30 Minuten verkürzte Voraktivierung konnte die Bildung von **98** zwar unterbunden werden, die Insertion lief nun jedoch unvollständig ab und es verblieben Reste des Iodalanins **91**. Auch ein Erwärmen der Reaktionslösung auf 60 °C half nicht, sondern führte zum Verschwinden der vorhandenen Spuren von **95** bzw. **96**. Die gleichzeitige Zugabe von **91** und Aldehyd mit katalytischen Mengen Bortrifluorid ergab nur das Hydrolyseprodukt **98**. Daraufhin sollten als Vergleich die entsprechenden Magnesate **XV** untersucht werden, um das Metall als Ursache für das Misslingen der Reaktion auszuschließen.



Schema 4-15: Zink-katalysierte Addition von 91 an *ortho*-Brombenzaldehyd 33.

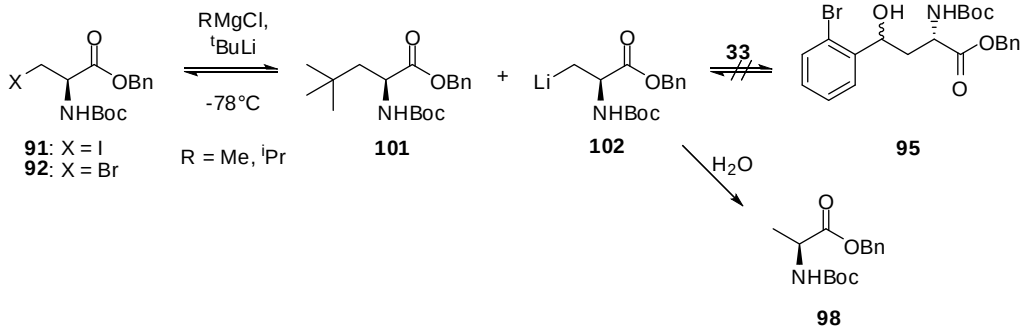
Bei Verwendung von Grignardreagenzien in absolutiertem THF war weder eine Homokupplung, noch eine Hydrolyse zu beobachten (ESI-MS; Schema 4-16). Diese Beobachtung sprach dafür, dass das Auftreten von **98** bei der Aktivierung mit Zink eher auf eine mangelnde Aktivität des Zinkats als auf vorhandene Feuchtigkeit zurückzuführen war.

Stattdessen trat in diesem Fall die Eliminierung von Iodwasserstoff unter Bildung des Dehydroalanins **99** ein. Auch beim Mg-vermittelten Halogen-Metall-Austausch konnten Spuren des gewünschten Produktes **95** beobachtet, die Verbindung auf Grund der Komplexität des entstandenen Substanzgemisches jedoch nicht analysenrein isoliert werden.



Schema 4-16: Magnesium-katalysierte Addition von 91 an *ortho*-Brombenzaldehyd 33.

Um den Anteil von Nebenprodukten zu verringern und dennoch eine hohe Reaktivität zu erhalten wurde die Reaktion unter kinetischen Bedingungen getestet. Zu diesem Zweck wurde der Halogen-Metall-Austausch bei -78 °C mit *tert*-Butyllithium in absolutiertem THF wiederholt und die Reaktion 10 min nach Zugabe des Aldehyds abgebrochen (Schema 4-17). Während beim bromierten Edukt **92** erneut ein komplexes Gemisch entstand, traten bei der iodierten Verbindung **91** nur zwei Produkte auf, nämlich das alkylsubstituierte Nebenprodukt **101** und das Hydrolyseprodukt **102**. Da das Lithiumorganyl jedoch reaktiv genug für eine Addition an den Aldehyd sein sollte, ist in diesem Fall davon auszugehen, dass ein Großteil des Eduktes durch *tert*-Butyllithium inaktiviert wurde, während entstandenes Intermediat **102** schnell durch Reste an Feuchtigkeit im Lösungsmittel protoniert wurde.

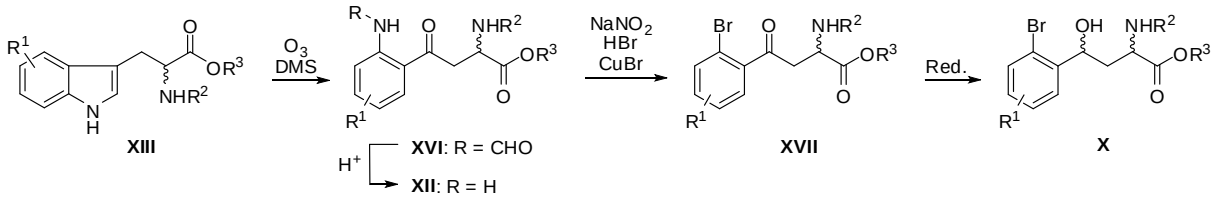


Schema 4-17: Lithium-katalysierte Addition von 91/92 an *ortho*-Brombenzaldehyd 33.

In Anbetracht dieser schlechten Vorergebnisse wurde erwogen, anstatt der metallkatalysierten Fragmentverknüpfung von einem vollständigen Kohlenstoffgerüst des Peptidboronsäurekonjugats auszugehen und lediglich die notwendigen Funktionalitäten einzuführen. Eine entsprechende retrosynthetische Analyse ergab Tryptophan als ideale Ausgangsverbindung.

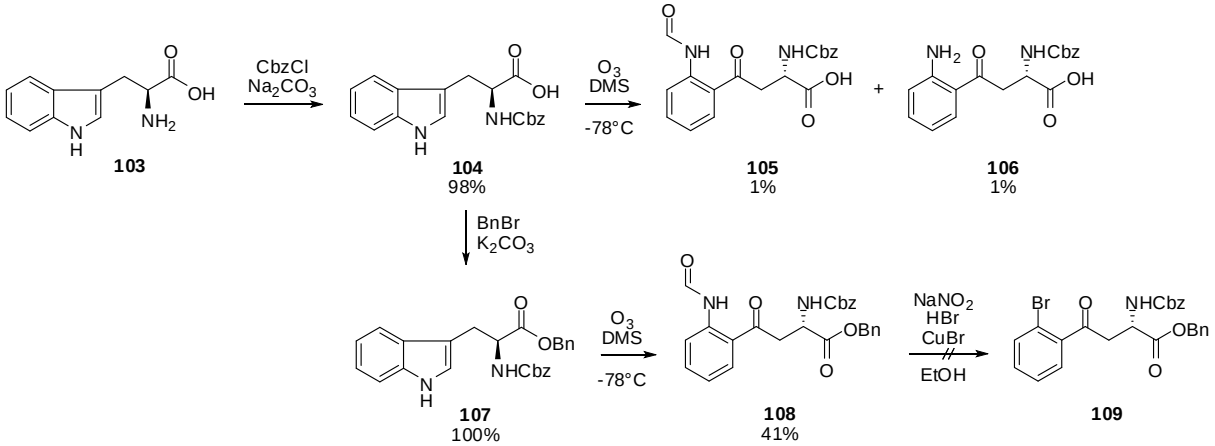
4.2.2 Synthese aus Tryptophan

Tryptophan besitzt nicht nur die richtige Länge des Kohlenstoffrückgrades, seine Ozonolyse führt auch eine Ketogruppe an der für das Boroxol erforderlichen Benzylposition ein.[187] Nach saurer Hydrolyse der Formylgruppe sollte das Anilin **XII** mittels Sandmeyer-Reaktion in die bromierte Verbindung **XVII** umgesetzt werden können (Schema 4-18).[188] Für die abschließende Reduktion zum Boroxol-Vorläufer **X** boten sich, dank der β-Stellung zum bereits vorhandenen Chiralitätszentrum, mehrere diastereoselektive Methoden an.[189-190]



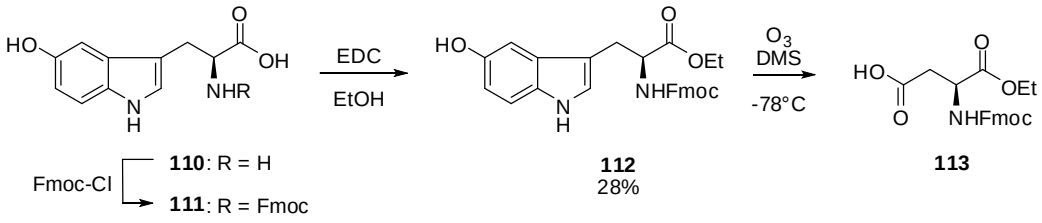
Schema 4-18: **Synthese des Boroxolvorläufers X durch Ozonolyse.**

Zunächst wurde die Ozonolyse des C-terminal ungeschützten Tryptophans **104** durchgeführt (Schema 4-19). Das erhaltene komplexe Gemisch ließ sich jedoch trotz mehrfacher Versuche nicht säulenchromatographisch trennen. Erst eine Reinigung mittels präparativer HPLC (RP18) ergab analytische Mengen des gewünschten Produktes **105** sowie des bereits entschützten Anilins **106**. Daraufhin wurde C-terminal eine Benzylschutzgruppe eingeführt und das zweifach geschützte Tryptophan **107** erfolgreich zum Zwischenprodukt **108** umgesetzt. Da die Sandmeyerreaktion selbst stark saure Bedingungen erfordert, wurde beschlossen auf eine vorhergehende Hydrolyse der Formylgruppe zu verzichten. Anstatt des vergleichsweise unpolaren Brombenzols **109** entstand jedoch ein Gemisch stark polarer Substanzen, das sich schlecht aufreinigen ließen. Auf Grund des hohen Anteils von HBr in der Reaktionslösung (EtOH/48% HBr, v/v 4:1) wurde eine Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe und evtl. auch des Benzylesters vermutet.



Schema 4-19: **Ozonolyse der Tryptophanderivate 104 und 107.**

Daraufhin sollten die beiden Schutzgruppen durch die säurestabilere Fmoc-Gruppe sowie den Ethylester ersetzt werden. Letzter bot sich aus dem Grund an, dass die Sandmeyerreaktion in Ethanol durchgeführt wurde und andere Reste an dieser Stelle eine partielle Umesterung verursacht hätten. Um die Option eines Linkers zu testen wurde darüber hinaus vom kommerziell erhältlichen (D,L)-5-Hydroxytryptophan **110** ausgegangen (Schema 4-20). Die Fmoc-Schützung war bereits literaturbekannt und verlief annähernd quantitativ, die Veresterung dagegen nur mit 28%.[191] Dieser Umstand ist vor allem auf Verluste beim Säulen zurückzuführen, da das mit 85% Ausbeute (2 Schritte) erhaltene Rohprodukt von **112** bereits eine relativ hohe Reinheit aufgewiesen hatte. Die anschließende Ozonolyse verlief unter vollständiger oxidativer Abspaltung des Aromaten zum Aspartat **113**. Diese Zersetzung ist dem elektronenschiebenden Effekt der Phenolgruppe zuzuschreiben, welche somit als Linkerfunktion ungeeignet schien. Da alternative Funktionalitäten wie Amine oder Halogene einen ähnlich starken induzierenden, bzw. inhibierenden Einfluss auf die Oxidation des Tryptophans haben dürften, blieb nur die nachträgliche Einführung eines Linkers auf der Stufe des Anilins **XII**.



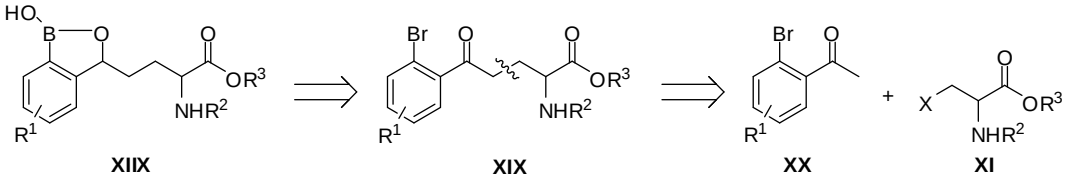
Schema 4-20: Ozonolyse des geschützten 5-Hydroxytryptophan 112.

Eine regioselektive Halogenierung von Phenylalanin ist zwar bekannt, hätte die Synthesesequenz, zusammen mit dem dazu notwendigen Umschützen von Funktionalitäten, jedoch noch weiter verlängert und sehr unökonomisch gemacht.[192] Die Strategie bot somit keine Möglichkeit einer praktischen und orthogonalen Einführung eines Linkers neben der Boronsäurefunktion und wurde daher ebenfalls verworfen. Problematisch für die Homoserinderivate insgesamt schien zudem das Gleichgewicht mit der Lactonform des Boroxolvorläufers **96** zu sein. Alle produkthaltigen Fraktionen hatten zu einem hohen Prozentsatz diese C-terminal entschützte Verbindung gezeigt, die sich nicht nur deutlich schwerer in das entsprechende Boroxol überführen lassen, sondern auch eine geringere Reaktivität in künftigen Peptidkupplungen zeigen dürfte. In jedem Fall läge ein Gleichgewicht zwischen zwei konkurrierenden Zyklisierungen vor, das jegliche Interaktionen mit Carboxylgruppe oder Boronsäure verkomplizieren dürfte. Diese Erkenntnisse führten

schließlich zu einer weiteren Verlängerung des Aminosäurerückgrades und der Synthese eines Hydroxynorvalinderivats.

4.3 Derivate des Hydroxynorvalins

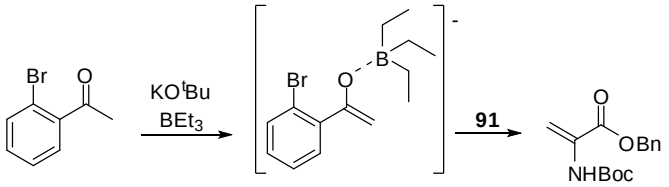
Wie bereits im Ansatz zuvor wurde das Gerüst retrosynthetisch auf halogensubstituierte Serinderivate **XI** als Ausgangsprodukt zurückgeführt, so dass die bereits hergestellten Verbindungen erneut eingesetzt werden konnten (Schema 4-21). In diesem Fall fungieren sie jedoch als Elektrophile, die mit Acetophenonen **XX** zum Vorläufer **XIX** umgesetzt werden. Eine diastereoselektive Reduktion mit anschließender Borierung sollte dann das gewünschte Produkt **XIIX** ergeben.



XIIX **XIX** **XX** **XI**

Schema 4-21: Retrosynthese zum Aufbau des Boroxols XIIX.

Zunächst wurde bei 0 °C mit Hilfe von Kaliumtertbutanolat das Enolat **105** vorgebildet, das durch seine Gelbfärbung gut zu beobachten ist (Schema 4-22). Direkt darauf erfolgte die Zugabe von Triethylboran, da unkomplexierte Enolate von Acetophenonen zu Nebenreaktionen neigen. Nach Versetzen mit Iodalanin **85** ließ die schnelle Eliminierung von Iodwasserstoff jedoch keine nucleophile Substitution zu, so dass ausschließlich das Dehydroalanin **91** entstand. Spuren des gewünschten Produktes **XV** wurden nicht beobachtet (ESI-MS). Auf Grund der schlechten Erfahrungen bei der nucleophilen Addition von halogensubstituierten Serinen an Benzaldehyde wurde kein analoger Versuch mit Homoserinen durchgeführt.



114 **115** **99**

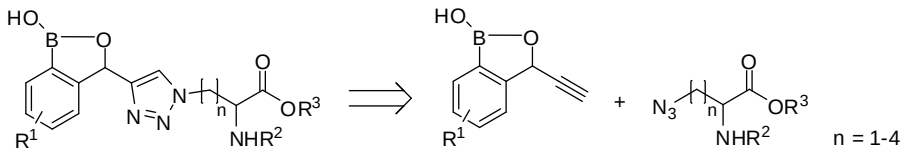
Schema 4-22: Umsetzung von Bromacetophenon 114 mit Iodalanin 91.

Nach dem Fehlschlagen dieser drei verwandten Syntheserouten musste der verfolgte Ansatz zur Herstellung von Peptidboroxolkonjugaten vom Prinzip her in Frage gestellt werden. Offensichtlich waren die angewandten Reaktionsbedingungen oft zu drastisch für die kleinen, aber hoch funktionalisierten Edukte, was zu einer Vielzahl von Nebenreaktionen und

Zersetzungsprozessen führte. Dies wirkte sich nicht nur negativ auf die Reinigung der Produkte und ihre Ausbeuten aus, sondern sorgte zudem für eine unökonomische Reaktionsführung, da viele Reagenzien im Überschuss eingesetzt werden mussten. Darüber hinaus hatte sich die hohe Dichte von Funktionalitäten, in Verbindung mit einem flexiblen Rückgrad, als Problem herausgestellt. Konkurrierende intramolekulare Zyklisierungen dürften sowohl die Synthese, als auch die Analytik künftiger Konjugate verkomplizieren. Die bisherige Herangehensweise schien somit ungeeignet und wurde durch einen neuartigen, Cycloadditions-basierten Zugang zu Peptidboroxolkonjugaten ersetzt.

4.4 Triazolderivate

Die retrosynthetische Zerlegung des chiralen Boroxolbausteins **XXI** in zwei Huisgen-Cycloadditionsedukte bietet gegenüber den bisherigen Ansätzen gleich mehrere Vorteile (Schema 4-23). Die kupferkatalysierte Verknüpfung („Click-Reaktion“) erfolgt unter so milden Bedingungen, dass sie eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionalitäten toleriert und mit dem ungeschützten Boroxol **XXII** durchführbar sein sollte. Auch längerkettige Peptide können damit ohne Gefahr der Deboronierung nach Standardverfahren an der festen Phase synthetisiert und direkt mit Boronsäuren zum Zielprodukt gekuppelt werden. Darüber hinaus verläuft die Clickreaktion auch unter physiologischen Bedingungen häufig mit guten Ausbeuten und wenigen Nebenprodukten, was das Anwendungsspektrum der Konjugate bedeutend erweitert. Eine Deboronierung von Boronsäuren durch Kupferionen ist zwar bekannt, doch konnte dieser Zersetzung bereits erfolgreich vorgebeugt werden.[193] Die Rigidität des gebildeten Triazols verhindert eine intramolekulare Lactonisierung und ermöglicht zudem die selektive Interaktion mit Kohlenhydraten. Schließlich existieren nicht nur verschiedene Methoden zur Herstellung Azid substituierter Aminosäuren **XXIII**.[194-197] Es besteht auch die Möglichkeit sie als Methioninsubstitut über die Methionyl-tRNA-Synthetase in *E.coli*-Proteine einzuführen und diese somit posttranslational mit Boroxoleinheiten zu verknüpfen.[197-199]

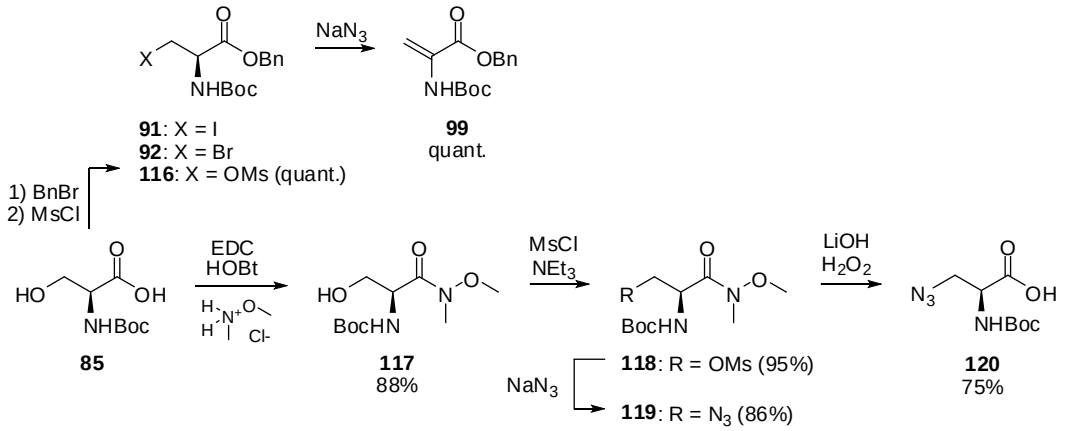


XXI **XXII** **XXIII**

Schema 4-23: Retrosynthese des Boroxols XXI mittels Huisgen-Cycloaddition (Click-Reaktion).

4.4.1 Synthese von Azidalanin

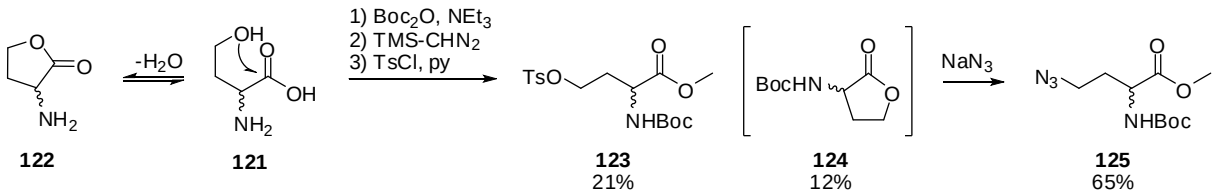
Die für Azidalanin **120** geeigneten Vorläufer **91**, **92** und **116** waren bereits vorhanden und wurden nach Vorschrift mit Natriumazid umgesetzt (Schema 4-24). Anstatt des gewünschten Produktes trat jedoch in allen Fällen eine Eliminierung zu Dehydroalanin **99** ein. Weder ein Austausch des Lösungsmittels (DMF, Aceton) noch eine Variation der Reaktionstemperatur (40 °C, 70 °C) brachte eine Verbesserung. Eine Literaturrecherche zeigte, dass Panda *et al.* das Problem durch Absenken der CH-Azidität in α-Stellung mit Hilfe des Weinrebamids gelöst hatten.[200] Tatsächlich ergab die nach Vorschrift durchgeführte Synthese einen vollständigen Umsatz des Mesylats **118** in das Azid **119**, das anschließend in die gewünschte Carbonsäure **120** überführt werden konnte und somit die Zielverbindung mit guten Ausbeuten ergab.



Schema 4-24: **Synthese des Clickbausteins Azidalanin 120.**

4.4.2 Synthese von Azidhomoalanin

Als Alternative wurde die Synthese des um eine Methyleneinheit verlängerten Azids **125** getestet (Schema 4-25).[195]



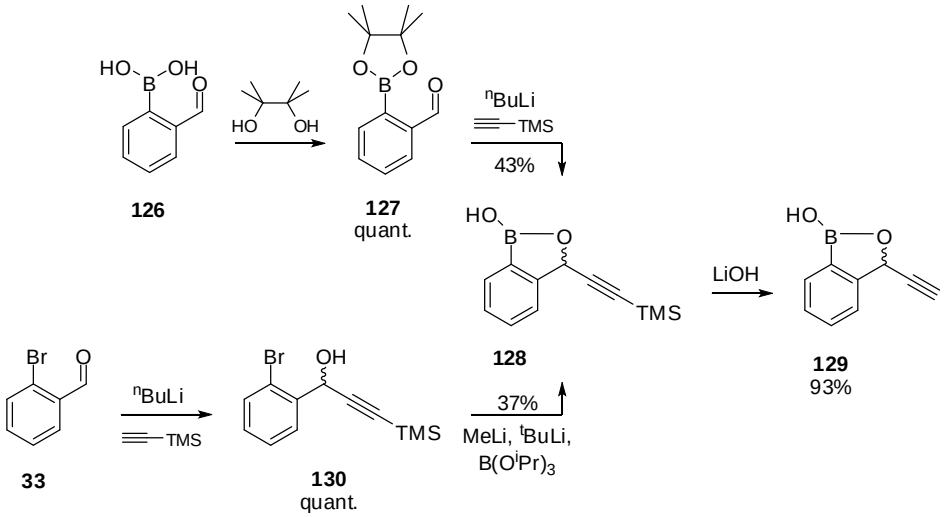
Schema 4-25: **Synthese des Clickbausteins Azidhomoalanin 125.**

Homoserin **121** mit ungeschützter OH-Funktion liegt bei saurem pH-Wert im Gleichgewicht mit seinem Lacton **122** vor, was bereits zuvor zu Schwierigkeiten bei der Synthese geführt hatte (siehe Abschnitt 4.2). Aus diesem Grund wurden die ersten drei Schritte zügig hintereinander durchgeführt und erst das Tosylat **123** aufgereinigt.

Ausbeuteverluste dürften hierbei vor allem auf eine unvollständige Versterung und Tosylierung zurückzuführen sein. Als Nebenprodukt wurde das Lacton **124** isoliert. Wie erwartet trat bei der abschließenden Azidierung weder eine Eliminierung, noch Hydrolyse auf und es konnte das Azid substituierte Homoalanin **125** erhalten werden.

4.4.3 Synthese des Alkinboroxols

Die Synthese des alkinylierten Boroxols **129** erfolgte auf zwei Routen, die sich durch unterschiedliche Vorteile auszeichneten (Schema 4-26).



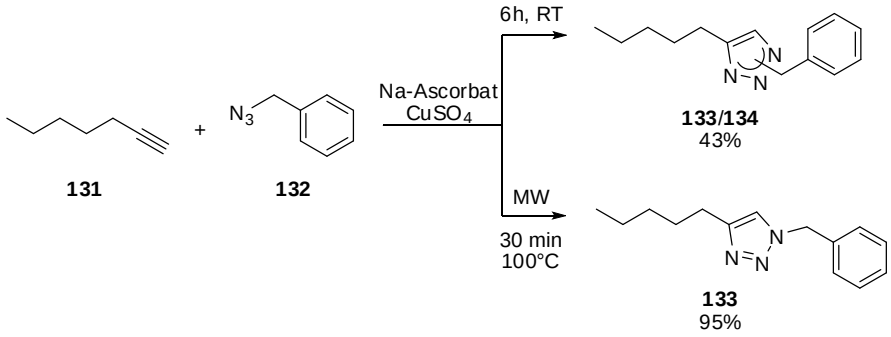
Schema 4-26: Synthese des alkinylierten Boroxols 129 als Clickbaustein.

Ortho-Formylboronsäure **126** konnte käuflich erworben werden und ließ sich, nach Pinakolschützung, relativ einfach, wenn auch mit mäßiger Ausbeute ins Boroxol **128** überführen. Die Reduktion der Aldehydfunktion durch Trimethylsilylacetylen führte auf Grund der Boroxolbildung zu einer partiellen Abspaltung der Schutzgruppe, die meist bei der säulenchromatographischen Reinigung über Kieselgel vervollständigt wurde. Basische Abspaltung der TMS-Grupe ergab in guter Ausbeute den ligationsfähigen Baustein **129**. Diese Syntheseroute lieferte zwar in kurzer Zeit die gewünschte Verbindung, das Edukt war jedoch vergleichsweise teuer und ließ sich nicht effizient in 4- oder 5-Position für die Installation eines Linkers funktionalisieren. *Ortho*-Brombenzaldehyd **33** dagegen ließ sich einfach und günstig in unterschiedlich funktionalisierter Form herstellen (siehe Synthese von **34** und **35**). Der Boroxolvorläufer **130** konnte in quantitativer Ausbeute isoliert und mittels chiraler HPLC sogar in seine Enantiomere getrennt werden (siehe Chromatogramm 4, Anhang). Dagegen brachte die Borierung auf Grund des ungeschützten Alkohols erneut große Schwierigkeiten mit sich. Auch ein Überschuss an Reagenzien und *in-situ* zugesetztes Trimethylsilylchlorid zeigten keinen wesentlichen Einfluss auf die Ausbeute. Dennoch konnte auch auf diesem Weg

die gewünschte Verbindung **129** synthetisiert und damit ein Zugang zu variabel substituierten und alkinylierten Boroxolen etabliert werden.

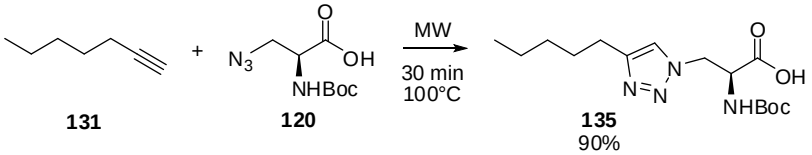
4.4.4 Clickreaktionen

Bevor die eigentlichen Zielverbindungen eingesetzt wurden, sollten zunächst die Reaktionsbedingungen für die 1,3-dipolare Cycloaddition optimiert werden. Zu diesem Zweck wurden in einer Testreaktion Heptin **131** und Benzylazid **132** unter zwei verschiedenen Standardbedingungen miteinander umgesetzt (Schema 4-27). Die Reaktion bei Raumtemperatur verlief unvollständig und ergab nach wässriger Aufarbeitung ein Regioisomerengemisch **133**/**134** in niedriger Ausbeute. Das Verhältnis ließ sich auf Grund einer Überlappung der ^{1}H-NMR-Signale nicht genau bestimmen, lag aber deutlich auf der Seite des sterisch ungehinderten 1,4-Isomers. Dieselben Reagenzien unter Mikrowellenbedingungen führten dagegen vollständig und ausschließlich zum gewünschten 1,4-Isomer **133** innerhalb von nur 30 Minuten. In beiden Fällen gestaltete sich jedoch die vollständige Entfernung von Kupferresten schwierig, was zu verbreiterten Signalen im ^{1}H-NMR führte.



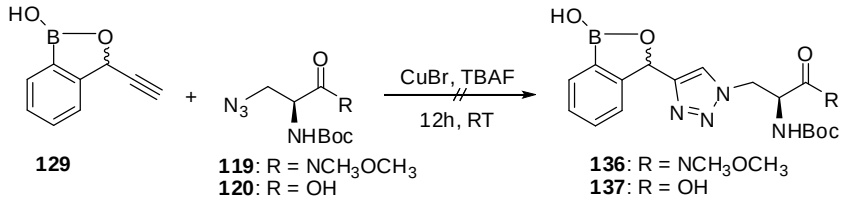
Schema 4-27: Modellversuch zur Optimierung der Clickreaktion.

Daraufhin wurde die Reaktion mit dem C-terminal ungeschützten Azidalanin **120** durchgeführt (Schema 4-28). Auch hier entstand das gewünschte Produkt mit guter Selektivität und Ausbeute, wenngleich die analysenreine Isolierung von **135** durch säulenchromatographische Reinigung nicht ganz vollständig gelang.



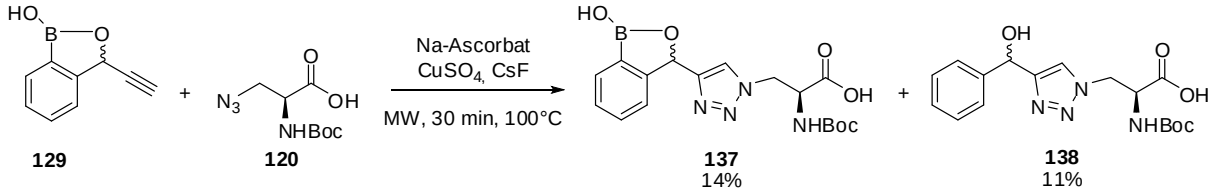
Schema 4-28: Clickreaktion mit Azidalanin 120.

Obwohl damit eine effiziente Methode zur Durchführung der Clickreaktion etabliert war, war eine Zersetzung des alkinylierten Boroxols **129** unter den harschen Bedingungen der Mikrowelle zu befürchten. Aus diesem Grund wurden hier ebenfalls Vorversuche bei Raumtemperatur durchgeführt. Weder das ungeschützte, noch das geschützte Azidderivat ergaben jedoch das gewünschte Cycloadditionsprodukt **136** bzw. **137**, welche lediglich in Spuren massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnten (Schema 4-29). Stattdessen wurden in beiden Fällen die eingesetzten Edukte reisoliert. Offensichtlich waren die gewählten Reaktionsbedingungen auch in diesem Fall zu mild um eine effektive Umsetzung zu bewirken.



Schema 4-29: Clickreaktion zur Herstellung der Boroxole 136 und 137.

Daraufhin wurde die Reaktion unter Mikrowellenbestrahlung wiederholt (Schema 4-30). Tatsächlich konnte in diesem Fall das Cycloadditionsprodukt **137** sowie das deboronierte Zersetzungsprodukt **139** analysenrein erhalten werden. Wegen Trennungsschwierigkeiten bei der säulenchromatographischer Reinigung konnten die Verbindungen jedoch nur mit geringen Ausbeuten isoliert werden. Eine weitere Optimierung von Reaktionsbedingungen und Aufarbeitung erfolgt zurzeit in der Masterarbeit von Frau Karolina Graczyk.



Schema 4-30: Clickreaktion zum Boroxol 138 und dem Zersetzungsprodukt 139.

Trotz dieser Schwierigkeiten bei der Isolierung der Kupplungsprodukte konnte mit Hilfe des clickfähigen Boroxols **129** ein neuer, effektiver Zugang zu Peptid-Boroxolkonjugaten etabliert werden. Kurze Reaktionszeiten, die Tolerierung funktioneller Gruppen und eine geringe Zahl an Nebenprodukten machen die Huisgen-Cycloaddition zu einer potenten Schlüsselreaktion in der Entwicklung von Kohlenhydratrezeptoren. Insbesondere das gewählte Azidalanin **120** sollte für diesen Reaktionstyp geeignet sein, da sein günstiges Heteroatommuster eine Vorkomplexierung des Kupferions [**120**-Cu^{+}] ermöglicht und Clickreaktionen somit entropisch begünstigt sind.[201] Zukünftige Aufgaben liegen vor allem in

der enantioselektiven Synthese verschiedener Boroxolbausteine und einer erhöhten Stabilität der Kohlenstoff-Bor-Bindung gegenüber Kupferionen. Letzteres Problem lässt sich von zwei Seiten angehen. Da zweizähnige Schutzgruppen für Boroxole ungeeignet sind bleibt auf der Seite des Rezeptors nur der Einsatz noch stärker komplexierter Boronsäuren wie **139**, um die Kohlenstoff-Bor-Bindung sterisch abzuschirmen.[202] Auf der Seite des Katalysators dagegen bieten sich verschiedene Lösungsansätze an. Phosphor- oder Stickstoff-haltige Liganden wie TBTA sind leicht selber herzustellen und können die Aktivität des Kupferions und möglicherweise auch die Insertionstendenz beeinflussen.[203] Eine andere Möglichkeit stellen heterogene Kupferkatalysatoren dar. Diese besitzen nicht nur ein anderes Wirkungsprofil als lösliche Kupfersalze, sie lassen sich nach der Reaktion auch leichter vom Produkt abtrennen und, falls gewünscht, recyclen.[204-206] Schließlich bleibt noch die Erprobung alternativer Metalle, die ebenfalls eine Cycloaddition katalysieren können, wie z.B. Zink.[207]

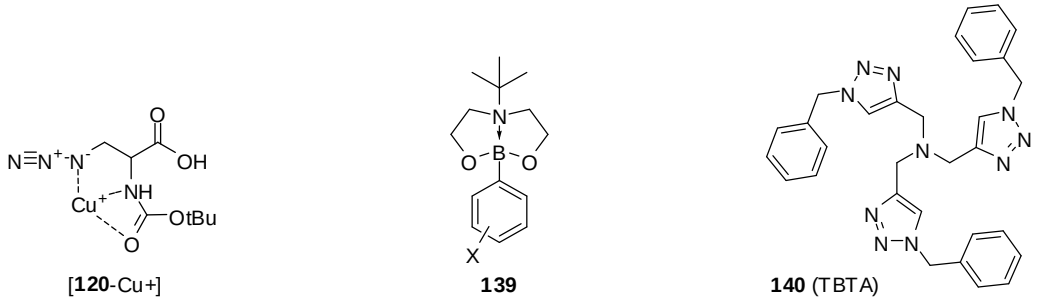
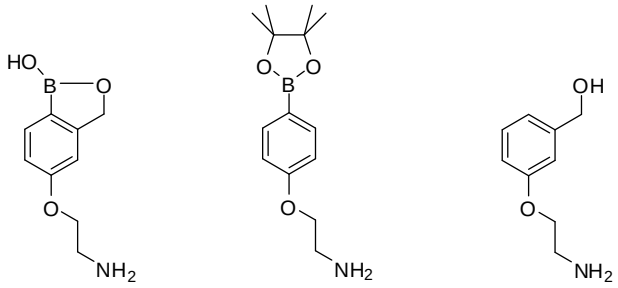


Abbildung 4-6: Mögliche Einflussfaktoren für die Clickreaktion des Boroxols 129.

4.5 Derivate mit Linker

Um bei der mono- oder multivalenten Kohlenhydraterkennung eine differenzierte Struktur-Wirkungsbeziehung herstellen zu können, sollten neben den angestrebten Peptidboroxolkonjugaten bestimmte Referenzverbindungen zum Vergleich synthetisiert werden. Das Boroxol **141** stellt den nicht-chiralen Kern der Konjugate dar und ermöglicht es, den Einfluss chiraler Reste zu untersuchen. Ein Aminlinker würde der Verknüpfung mit multivalenten Grundgerüsten, später auch der Festphase oder Reportermolekülen dienen. Das Bindungsverhalten der Phenylboronsäure **142** dagegen sollte Aufschluss über den Einfluss der benzylischen OH-Funktion liefern. Der Benzylalkohol **143** würde als Blindprobe dienen und Informationen über das Ausmaß hydrophober Wechselwirkungen liefern.



141 **142** **143**

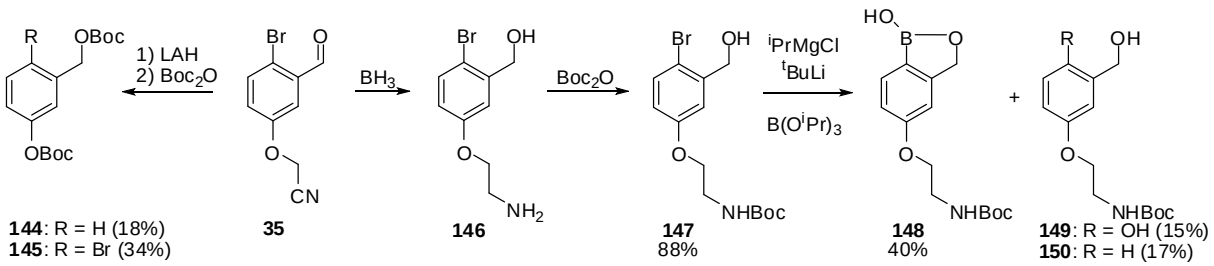
Abbildung 4-7: Vergleichssubstanzen für die Evaluierung chiraler Peptid-Boroxolkonjugate.

4.5.1 Synthese des Boroxols

Die Synthese des Boroxols **148** erfolgte aus dem bereits vorhandenen Baustein **35** (Schema 4-31). Nitril- und Aldehydfunktion konnten in einem Schritt reduziert werden. Zunächst wurde dazu Lithiumaluminiumhydrid (LAH) verwendet, was jedoch zur Abspaltung des Phenollinkers führte und nach Boc-Schützung die beiden Zersetzungsprodukte **144** und **145** ergab. Das mildere Boran dagegen führte unter gleichen Reaktionsbedingungen und mit guter Ausbeute zum gewünschten Amin und nach Boc-Schützung zum Zwischenprodukt **147**. Damit konnte **147**, ausgehend vom bromierten Phenol **42**, ohne säulenchromatographische Reinigung analysenrein und mit einer Ausbeute von 85% über drei Stufen erhalten werden.

Die anschließende Borierung unter Standardbedingungen zum Boroxol **148** ergab trotz wiederholter Durchführung nur eine maximale Ausbeute von 40% und lag damit vergleichbar niedrig wie beim Boroxol **128**. Zumindest erwies sich die Reaktion als skalierbar, denn dasselbe Ergebnis wurde auch bei größeren Ansätzen mit 3 g Edukt erzielt. Auch in diesem Fall konnten Zersetzungs- und Hydrolyseprodukte wie **149** und **150** identifiziert, sowie Edukt reisoliert werden. Ebenso wurde die bereits erwähnte partielle Abspaltung der Pinakol-Schutzgruppe beobachtet, so dass im weiteren Verlauf auf zyklische Boronsäureester als Reagenzien verzichtet wurde. Die Hauptursachen für die Ausbeuteverluste wurden in den beiden aciden Protonen, Resten an Feuchtigkeit im Reaktionsgefäß sowie der säulenchromatographischen Reinigung über Kieselgel vermutet. Letztere erwies sich nicht nur durch starke Fraktionsverbreiterung als schwierig, sondern stand auch im Verdacht das Produkt irreversibel zu adsorbieren oder zu hydrolysieren und somit die Ausbeute nachträglich zu verringern. Der Versuch das Rohprodukt über Säure-Base-Wäsche oder verschiedene HPLC-Phasen (RP18, Chromolith RP18, RP8, Phenyl, Diol, Amin, Kieselgel) effektiv zu trennen blieb jedoch erfolglos. Auch ein von Hall beschriebener, Kohlenhydrat-vermittelter Phasentransfer von Boronsäuren brachte nicht den gewünschten

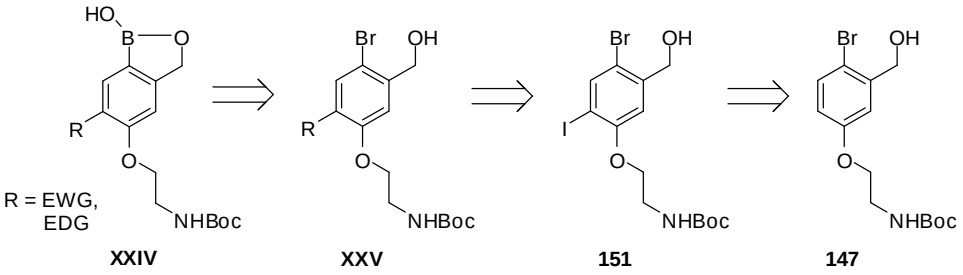
Reinigungseffekt.[208] Die säulenchromatographische Trennung über Kieselgel blieb damit die einzige Methode um das Produkt in analysenreiner Form zu isolieren.



Schema 4-31: Synthese des Boroxols 148 aus dem bromierten Benzaldehyd 35.

4.5.2 Derivatisierung des Boroxols

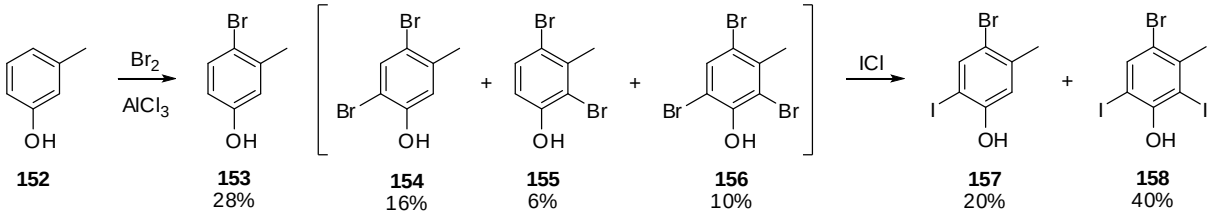
Wie bereits in Abschnitt 1.2.1 erwähnt, ist die Bindung von Kohlenhydraten maßgeblich von der Acidität der Boronsäure und damit auch von den elektronischen Eigenschaften des Aromaten abhängig. So weisen elektronenarme Phenylboronsäuren eine tendenziell höhere Affinität als elektronenreiche auf.[209] Um das Boroxol **148** elektronisch zu modifizieren, musste ein Weg gefunden werden, möglichst spät in der Synthesesequenz elektronenschiebende oder –ziehende Reste am Aromaten einzuführen, ohne dabei mit der Bindungseinheit zu interferieren. Zu diesem Zweck bot sich eine Iodierung des bromierten Vorläufers **147** in *para*-Stellung zum Benzylalkohol an (Schema 4-32). Diese Position war sowohl sterisch als auch elektronisch begünstigt und sollte bei einer aromatischen Halogenierung regioselektiv besetzt werden. Knochel *et al.* hatten zuvor gezeigt, dass sich mit Hilfe von Grignardreagenzien das Iodid in bihalogenierten Aromaten chemoselektiv mit Elektrophilen substituieren lässt.[179] Die resultierenden Bromphenole **XXI** sollten dann, analog zur bisherigen Vorgehensweise, in die Boroxole **XXIV** überführt werden.



Schema 4-32: Retrosynthese des substituierten Boroxols XXIV.

Um die Durchführbarkeit der Reaktion zu überprüfen wurde zunächst eine Iodierung von Bromkresol **152** als Modellverbindung versucht (Schema 4-33). Die Herstellung des Eduktes mit Brom und Aluminiumchlorid aus *meta*-Kresol gelang zwar, führte jedoch auch zu einer Reihe von Nebenprodukten. Das Weglassen des Lewis-Katalysators reduzierte den Anteil der

dibromierten (von 22% auf 6%) und tribromierten Phenole (von 10% auf <1%), ergab aber das gewünschte Produkt **153** ebenfalls mit nur 28%. Die insgesamt geringe Ausbeute ist in beiden Fällen einem versehentlichen Waschschritt mit 2 M Natronlauge zuzuschreiben, so dass von einem vollständigen Umsatz ausgegangen werden kann. Die anschließende Reaktion mit elementarem Iod lieferte ausschließlich das Edukt **153**. Erst die Verwendung von Iodmonochlorid lieferte die nötige Reaktivität und ergab das gewünschte Produkt **157** sowie, auf Grund eines geringen Reagenzüberschusses, das diiodierte Phenol **158**.[210] Beide Spezies waren bei Raumtemperatur hinreichend stabil und konnten mittels Säulenchromatographie getrennt werden. Die damit erzielte Ausbeute von 60% Iodierungsprodukt erschien vielversprechend genug, um eine entsprechende Versuchsreihe am Zielsubstrat **147** durchzuführen.



Schema 4-33: Modellversuch zur Iodierung des bromierten Kresols 139.

Zusammenfassend kann vorweggenommen werden, dass keine der gewählten Versuchsbedingungen eine Iodierung zum Produkt **137** herbeiführte (Schema 4-34 A). Trotz systematischer Variation von Temperatur (-40 °C – 110 °C), Lösungsmittel (Methanol, Dichlormethan, Chloroform, DMF, Wasser) und Katalysator (Aluminiumchlorid, Periodsäure, Silbertrifluoracetat) wurde in allen Fällen das eingesetzte Edukt reisoliert und die Versuchsreihe schließlich abgebrochen. Es steht zu vermuten, dass der Phenollinker aus sterischen Gründen keine Iodierung in *ortho*-Position zuließ.



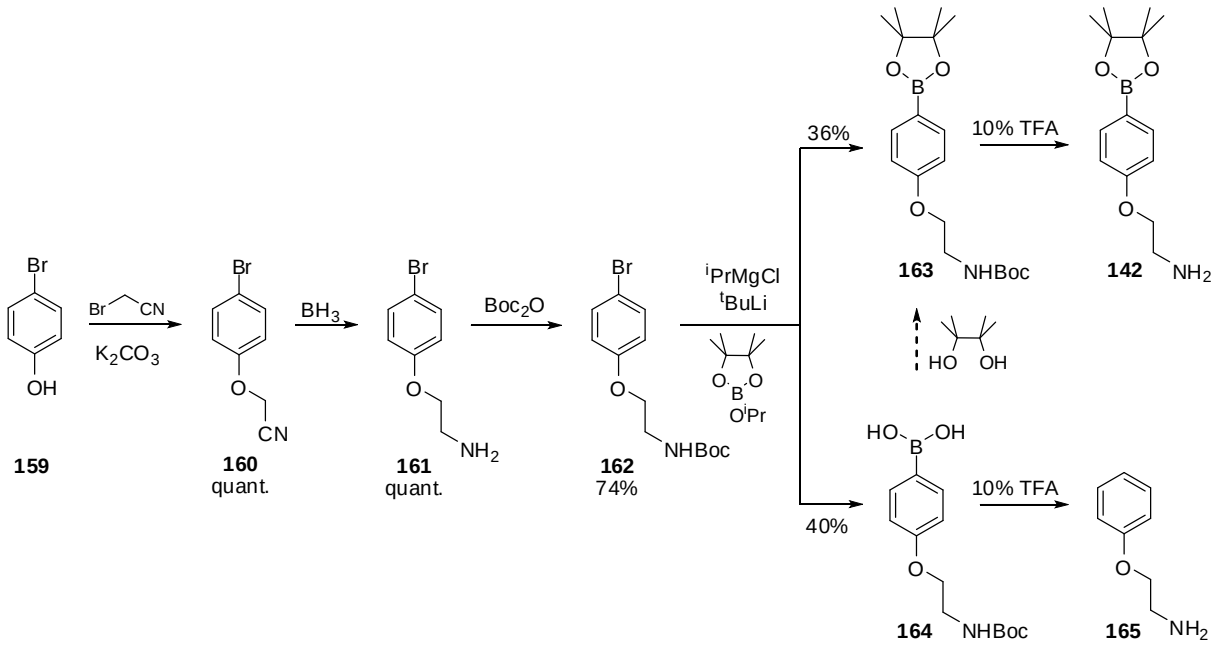
Schema 4-34: A) Iodierung des Boroxolvorläufers 147; B) Entschützung des Boroxols 148.

Die abschließende Abspaltung der Boc-Gruppe erfolgte durch 90-minütiges Rühren in 10% Trifluoressigsäure (TFA) bei 0 °C (Schema 4-34 B). Vor allem Abweichungen in der Temperatur oder Säurekonzentration führten zum Auftreten von Zersetzungsprodukten oder Eduktresten (ESI-MS), so dass die Hydrolysebedingungen strikt eingehalten wurden.

Lediglich die Reaktionszeit musste bei größeren Ansätzen etwas verlängert werden, um einen vollständigen Umsatz zum gewünschten Amin **141** zu erreichen.

4.5.3 Synthese der Phenylboronsäure

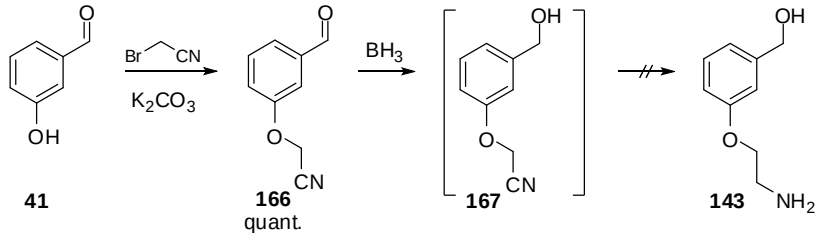
Die Synthese der Boronsäure **163** entsprach im Wesentlichen der bisherigen Vorgehensweise, ging jedoch von *para*-Bromphenol **159** als Edukt aus (Schema 4-35). Nach Kupplung des Phenols mit Bromacetonitril, Reduktion von Aldehyd und Nitril durch Boran und Boc-Schützung erhielt man den Vorläufer **162** mit guter Ausbeute und analysenrein ohne säulenchromatographische Reinigung. An dieser Stelle machte sich das Wegfallen der aciden OH-Gruppe bemerkbar, denn die anschließende Borierung verlief mit insgesamt 76% fast doppelt so gut wie beim Boroxol **148**. Mehr als die Hälfte des Produktes wurde als freie Boronsäure **164** isoliert, die sich jedoch säulenchromatographisch gut abtrennen ließ. Da das Borreagenz keine Anzeichen der Zersetzung zeigte und Verbindung **164** schon im Rohprodukt auftrat, muss die Abspaltung der Pinakolgruppe während der Reaktion oder aber bei der wässrig-sauren Aufarbeitung passiert sein. Dies war nicht unwesentlich, da nur die geschützte Boronsäure **163** gegenüber der sauren Boc-Abspaltung inert war und zum gewünschten Amin **142** führte, während bei Verbindung **164** eine vollständige Deboronierung zum unsubstituierten Phenol **165** eintrat. Die guten Ausbeuten bei der Pinakolschützung anderer Boronsäuren (siehe **127**) sprechen jedoch dafür, dass sich die freie Boronsäure **164** gut nachträglich schützen lässt.



Schema 4-35: Synthese der ligationsfähigen Boronsäure 142.

4.5.4 Synthese des Blindrezeptors

Der Blindrezeptor **143** sollte nach analogem Vorgehen aus *meta*-Hydroxybenzaldehyd **41** synthetisiert werden (Schema 4-36). Die Kupplung des Phenols mit Bromacetonitril verlief wie zuvor quantitativ, doch die Zugabe von Boran ergab lediglich die Reduktion des Aldehyd. Andere Reagenzien wie Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL), Lithiumaluminiumhydrid (LAH) oder Wasserstoff bewirkten ebenfalls eine Reduktion zum Benzylalkohol **167**, führten aber zu komplexen Gemischen, die sich nicht aufreinigen ließen. Offensichtlich fehlte in diesem Fall der elektronische Einfluss des Bromids um auch die Nitrilfunktion effektiv zu reduzieren. Aus diesem Grund wurde beschlossen den bereits synthetisierten und ebenfalls nicht-boronierten Baustein **161** als Blindrezeptor zu nutzen.



Schema 4-36: Synthese des Blindrezeptors 143.

4.6 Multivalente Systeme

Um die drei synthetisierten Kohlenhydratrezeptoren **141**, **142** und **161** in Multivalenzassays zu testen wurden entsprechende Grundgerüste benötigt, die als Träger fungieren konnten. Mit Hinblick auf das bei Lektinen häufig auftretende tripodale Motiv und die Absicht einer kleinen, systematischen Bindungsstudie wurde zu diesem Zweck Adamantan ausgewählt (Abbildung 4-8).

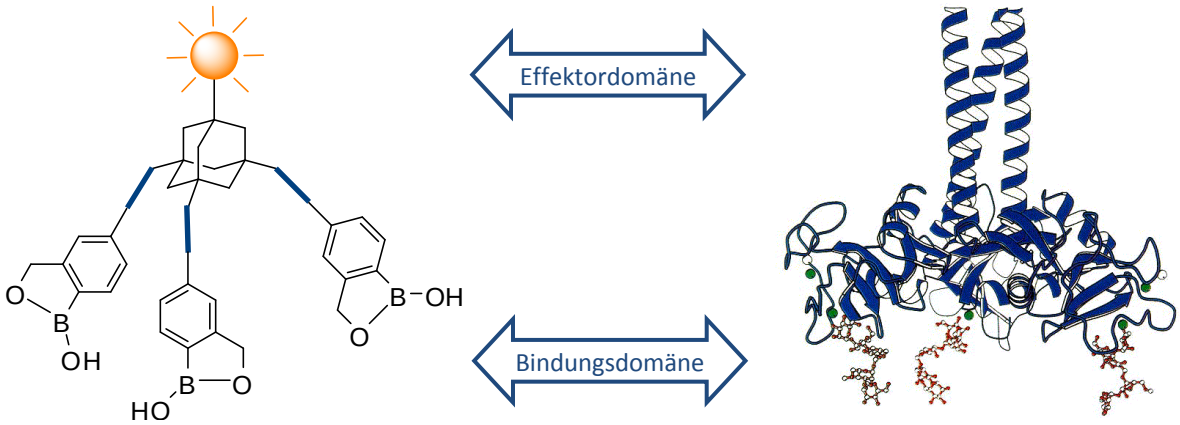


Abbildung 4-8: Multivalente Boroxole als niedermolekulare Lektinmimetika (MBP-A[62]).

Dieses rigide Kohlenstoffgerüst lässt sich leicht an seinen vier Brückenkopfatomen funktionalisieren und präsentiert an diesen Stellen gekuppelte Rezeptoren in tetraedrischer

Form. Der Austausch eines der vier Rezeptoren mit einem Reporter- oder Effektormolekül bietet die Möglichkeit die Erkennung eines bestimmten Kohlenhydratepitops an ein beliebig wählbares Signal zu kuppeln ohne dabei mit dem Bindungsprozess zu interferieren.

4.6.1 Synthese der Grundgerüste

Zur Untersuchung der Parameter Valenz, Flexibilität und Größe der multivalenten Rezeptoren in der Bindungsstudie wurden in einem übergreifenden Projekt von drei Bachelorarbeiten eine Reihe unterschiedlicher Adamantylcarbonsäuren **168-173** und ihre flexiblen Analoga **174-178** synthetisiert (Abbildung 4-10). Der Übersicht halber wurde auf eine Darstellung der Synthesen verzichtet, sie sind (einschließlich der analytischen Daten) in den Arbeiten von Herrn Carsten Fleck und Herrn Christian Seitz zu finden. Alle Systeme wurden als Mono-, Di- und Trimer, sowie mit zwei Linkerlängen hergestellt. Einzige Ausnahme stellte das Monomer **174** dar, zwischen dessen kurzer und langer Form kein wesentlicher Unterschied im Bindungsverhalten erwartet wurde. Aus Zeitgründen wurde die vierte Position nicht für die Installation eines Effektor- oder Reportermoleküls funktionalisiert.

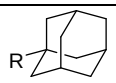
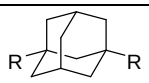
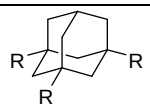
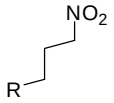
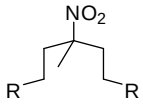
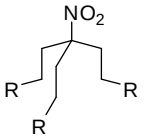
	Monomer	**Dimer**	**Trimer**
Rigide	 **168**: R = COOH **169**: R = $(CH_2)_2$COOH	 **170**: R = COOH **171**: R = $(CH_2)_2$COOH	 **172**: R = COOH **173**: R = $(CH_2)_2$COOH
Flexibel	 **174**: R = COOH	 **175**: R = COOH **176**: R = $(CH_2)_2$COOH	 **177**: R = COOH **178**: R = $(CH_2)_2$COOH

Abbildung 4-9: Bibliothek multivalenter Grundgerüste für die Ligation mit Kohlenhydratrezeptoren.

4.6.2 Kupplung der Rezeptoren

Alle Peptidkupplungen wurden mit HBTU durchgeführt, da in Vorversuchen hiermit bessere Ergebnisse erzielt worden waren als mit EDC/HOBt, NHS-Estern oder Säurechloriden. Es stellte sich jedoch bald heraus, dass auf eine Umsetzung der dimeren Grundgerüste und derer mit langen Seitenketten verzichtet werden musste. Die Kupplungen nahmen mehr Zeit für die Reinigung in Anspruch und verbrauchten größere Substanzmengen der im Überschuss eingesetzten Rezeptoren als veranschlagt. Insbesondere die Trennung der

trimeren Zielsubstanzen von Resten der Kupplungsreagenzien stellte sich immer wieder als Herausforderung dar und ließ sich methodisch nicht standardisieren. Die Isolierung der Monomere dagegen verlief meist unproblematisch und mit guten Ausbeuten. Reste an HOBt konnten oft nur durch Rühren in Diethylether minimiert, aber nicht vollständig entfernt werden. Darüber hinaus gestaltete sich die Boc-Entschützung der beiden Boronsäuren **148** und **163** als schwierig. Auf Grund der größeren Substanzmengen musste die Reaktionszeit häufig verlängert werden um einen vollständigen Umsatz zu erhalten. Dies führte jedoch teilweise zur Deboronierung der Rezeptoren, was die spätere Reinigung erwschwerte und die Ausbeute reduzierte. Aus diesem Grund konnten die meisten Kupplungsprodukte der Pinakol-geschützten Boronsäure **163** nicht analysenrein isoliert, sondern nur massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

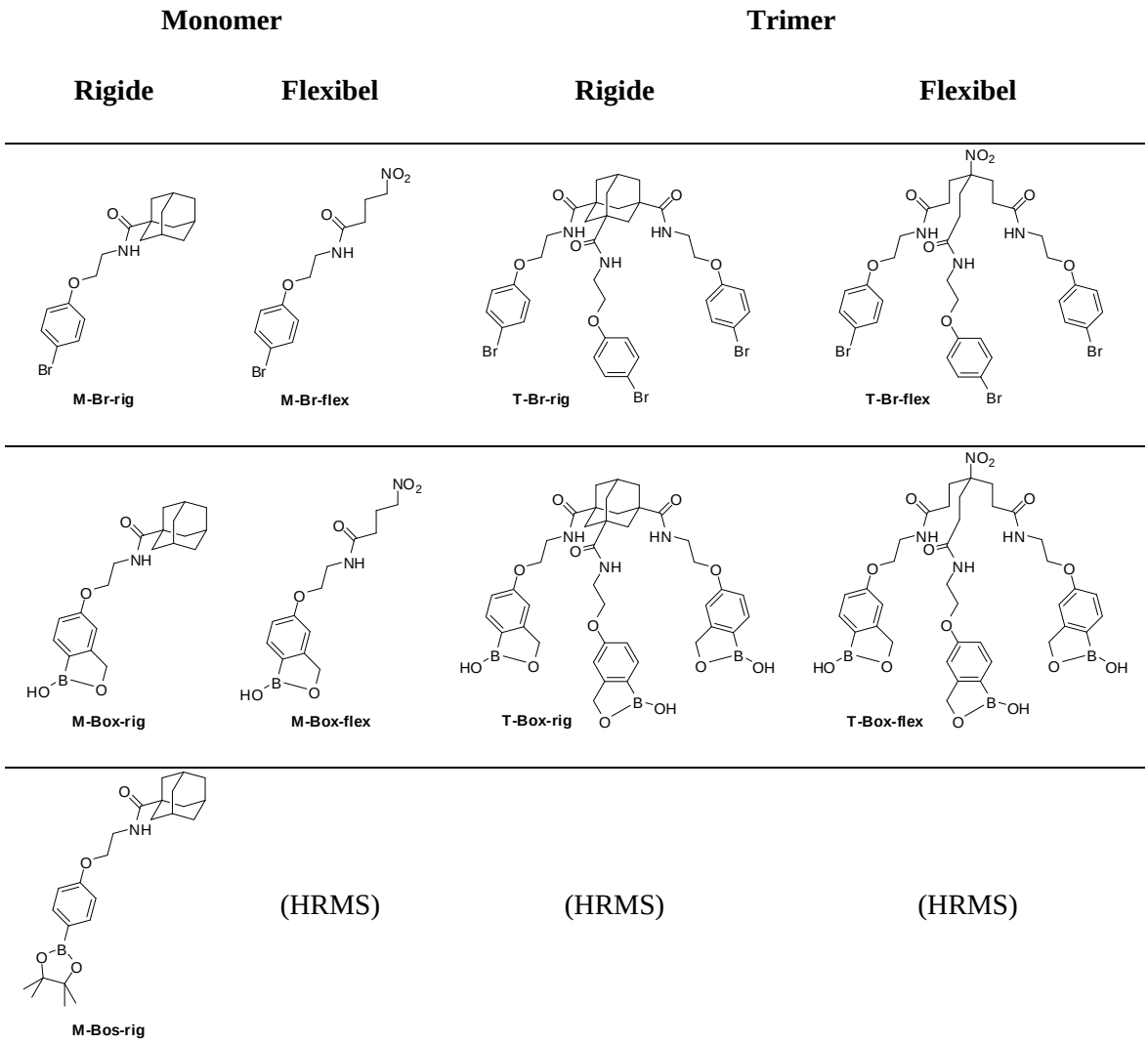


Abbildung 4-10: **Bibliothek erfolgreich gekuppelter, multivalenter Kohlenhydratrezeptoren (M = Monomer, T = Trimer, Br = Bromid, Bos = Boronsäure, Box = Boroxol).**

Ein Versuch, das gekuppelte Tribromid T-Br-rig nachträglich zu T-Bos-rig zu borieren, führte zu einem komplexen Produktgemisch und stellte keine effiziente Alternative dar. Das Boroxol **148** erwies sich dagegen als stabilere Funktionalität bei der Boc-Entschützung und ließ sich in fast allen Kombinationen gut säulenchromatographisch aufreinigen. Damit stand eine kleine, aber strukturell klar charakterisierte Bibliothek von monovalenten und trivalenten Systemen für Bindungsstudien an Kohlenhydraten zur Verfügung (Abbildung 4-11).

4.7 Bindungsassays

In der Literatur existiert eine Vielzahl von Methoden zur Bestimmung von Bindungskonstanten, bei denen man sich eine Änderung bestimmter Eigenschaften bei der Komplexierung zunutze macht.[211] Bei größeren und biologisch aktiven Molekülen wie Enzymen stehen meist chemische Größen wie Reaktivität oder inhibitorische Aktivität im Vordergrund. Interessante Parameter bei der Beobachtung kleiner Moleküle sind dagegen meist eher physikalischer Natur wie Löslichkeit, Resonanzverhalten, Diffusion sowie optische oder elektronische Eigenschaften. Eine Bindungsbildung zwischen Boronsäuren und Kohlenhydraten kann mit Hilfe von pH-Wertmessungen,[212] Potentiometrie,[213] Konduktometrie,[214] sowie Oberflächenplasmonenresonanz-,[215] Fluoreszenz-, UV/VIS-,[216] IR-,[217] NMR-[218] oder CD-Spektroskopie[219] verfolgt werden. Die weitaus am häufigsten verwendeten Techniken sind jedoch UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie, die mit relativ einfachen Mitteln schnell durchzuführen sind und innerhalb eines Assays meist zu realistischen Bindungsverhältnissen führen. Ein Vergleich von Bindungskonstanten zwischen verschiedenen Assays oder sogar Methoden ist dagegen äußerst schwierig, da sich hier Fehlerquellen unterschiedlich stark auswirken können. Zu letzteren gehören vor allem Mediumeffekte, stöchiometrische Verhältnisse und die Art der Datenauswertung.[211,220] Im Falle der Kohlenhydratbindung wird eine Analytik zusätzlich durch die Mutarotation der Zucker sowie die Stereogenität der Boronsäuren verkompliziert. Jedes Diol kann mit einer Boronsäure einen exo- und einen endo-Ester bilden, in manchen Fällen wie der Fructose auch noch in einer tridentalen Form (Abbildung 4-12). Zusammen mit den verschiedenen Diolen eines Zuckers sowie intra- und intermolekularen Gleichgewichtsformen von Boronsäuren führt dies zu einer Vielzahl möglicher Strukturen, die eine Analyse mit strukturbasierten Methoden wie der NMR-Spektroskopie erschweren.[136,221-223] Als weitere Konsequenz können Bindungskonstanten selbst bei Monosacchariden nur als gemittelter Wert K_{app} (*eng*. appear = erscheinen) bestimmt werden. Ein Vergleich von Bindungskonstanten unterschiedlicher

Messreihen ist somit nur unter Vorbehalt möglich und eine Kalibrierung mit bereits bekannten Zucker-Boronsäure-Paaren unerlässlich.

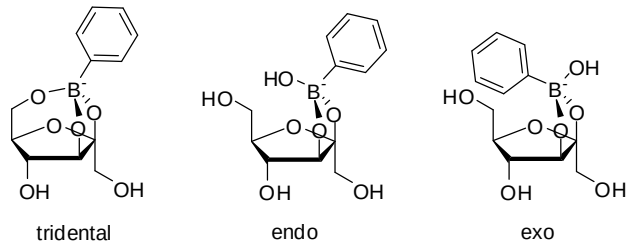
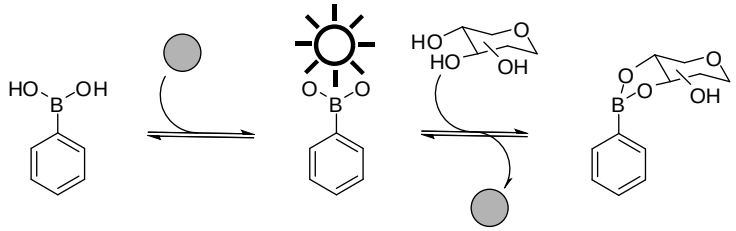


Abbildung 4-11: Mögliche Ester aus Phenylboronsäure und β-D-Fructose.

4.7.1 Fluoreszenzassay

Ein Fluoreszenzassay ist nicht nur schnell und mit relativ einfachen Geräten durchführbar, er bietet sich in der Variante eines Kompetitionsassays auch für Verbindungen an, die selbst gar nicht fluoreszieren. Catechole stellen eine große Klasse von Fluorophoren dar, die auf Grund ihrer hohen Acidität eine starke Affinität zu Boronsäuren zeigen. Da ihre optischen Eigenschaften mit den elektronischen korrelieren, wirkt sich die Interaktion mit einer Boronsäure direkt auf das Absorbtions-, bzw. Emissionsspektrum aus, was sich als Signal für die Bindung quantitativ auswerten lässt. In der Praxis werden nacheinander zwei Bindungskonstanten bestimmt (Schema 4-37). Im ersten Gleichgewicht wird die Affinität der freien Boronsäure zum Catechol bestimmt, welches in seiner komplexierten Form stark zu fluoreszieren beginnt. Bei Zugabe eines Zuckers oder eines anderen bindungsfähigen Diols wird das Catechol nach und nach von der Boronsäure verdrängt und liegt nun wieder in freier Form vor. Je größer also die Affinität der Boronsäure zum Zucker, desto schneller ist der Fluoreszenzabfall in diesem Gleichgewicht.



Schema 4-37: Kompetitiver Fluoreszenzassay zur Bestimmung von Bindungskonstanten.

4.7.2 Etablierung des ARS-Assay

Der erste kompetitive Fluoreszenzassay zur Untersuchung von Zucker-Boronsäure-Gleichgewichten wurde 2001 auf der Basis des fluorophoren Catechols Alizarin (ARS, Alizarin red sodium) von Wang *et al.* entwickelt.[224-225] Auf Grund seiner einfachen

Durchführung wurde dieses Messverfahren seitdem von mehreren Gruppen aufgegriffen um Bindungskonstanten von Boronsäuren zu ermitteln.[126,209,226] Ein späterer Vergleich verschiedener Catchole bestätigte ARS als geeignetstes Fluorophor, da hier die spektralen Unterschiede zwischen komplexierter und freier Form am größten waren.[227] Trotz seiner breiten Verwedung in der Literatur musste die genaue Durchführung und Reproduzierbarkeit des Assay jedoch zunächst unter den gegebenen Laborbedingungen etabliert werden. In einer ersten Versuchsreihe sollten daher unter physiologischen Bedingungen (PBS, pH 7.2-7.4) die Affinitäten von Phenylboronsäure (PBA), 3-Fluorphenylboronsäure (FPBA) und 3-Methoxyphenylboronsäure (MPBA) zu verschiedenen Monosacchariden bestimmt werden.

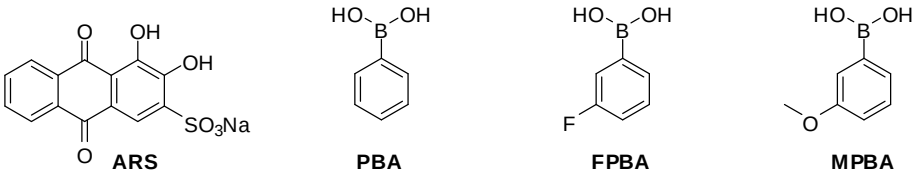


Abbildung 4-12: **Fluoreszenzfarbstoff ARS zur Bestimmung der Kohlenhydrataffinität dreier Phenylboronsäuren**

4.7.2.1 Optimierung der Messbedingungen

Zunächst wurde der Fluoreszenzfaktor des ARS·PBA-Komplexes bestimmt. Zu diesem Zweck wurde ARS zu einer neutral gepufferten, konzentrierten PBA-Lösung titriert und der Fluoreszenzanstieg dokumentiert. Als konstanter Messpunkt der Emission wurden 592 nm gewählt, da hier die Intensität bei maximaler Fluoreszenz am stärksten war (Diagramm 4-1). Das Verhältnis der Fluoreszenz bei dieser Wellenlänge zur ARS-Konzentration ließ sich gut durch eine Ausgleichsfunktion darstellen und lieferte einen durchschnittlichen Fluoreszenzfaktor von $1 \cdot 10^{-10}$ (Diagramm 4-2).

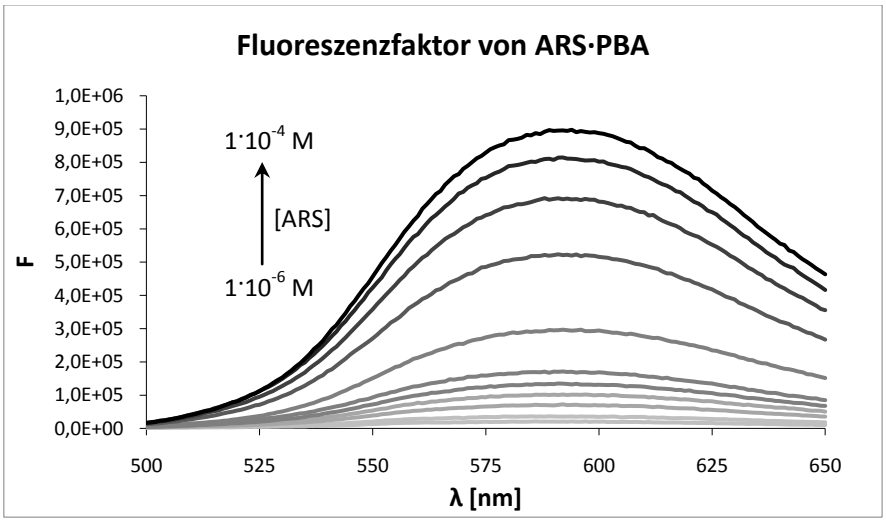


Diagramm 4-1: **Fluoreszenzspektren des ARS·PBA-Komplexes (λ_{Abs} = 468nm, PBA 0.05 M, pH 7.20, 0.1 M PBS).**

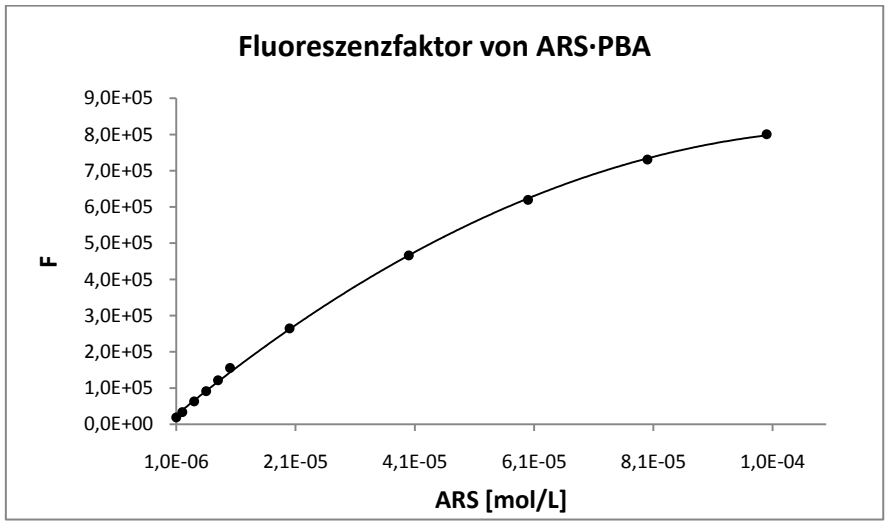


Diagramm 4-2: **Bestimmung des Fluoreszenzfaktors des ARS·PBA-Komplexes. (λ_{Abs} = 468 nm, λ_{Em} = 592 nm, PBA 0.05 M, pH 7.20, 0.1 M PBS).**

4.7.2.2 Erstes Gleichgewicht

Die Bestimmung der Bindungskonstanten im ersten Gleichgewicht erfolgte anhand unterschiedlicher Wellenlängen. Der Grund hierfür war eine Verschiebung der intensivsten Wellenlänge bei maximaler Emission der ARS-Boronsäurekomplexe (Diagramm 4-3).

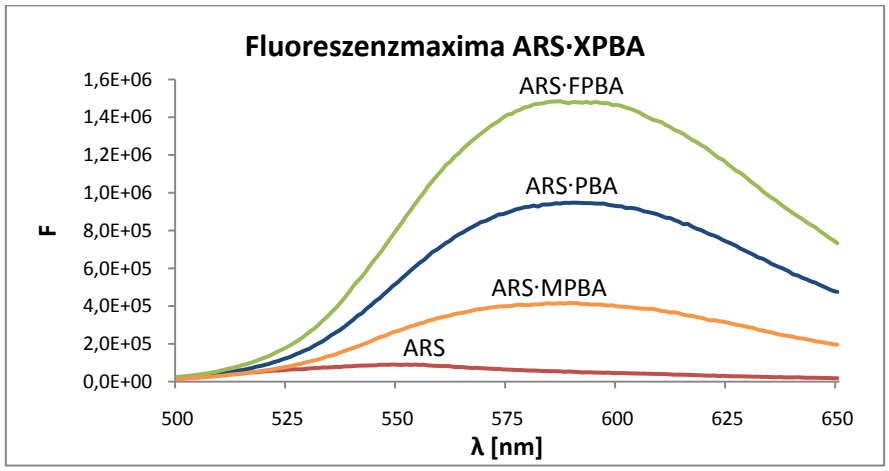


Diagramm 4-3: **Fluoreszenzspektren der ARS·XPBA-Komplexe bei 100 Äquivalenten Boronsäure (λ_{Abs} = 468 nm, ARS 9·10^{-6} M, 0.1 M PBS, pH 7.2 – 7.4).**

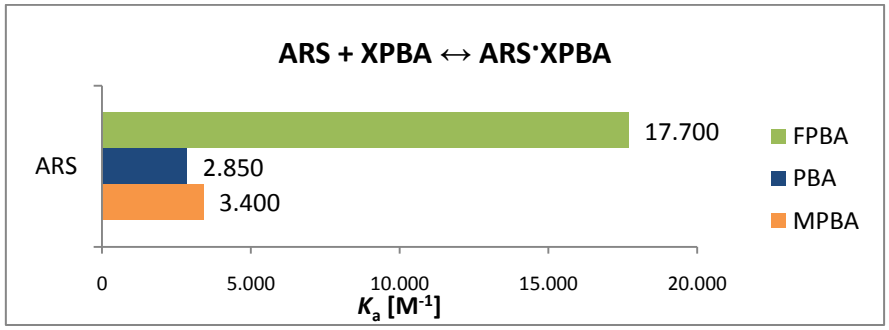


Diagramm 4-4: **Bindungskonstanten der ARS·XPBA-Komplexe (ARS 1·10^{-4} M, 0.1 M PBS, λ_{em}(FPBA) = 585 nm, λ_{em}(MPBA) = 591 nm, λ_{em}(PBA) = 592 nm, pH 7.2 – 7.4).**

Die Auswertung der einzelnen Bindungskurven ergab jedoch ein deutlich anderes Bild. Demnach besaßen MPBA und PBA eine vergleichbar geringe Affinität zum Catechol, während die Bindungskonstante des fluorierten Derivats rund sechsmal größer war (Diagramm 4-4).

4.7.2.3 Zweites Gleichgewicht

Nun konnten in einer weiteren Messreihe die Affinitäten der drei Boronsäuren zu Kohlenhydraten untersucht werden. Als biologisch relevante Monosaccharide wurden Glucose, Galactose, Fructose und Ribose gewählt. Mandelsäure sollte als Testligand für spätere chirale Boronsäurerezeptoren fungieren, während Catechol einen Vergleich mit dem Fluorophor ARS ermöglichte.

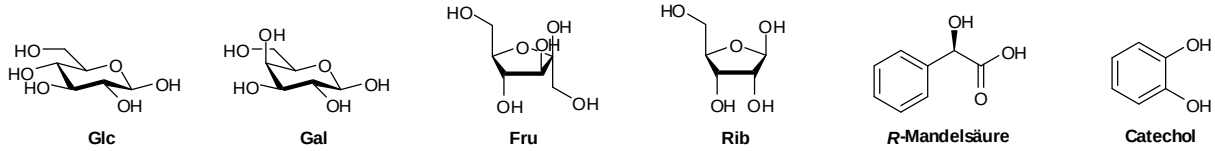


Abbildung 4-13: Biologisch relevante Monosaccharide und Diole, die im Bindungsassay getestet wurden.

Zunächst erfolgte eine Evaluierung der PBA-Bindungskonstanten anhand von Literaturwerten. Um die Ergebnisse besser miteinander abgleichen zu können, wurden die Bindungskonstanten für die ARS-Bindung gleichgesetzt. Die Übereinstimmung erwies sich (unter Berücksichtigung der Standardabweichung) als sehr gut (Diagramm 4-5). Dies bestätigte neben der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch die korrekte Durchführung des Assays.

Die im ersten Gleichgewicht beobachtete Reaktivitätsabstufung trat auch hier auf. Während PBA und MPBA über ein annähernd identisches Bindungsprofil verfügten, zeigte FPBA im Durchschnitt zehnmal höhere Bindungskonstanten. Die Einführung einer elektronenziehenden Gruppe führte damit wie erwartet zu einer drastischen Erhöhung der Affinität zu allen getesteten Diolen. Ein Effekt der elektronenschiebenden Methoxygruppen auf die Affinität konnte dagegen nicht festgestellt werden.

Auch die Selektivität der Diolbindung entsprach weitestgehend den Erwartungen und bereits publizierten Bindungsverhältnissen (s. Abschnitt 1.2.1). Catechol wurde von FPBA genauso gut gebunden wie ARS. Bei den schwächer bindenden Boronsäuren PBA und MPBA wirkten sich die unterschiedlichen elektronischen Eigenschaften dagegen deutlich auf die Bindungskonstante aus (nicht dargestellt). Sie zeigten in diesem Fall die bessere Selektivität. Mandelsäure wurde von PBA und FPBA ähnlich stark gebunden wie Ribose, nur MPBA

zeigte hier ein abweichendes Bindungsverhältnis von 3:1 und damit einen gewissen Einfluss des elektronenschiebenden Substituenden.

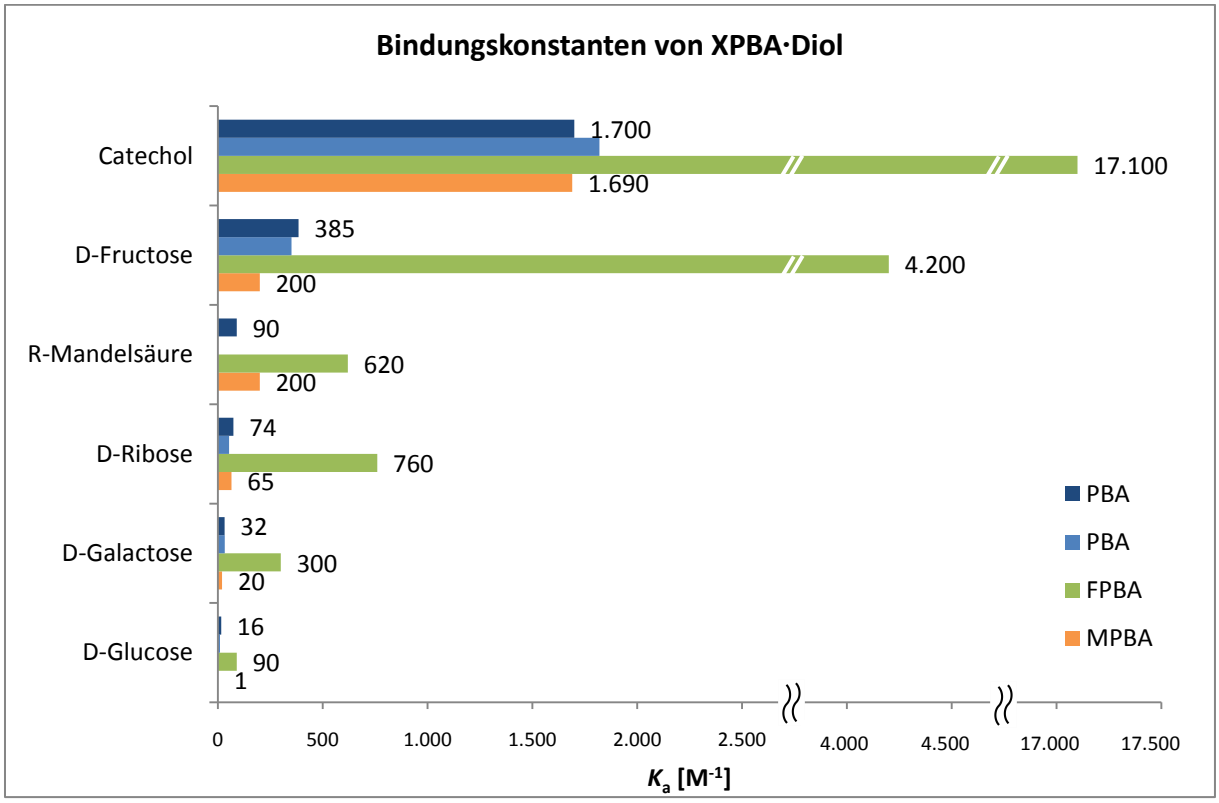


Diagramm 4-5: Bindungskonstanten der XPBA·Diol-Komplexe (0.1 M PBS, pH 7.38).

Somit war der ARS-Fluoreszenzassay zur Bestimmung von Bindungskonstanten in der Kohlenhydraterkennung erfolgreich etabliert und die gesammelten Daten verifiziert. Darüber hinaus konnten einige wichtige Erkenntnisse über die Durchführung der Messungen und das Bindungsverhalten der drei Boronsäuren gewonnen werden. Die schwache Bindung der Monosaccharide durch PBA und MPBA befand sich bereits in der Nähe der Nachweisgrenze und führte auf Grund des geringen Fluoreszenzabfalls zu großen Standardabweichungen. Des weiteren erforderte sie einen hohen Überschuss an Boronsäure um genügend komplexiertes ARS bereitzustellen, bzw. einen hinreichenden Fluoreszenzanstieg im ersten Gleichgewicht zu erhalten. Dieser Überschuss dürfte nicht nur das kompetitive Gleichgewicht der zwei Diole beeinflussen, sondern auch alle Eigenschaften des Mediums wie pH-Wert oder Ionenstärke. Bisweilen traten Löslichkeitsprobleme auf, so dass die Anzahl der Messpunkte beschränkt werden musste. Der Einsatz von Boronsäuren mit elektronenziehenden Substituenden eröffnet hier die Möglichkeit einerseits stabile und sicher zu bestimmende Kohlenhydratbindungen zu erreichen und andererseits das System so wenig wie möglich durch zusätzliche Einflüsse zu verfälschen. Eine andere Möglichkeit der Affinitätssteigerung liegt in der multivalenten

Präsentation von Boronsäuren. Diese Option sollte mit den zuvor hergestellten multivalenten Verbindungen in einem weiteren ARS-Assay getestet werden (s. Abschnitt 4.6.2).

4.7.3 Multivalenz-ARS-Assay

Der Multivalenz-ARS-Assay wurde analog zur soeben beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt, jedoch mit Hilfe eines HPLC-gekoppelten Fluoreszenzdetektors anstatt des bisher verwendeten Küvettengerätes. Die Verwendung einer HPLC brachte in Bezug auf den Fluoreszenzassay eine Vielzahl von Vorteilen mit sich. Der kontinuierliche Fluss ersparte das aufwändige und fehlerbehaftete Reinigen der Küvette nach jeder Messung. Zusammen mit der schnelleren (monochromatischen) Detektion konnte die Anzahl der Messungen pro Zeiteinheit dadurch drastisch erhöht und ihre Durchführung erleichtert werden. Die Verwendung einer analytischen Fließzelle ermöglichte eine starke Reduzierung der benötigten Probenmenge von 0.5 – 1 mL auf 20 µL pro Lauf, so dass bereits wenige Milligramm Substanz für mehrere Messungen ausreichten. Darüber hinaus bietet die einfache Kopplung der HPLC mit einem Autosampler die Möglichkeit der Programmierung und Automation, was gerade bei größeren Substanzbibliotheken von großem Nutzen wäre. Als einzige Einschränkung musste die intensivste Wellenlänge bei maximaler Emission separat bestimmt, bzw. eine zu messende Wellenlänge festgelegt werden. In diesem Fall wurde die Emission bei 592 nm detektiert. Bereits die Bestimmung des Fluoreszenzfaktors deutete auf die verbesserten Assaybedingungen hin (Diagramm 4-6). Derselbe Konzentrationsbereich an ARS wie zuvor lieferte diesmal ein lineares Verhältnis zur Fluoreszenzintensität und einen Fluoreszenzfaktor von $6 \cdot 10^{-10}$.

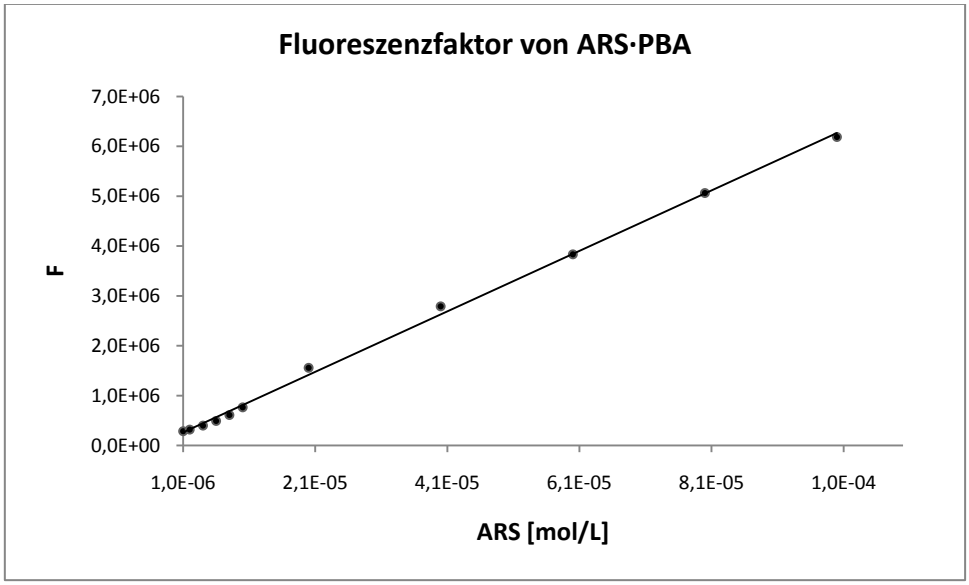


Diagramm 4-6: **Bestimmung des Fluoreszenzfaktors des ARS·PBA-Komplexes (λ_{Abs} = 468 nm, λ_{Em} = 592 nm, PBA 0.05 M, 0.1 M PBS, pH 7.2 – 7.4).**

4.7.3.1 Erstes Gleichgewicht

Zunächst wurde auch hier eine Messung des unsubstituierten PBA sowie des freien Boroxolrezeptors **141** zur Kalibration durchgeführt (Diagramm 4-7). Wie zu erwarten unterschied sich die neu ermittelte Bindungskonstante von PBA (K_a = 349 ± 9 M^{-1}) trotz ähnlicher Messbedingungen deutlich vom zuvor am Küvettengerät bestimmten Wert (K_a = 2850 ± 140 M^{-1}). Überraschend dagegen war ein Vergleich mit dem unverknüpften Boroxol. Die zusätzliche Wechselwirkung einer *ortho*-ständigen Methylhydroxygruppe im Boroxol resultierte in einer fast doppelt so hohen Bindungsaffinität wie bei PBA und erfüllte damit die gestellten Erwartungen. Diese Annahme basiert jedoch auf der Voraussetzung, dass der Einfluss des Aminlinkers vernachlässigbar klein ist.

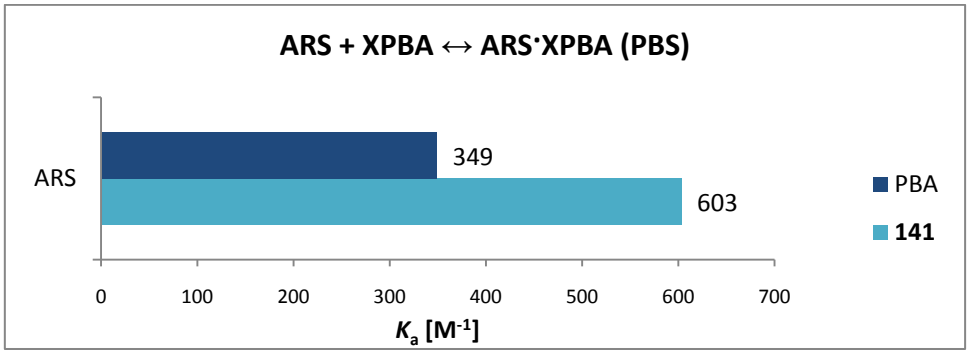
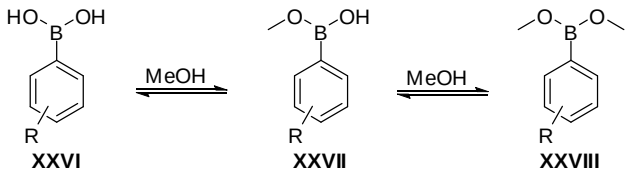


Diagramm 4-7: **Bindungskonstanten der ARS·XPBA-Komplexe in 0.1 M PBS (λ_{Abs} = 468 nm, λ_{Em} = 592 nm, ARS 1·10^{-4} M, pH 7.2 – 7.4).**

Die Ausweitung des Assays auf die multivalenten Systeme zeigte jedoch ein gravierendes Problem auf. Keiner der gekuppelten Rezeptoren erwies sich in der bisher verwendeten Phosphatpufferlösung als hinreichend löslich. Selbst drei Boroxoleinheiten in T-Box-flex und T-Box-rig reichten nicht aus, um die Hydrophobizität der gewählten Grundgerüste zu kompensieren. Als Konsequenz wurde beschlossen einige Verbindungen exemplarisch in reinem Methanol zu vermessen. Dies bedeutete jedoch nicht nur den Verlust physiologischer Testbedingungen, sondern auch eine wesentliche Beeinflussung der Boronsäuren durch partielle Veresterung (Schema 4-38). Aus diesen Gründen musste die Aussagefähigkeit der neuen Daten generell in Frage gestellt werden



Schema 4-38: **Versterung von Boronsäuren in Methanol.**

.Die Neuvermessung des PBA-ARS-Gleichgewichts in Methanol ergab eine Bindungskonstante von K_a = 2472 ± 100 M^{-1}, die damit sieben bis achtmal höher lag als unter wässrigen Bedingungen (Diagramm 4-8). Im Vergleich dazu zeigte das Monoboroxol M-Box-rig eine deutlich geringere Affinität zu ARS, was entweder auf das Adamantangerüst oder eine unterschiedlich starke Beeinflussung der beiden Verbindungen durch das Lösungsmittel zurückgeführt werden kann. Auch eine mögliche Verschiebung des Fluoreszenzspektrums und eine dadurch ungeeignete Messwellenlänge muss als Fehlerquelle in Betracht gezogen werden. Der trivalente Rezeptor T-Box-flex unterschied sich kaum vom monovalenten System. Er zeigte damit zwar keinen multivalenten Effekt, bestätigte aber gewissermaßen den für M-Box-rig erhaltenen Wert.

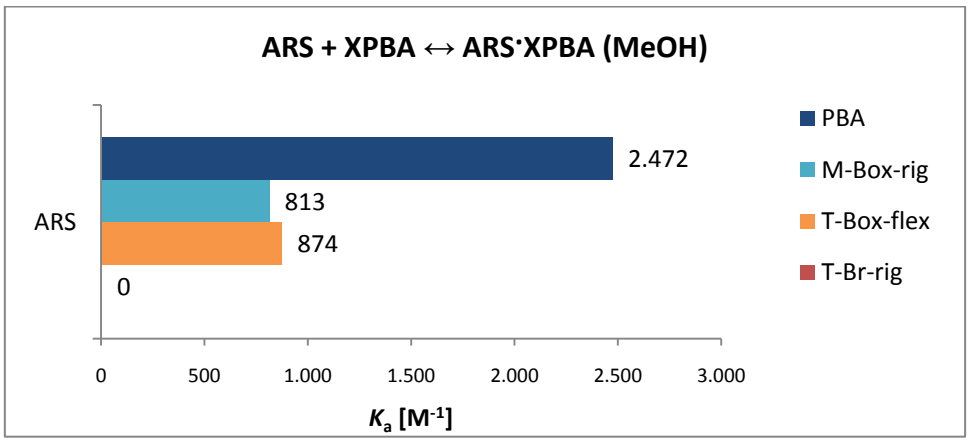


Diagramm 4-8: **Bindungskonstanten der ARS·XPBA-Komplexe in Methanol (λ_{Abs} = 468 nm, λ_{Em} = 592 nm, ARS 1·10^{-4} M).**

Interessanter Weise wiesen die Chromatogramme dieser beiden Boroxole bei hohen Konzentrationen eine Anomalie im Signalmuster auf (Diagramm 4-9). Diese äußerte sich in Form eines Doppelpeaks, der auf eine Überladung der Transportschläuche hindeutete. Da eine unterschiedliche Retention zweier fluoroeszierender Spezies ausgeschlossen werden konnte und lediglich die Signalfläche ausgewertet wurde, hatte diese jedoch keine Auswirkung auf die Ermittlung der Bindungskonstanten. Dass die in allen Messreihen beobachteten Fluoreszenzanstiege tatsächlich auf eine Versterung der Boronsäuren und keine hydrophoben Wechselwirkungen zurückzuführen waren, bewies das Ergebnis des bromierten Rezeptors T-Br-rig. In seinem Fall konnte keine Veränderung der Emission detektiert werden.

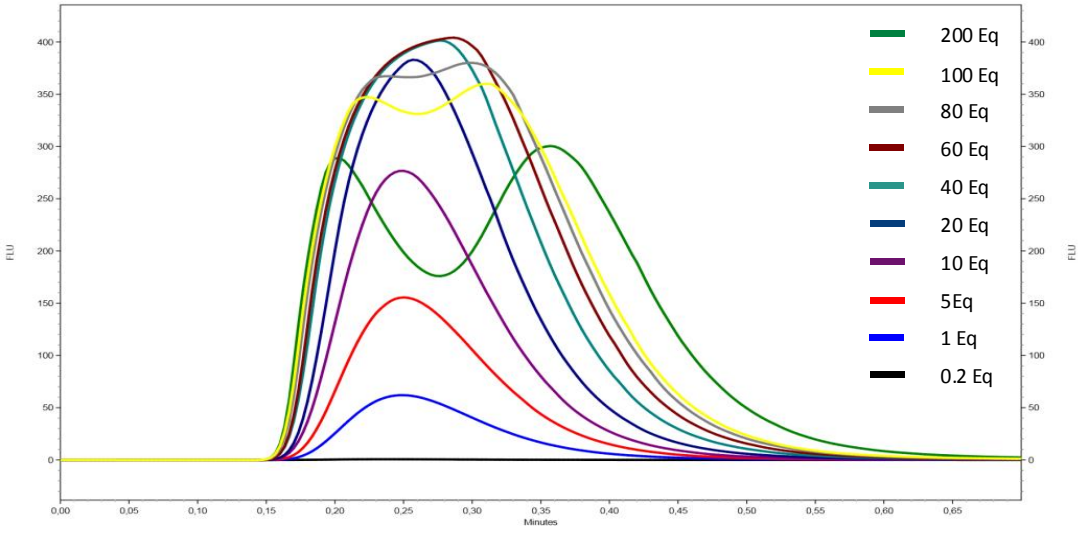


Diagramm 4-9: **HPLC-Fluoreszenzchromatogramme in Methanol bei verschiedenen Konzentrationen an M-Box-rig (λ_{Abs} = 468 nm, λ_{Em} = 592 nm, ARS $1 \cdot 10^{-4}$ M).**

4.7.3.2 Zweites Gleichgewicht

Die kleine Bibliothek multivalenter Rezeptoren sollte an einer Reihe oligomerer Kohlenhydrate getestet werden, um auch multivalente bimolekulare Wechselwirkungen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zusätzlich zu den bisher getesteten Zuckern Mannose, die Disaccharide Lactose, Maltose, Saccharose und Melibiose, sowie die Trisaccharide Melezitose und Raffinose ausgewählt.

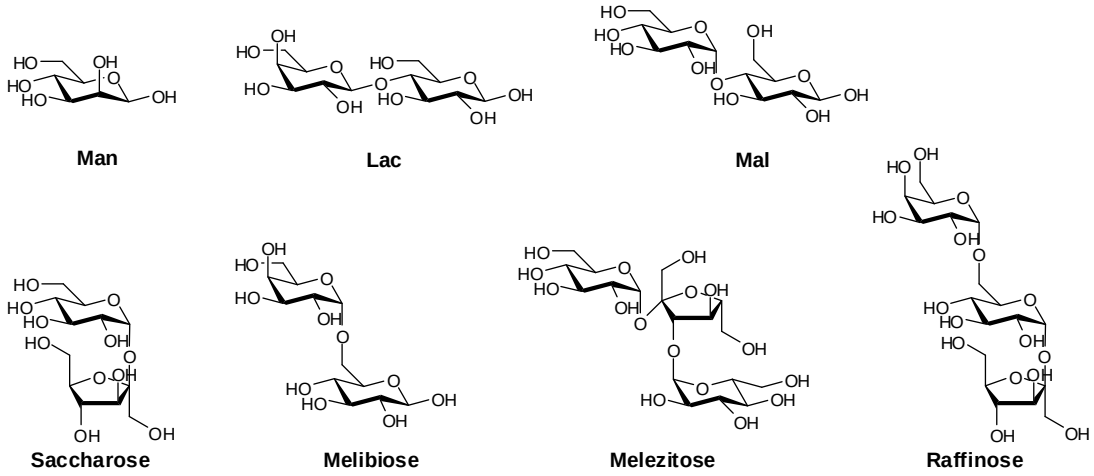


Abbildung 4-14: **Mono-, Di- und Trisaccharide, die im Bindungsassay getestet wurden.**

Zunächst erfolgte ein Vergleich der an den beiden unterschiedlichen Geräten ermittelten Bindungskonstanten für PBA (Diagramm 4-10). Wie bereits beim Abgleich der Literaturwerte wurden auch hier die Affinitäten zu ARS gleichgesetzt. Die Gegenüberstellung zeigt im HPLC-Assay tendenziell größere Werte, die relativen Bindungsverhältnisse sind jedoch ähnlich. Mit Hinblick auf die insgesamt schwachen Bindungen und eine Detektion nahe der Nachweisgrenze durften die beiden Assays also als vergleichbar angesehen werden.

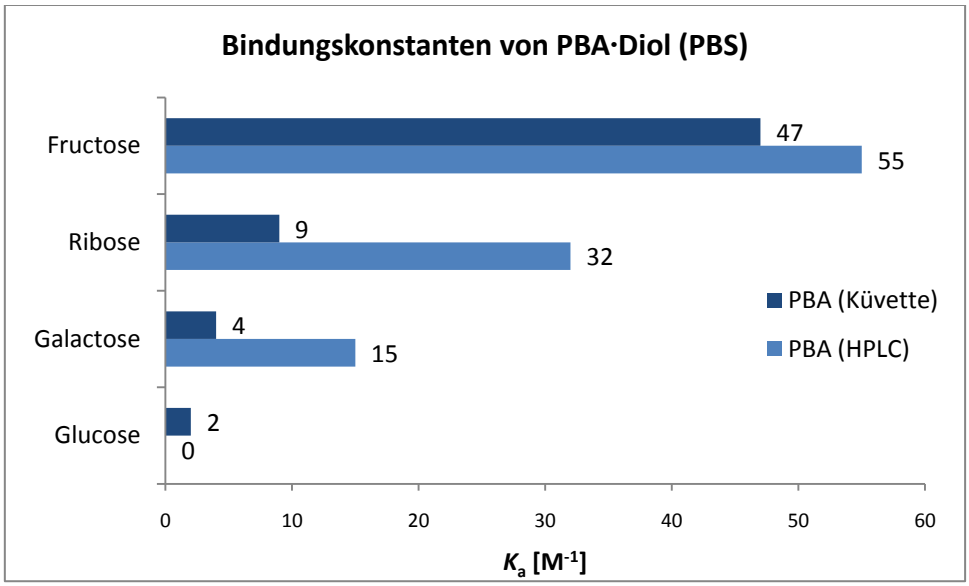


Diagramm 4-10: **Bindungskonstanten der PBA·Diol-Komplexe in 0.1 M PBS (λ_{Abs} = 468 nm, λ_{Em} = 592 nm, ARS 9·10^{-6} M, PBA 2·10^{-3} M, pH 7.2 – 7.4).**

Die Affinitäten der beiden Boronsäuren PBA und **128** zu verschiedenen Kohlenhydraten entsprachen den Verhältnissen im ersten Gleichgewicht und zeigten erneut eine höhere Aktivität des Boroxols (Diagramm 4-11).

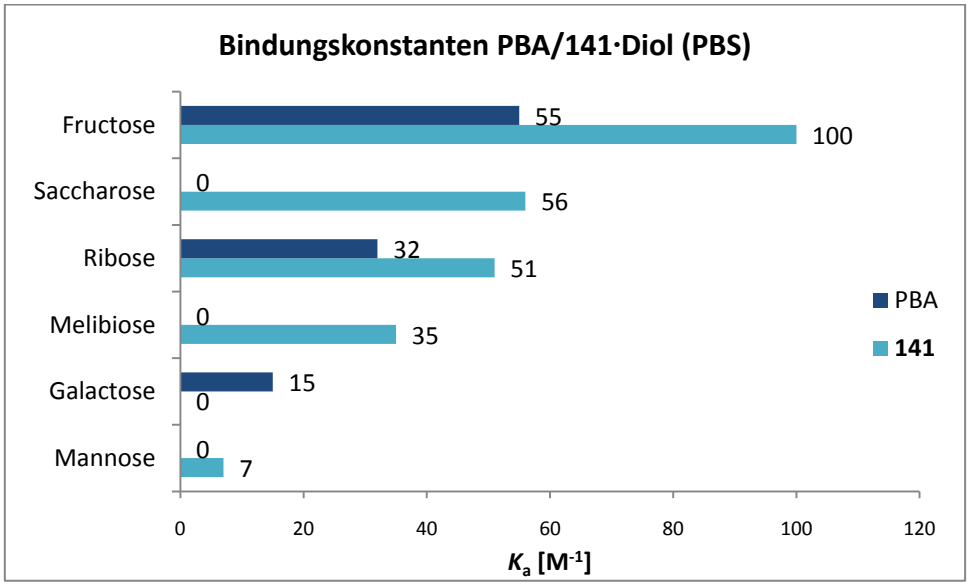


Diagramm 4-11: **Bindungskonstanten der PBA/141·Diol-Komplexe in 0.1 M PBS (λ_{Abs} = 468 nm, λ_{Em} = 592 nm, ARS 9·10^{-6} M, PBA/141 2·10^{-3} M, pH 7.2 – 7.4).**

Die Bindungskonstanten des Boroxols waren im Durchschnitt doppelt so hoch wie die von PBA, im Fall von Saccharose, Melibiose und Mannose konnte nur hier eine signifikante Fluoreszenzänderung beobachtet werden. Lediglich Galactose wurde besser von PBA gebunden. Alle anderen Mono-, Di- oder Trisaccharide bewirkten bei keinem der beiden Rezeptoren eine Verdrängung aus dem ARS-Komplex.

In einem Einzelversuch wurde zusätzlich die Stöchiometrie des Boroxol **128**-Fructosekomplexes untersucht. Mit Hilfe einer ESI-MS-Messreihe konnte festgestellt werden, dass sich selbst bei hohem Fructoseüberschuss nur der 1:1-Komplex bildete. Zu dem gleichen Ergebnis kam eine ^{1}H-NMR-Untersuchung, bei der mit zunehmender Fructosekonzentration nur ein neuer Signalsatz auftrat (Diagramm 4-12). Überraschenderweise führte die Messung in reinem deuteriertem Wasser zunächst nur zu einer Peakverbreiterung. Erst bei Zugabe des Phosphatpuffers trat eine Versterung ein. Diese Beobachtung unterstrich die starke Abhängigkeit des Bindungsprozesses von den Eigenschaften des Mediums.

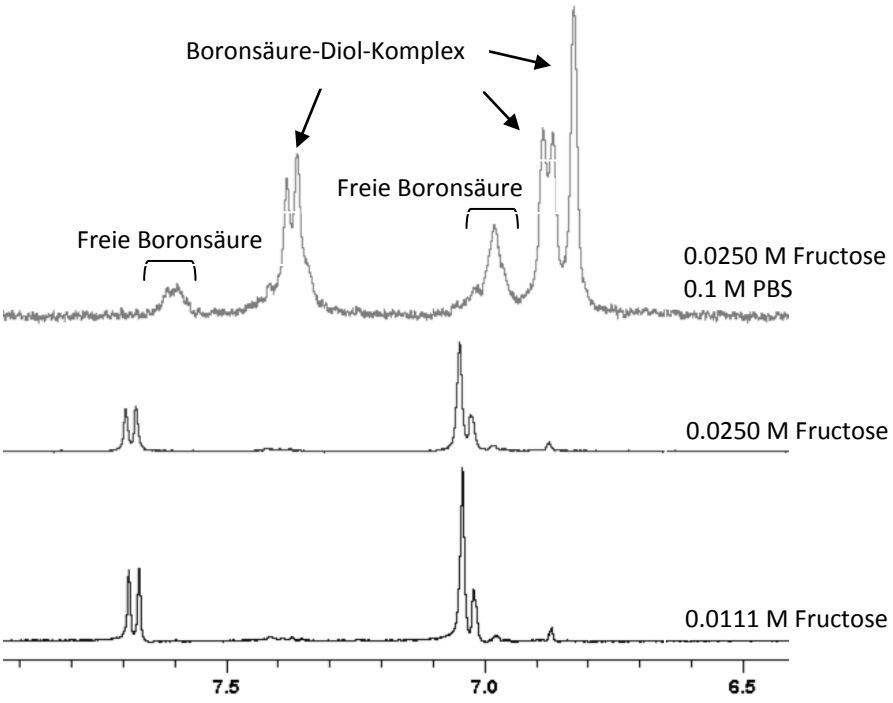


Diagramm 4-12: **^{1}H-NMR-Spektren des Boroxol 141·Fructose-Komplexes (D_2O, Boroxol 1.2 – 1.5 M)**

Damit zeigte auch das Boroxol **128** eine deutliche Präferenz von Fructose vor Ribose und Galactose. Die Tatsache, dass Fructose zunehmend schlechter gebunden wird, je mehr Kohlenhydrate damit verknüpft sind, spricht für eine sterische Abschirmung bzw. Blockierung reaktiver Gruppen anstatt einer kooperativen Wirkung von Diolen in Oligosacchariden (Abbildung 4-16). Anders dagegen das Verhältnis bei Galactose. Hier führte erst die glycosidische Verknüpfung mit Glucose zu einer erkennbaren Bindung durch das Boroxol. In diesem Fall scheint eine Affinitätssteigerung durch die erhöhte Anzahl bindungsfähiger Diole möglich. Auf Grund der insgesamt schwachen Wechselwirkungen erfordern diese Vermutungen jedoch eine Überprüfung mit stärkeren Rezeptoren als PBA und Boroxol **141**.

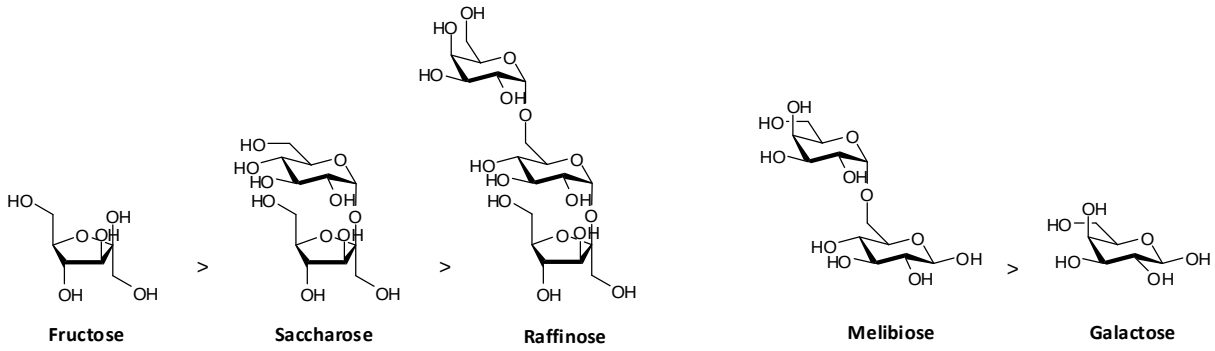


Abbildung 4-15: Affinitätsverhältnisse der Derivate mit Fructose und Galactose.

Nach den fragwürdigen Ergebnissen des ersten Gleichgewichts in Methanol setzten sich die Schwierigkeiten bei der Untersuchung der Kohlenhydratbindung fort. Im Gegensatz zu den Rezeptoren erwiesen sich nun wiederum die meisten Zucker als unlöslich, so dass lediglich Fructose, Ribose und Raffinose an den gekuppelten Rezeptoren T-Box-flex, M-Box-rig und T-Br-flex sowie PBA getestet werden konnten. In keinem der Fälle konnte jedoch eine signifikante Bindung festgestellt werden. Darüber hinaus traten Unregelmäßigkeiten bei der Fluoreszenzmessung auf. Die Erhöhung der Fructosekonzentration bei ARS·PBA beispielsweise führte zunächst zum erwarteten Emissionsabfall, im weiteren Verlauf stieg die Fluoreszenzintensität jedoch wieder an (Diagramm 4-13).

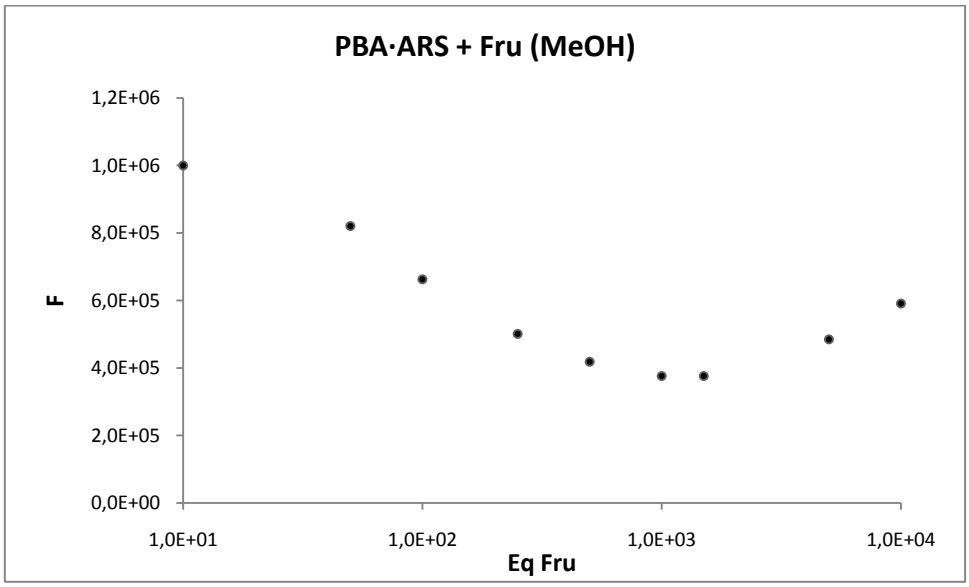


Diagramm 4-13: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Bindungskonstante von PBA an Fructose in Methanol (λ_{Abs} = 468 nm, λ_{Em} = 592 nm, ARS $9 \cdot 10^{-6}$ M, PBA $2 \cdot 10^{-3}$ M).

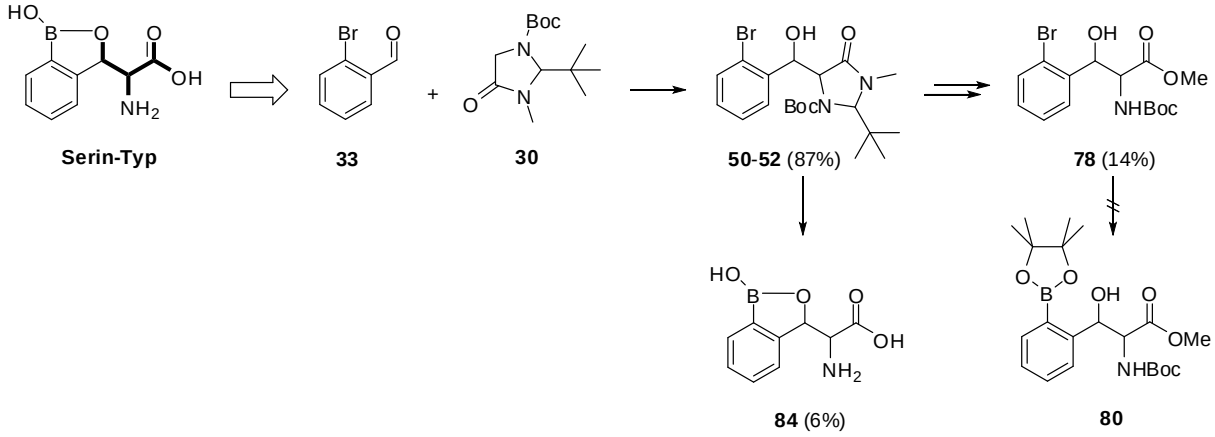
Aus diesem Grund konnte trotz beobachtetem Fluoreszenzabfall keine Bindungskonstante für den PBA-Fructosekomplex bestimmt werden. Da Methanol als wesentlicher Urheber der beschriebenen Löslichkeits- und Reaktivitätsprobleme angenommen werden konnte, wurde die Bindungsstudie an dieser Stelle abgebrochen.

Obwohl eine Untersuchung multivalenter Wechselwirkungen zwischen Boronsäuren und Kohlenhydraten somit nicht erreicht worden war, konnten wichtige Erkenntnisse aus den beiden Assays gezogen werden. Das Boroxol hatte sich gegenüber der Boronsäure nicht nur als stabilere und besser aufzureinigende, sondern auch als reaktivere Funktionalität bei der Kohlenhydratbindung erwiesen. Die Einführung elektronegativer Substituenden führte zu einer drastischen Affinitätssteigerung der Rezeptoren und ist somit für Untersuchungen an schwach bindenden oder sterisch abgeschirmten Oligosacchariden sehr zu empfehlen. Eine Hydrophilisierung der Grundgerüste durch polare Reste dürfte schließlich auch die Untersuchung von Multivalenzeffekten an Oligosacchariden ermöglichen. Mit Hilfe der automatisierbaren HPLC-Unterstützung könnten diese Systeme detaillierte Erkenntnisse über die Interaktion mit Kohlenhydraten unter physiologischen Bedingungen liefern und somit zur Weiterentwicklung von Zelloberflächensensoren beitragen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit stellt eine systematische Untersuchung neuer Syntheserouten zu chiralen Boroxolkonjugaten für die selektive Kohlenhydraterkennung unter physiologischen Bedingungen dar. Die Entwicklung von Boroxol-Peptid-Konjugaten des Serin-Typs über die des Homoserins und Hydroxynorvalins bis hin zum Triazol-Typ erfolgte in konsekutiver Weise und lieferte wichtige Erkenntnisse über den Aufbau und Eigenschaften derartiger Systeme. Im Folgenden sollen einige Schlüsselschritte[g] exemplarisch beschrieben werden.

Ein Zugang zu Boroxolkonjugaten des Serin-Typs konnte erfolgreich durch diastereoselektive Addition von BocBMI **30**[228] an *ortho*-Brombenzaldehyd **33** etabliert werden (Schema 5-1). Die resultierenden Aldole **50**-**52** wurden getrennt und zu den entsprechenden β-Hydroxy-α-aminosäuren hydrolysiert. Eine Isolierung borierter Endprodukte wie **80** scheiterte jedoch an einer fehlenden effizienten Schutzgruppenstrategie. Mit der Boronsäure kompatible Schutzgruppen ließen sich entweder nicht installieren oder hielten den harschen Reaktionsbedingungen nicht stand, wie z.B. der Methylester **78**. Dagegen gelang die direkte Synthese des Boroxols **84** aus dem Aldol **50**. Damit konnte zum ersten Mal ein Boroxol mit Aminosäureterminus synthetisiert werden, das beispielsweise als Baustein in der Festphasensynthese von Peptiden eingesetzt werden kann. Insgesamt erschien die Dichte der Funktionalitäten im Serin-Typ jedoch zu hoch und sollte durch Verlängerung des Rückgrades reduziert werden.

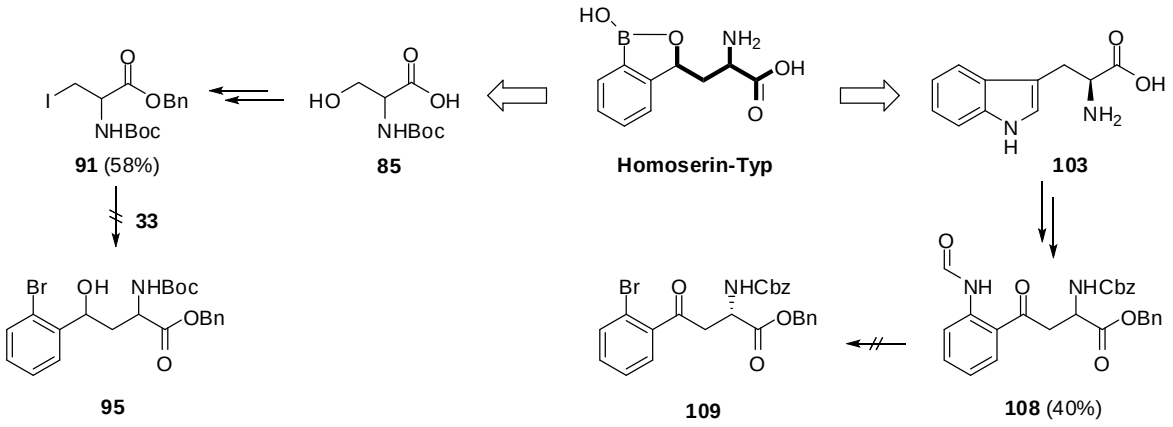


Schema 5-1: Schlüsselschritte in der Synthese von Boronsäurekonjugaten des Serin-Typs.

Konjugate des Homoserin-Typs wurden retrosynthetisch auf Derivate des Serins **85** oder des Tryptophans **103** zurückgeführt (Schema 5-2). Es gelang die Synthese halogenierter Alanine wie **91**, die daraus gebildeten Zinkate und Magnesate stellten sich aber als zu

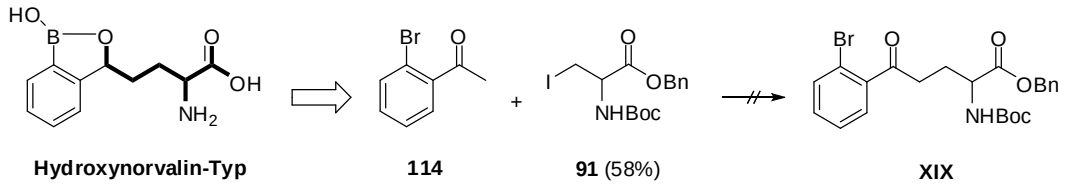
[g] Alle angegebenen Ausbeuten sind Gesamtausbeuten, ausgehend von käuflichen Edukten.

unreaktiv für eine Addition an Benzaldehyd **33** heraus. Die Ozonolyse von Tryptophanen führte erfolgreich zu Anilinen vom Typ **108**, die gewählten Schutzgruppen erwiesen sich jedoch als nicht kompatibel mit der anschließenden Sandmeyerreaktion.



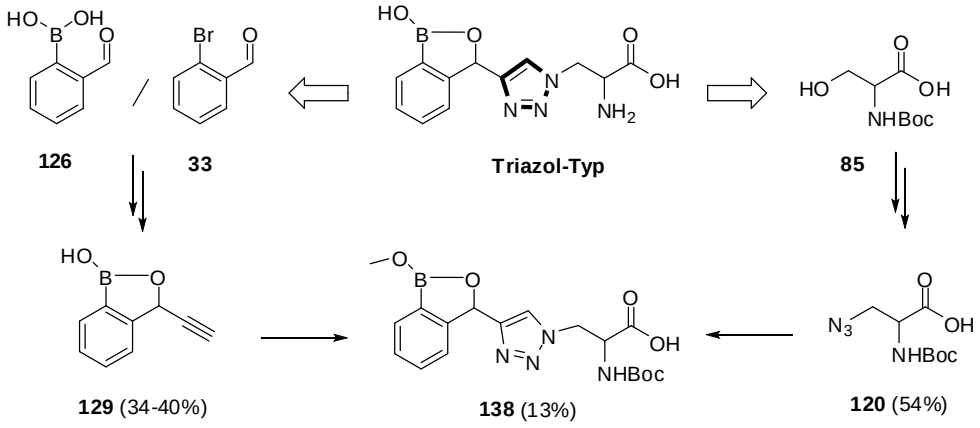
Schema 5-2: **Schlüsselschritte in der Synthese von Boronsäurekonjugaten des Homoserin-Typs.**

Der Aufbau von Konjugaten des Hydroxynorvalin-Typs aus den bereits vorhandenen halogenierten Alaninen und *ortho*-bromiertem Acetophenon **114** gelang nicht (Schema 5-3). Die Eliminierung erwies sich als unvermeidlich schneller als die Substitution, so dass Versuche zu diesem Gerüst bereits früh eingestellt wurden.



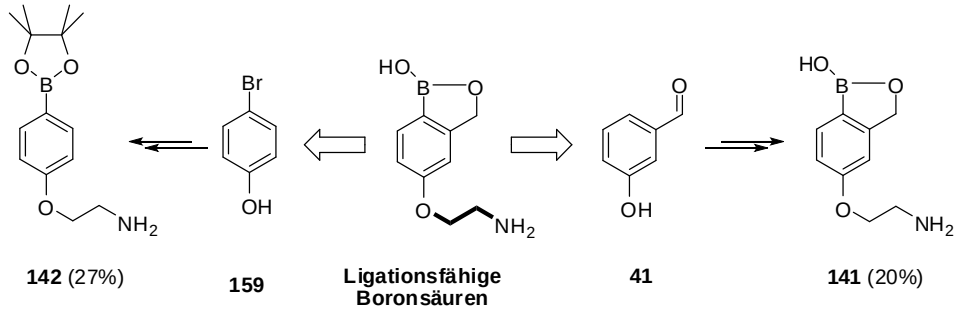
Schema 5-3: **Schlüsselschritt in der Synthese von Boronsäurekonjugaten des Hydroxynorvalin-Typs.**

Mit guten Ausbeuten dagegen verlief die Synthese von Huisgen-Cycloadditionsedukten zur Herstellung von Boroxolkonjugaten des Triazol-Typs (Schema 5-4). Während Azidaminosäuren wie **120** bereits literaturbekannt waren, wurden für den Alkinbaustein **129**, ausgehend von **126** bzw. **33**, zwei neue Syntheserouten entwickelt.[197] Mit der erfolgreichen Verknüpfung der beiden Komponenten zum Triazol **138** konnte zum ersten Mal ein Zugang zu chiralen Boroxolkonjugaten mittels Click-Chemie etabliert werden. Damit bieten sich Boroxole vom Typ **129** für die schonende Einführung in komplexe Peptidbibliotheken und die automatisierte Herstellung von Kohlenhydratsensoren auf der Basis multivalenter Boroxol-Peptidkonjugate an.



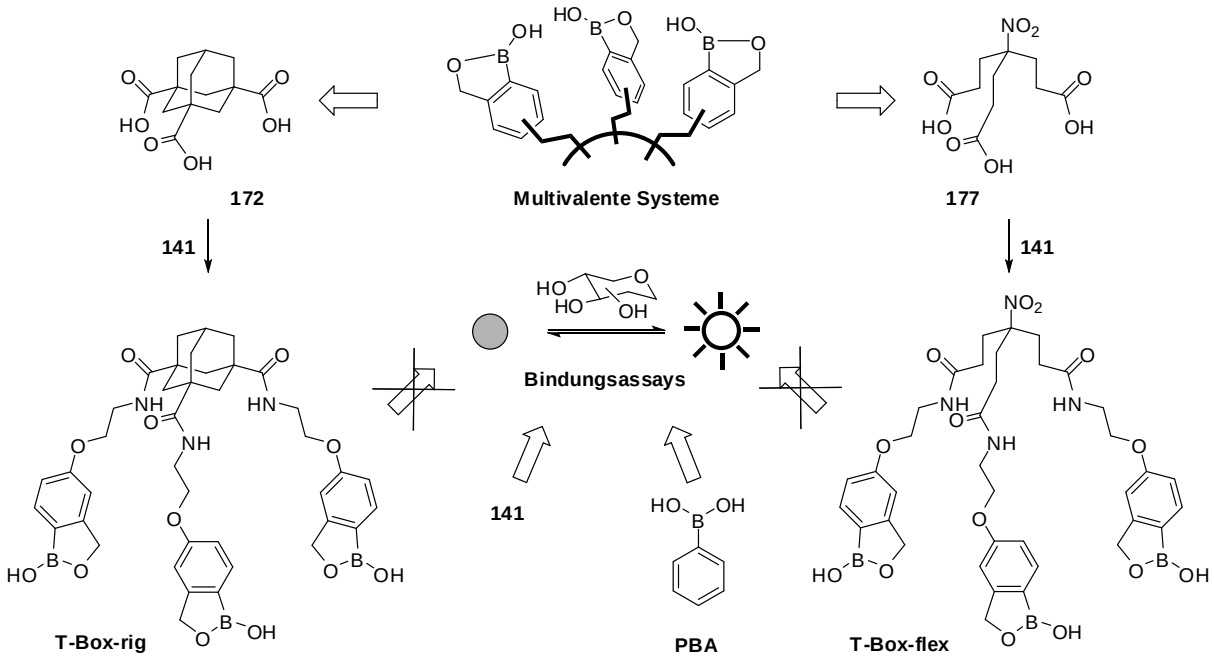
Schema 5-4: **Schlüsselschritte in der Synthese von Boronsäurekonjugaten des Triazol-Typs.**

Um eine Verknüpfung der synthetisierten Verbindungen mit der festen Phase, Reportermolekülen oder Effektoren zu ermöglichen, wurden zwei neue Syntheserouten zu ligationsfähigen Boronsäuren entwickelt (Schema 5-5). Die beiden Kohlenhydratsensoren **142** und **141** konnten erfolgreich aus den Edukten **159** und **41** synthetisiert und an Carbonsäuren gekuppelt werden. In dieser Arbeit bildeten sie die Basis für die Herstellung multivalenter Kohlenhydratsensoren.



Schema 5-5: **Schlüsselschritte in der Synthese ligationsfähiger Boronsäuren.**

Die Herstellung multivalenter Systeme erfolgte mit Hilfe rigider (**172**) und flexibler (**177**) tripodaler Grundgerüste, die in Bachelorarbeiten synthetisiert wurden (Schema 5-6). Durch Kupplung ligationsfähiger Rezeptoren wie Boroxol **141** konnte erfolgreich eine kleine Bibliothek mono- und trivalenter Kohlenhydratsensoren wie T-Box-rig und T-Box-flex erstellt werden. Auf Grund einer zu geringen Wasserlöslichkeit war eine zuverlässige Bestimmung ihrer Bindungseigenschaften in einem Fluoreszenzassay jedoch leider nicht möglich. Stattdessen wurde der ungekuppelte Rezeptor **141** gegenüber der kommerziell erhältlichen Phenylboronsäure (PBA, phenyl boronic acid) getestet.



Schema 5-6: **Schlüsselschritte in der Synthese und Evaluierung multivalenter Boronsäuren.**

Das Boroxol **141** besaß gegenüber Boronsäuren wie **142** nicht nur synthetische Vorteile wie z.B. höhere chemische Stabilität, es zeigte auch eine im Durchschnitt doppelt so hohe Affinität zu Kohlenhydraten wie PBA (Diagramm 5-1). Zusammen mit der erfolgreichen Herstellung multivalenter Systeme wie T-Box-rig oder T-Box-flex sind dies vielversprechende Ergebnisse für die Entwicklung neuartiger und selektiver biomimetischer Kohlenhydratsensoren.

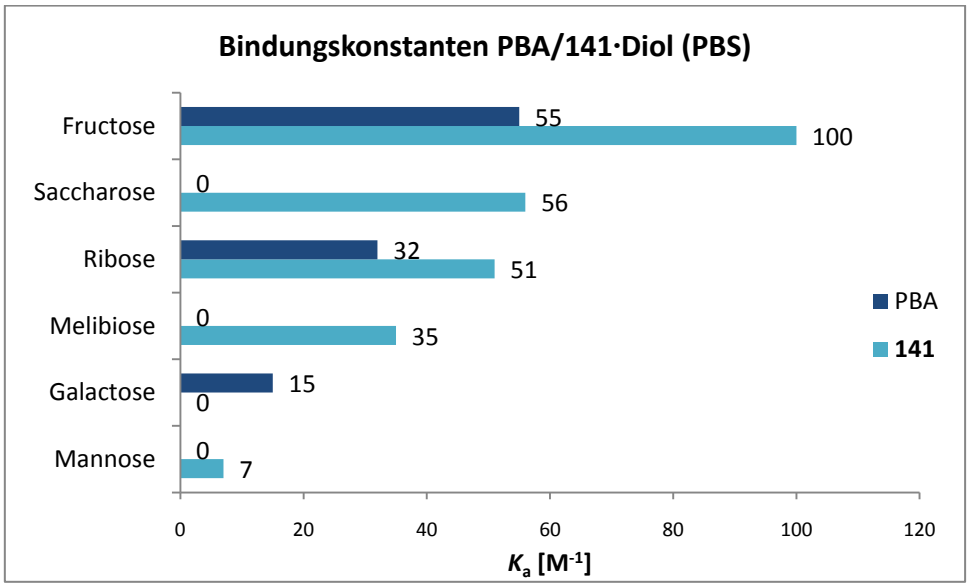
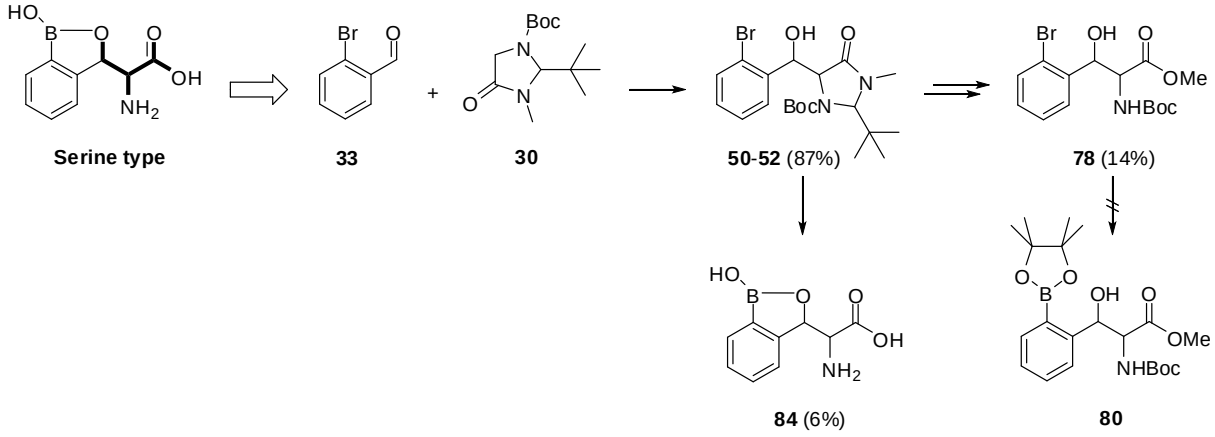


Diagramm 5-1: **Bindungskonstanten der PBA/141·Diol-Komplexe in 0.1 M PBS (λ_{Abs} = 468 nm, λ_{Em} = 592 nm, ARS 9·10^{-6} M, PBA/141 2·10^{-3} M, pH 7.2 – 7.4).**

6 Summary

This work presents a systematic investigation of new synthetic routes to chiral boroxol conjugates for selective carbohydrate recognition under physiological conditions. The process of developing different approaches to these conjugates provided detailed insight into their build-up options and properties. In the following, characteristic key steps[h] of the synthetic routes will be described.

Access to boroxol conjugates of the serine type was successfully accomplished through the diastereoselective addition of BocBMI **30**[228] to *ortho*-bromobenzaldehyde **33** (scheme 6-1). The resulting aldols **50**-**52** were separated and hydrolysed to the corresponding β-hydroxy-α-amino acids. Unfortunately, the borylated product **80** could not be isolated, since an efficient protection strategy was lacking. Protection groups were either incompatible with the boronic acid moiety or unstable under the strongly basic conditions, such as the methyl ester **78**. Boroxol **84** was surprisingly obtained from the direct borylation of aldol **50**. This is the first example of a boronic acid that features a glycine terminus. Building blocks such as **84** are valuable compounds for the solid phase synthesis of peptidic carbohydrate sensors. However, to improve the yield of the reaction, the functional density was decided to be reduced by elongating the backbone.

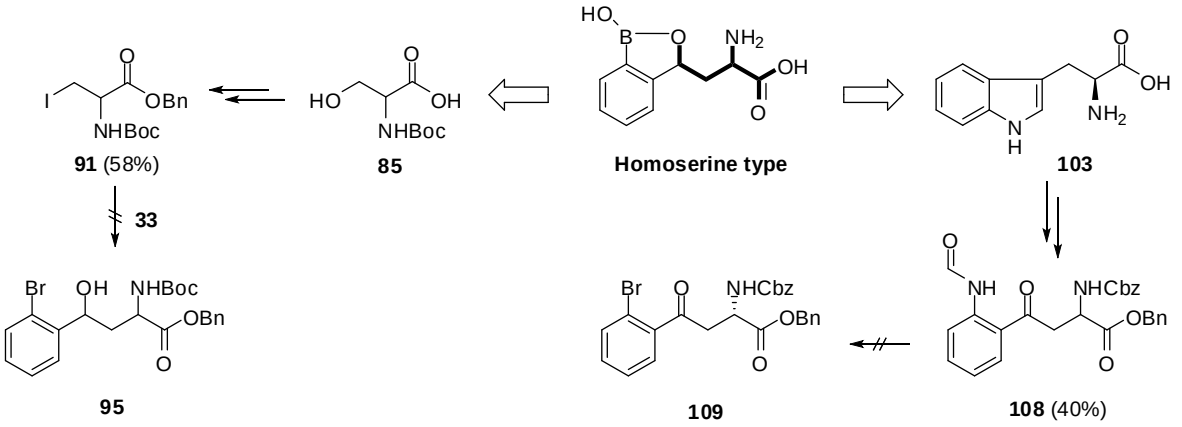


Scheme 6-1: **Key steps in the synthesis of boronic acid conjugates of the serine type.**

Conjugates of the homoserine type were retro-synthetically lead back to serine **85** or tryptophane **103** (scheme 6-2). Even though halogen substituted serines such as **91** were successfully synthesized, the corresponding zinkate and magnesate complexes exhibited insufficient reactivity for the addition to benzaldehyde **33**. Ozonolysis of tryptophane

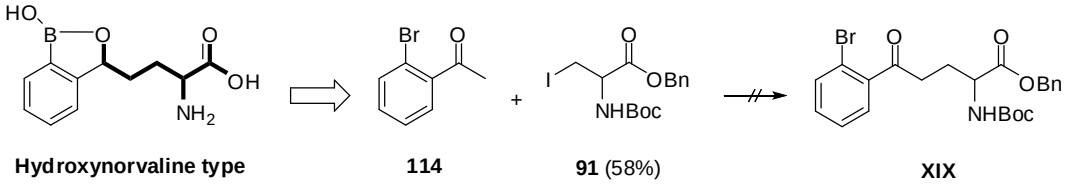
[h] All yields are overall yields, referring to commercially available educts.

produced intermediate anilins such as **108**, but protection groups proved to be unstable in the subsequent Sandmeyer reaction.



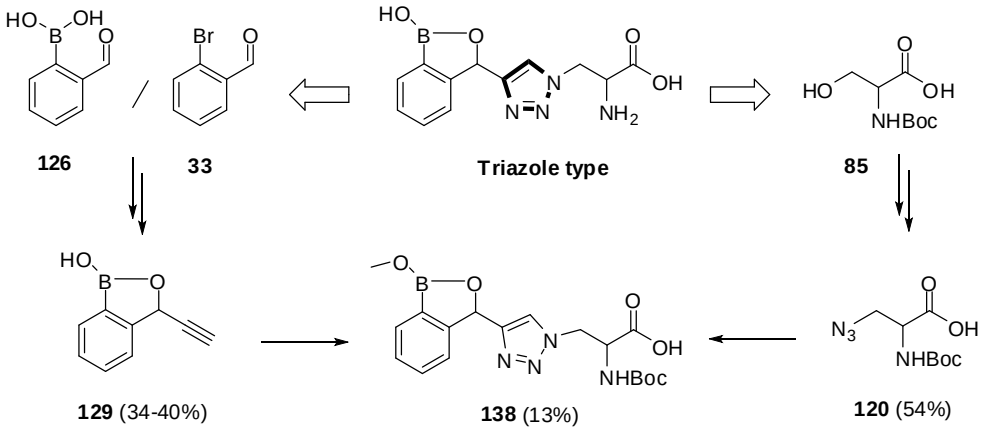
Scheme 6-2: **Key steps in the synthesis of boronic acid conjugates of the homoserine type.**

The synthetic approach to build up boroxols of hydroxynorvaline type from already available alanines **91** and *ortho*-bromo acetophenone **114** failed from the very beginning (scheme 6-3). The elimination turned out to be too fast to allow for a nucleophilic substitution so efforts were concentrated on triazoles.



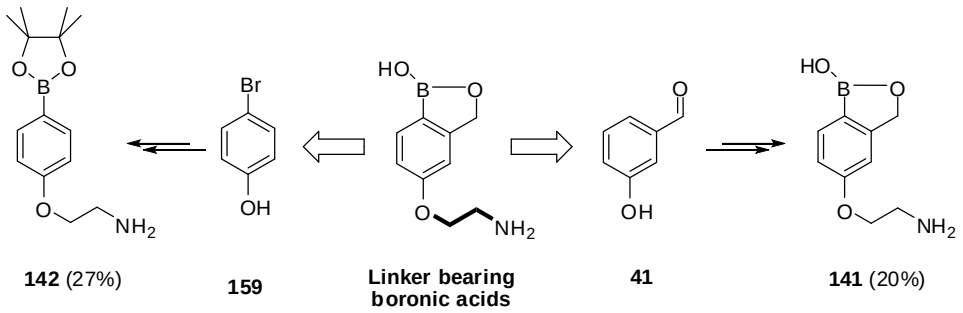
Scheme 6-3: **Key step in the synthesis of boronic acid conjugates of the hydroxynorvaline type.**

Triazole linkages are commonly produced through a Huisgen cycloaddition reaction (scheme 6-4). Required azides **120** were already known from the literature.[197] In order to gain access to suitable alkines like **129**, two new synthesis routes were developed, starting from compound **126** and **33**, respectively. With the successfully obtained triazole **128**, a chiral boroxol conjugate was synthesized by click chemistry approach for the first time. With boroxols like **129**, a convenient introduction of boronic acid functionality into large peptide libraries seems to be possible. This in turn would allow for the automated synthesis of carbohydrate sensors and a diversity oriented development of multivalent boroxol peptide conjugates for extensive carbohydrate recognition studies.



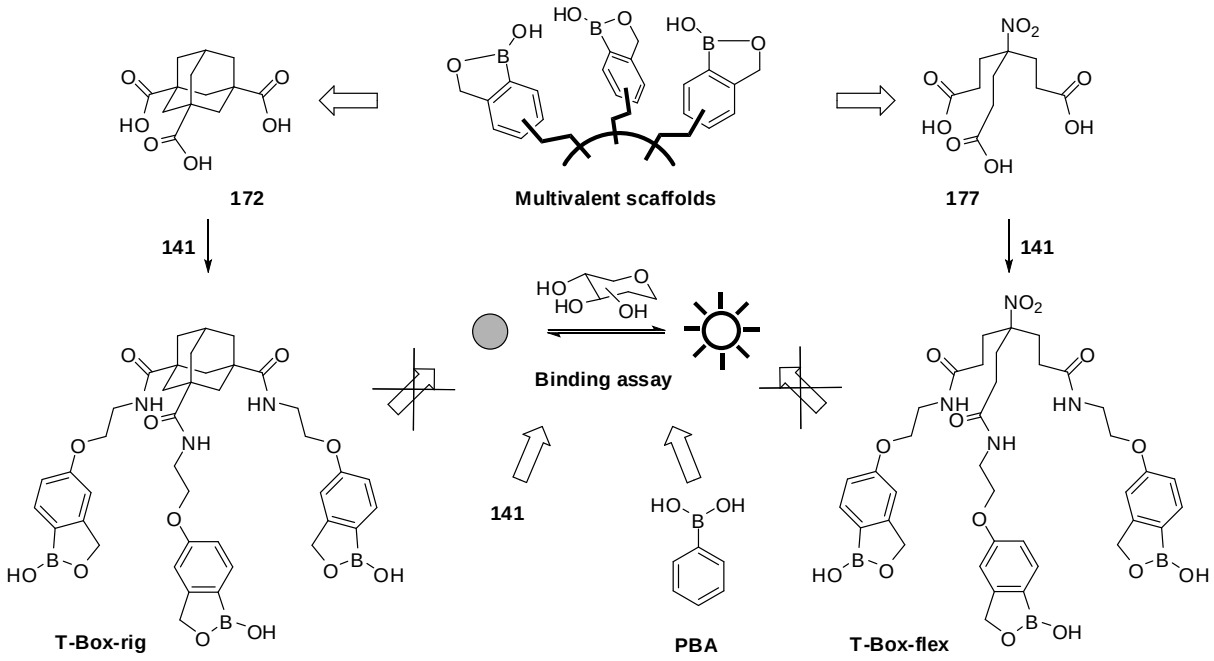
Scheme 6-4: **Key steps in the synthesis of boronic acid conjugates of the triazole type.**

In order to facilitate ligation of the receptor to the solid phase, a reporter label or an effector molecule, two synthesis routes to linker bearing boronic acids were established. (scheme 6-5). Carbohydrate sensors **142** and **141** were successfully synthesized from educts **159** and **41** and subsequently linked to carboxylic acids. In this work they were used to build up multivalent carbohydrate receptors.



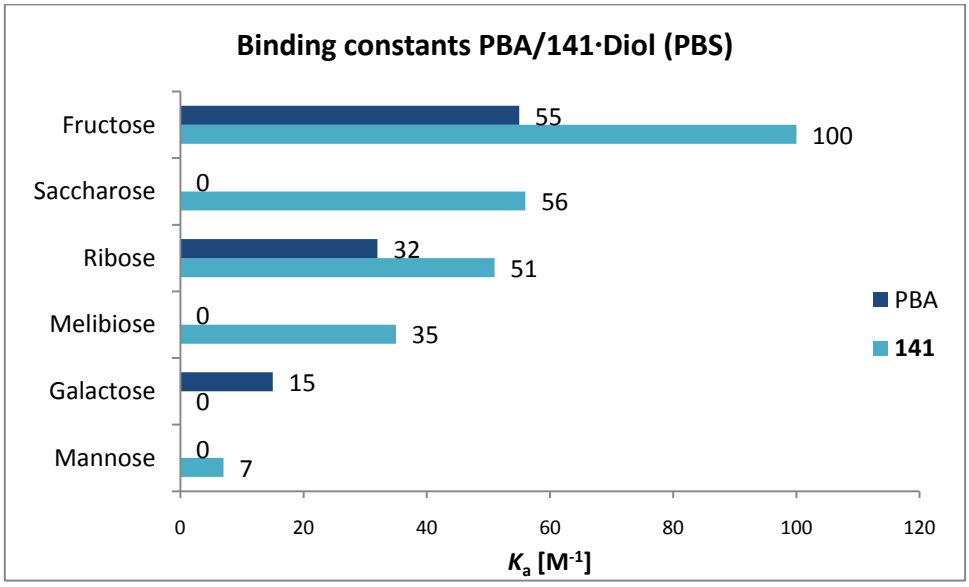
Scheme 6-5: **Key steps in the synthesis of linker bearing boronic acids.**

Receptor multimerisation was accomplished using rigid (**172**) and flexible (**177**) tripodal scaffolds that were synthesised in three bachelor thesis (scheme 6-6). By attaching linker bearing receptors such as **141**, a small library of mono- and trivalent carbohydrate sensors like T-Box-rig und T-Box-flex was successfully synthesized. Unfortunately, due to low water solubility a reliable determination of binding affinity to diols was not possible. Instead, the single boroxol sensor **141** was tested against commercially available phenyl boronic acid (PBA).



Scheme 6-6: **Synthesis and evaluation of multivalent boronic acid conjugates.**

The boroxol moiety in **141** proved to be superior to the phenylboronic acid functionality in PBA in many ways. Most importantly, **141** exhibited a much higher chemical stability during synthesis and bound most carbohydrates on average twice as strong as PBA (scheme 6-7). In combination with the successful approach to the multivalent boronic acids T-Box-rig and T-Box-flex, these are promising results for the development of novel and selective biomimetic carbohydrate sensors.



Scheme 6-7: **Binding constants of PBA/141·diol complexex in 0.1 M PBS (λ_{Abs} = 468 nm, λ_{Em} = 592 nm, ARS 9·10^{-6} M, PBA/141 2·10^{-3} M, pH 7.2 – 7.4).**

7 Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse haben Boronsäuren, insbesondere Benzoboroxole, als vielseitig einsetzbare und leistungsstarke Kohlenhydratsensoren bestätigt. Voraussetzungen für ihre schnelle und breit gefächerte Entwicklung über die Grundlagenforschung hinaus sind vor allem eine solidere Etablierung von Reinigung und Handhabung, Optimierung von Schlüsselmethoden der Synthese sowie einfachere Zugänge zu aussagekräftigen Substanzbibliotheken und Assays.

7.1 Reinigung

Mäßige Reinheitsgrade und Ausbeuteverluste bei der säulenchromatographischen Reiningung von Boronsäuren über Kieselgel, verbunden mit einem Mangel an effizienten anderen Methoden, behindern die zügige Entwicklung neuartiger Systeme. Ein Schwerpunkt zukünftiger Forschung sollte deshalb in der Verbesserung alternativer Reinigungsprozeduren wie z.B. der Verteilungs-, der Ionenaustausch- oder der Größenausschlusschromatographie liegen. Auch die Untersuchung neuer Klassen von Boronsäuren bzgl. ihrer Stabilität und Tendenz der Anhydridbildung dürfte von Nutzen sein. Letztere ist beispielweise bei Boroxolen herabgesetzt, was die Reinigung bereits deutlich erleichtert.

7.2 Synthese

Das häufige Auftreten von Eduktresten und Hydrolyseprodukten bei der Borierung CH-acider Verbindungen deutet auf eine hohe Instabilität des intermediär gebildeten Phenyllithiumsalzes hin. Fluorierte oder nitrierte Aromaten offerieren nicht nur eine wesentlich stärkere Bindung an Kohlenhydrate, sie dürften auch die Bildung des Intermediates begünstigen und somit die Konkurrenzfähigkeit des Borsäureesters gegenüber Protonen erhöhen. Daneben gilt es geeignete Vorläuferverbindungen zu entwickeln, die z.B. die Möglichkeit bieten den aciden Benzylalkohol erst nach der Borierung einzuführen (Styrylepoxide **XXVI**, Benzylverbindungen **XXIX**) oder eine andere Form der Komplexierung zu nutzen (Ester **XXXII**, Abbildung 7-1). Ein weiterer Schwerpunkt sollte auf der Optimierung von Schlüsselmethoden der Verknüpfung mit anderen Molekülen liegen, um standardisierte Syntheseprotokolle nutzen zu können. Als herausragende Technik ist hier die Click-Chemie hervorzuheben, die eine Konjugation von Boronsäurebausteinen unter äußerst milden Bedingungen und mit hoher Reinheit ermöglicht. Verbesserungsansätze liegen hier in

einer sterischen Abschirmung der Reaktanden, einer chemischen Modifikation des Boroxols oder alternativen Katalysatoren (siehe Abschnitt 4.4.4).

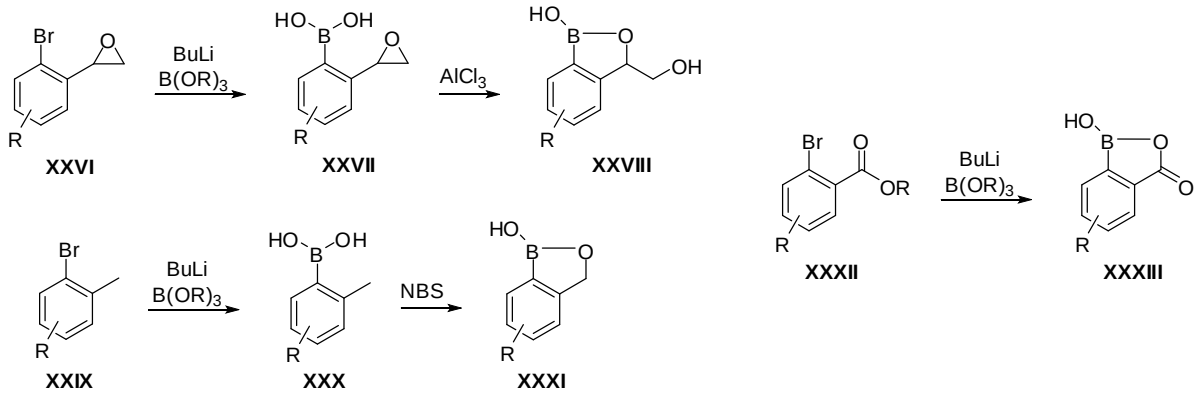


Abbildung 7-1: **Mögliche Vorläuferverbindungen für die Boroxole XXVIII, XXXI und XXXIII.**

7.3 Evaluierung

Um schneller auswertbare Systeme zu erhalten sollte die Komplexität der Gerüste reduziert werden. Im Fall des anvisierten Rezeptordesigns könnte dies die Beschränkung auf ein freies Amin, eine Carbonsäure oder einen Aldehyd bedeuten, wodurch die Synthese und eine Verknüpfung z.B. mit Aminosäuren, anderen chiralen Resten oder multivalenten Grundgerüsten leichter zu bewerkstelligen wäre. Auch eine variable Position des Linkers wäre denkbar. Auf diese Weise könnten mehr Struktur-Wirkungsbeziehungen in der mono- und multivalenten Kohlenhydraterkennung hergeleitet und das Design zukünftiger Systeme besser ausgerichtet werden.

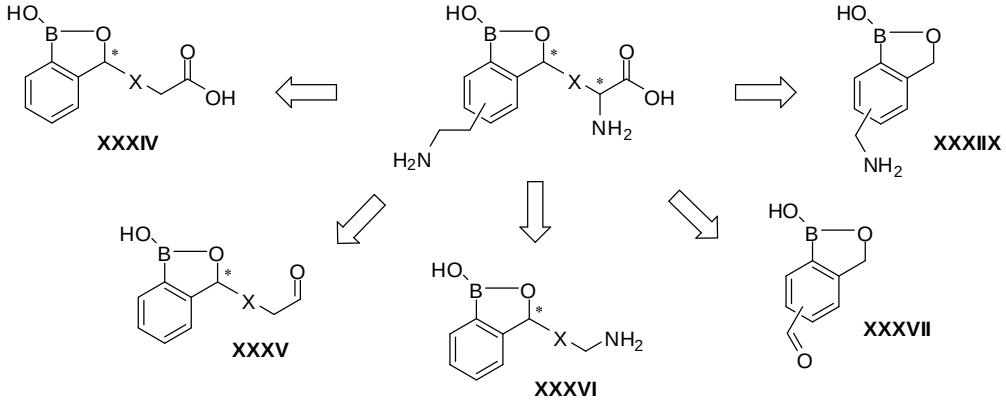


Abbildung 7-2: **Reduzierte Zielstrukturen für vereinfachte Syntheserouten und schnellere Erfassung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen.**

8 Experimenteller Teil

Alle Reaktionen wurden, sofern erforderlich, mit Stickstoff als Schutzgas unter Verwendung der Schlenk-Technik in absolutierten Lösungsmitteln und in ausgeheizten Schlenckgefäßen durchgeführt. Die Trocknung der Lösungsmittel erfolgte nach Standardmethode oder mit Hilfe einer Lösungsmitteltrocknungsanlage der Firma MBraun Intergas-System GmbH (SPS-800 Solvent Purification System, Standard Operating Manual Edition 04/2008). Glasgeräte wurden vor Gebrauch für mindestens 12h in einem Trockenofen bei 70 °C getrocknet. Verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Fluka, Sigma, Merck und Lancaster käuflich erworben. Die Qualität entsprach entweder „zur Synthese“ oder „per analysis“. Sofern nicht angegeben, erfolgte keine weitere Reinigung dieser Chemikalien.

8.1 Präparative Reinigung

8.1.1 Säulenchromatographie

Als Trennmaterial wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 60-200 µm der Firma J. T. Baker verwendet. Zur Kontrolle von Reaktionen wurde der R_f-Wert durch Dünnschichtchromatographie (DC) auf Fluorophor-beschichteten Kieselgelplatten der Firma Merck bestimmt. Die Visualisierung der Spots erfolgte mit Hilfe folgender Reagenzien: Cersulfat (5 g Ammoniummolybdat, 0.1 g Cersulfat, 90 mL Wasser, 10 mL konz. Schwefelsäure), Ninhydrin (0.2% Ninhydrin (2,2-Dihydroxy-1,3-indandion) in Butanol), $KMnO_4$ (drei Spatelspitzen Kaliumpermanganat in 30 mL Wasser) und UV-Licht (254 nm und 366 nm).

8.1.2 HPLC

Die Trennung von Substanzgemischen durch semipräparative HPLC wurde auf einer Merck Hitachi Elite LaChrom vorgenommen (Pumpe L-7150). Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption (L-7455), das Sammeln der Fraktionen mit Hilfe eines Teledyne ISCO Foxy Jr. Folgende Säulen wurden zur Trennung verwendet: Standard RP18 (Kieselgel der Marke LiChrosorb RP-18 von Merck, Partikelgröße 5 µm, 250 mm x 8 mm ID) Silica gel (Merck, Partikelgröße 5 µm, 250 mm x 8 mm ID), Daicel Chiralpak IC (250 mm x 8.0 mm ID).

8.2 Analytik

8.2.1 NMR-Spektroskopie

Die Messungen der ^{1}H-, ^{11}B- und ^{13}C-NMR Spektren erfolgten an einem Avance II 200 MHz „Microbay“ (AV 200), Avance II 400 MHz WB (AV 400) oder Avance III 600 MHz (AV 600) der Firma Bruker BioSpin GmBH, Rheinstetten, bei Raumtemperatur. Zur Strukturaufklärung neuer Substanzen wurden zweidimensionale NMR Messungen vorgenommen (HH-COSY, HSQC, HMBC, NOESY).

Chemische Verschiebungen sind als δ-Werte in ppm in Bezug auf TMS angegeben. Zur Kennzeichnung der Multiplizität dienten die üblichen Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, b = breit. Kopplungen wurden mit dem Symbol J gekennzeichnet und in Hz angegeben.

Die Kalibration erfolgte anhand nicht deuterierter Lösungsmittelsignale nach Literaturwerten.[229] Als Standard für die ^{11}Bor-NMR-Messungen wurde Bortrifluorid-Etherat verwendet.

Die für die Auswertung der NMR-Spektren vorgenommene und daher im Syntheseteil angegebene Nummerierung entspricht teilweise nicht der IUPAC-Empfehlung und stimmt in diesen Fällen nicht mit der Namensgebung der Moleküle überein.

8.2.2 Massenspektrometrie

EI-Massenspektren wurden an einem MS MAT 311A der Firma Varian MAT gemessen. **ESI-Massenspektren** wurden mit einem Elektrospray-Gerät (Finnigan MAT 95 Trap XL) gemessen und mit der Software ISIS 8.1 nachbearbeitet. **HR-Massenspektren** wurden mit einem MicroTOF-Gerät der Firma Bruker daltonics aufgenommen. Die Datenaufnahme erfolgte mit Hilfe der Software MicroTOF Control, die Auswertung mit Hilfe der Software Data Analysis. Für die Aufnahme von LCMS-Spektren wurde eine analytische HPLC der Marke Merck-Hitachi Elite LaChrom zugeschaltet (Pumpe L-2100, Autosampler L-2200, UV-Detektor L-7455). In diesen Fällen erfolgte die Auswertung unter Verwendung der Software HyStar. Zur Trennung von Gemischen diente eine Chromolith-Säule von Merck (RP18e, 100 mm x 3 mm ID).

8.2.3 Elementaranalyse

Die Elementaranalysen für C/H/N-Messungen wurden an einem C/H/N-Analysator Carlo Erba 1106 durchgeführt. Das Abwiegen erfolgte mit Hilfe einer Mettler Toledo UMX-2.

8.2.4 Polarimetrie

Die Bestimmung der Drehwerte wurde an einem Perkin Elmer Polarimeter 341 durchgeführt.

8.2.5 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden an einem Fluoromax-4 Spectrofluorimeter der Marke Horiba Jobin Yvon mit 1 mL Küvetten aufgenommen. Zur Auswertung der Spektren diente das MS Office Programm Excel. Bindungskonstanten wurden mit Hilfe der Software Copasi (www.copasi.org) ermittelt.

8.2.6 pH-Wert-Bestimmung

Die Ermittlung von pH-Werten erfolgte mit Hilfe eines Mettler Toledo E20/EL20.

8.2.7 HPLC

Analytische HPLC-Chromatogramme wurden an einer Merck-Hitachi Elite LaChrom durchgeführt (Pumpe L-2130). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software EZ ChromElite. Als Detektoren dienten die Module L-7455 (dioden array, UV/VIS-Absorption), L-2480 (Fluoreszenz) und L-2490 (Brechungsindex).

Zur Trennung wurden folgende Säulen verwendet: Standard RP18-gel (Kieselgel der Marke LiChrosorb RP-18 von Merck, Partikelgröße 5 µm, 250 mm x 4.6 mm ID), RP8-gel (Merck, Partikelgröße 5 µm, 250 mm x 4.6 mm ID) und silica gel (Merck, Partikelgröße 5 µm, 250 mm x 4.6 mm ID) sowie die chiralen Phasen Daicel Chiralpak AD-H (Amylose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamat) auf Kieselgel, Partikelgröße 5 µm, 250 mm x 4.6 mm ID), Daicel Chiralpak OD (Cellulose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamat) auf Kieselgel, Partikelgröße 5 µm, 250 mm x 4.6 mm ID) sowie Daicel Chiralpak IB und IC (250 mm x 4.6 mm ID).

8.3 Nach bekannten Vorschriften synthetisierte Produkte:

29[171], **30**[228], **34**[173], **37**[172], **38**[173], **89**[186], **91**[186], **104**[230], **111**[191], **116**[197], **117-120**[200], **123**[195], **125**[195], **160**[231].

8.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1 (Aldolreaktion)

Diisopropylamin (0.31 mL, 2.2 mmol) wurde in abs. THF (7 mL) gelöst und auf –78 °C abgekühlt. Es wurde *n*-BuLi-Lösung (2.22 M in Hexan, 1.17 mL, 2.6 mmol) zugetropft und für 10 min bei konstanter Temperatur gerührt. Eine Lösung aus (*R*,*S*)-BocBMI (0.51 g, 2.0 mmol) in abs. THF (3 mL) wurde langsam zugetropft, wobei eine starke Gelbfärbung eintrat. Nach weiteren 30 min wurde die Mischung auf –100 °C abgekühlt und mit einer Lösung des Benzaldehydderivats (0.3 mL, 2.2 mmol) in abs. THF (2 mL) versetzt. Je nach Substitutionsmuster der Aromaten trat eine unterschiedliche starke Verfärbung der Lösung auf. Nach Abbruch der Reaktion durch Zugabe von ges. Ammoniumchloridlösung (7 mL) wurde zweimal mit Et_2O extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.

AAV 2 (Hydrolyse)

Das Aldol wurde in 6 M HCl (15 mL) suspensiert und über Nacht am Rückfluss erhitzt. Nach Reaktionsende wurde die Lösung eingeengt und ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt. Die Menge an verbliebenem Methylamid sowie der Epimerisierungsgrad während der Reaktion wurden mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie verfolgt.

AAV 3 (Boc-Schützung 1)

β-Hydroxy-α-aminosäure (1.0 mmol) wurde in H_2O/THF (20 mL, v/v, 1:1) gelöst. Nach Zugabe von Natriumhydroxid (0.12 g, 3.1 mmol) und DMAP (0.01 g, 0.1 mmol) wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt. Es wurde mit Boc_2O (0.62 g, 2.8 mmol) versetzt, 30 min bei 0 °C gerührt und dann über Nacht auf RT erwärmt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der erhaltene Feststoff mit Ethanol extrahiert. Das Filtrat wurde eingeengt und das erhaltene Rohprodukt durch präparative HPLC (RP18) getrennt.

AAV 4 (Phenolkupplung)

Phenol (78 mmol) und Kaliumcarbonat (101 mmol) wurden in abs. THF (100 mL) gelöst. Die farblose Suspension wurde mit Bromacetonitril (101 mmol) versetzt und über Nacht unter

Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung filtriert und der Rückstand mit Ethylacetat (50 mL) extrahiert. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum bis zur Trockene eingeengt.

AAV 5 (Nitrilreduktion)

Das Nitril (80 mmol) wurde in abs. THF (100 mL) gelöst. Nach Zugabe von Boran (80 mmol) wurde 12 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung in HCl (1 M) gegeben und dreimal mit Ethylacetat (je 50 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit HCl (1 M, je 50 mL) nachextrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden im Vakuum bis zur Trockne eingeengt.

AAV 6 (Boc-Schützung 2)

Das Ammoniumchlorid wurde in abs. Methanol (15 mL) gelöst und durch Zugabe von Triethylamin basisch gemacht (ca. 1.5 mL). Nach Versetzen mit Boc_2O (280 mg, 1.3 mmol) wurde 12 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan (ca. 20 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt.

AAV 7 (Bn-Schützung)

Die Carbonsäure (1.0 mmol) wurde in DMF (20 mL) gelöst. Nach Zugabe von Benzylbromid (1.1 mmol) und Kaliumcarbonat (1.1 mmol) wurde bei RT gerührt und der Reaktionsverlauf per DC verfolgt. Nach Reaktionsende (ca. 2 h) wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Bei Bedarf wurde der DMF-Gehalt durch zusätzliches Waschen einer Lösung des Rohproduktes in Ethylacetat mit Wasser reduziert.

AAV 8 (Nucleophile Substitution)

Das Mesylat/Tosylat (2.55 mmol) wurde in Aceton (10 mL) gelöst und mit LiBr (5.10 mmol) versetzt. Nach 3 h Erhitzen unter Rückfluss wurde auf RT abgekühlt und mit Ethylacetat (20 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde nacheinander mit verdünnter HCl (1M) und NaOH (1M) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferte das gewünschte Rohprodukt.

AAV 9 (Ozonolyse)

Das geschützte Tryptophan (1.0 mmol) wurde in dest. Methanol (20 mL) gelöst und auf -78 °C abgekühlt. Über eine Glaspipette wurde so lange Ozon durch die Lösung geleitet, bis sich diese tiefblau färbte (ca. 1 h). Nun wurde bis zur Entfärbung der Lösung Stickstoff

durchgeleitet. Nach Versetzen mit DMS (2.0 mmol) wurde auf RT erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt.

AAV 10 (Boc-Entschützung)

Das Boc-geschützte Amin wurde für 90 min bei 0 °C in einer Lösung aus CH_2Cl_2 und TFA (9:1) gerührt. Anschließend wurde die Lösung bei RT eingeengt und viermal mit destilliertem CH_2Cl_2 coevaporiert.

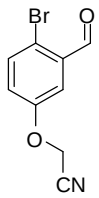
AAV 11 (Alkinaddition)

TMS-Acetylen (0.5 mL, 3.3 mmol) wurde in abs. THF (7 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Im Abstand von 15 min wurden nacheinander *n*-BuLi (1.4 M in Hexan, 2.1 mL, 3.0 mmol) und der Benzaldehyd (3.0 mmol) zugegeben und die Mischung für 75 min bei konstanter Temperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. $NaHCO_3$-Lösung (10 mL) unterbrochen und die wässrige Phase mit Et_2O (2 x 10 mL) extrahiert. Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferte das gewünschte Produkt.

AAV 12 (Click-Reaktion)

Alkin (1.0 mmol), Azid (1.0 mmol), Natriumascorbat (0.02 g, 0.1 mmol) und Kupfersulfat (0.02 g, 0.1 mmol) wurden in dest. DMF (5 mL) gelöst und für 30 min in der Mikrowelle auf 100 °C (200 W) erwärmt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in CH_2Cl_2 (20 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde nacheinander mit Wasser (10 mL) und wässriger EDTA-Lösung (1 M, 10 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferte das gewünschte Produkt

8.5 Synthese der Serinderivate



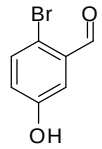
2-(4-Brom-3-formylphenoxy)acetonitril 35

Die Synthese erfolgte nach AAV 4 (Edukt **42**, 4.38 g, 21.8 mmol). Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE, v/v, 2:1) und in Form eines farblosen Pulvers erhalten (5.08 g, 21.2 mmol, 97%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 10.32 [s, 1H, C*H*O], 7.63 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.8 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.48 [d, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 3.2 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.14 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.8 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 3.3 Hz, 1H, CH_{arom}], 4.82 [s, 2H, CH_2].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 191.0 [*C*HO], 156.0 [*C*O], 135.3 [*C*H_{arom}], 134.3 [*C*CHO], 123.4 [*C*H_{arom}], 120.4 [*C*Br], 114.2 [*C*N], 113.8 [*C*H_{arom}], 53.6 [*C*H_2].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_9H_6BrNO_2$ $[M+H]^+$ = 239.9655, gef. 239.9654.



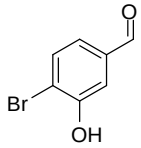
2-Brom-5-hydroxybenzaldehyd 42

3-Hydroxybenzaldehyd **41** (12.2 g, 100 mmol) wurde in einem Chloroform/Acetonitril Gemisch (220 mL, v/v, 10:1) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach tropfenweiser Zugabe einer Lösung von Brom (5.14 mL, 100 mmol) in Chloroform (20 mL) wurde bei 0 °C gerührt. Nach 2 h wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. Natriumsulfitlösung und etwas 2 M KOH-Lösung unterbrochen und die Lösung im Vakuum zum grünen Feststoff eingeengt. Das Rohprodukt wurde mit reichlich Ethylacetat extrahiert und die Lösung im Vakuum zum beigen Feststoff eingeengt. Die wiederholte säulenchromatographische Trennung (Hexan/EE, v/v, 4:1) ergab das gewünschte Produkt **42** in Form eines beigefarbenen Pulvers (11.59 g, 58 mmol, 58%). Als Nebenprodukt trat das regioisomere 4-Brom-3-hydroxybenzaldehyd **43** auf.

^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 10.23 [s, 1H, C*H*O], 7.49 [d, ^{3}J ($^{1}H,^{1}H$) = 8.7 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.27 [d, ^{4}J ($^{1}H,^{1}H$) = 3.1 Hz, 1H, CH_{arom}], 6.98 [dd, ^{3}J (^{1}H, ^{1}H) = 8.7 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 3.1 Hz, 1H, CH_{arom}].

^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 193.0 [*C*HO], 159.0 [C_{arom}], 135.9 [*C*H_{arom}], 135.5 [C_{arom}], 124.4 [*C*H_{arom}], 116.7 [C_{arom}], 116.4 [*C*H_{arom}].

HPLC (RP18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm Partikel, 1 mL/min, 20 zu 60% MeCN in 15 min mit H_2O, 254 nm): t_r = 11.8 min.

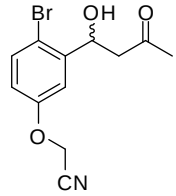


4-Brom-3-hydroxybenzaldehyd 43

^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 9.86 [s, 1H, C*H*O], 7.68 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.1 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.36 [d, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.9 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.27 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.1 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.9 Hz, 1H, CH_{arom}].

^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 193.1 [*C*HO], 156.3 [*C*OH], 138.5 [*C*CHO], 135.1, 123.3 [*C*H$_{arom}$], 118.6 [*C*Br], 116.0 [*C*H$_{arom}$].

HPLC (RP18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm Partikel, 1 mL/min, 20 zu 60% MeCN in 15 min mit H_2O, 254 nm): t_r = 10.9 min.



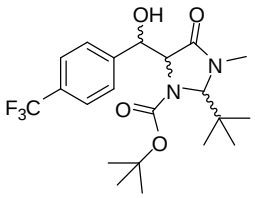
3-(2-Brom-5-(cyanomethoxy)phenyl)-3-hydroxypropionsäureethylester 44

Die Synthese erfolgte nach AAV 4 (Edukt **42**, 4.38 g, 21.8 mmol), jedoch in Aceton anstatt THF. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE, v/v, 2:1) und in Form eines gelben Pulvers isoliert (4.4 g, 14.8 mmol, 74%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.47 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.8 Hz, 1H, C*H*$_{arom}$], 7.28 [d, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 3.2 Hz, 1H, C*H*$_{arom}$], 6.80 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.8 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 3.2 Hz, 1H, C*H*$_{arom}$], 5.39 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.9 Hz, 9.8 Hz, 1H, C*H*OH], 4.79 [s, 2H, C*H*$_2$CN], 3.63 [bs, 1H, O*H*], 3.03 [dd, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = 17.9 Hz, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.0 Hz, 1H, C*H*$_2$CO], 2.60 [dd, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = 17.9 Hz, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 9.8 Hz, 1H, C*H*$_2$CO], 2.23 [s, 3H, C*H*$_3$].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 209.1 [*C*O], 156.2 [*C*$_{arom}$O], 143.5 [*C*CHOH], 133.7, 116.0 [*C*H$_{arom}$], 114.7, 113.9 [*C*Br, *C*N], 113.6 [*C*H$_{arom}$], 68.6 [*C*HOH], 53.6 [*C*H$_2$CN], 49.8 [*C*H$_2$CO], 30.6 [*C*H$_3$].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{12}H_{12}BrNO_3$ $[M+Na]^+$ = 319.9893, gef. 319.9897.

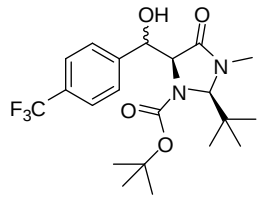


2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-(hydroxy-(4-(trifluormethyl)-phenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 46-47

Die Synthese erfolgte nach AAV 1 (Edukt **30**, 0.51 g, 2.0 mmol). Nach Zugabe des Aldehyds wurde die Lösung 45 min bei -100 °C gerührt und dann langsam erwärmt. Bei -60 °C erfolgte der Reaktionsabbruch. Die säulenchromatographische Reinigung ergab zwei Diastereomere (**46**, **47)** im Verhältnis 74:26 (insg. 0.39 g, 0.9 mmol, 46%).

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{21}H_{29}F_3N_2O_4$ $[M+Na]^+$ = 453.1977, gef. 453.1962.

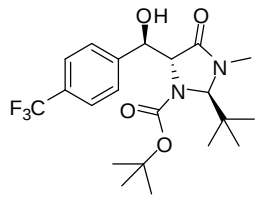
EA für $C_{21}H_{29}F_3N_2O_4$: ber. C, 58.59; H, 6.79; N, 6.51, gef. C, 58.38; H, 6.72; N, 6.37.



(2*R*,5*S*)-2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-((*S*)-hydroxy(4-(trifluormethyl)phenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 46

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7.66 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.2 Hz, 2H, CH_{arom}], 7.42 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.0 Hz, 2H, CH_{arom}], 5.80 [s, 1H, O*H*], 5.59 [bs, 1H, C*H*OH], 4.68 [s, 1H, C*H*C(CH$_3$)$_3$], 4.37 [s, 1H, C*H*CON], 2.58 [s, 3H, NCH_3], 1.39 [s, 9H, OC(CH_3)$_3$], 0.85 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

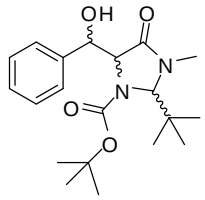
^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 169.3 [*C*ON], 152.3 [N*C*O$_2$], 146.0 [C_{arom}], 127.7, 127.4, 126.8, 125.6, 124.3, 124.3, 122.9 [C_{arom}, *C*H$_{arom}$], 80.5 [O*C*(CH$_3$)$_3$], 79.7 [*C*HC(CH$_3$)$_3$], 68.6 [*C*HOH], 62.7 [*C*HCON], 30.9 [N*C*H$_3$], 27.6 [OC(*C*H$_3$)$_3$], 26.0 [C(*C*H$_3$)$_3$].



(2*R*,5*R*)-2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-((*R*)-hydroxy(4-(trifluormethyl)phenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 47

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7.69 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.5 Hz, 2H, CH_{arom}], 7.65 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.6Hz, 2H, CH_{arom}], 5.83 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 4.7 Hz, 1H, O*H*], 5.05 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 4.0 Hz, 1H, C*H*OH], 4.88 [s, 1H, C*H*C(CH_3)$_3$], 4.18 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 3.3 Hz, 1H, C*H*N], 2.85 [s, 3H, NCH_3], 1.39 [s, 9H, OC(CH_3)$_3$], 1.06 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 167.6 [*C*ON], 155.6 [N*C*O$_2$], 147.5 [C_{arom}], 127.6, 127.3, 127.2, 126.7, 125.7, 124.8, 124.4, 124.4, 123.0 [C_{arom}, *C*H$_{arom}$], 80.7 [O*C*(CH$_3$)$_3$], 80.5 [*C*HC(CH$_3$)$_3$], 72.7 [*C*HOH], 65.2 [*C*HCON], 36.8, [*C*(CH$_3$)$_3$] 30.3 [N*C*H$_3$], 27.7 [OC(*C*H$_3$)$_3$], 26.8 [C(*C*H$_3$)$_3$].

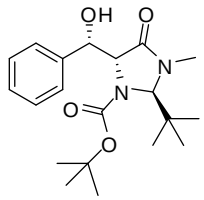


2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-(hydroxy(phenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 48-49

Die Synthese erfolgte nach AAV 1 (Edukt **30**, 0.77 g, 3.0 mmol). Nach Aldehydzugabe wurde langsam auf RT erwärmt und die Reaktion 30 min später abgebrochen. Die säulenchromatographische Reinigung ergab zwei Diastereomere (**48, 49**) im Verhältnis 65:35 (insg. 0.64 g, 1.8 mmol, 59%).

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{20}H_{30}N_2O_4$ $[M+Na]^+$ = 385.2098, gef. 385.2087.

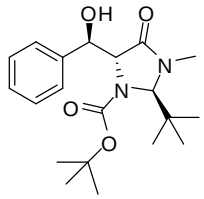
EA für $C_{20}H_{30}N_2O_4$: ber. C, 66.27; H, 8.34; N, 7.73, gef. C, 66.34; H, 8.37; N, 7.77.



(2*R*,5*R*)-2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-((*S*)-hydroxy(phenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 48

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7.32-7.18 [m, 5H, CH_{arom}], 5.52 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.3 Hz, 1H, O*H*], 5.17 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 5.7 Hz, C*H*OH], 4.56 [s, 1H, C*H*C$(CH_3)_3$], 4.49 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 5.7 Hz, C*H*OH], 4.32 [s, C*H*CON], 2.56 [s, 3H, NCH_3], 1.43 [s, 9H, OC(CH_3)$_3$], 0.84 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

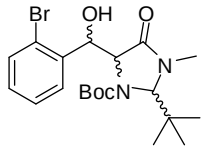
^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 169.6 [*C*ON], 142.4 [*C*-1], 140.1 [N*C*O_2], 127.9, 127.4, 127.2, 126.5, 126.3 [*C*H$_{arom}$], 80.3 [O*C*$(CH_3)_3$], 79.7 [*C*HC$(CH_3)_3$], 62.7 [*C*HOH], 62.3 [*C*HCON], 30.9 [N*C*H_3], 27.7 [OC(*C*H_3)$_3$], 26.2 [*C*$(CH_3)_3$], 26.0 [C(*C*H_3)$_3$].



(2*R*,5*R*)-2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-((*R*)-hydroxy(phenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 49

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7.45 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.4 Hz, 2H, CH_{arom}], 7.31 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.5 Hz, 2H, CH_{arom}], 7.23 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.3 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.56 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 4.5 Hz, 1H, O*H*], 4.93 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 4.0 Hz, H, C*H*OH], 4.86 [s, 1H, C*H*C$(CH_3)_3$], 4.14 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 3.4 Hz, 1H, C*H*CON], 2.86 [s, 3H, NCH_3], 1.37 [s, 9H, OC(CH_3)$_3$], 1.05 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 167.9 [*C*ON], 155.6 [N*C*O_2], 142.8 [C_{arom}], 127.5, 126.7, 126.6 [*C*H$_{arom}$], 80.7 [*C*HC$(CH_3)_3$], 80.4 [O*C*$(CH_3)_3$], 73.5 [*C*HOH], 65.3 [*C*HCON], 36.8 [*C*$(CH_3)_3$], 30.3 [N*C*H_3], 27.7 [OC(*C*H_3)$_3$], 26.9 [C(*C*H_3)$_3$].

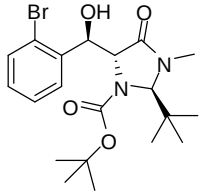


2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-(hydroxy(2-bromphenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 50-52

Die Synthese erfolgte nach AAV 1 (Edukt **30**, 2.56 g, 10.0 mmol). Die Reaktion wurde 10 min nach Zugabe des Aldehyds bei -100 °C unterbrochen. Die säulenchromatographische Reinigung ergab drei Diastereomere **50**, **51**, **52** im Verhältnis 16:50:34 (insg. 3.84 g, 8.7 mmol, 87%).

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{20}H_{29}BrN_2O_4$ $[M+Na]^+$ = 463.1203, gef. 463.1206.

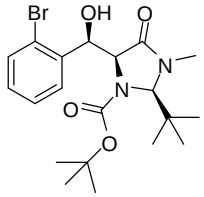
EA für $C_{20}H_{29}BrN_2O_4$: ber. C, 54.43; H, 6.62; N, 6.35, gef. C, 54.19; H, 6.75; N, 6.02.



(2*R*,5*R*)-2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-((*R*)-hydroxy(2-bromphenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 50

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7.52 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.9 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.36 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.5 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.29 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.3 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.15 [dt, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.9 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 1.5 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.80 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 6.7 Hz, 1H, O*H*], 5.46 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 2.6, 6.7 Hz, 1H, C*H*OH], 5.00 [s, 1H, C*H*C$(CH_3)_3$], 4.55 [m, 1H, C*H*N], 2.93 [s, 3H, NCH_3], 1.24 [s, 9H, OC(CH_3)$_3$], 0.90 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

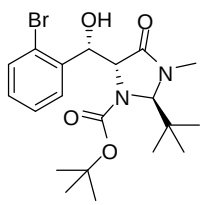
^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 170.4 [*C*ON], 152.0 [N*C*O_2], 141.3 [C_{arom}], 132.1, 128.8, 128.5, 126.5 [*C*H$_{arom}$], 121.8 [C_{arom}], 79.9 [*C*HC$(CH_3)_3$], 79.8 [O*C*$(CH_3)_3$], 70.9 [*C*HOH], 61.1 [*C*HCON], 40.3 [*C*$(CH_3)_3$], 31.5 [N*C*H_3], 27.4 [OC(*C*H_3)$_3$], 26.1 [C(*C*H_3)$_3$].



(2*R*,5*S*)-2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-((*R*)-hydroxy(2-bromphenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 51

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7.74 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.8 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 1.5 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.52 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.0 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 1.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.35 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.1 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.18 [dt, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.8 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 1.7 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.81 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 5.1 Hz, 1H, O*H*], 5.26 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 3.9, 4.7 Hz, 1H, C*H*OH], 4.89 [s, 1H, C*H*C$(CH_3)_3$], 4.32 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 3.3 Hz, 1H, C*H*N], 2.84 [s, 3H, NCH_3], 1.38 [s, 9H, OC(CH_3)$_3$], 1.07 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

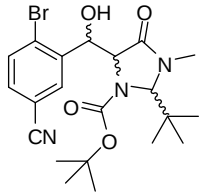
^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 167.3 [*C*ON], 155.1 [N*C*O_2], 141.5 [C_{arom}], 131.5, 130.8, 128.8, 126.9 [*C*H$_{arom}$], 121.2 [*C*Br], 80.7 [*C*HC$(CH_3)_3$], 80.2 [O*C*$(CH_3)_3$], 72.1 [*C*HOH], 62.7 [*C*HCON], 36.6 [*C*$(CH_3)_3$], 30.3 [N*C*H_3], 27.8 [OC(*C*H_3)$_3$], 26.8 [C(*C*H_3)$_3$].



(2*R*,5*R*)-2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-((*S*)-hydroxy(2-bromphenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 52

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7.52 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.9 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.50 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.1 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.31 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.4 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.16 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.3 Hz, 1H, CH_{arom}], 6.22-5.93 [m, 1H, O*H*], 5.69 [s, 1H, C*H*OH], 5.09-4.99 [m, 1H, C*H*C$(CH_3)_3$], 4.21 [s, 1H, C*H*CON], 2.85 [s, 3H, NCH_3], 1.50 [s, 9H, OC(CH_3)$_3$], 0.87 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

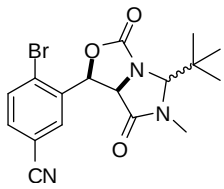
^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 167.5 [*C*ON], 153.4 [N*C*O_2], 140.6 [C_{arom}], 131.3, 131.2, 128.4, 125.9 [*C*H$_{arom}$], 120.2 [*C*Br], 80.1 [O*C*$(CH_3)_3$], 79.1 [*C*HC$(CH_3)_3$], 68.2 [*C*HOH], 60.5 [*C*HCON], 40.0 [*C*$(CH_3)_3$], 30.9 [N*C*H_3], 27.9 [OC(*C*H_3)$_3$], 25.8 [C(*C*H_3)$_3$].



2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-(hydroxy((2-brom-5-cyan)phenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 53-56

Die Synthese erfolgte nach AAV 1 (Edukt **30**, 2.56 g, 10.0 mmol). Die Reaktion wurde 10 min nach Zugabe des Aldehyds bei -100 °C unterbrochen. Das komplexe Produktgemisch konnte auf Grund einer Reihe von Nebenprodukten nicht vollständig durch Säulenchromatographie gereinigt und somit weder Gesamtausbeute noch Produktverhältnis bestimmt werden. Es wurden zwei Diastereomere (**55**, **56**) im Verhältnis 67:33 (insg. 1.40 g, 3.0 mmol, 30%) sowie die Verbindungen **53** und **54** in analytischen Spuren isoliert.

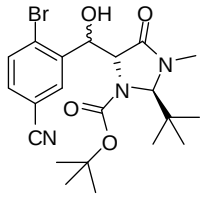
HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{21}H_{28}BrN_3O_4$ $[M+Na]^+$ = 488.1155, gef. 488.1152.



4-Brom-3-((1*R*,7a*R*)-5-*tert*-butyl-6-methyl-3,7-dioxohexahydroimidazo[1,5-c]oxazol-1-yl)benzonitril 53

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.73 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.2 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.55 [d, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.8 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.52 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.2 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 6.13 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 9.4 Hz, 1H, C*H*OH], 4.78 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 9.3 Hz, 1H, C*H*CON], 4.78 [s, 1H, C*H*C$(CH_3)_3$], 2.86 [s, 3H, NCH_3], 1.08 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

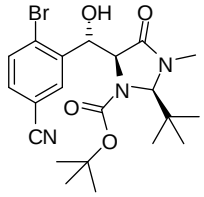
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 167.3 [*C*ON], 161.0 [N*C*O_2], 135.9 [C_{arom}], 133.5, 133.4, 129.6 [*C*H$_{arom}$], 127.4 [*C*Br], 117.6 [*C*N], 112.1 [*C*CN], 84.6 [*C*HC$(CH_3)_3$], 76.9 [*C*HO], 59.6 [*C*HCON], 37.9 [*C*$(CH_3)_3$], 31.3 [N*C*H_3], 25.7 [C(*C*H_3)$_3$].



(2*R*,5*R*)-2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-(hydroxy((2-brom-5-cyano)phenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 54

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.21 [d, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.8 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.64 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.3 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.38 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.3 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 4.92 [s, 1H, CHC$(CH_3)_3$], 4.75 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 4.7 Hz, 1H, CHOH], 4.51 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 4.8 Hz, 1H, CHCON], 3.03 [s, 3H, NCH_3], 1.30 [s, 9H, OC(CH_3)$_3$], 1.05 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

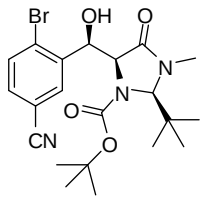
^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 169.3 [*C*ON], 155.9 [N*C*O_2], 144.9 [C_{arom}], 134.1, 133.6, 131.6 [*C*H$_{arom}$], 128.8 [*C*Br], 118.0 [*C*N], 112.1 [*C*CN], 82.7 [*C*HC$(CH_3)_3$], 82.2 [O*C*$(CH_3)_3$], 63.9 [*C*HOH], 58.3 [*C*HCON], 37.3 [*C*$(CH_3)_3$], 31.3 [N*C*H_3], 27.9 [OC(*C*H_3)$_3$], 26.9 [C(*C*H_3)$_3$].



(2*R*,5*S*)-2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-((*S*)-hydroxy((2-brom-5-cyano)phenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 55

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.91 [d, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.9 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.60 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.2 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.39 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.2 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 6.33 [bs, 1H, CHOH], 5.06 [s, 1H, CHC$(CH_3)_3$], 4.48 [s, 1H, CHCON], 2.97 [s, 3H, NCH_3], 2.60 [bs, 1H, OH], 1.55 [s, 9H, OC(CH_3)$_3$], 0.97 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 168.0 [*C*ON], 153.3 [N*C*O_2], 140.9 [C_{arom}], 134.3, 133.0, 131.7 [*C*H$_{arom}$], 126.3 [*C*Br], 118.5 [*C*N], 110.7 [*C*CN], 81.9 [O*C*$(CH_3)_3$], 80.7 [*C*HC$(CH_3)_3$], 68.4 [*C*HOH], 60.9 [*C*HCON], 40.5 [*C*$(CH_3)_3$], 31.7 [N*C*H_3], 28.4 [OC(*C*H_3)$_3$], 26.4 [C(*C*H_3)$_3$].

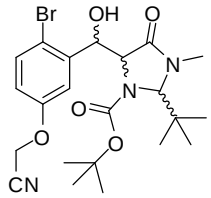


(2*R*,5*S*)-2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-((*R*)-hydroxy((2-brom-5-cyano)phenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 56

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.89 [d, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.7 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.63 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.3 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.42 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.3 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.40 [dd, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = 3.6 Hz, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.7 Hz, 1H, CHOH], 4.90 [s, 1H,

C*H*C(CH$_3$)$_3$], 4.30 [d, ^3J(^{1}H,^{1}H) = 8.8 Hz, 1H, C*H*CON], 2.95 [s, 3H, NC*H$_3$*], 1.51 [s, 9H, OC(C*H$_3$*)$_3$], 1.10 [s, 9H, C(C*H$_3$*)$_3$].

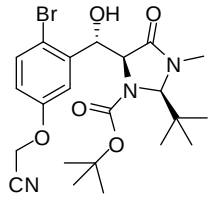
^{13}C-NMR (150 MHz, CDCl$_3$): δ (ppm) = 166.7 [*C*ON], 157.8 [N*C*O$_2$], 142.1 [*C*$_{arom}$], 133.3, 132.9, 132.1 [*C*H$_{arom}$], 129.4 [*C*Br], 118.1 [*C*N], 111.8 [*C*CN], 84.0 [O*C*(CH$_3$)$_3$], 82.2 [*C*HC(CH$_3$)$_3$], 73.5 [*C*HOH], 65.4 [*C*HCON], 37.4 [*C*(CH$_3$)$_3$], 31.6 [NCH$_3$], 28.1 [OC(*C*H$_3$)$_3$], 26.7 [C(*C*H$_3$)$_3$].



2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-(hydroxy((2-brom-5-cyanomethoxy)phenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 57-58

Die Synthese erfolgte nach AAV 1 (Edukt **30**, 2.56 g, 10.0 mmol). Die Reaktion wurde 10 min nach Zugabe des Aldehyds bei -100 °C unterbrochen. Das komplexe Produktgemisch konnte auf Grund einer Reihe von Nebenprodukten nicht vollständig durch Säulenchromatographie gereinigt und somit weder Gesamtausbeute noch Produktverhältnis bestimmt werden. Es wurden zwei Diastereomere (**57**, **58**) im Verhältnis 60:40 (insg. 0.13 g, 0.3 mmol, 3%) isoliert.

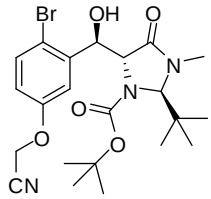
HRMS (ESI): m/z ber. für C$_{22}$H$_{30}$BrN$_3$O$_5$ [M+Na]$^+$ = 520.1246, gef. 520.1236.



(2*R*,5*S*)-2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-((*S*)-hydroxy((2-brom-5-cyanomethoxy)phenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 57

^{1}H-NMR (600 MHz, CDCl$_3$): δ (ppm) = 7.45 [d, ^3J(^{1}H,^{1}H) = 8.7 Hz, 1H, C*H*$_{arom}$], 7.43 [d, ^4J(^{1}H,^{1}H) = 3.1 Hz, 1H, C*H*$_{arom}$], 6.81 [dd, ^3J(^{1}H,^{1}H) = 8.8 Hz, ^4J(^{1}H,^{1}H) = 3.1 Hz, 1H, C*H*$_{arom}$], 5.31 [d, ^3J(^{1}H,^{1}H) = 6.8 Hz, 1H, C*H*OH], 4.98 [s, 1H, C*H*C(CH$_3$)$_3$], 4.88 [bs, 1H, O*H*], 4.79 [d, ^2J(^{1}H,^{1}H) = 16.0 Hz, 1H, C*H$_2$*], 4.76 [d, ^2J(^{1}H,^{1}H) = 16.0 Hz, 1H, C*H$_2$*], 4.38 [d, ^3J(^{1}H,^{1}H) = 6.8 Hz, 1H, C*H*CON], 3.03 [s, 3H, NC*H$_3$*], 1.21 [s, 9H, OC(C*H$_3$*)$_3$], 1.08 [s, 9H, C(C*H$_3$*)$_3$].

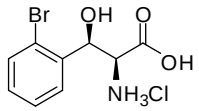
^{13}C-NMR (100 MHz, CDCl$_3$): δ (ppm) = 170.3 [*C*ON], 156.1 [*C*$_{arom}$O], 155.9 [N*C*O$_2$], 143.0 [*C*$_{arom}$], 133.4, 116.6, 116.4 [*C*H$_{arom}$], 116.0 [*C*Br], 114.8 [*C*N], 83.2 [*C*HC(CH$_3$)$_3$], 82.1 [O*C*(CH$_3$)$_3$], 74.2 [*C*HOH], 63.3 [*C*HCON], 53.6 [*C*H$_2$], 37.3 [*C*(CH$_3$)$_3$], 31.4 [NCH$_3$], 27.8 [OC(*C*H$_3$)$_3$], 26.6 [C(*C*H$_3$)$_3$].



(2*R*,5*R*)-2-*tert*-Butyl-1-*tert*-butoxycarbonyl-5-((*R*)-hydroxy((2-brom-5-cyanomethoxy)phenyl)-methyl)-3-methyl-4-imidazolidinon 58

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.42 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.7 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.27 [d, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 3.1 Hz, 1H, CH_{arom}], 6.78 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.7 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 3.1 Hz, 1H, CH_{arom}], 6.24 [bs, 1H, C*H*OH], 5.06 [s, 1H, C*H*C$(CH_3)_3$], 4.77 [d, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = 16.0 Hz, 1H, CH_2], 4.74 [d, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = 16.0 Hz, 1H, CH_2], 4.46 [s, 1H, C*H*CON], 2.93 [s, 3H, NCH_3], 1.52 [s, 9H, OC(CH_3)$_3$], 0.94 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

^{13}C-NMR (50 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 168.3 [*C*ON], 155.2 [C_{arom}O], 153.3 [N*C*O_2], 141.0 [C_{arom}], 133.0, 116.6, 116.3 [*C*H$_{arom}$], 115.1 [*C*N], 114.2 [*C*Br], 81.6 [O*C*$(CH_3)_3$], 80.5 [*C*HC$(CH_3)_3$], 68.6 [*C*HOH], 61.1 [*C*HCON], 53.8 [*C*H_2], 40.4 [*C*$(CH_3)_3$], 31.6 [N*C*H_3], 28.3 [OC(*C*H_3)$_3$], 26.3 [C(*C*H_3)$_3$].

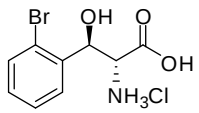


(2*S*,3*R*)-2-Amino-3-(2-bromphenyl)-3-hydroxypropionsäure Hydrochlorid 61

Die Synthese erfolgte nach AAV 2 aus den Aldolen **51** (1.12 g, 2.5 mmol) und **52** (1.56 g, 3.5 mmol). Die vollständige Hydrolyse dauerte 44 h und verlief mit 35% (**51**) bzw. 7% (**52**) Epimerisierung (best. durch HPLC der Folgestufe).

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 7.70-7.64 [m, 1H, CH_{arom}], 7.57 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.9 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.4 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.51-7.43 [m, 1H, CH_{arom}], 7.35-7.28 [m, 1H, CH_{arom}], 5.49 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 3.1 Hz, 1H, C*H*OH], 4.46 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 3.2 Hz, 1H, C*H*NH].

^{13}C-NMR (100 MHz, D_2O): δ (ppm) = 170.1 [*C*OOH], 138.2 [C_{arom}], 133.8, 131.4, 129.4, 128.8 [*C*H$_{arom}$], 122.0 [*C*Br], 71.8 [*C*HOH], 57.3 [*C*HNH_3].



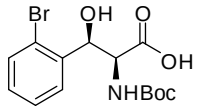
(2*R*,3*R*)-2-Amino-3-(2-bromphenyl)-3-hydroxypropionsäure Hydrochlorid 62

Die Synthese erfolgte nach AAV 2 aus Aldol **50** (0.42 g, 0.9 mmol). Die vollständige Hydrolyse dauerte 23 h und verlief mit 2% Epimerisierung (best. durch HPLC der Folgestufe).

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 7.70 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.0 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.1 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.65 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.8 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.5 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.50 [dt,

$^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.7 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.33 [dt, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.7 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.7 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.71 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 3.4 Hz, 1H, C*H*OH], 4.42 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 3.4 Hz, 1H, C*H*NH_3].

^{13}C-NMR (100 MHz, D_2O): δ (ppm) = 171.4 [*C*OOH], 138.0 [C_{arom}], 134.3, 131.6, 129.3, 128.8 [CH_{arom}], 122.4 [*C*Br], 70.9 [*C*HOH], 58.1 [*C*HNH_3].



(2*S*,3*R*)-3-(2-Bromphenyl)-2-(*tert*-butyloxycarbonylamino)-3-hydroxypropionsäure 63

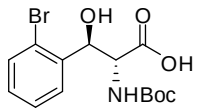
Die Synthese erfolgte nach AAV 3 aus den Rohprodukten **61**. Das gewünschte Produkt wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten (Aldol **51**: 0.30 g, 0.8 mmol, 33%; Aldol **52**: 0.38 g, 1.0 mmol, 30%, jeweils über zwei Schritte).

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 12.40 [bs, 1H, COO*H*], 7.56 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.0 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.49 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.7 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.35 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.4 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.20 [dt, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.6 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.4 Hz, 1H, CH_{arom}], 6.70 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 9.2 Hz, 1H, N*H*], 5.84 [bs, 1H, O*H*], 5.02 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.2 Hz, 1H, C*H*OH], 4.33 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.3 Hz, 9.2 Hz, 1H, C*H*NH], 1.33 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 171.1 [*C*OOH], 154.7 [N*C*O_2], 140.2 [C_{arom}], 131.9, 129.1, 129.0, 127.0 [CH_{arom}], 121.9 [*C*Br], 78.3 [*C*$(CH_3)_3$], 72.0 [*C*OH], 57.9 [*C*NH], 27.9 [C(*C*H_3)$_3$].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{14}H_{18}BrNO_5$ $[M-H]^-$ = 358.0296, gef. 358.0305.

HPLC (Chromolith® RP-18e, 100 x 3 mm ID, 5 µm Partikel, 0.3 mL/min, 5 zu 95% MeCN in 10 min mit H_2O, 230 nm): t_r = 6.1 min.



(2*R*,3*R*)-3-(2-Bromphenyl)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-hydroxypropionsäure 64

Die Synthese erfolgte nach AAV 3 aus dem Rohprodukt **62**. Das gewünschte Prtodukt wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten (0.13 g, 0.3 mmol, 37% über zwei Schritte).

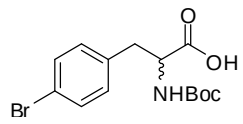
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 12.89 [bs, 1H, COO*H*], 7.59-7.52 [m, 2H, CH_{arom}], 7.36 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.18 [dt, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.7 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.6 Hz, 1H, CH_{arom}], 6.29 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 10.0 Hz, 1H, N*H*], 5.86 [d,

$^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 10.1 Hz, 1H, O*H*], 5.40 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.8 Hz, 1H, C*H*OH], 4.41 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 10.0 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.3 Hz, 1H, C*H*NH], 1.20 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 171.7 [*C*OOH], 155.2 [N*C*O_2], 140.5 [C_{arom}], 131.9, 129.0, 129.0, 127.1 [*C*H$_{arom}$], 120.9 [*C*Br], 78.1 [*C*(CH_3)$_3$], 71.6 [*C*OH], 56.7 [*C*NH], 27.9 [C(*C*H_3)$_3$].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{14}H_{18}BrNO_5$ $[M-H]^-$ = 358.0296, gef. 358.0305.

HPLC (Chromolith® RP-18e, 100 x 3 mm ID, 5 µm Partikel, 0.3 mL/min, 5 zu 95% MeCN in 10 min mit H_2O, 230 nm): t_r = 6.9 min.



3-(4-Bromphenyl)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propionsäure

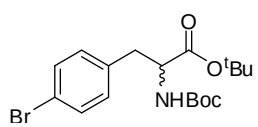
69

68 (100 mg, 0.4 mmol) wurde in Methanol (15 mL) suspensiert und mit einigen Tropfen NEt_3 versetzt. Nach Zugabe von Boc_2O (113 mg, 0.52 mmol) wurde 36 h bei RT gerührt. Die klare Lösung wurde im Vakuum eingeengt und das Rohprodukt in EE (50 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 1 M HCl gewaschen, mit Wasser neutralisiert und über Natriumsulfat getrocknet. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab das Produkt in quantitativer Ausbeute (138 mg, 0.4 mmol, 100%).

^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.42 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.3 Hz, 2H, C*H*$_{arom}$], 7.16 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.3 Hz, 2H, C*H*$_{arom}$], 4.32 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.0 Hz, 9.1 Hz, 1H, C*H*NH], 3.14 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.0 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 13.9 Hz, 1H, CH_2], 2.87 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 9.2 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 13.9 Hz, 1H, CH_2], 1.38 [s, 9H, CH_3].

^{13}C-NMR (400 MHz, rt, CD_3OD): δ (ppm) = 175.4 [*C*OOH], 157.8 [N*C*(O)O], 138.2 [C_{arom}], 132.4, 132.4 [C*H*$_{arom}$], 121.5 [*C*Br], 80.6 [*C*(CH_3)$_3$], 56.2 [*C*HNH], 38.3 [*C*H_2], 28.7 [C(*C*H_3)$_3$].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{14}H_{18}BrNO_4$ $[M-H]^-$ = 342.0346, gef. 342.0343.



3-(4-Bromphenyl)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propionsäure-*tert*-butylester 70

68 (240 mg, 1 mmol) wurde in *t*-BuOH (15 mL) suspensiert und mit Boc_2O (1.09 g, 5 mmol) sowie einer Spatelspitze DMAP versetzt. Es wurde bei 30 °C bis zum Abschluss der Reaktion gerührt (DC-Kontrolle, ca. 60 h). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/EE, v/v, 19:1). Es

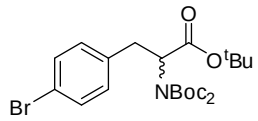
wurde sowohl sowohl das gewünschte Produkt **70** (94 mg, 0.2 mmol, 23%, farbloses Öl) als auch das zweifach Boc-geschützte Nebenprodukt **71** (14 mg, 0.03 mmol, 3%) erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.43 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.3 Hz, 2H, CH_{arom}], 7.15 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.3 Hz, 2H, CH_{arom}], 4.21 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 6.1 Hz, 8.6 Hz, 1H, C*H*NH], 3.02 [dd, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = 13.8 Hz, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 6.0 Hz, 1H, CH_2], 2.85 [dd, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = 13.8 Hz, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.9 Hz, 1H, CH_2], 1.41 [s, 9H, C(CH_3)$_3$], 1.39 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 172.7 [*C*OO^{t}Bu], 157.8 [O*C*(O)N], 138.0 [C_{arom}], 132.4 [*C*H$_{arom}$], 121.5 [*C*Br], 82.9, 80.6 [*C*(CH$_3$)$_3$], 57.0 [*C*HNH], 38.2 [*C*H$_2$], 28.7, 28.2 [C(*C*H$_3$)$_3$].

HPLC (Chromolith RP18e, 100 x 3 mm ID, 5 µm Partikel, 0.3 mL/min, 5 zu 95% MeCN in 10 min mit H_2O, 230 nm): t_r = 14.4 min.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{18}H_{26}BrNO_4$ $[M+Na]^+$ = 422.0943, gef. 422.0936.



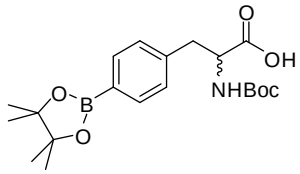
3-(4-Bromphenyl)-2-(di(*tert*-butoxycarbonyl)amino)propionsäure-*tert*-butylester 71

^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.41 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.3 Hz, 2H, CH_{arom}], 7.10 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.3 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.02 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.2 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.03 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.0 Hz, 10.9 Hz, 1H, C*H*NH], 3.30 [dd, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = verdeckt d. MeOH, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.0 Hz, 1H, CH_2], 3.17 [dd, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = 14.0 Hz, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 11.0 Hz, 1H, CH_2], 1.49, 1.48, 1.47 [s, 18H, C(CH_3)$_3$], 1.41 [s, 9H, C(CH_3)$_3$].

^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 170.6, 167.9 [CO_2], 155.7, 153.7 [N*C*O$_2$], 138.5, 136.3 [C_{arom}], 133.2, 132.7, 132.5, 132.3 [*C*H$_{arom}$], 122.1, 121.5 [*C*Br], 84.4, 84.3, 83.1, 81.3, 68.7 [O*C*(CH$_3$)$_3$], 61.3 [*C*HNH], 38.4, 36.2 [*C*H$_2$], 28.5, 28.0, 28.0, 27.8 [C(*C*H$_3$)$_3$].

HPLC (Chromolith RP18e, 100 x 3 mm ID, 5 µm Partikel, 0.3 mL/min, 5 zu 95% MeCN in 10 min mit H_2O, 230 nm): t_r = 16.1 min.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{23}H_{34}BrNO_6$ $[M+Na]^+$ = 522.1447, gef. 522.1435.



3-(4-(pinakolylboron)phenyl)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-propionsäure 74

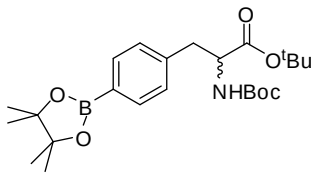
69 (34 mg, 0.10 mmol) wurde in abs. THF (5 mL) gelöst und auf -78 °C gekühlt. Im Abstand von 15 min wurden MeLi (5% in Et_2O, 0.14 mL, 0.22 mmol), *i*-PrMgCl (14% in THF, LiCl-Komplex, 0.22 mL, 0.22 mmol), *t*-BuLi (1.6 M in Hexan, 0.12 mL, 0.20 mmol) und Isopropylpinakolborat (0.08 mL, 0.40 mmol) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf RT erwärmt und weitere 2 h bei RT gerührt. Es wurde mit 0.5 M HCl versetzt und die wässrige Phase dreimal mit EE (je 10 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde über präparative HPLC gereinigt (RP18, 10 zu 90% MeCN in 15 min mit H_2O, 2 mL/min, 230 nm). Neben unverbrauchtem Edukt (9 mg, 0.03 mmol) wurde das Produkt in Form eines farblosen Feststoffes erhalten (5 mg, 0.01 mmol, 13%).

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.66 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.8 Hz, 2H, CH_{arom}], 7.24 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.7 Hz, 2H, CH_{arom}], 4.32-4.37 [m, 1H, C*H*NH], 3.12-3.19 [m, 1H, CH_2], 2.85-2.94 [m, 1H, CH_2], 1.37-1.34 [m, 21H, CH_3].

^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 175.4, 175.3, 175.1 [*C*OOH], 157.9, 157.8 [N*C*(O)O], 142.2, [C_{arom}], 135.8, 129.8 [CH_{arom}], 85.1 [$C(CH_3)_2$], 80.6 [$C(CH_3)_3$], 56.2, 56.2, 56.1 [*C*HNH], 38.9, 38.8, 38.2 [CH_2], 28.7, 28.5 [C(CH_3)$_3$], 25.2, 25.1 [C(CH_3)$_2$].

^{11}B-NMR (128 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 27.6.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{20}H_{30}BNO_6$ $[M-H]^-$ = 390.2093, gef. 390.2082.



3-(4-(pinakolylboron)phenyl)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-propionsäure-*tert*-butylester 75

70 (28 mg, 0.07 mmol) wurde in abs. THF (3 mL) gelöst und auf -78 °C gekühlt. Im Abstand von 10 min wurden nacheinander Methyllithium (5% in Diethylether, 0.08 mL, 0.08 mmol), *tert*-Butyllithium (1.5 M in Hexan, 0.1 mL, 0.14 mmol) und Isopropylpinakolborat (0.06 mL, 0.28 mmol) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde anschließend langsam auf RT erwärmt und mit Wasser (ca. 10 mL) versetzt. Es wurde

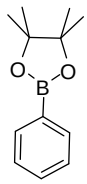
dreimal mit CH_2Cl_2 (je 10 mL) extrahiert und die vereinten organischen Extrakte über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/EE, v/v, 9:1). Das gewünschte Produkt wurde in Form eines farblosen Öls erhalten (15 mg, 0.03 mmol, 48%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.73 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.9 Hz, 2H, CH_{arom}], 7.17 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.9 Hz, 2H, CH_{arom}], 4.95 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.1 Hz, 1H, CHN*H*], 4.45 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 6.0 Hz, 8.0 Hz, 1H, C*H*NH], 3.07-3.09 [m, 2H, CH_2], 1.42, 1.41 [s, 18H, C(CH_3)$_3$], 1.34 [s, 12H, C(CH_3)$_2$].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 170.8 [CO_2], 155.0 [NCO_2], 139.6 [C_{arom}], 134.8, 129.0 [CH_{arom}], 83.7, 82.1 [$C(CH_3)_3$], 79.6 [$C(CH_3)_2$], 54.7 [*C*HNH], 38.4 [CH_2], 29.7, 28.3 [C(CH_3)$_3$], 28.0, 24.9 [C(CH_3)$_2$].

^{11}B-NMR (128 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 31.7.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{24}H_{38}BNO_6$ $[M+Na]^+$ = 470.2684, gef. 470.2695.



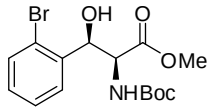
Pinakolylphenylboronsäure 76

Brombenzol **72** (0.11 mL, 1 mmol) wurde in abs. THF (5 mL) gelöst und auf -78 °C abgekühlt. Nacheinander wurden *t*-BuLi-Lösung (1.5 M in Hexan, 2 mL, 3 mmol) und Isopropoylpinakolborsäureester (0.3 mL, 1.3 mmol) hinzugetropft und die Reaktionsmischung langsam auf RT erwärmt. Nach 1 h wurde die Reaktion durch Zugabe von Ethanol unterbrochen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in DCM (20 mL) gelöst und mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde einmal mit DCM (ca. 15 mL) nachextrahiert. Die vereinten organischen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Säulenchromatographische Aufreinigung des Rückstandes (Hexan/EE, v/v, 19:1) ergab das Produkt in Form eines farblosen Öls (173 mg, (0.8 mmol, 85%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.81-7.83 [m, 2H, CH_{arom}], 7.45-7.49 [m, 1H CH_{arom}], 7.36-7.40 [m, 2H, CH_{arom}], 1.36 [s, 12H, CH_3].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 134.7, 131.7, 127.7 [CH_{arom}], 83.7 [$C(CH_3]_2$], 24.8 [CH_3].

^{11}B-NMR (128 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 30.9.

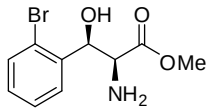


(2*S*,3*R*)-3-(2-Bromphenyl)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-hydroxy-propionsäuremethylester 78

63 (47 mg, 0.13 mmol) wurde in MeOH (5 mL) gelöst und mit TMS-Diazomethan (2.0 M in Hexan, 0.07 mL, 0.14 mmol) versetzt. Nach 1 h Rühren bei RT wurde weiteres TMS-Diazomethan (0.07 mL, 0.14 mmol) zugegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Es wurde 2 h bei 40 °C gerührt, mit TMS-Diazomethan (0.21 mL, 0.42 mmol) sowie einigen Tropfen Triethylamin versetzt und weitere 7 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingeengt und durch präparative HPLC gereinigt (RP18, 5 zu 95% MeCN in 10 min mit H_2O, 3 mL/min, 230 nm). Das gewünschte Produkt **78** wurde in Form eines öligen Feststoffes erhalten (24 mg, 0.06 mmol, 49%). Ebenfalls isoliert wurde ein Boc-entschütztes Zersetzungsprodukt **79** (<1 mg, <1%).

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.55 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.53 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.8 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 1.5 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.36 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.5 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.19 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.5 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.24 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 5.5 Hz, 1H, C*H*OH], 4.59 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 5.4 Hz, 1H, C*H*NH], 3.55 [s, 3H, CO_2CH_3], 1.39 [s, 9H, $C(CH_3)_3$].

^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 172.3 [CO_2], 157.3 [NCO_2], 141.4 [C_{arom}], 133.6, 130.5, 129.7, 128.5 [CH_{arom}], 123.5 [*C*Br], 81.0 [$C(CH_3)_3$], 74.0 [*C*HOH], 59.4 [*C*HNH], 52.3 [CO_2CH_3], 28.6 [$C(CH_3)_3$].

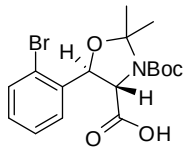


(2*S*,3*R*)-3-(2-Bromphenyl)-2-amino-3-hydroxypropionsäuremethylester 79

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.61 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.0 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 0.9 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.58 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.8 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 1.3 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.43 [dt, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.5 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 0.7 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.27 [dt, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.7 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 1.6 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.39 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 3.2 Hz, 1H, C*H*OH], 4.40 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 3.1 Hz, 1H, C*H*NH], 3.55 [s, 3H, CH_3].

^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 168.0 [CO_2], 139.8 [C_{arom}], 133.8, 131.2, 129.7, 128.7 [CH_{arom}], 122.3 [*C*Br], 72.2 [*C*HOH], 57.3 [*C*HNH], 52.9 [CH_3].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{10}H_{12}BrNO_3$ $[M+H]^+$ = 274.0073, gef. 274.0074.



Dimethyloxazolidin-3-(2-bromphenyl)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-3-hydroxypropionsäure 81

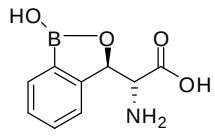
63 (50 mg, 0.14 mmol) wurde in Aceton (3 mL) gelöst und mit DMP (0.25 mL, 2 mmol) sowie einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure versetzt. Nach 2.5 h Rühren bei 70 °C wurde die Lösung im Vakuum eingeengt. Das Rohprodukt wurde in DCM (ca. 20 mL) aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab das Rohprodukt (40 mg) als leicht grünliches Öl, das über präparative HPLC gereinigt wurde (RP18, 5 zu 95% MeCN in 15 min mit H_2O, 3 mL/min, 230 nm). Das Produkt wurde in Form eines farblosen Feststoffes (17 mg, 0.04 mmol, 30%) erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.59 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.2 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.55 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.1 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 1.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.38 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.5 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.21 [dt, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.9 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 1.6 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.64 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.0 Hz, C*H*OH], 5.60 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.2 Hz, C*H*OH], 4.24 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.0 Hz, C*H*NH], 4.13 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.2 Hz, C*H*NH], 1.80-1.70 [m, 6H, C(CH_3)$_2$], 1.51-1.41 [m, 9H, C(CH_3)$_3$].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 176.5, 175.0 [*C*OOH], 151.9, 150.7 [N*C*O$_2$], 136.3 [C_{arom}], 133.0, 130.3, 128.5, 128.1 [*C*H$_{arom}$], 123.1 [*C*Br], 95.8, 95.1 [*C*(CH$_3$)$_2$], 81.6, 81.3 [*C*(CH$_3$)$_3$], 77.9 [*C*HOH] 66.1 [*C*HN], 28.3, 28.2 [C(*C*H$_3$)$_3$], 27.5, 26.3, 25.0, 24.1 [C(*C*H$_3$)$_2$].

HPLC (Chromolith RP-18e, 100 x 3 mm ID, 5 µm Partikel, 0.3 mL/min, 5 zu 95% MeCN in 10 min mit H_2O, 230 nm): t_r = 10.9 min.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{17}H_{22}BrNO_5$ $[M-H]^-$ = 398.0609, gef. 398.0607.



(2*R*,3*R*)-2-Amino-3-(2-phenylboron)-3-hydroxypropionsäure 84

50 (31 mg, 0.07 mmol) wurde in abs. Toluol (3 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zutropfen einer *i*-PrMgCl-Lösung (14% in THF, LiCl-Komplex, 0.35 mL, 0.35 mmol) wurde erst 15 min gerührt, dann auf -78 °C abgekühlt und mit *t*-BuLi (1.6 M in Hexan, 0.23 mL, 0.35 mmol) versetzt. 10 min später wurde Triisopropylborat (0.08 mL, 0.35 mmol) zugegeben und die Lösung langsam auf RT erwärmt. Nach 12 h wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser (10 mL) abgebrochen. Die wässrige Phase wurde mit 50% H_2SO_4 auf pH 1 – 2

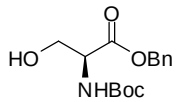
angesäuert und die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat (je 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes (50 mg neongelbes Öl, Hexan/EE, v/v 1:1) lieferte das Produkt **84** als farbloses Öl (1 mg, 0.005 mmol, 7%).

^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.90-7.84 [m, 3H, C*H*$_{arom}$], 7.71-7.67 [m, 1H, C*H*$_{arom}$], 6.07 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.2 Hz, 1H, C*H*O], 4.49 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.2 Hz, 1H, C*H*N].

^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 201.0 [*C*O_2], 160.5, 151.3 [*C*$_{arom}$], 137.8 [*C*H$_{arom}$], 136.3 [*C*$_{arom}$], 132.5, 128.8, 125.7 [*C*H$_{arom}$], 77.6 [*C*HO], 59.9 [*C*HN].

^{11}B-NMR (128 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 18.55.

8.6 Synthese der Homoserinderivate

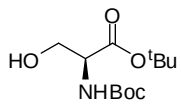


(*S*)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-hydroxypropionsäurebenzylester 86

Die Synthese erfolgte analog zu AAV 7 aus **85** (2.05 g, 10.0 mmol). Das Produkt wurde in quantitativer Ausbeute als farbloses Öl erhalten (2.99 g, 10.0 mmol) und konnte ohne Reinigung weiter umgesetzt werden.

^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.32-7.28 [m, 5H, C*H*$_{arom}$], 5.15 [s, 2H, OCH_2], 4.29 [bs, 1H, C*H*CH_2], 3.91 [dd, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = 11.3 Hz, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 3.6 Hz, 1H, CHC*H*$_2$], 3.78 [dd, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = 11.3 Hz, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 3.5 Hz, 1H, CHC*H*$_2$], 1.39 [s, 9H, C*H*$_3$].

^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 171.3 [*C*O_2], 156.3 [N*C*O_2], 135.5 [*C*$_{arom}$], 128.7, 128.5, 128.2 [*C*H$_{arom}$], 80.3 [*C*$(CH_3)_3$], 67.4 [O*C*H_2], 62.6 [CH*C*H_2], 56.0 [*C*HCH$_2$], 28.3 [*C*H$_3$].



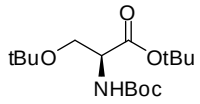
(*S*)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-hydroxypropionsäure-*tert*-butylester 87

N-Boc-Serin (0.64 g, 6.1 mmol) wurde in Chloroform (11 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von TAB (1.33 g, 6.1 mmol) und BF_3 (katalytisch) wurde langsam auf RT erwärmt. Nach 12 h wurde mit Ethylacetat verdünnt und die organische Phase mit ges. $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels

im Vakuum lieferte das Rohprodukt als leicht feuchten, farblosen Feststoff (1.35 g). Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE, v/v 9:1) erhielt man das gewünschte Produkt **87** (1.20 g, 4.6 mmol, 75%) sowie das veretherte Nebenprodukt **88** (0.14 g, 0.4 mmol, 7%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 5.42 [bs, 1H, N*H*], 4.26 [bs, 1H, C*H*], 3.90 [bs, 2H, CH_2], 1.48 [s, 9H, CH_3], 1.45 [s, 9H, CH_3].

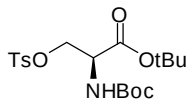
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 169.8 [CO_2], 163.6 [NCO_2], 91.8, 82.7 [$C(CH_3)_3$], 56.3 [CH_2], 53.4 [CH], 28.3, 28.0 [$C(CH_3)_3$].



(*S*)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-(*tert*-butoxy)propionsäure-*tert*-butylester 88

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 5.32 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.7 Hz, 1H, N*H*], 4.25 [dt, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.7 Hz, 8.9 Hz, 1H, C*H*], 3.76 [dd, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.6 Hz, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.8 Hz, 1H, CH_2], 3.51 [dd, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.6 Hz, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.9 Hz, 1H, CH_2], 1.45-1.42 [m, 18H, CH_3], 1.14 [s, 9H, CH_3].

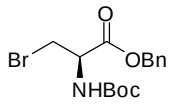
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 170.0 [CO_2], 155.7 [NCO_2], 81.5, 79.5, 72.9 [$C(CH_3)_3$], 62.4 [CH_2], 54.6 [CH], 28.3, 28.0, 27.3 [$C(CH_3)_3$].



(*S*)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-tosylpropionsäure-*tert*-butylester 90

87 (1.18 g, 4.5 mmol) wurde in dest. Pyridin (11 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von Tosylchlorid (1.12 g, 5.9 mmol) wurde langsam auf RT erwärmt und 12 h gerührt. Die klare gelbe Lösung wurde mit Ethylacetat (20 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde viermal mit verdünnter HCl (1M) und einmal mit verdünnter NaOH (1M) gewaschen. Anschließend wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt das Produkt als leicht feuchten, farblosen Feststoff (1.07 g, 2.6 mmol, 57%), der ohne Reinigung weiter umgesetzt wurde.

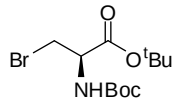
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.76 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.3 Hz 2H, CH_{arom}], 7.34 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.1 Hz 2H, CH_{arom}], 5.28 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.5 Hz 1H, N*H*], 4.40-4.37 [m, 2H, CH_2CH, CH_2CH], 4.24-4.21 [m, 1H, CH_2CH], 2.44 [s, 3H, $C_{arom}CH_3$], 1.43 [s, 9H, $C(CH_3)_3$], 1.40 [s, 9H, $C(CH_3)_3$].



(*S*)-3-Brom-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propionsäurebenzylester 92

Die Synthese erfolgte analog zur AAV 8 (Edukt: **89**, 0.28 g, 0.62 mmol), es wurde jedoch bei RT gerührt. Das gewünschte Produkt wurde in Form eines farblosen Öls (0.22 g, 0.60 mmol, 97%) erhalten, welches schnell auskristallisierte.

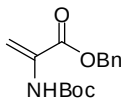
^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.39-7.35 [m, 5H, CH_{arom}], 5.42 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.7 Hz, 1H, N*H*], 5.24 [d, $^2J(^1H,^1H)$ = 12.2 Hz, 1H, OCH_2], 5.20 [d, $^2J(^1H,^1H)$ = 12.2 Hz, 1H, OCH_2], 4.79 [td, $^3J(^1H,^1H)$ = 3.2 Hz, 8.0 Hz, 1H, CH_2C*H*], 3.84 [dd, $^2J(^1H,^1H)$ = 10.5 Hz, $^3J(^1H,^1H)$ = 3.1 Hz 1H, CH_2CH], 3.71 [dd, $^2J(^1H,^1H)$ = 10.5 Hz, $^3J(^1H,^1H)$ = 3.5 Hz 1H, CH_2CH], 1.45 [s, 9H, CH_3].



(*S*)-3-Brom-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)propionsäure-*tert*-butylester 93

Die Synthese erfolgte analog zur AAV 8 (Edukt: **90**, 1.06 g, 2.55 mmol). Das Produkt wurde in Form eines farblosen Öls isoliert (0.72 g, 2.23 mmol, 88%) und ohne Reinigung weiter umgesetzt.

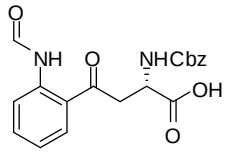
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 5.40 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.2 Hz, 1H, N*H*], 4.60 [ddd, $^3J(^1H,^1H)$ = 3.0 Hz, 3.2 Hz, 7.9 Hz, 1H, CH_2C*H*], 3.79 [dd, $^2J(^1H,^1H)$ = 10.3 Hz, $^3J(^1H,^1H)$ = 3.0 Hz 1H, CH_2CH], 3.70 [dd, $^2J(^1H,^1H)$ = 10.4 Hz, $^3J(^1H,^1H)$ = 3.4 Hz 1H, CH_2CH], 1.49 [s, 9H, CH_3], 1.45 [s, 9H, CH_3].



2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)acrylsäurebenzylester 99

91 (0.19 g, 0.5 mmol) wurde in dest. DMF (7 mL) gelöst und mit Natriumazid (0.07 g, 1.0 mmol) versetzt. Das Gemisch würde für 12 h bei 70 °C gerührt und anschließen auf RT abgekühlt. Nach Zugabe von CH_2Cl_2 (20 mL) wurde die organische Phase mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Einengen der Lösung im Vakuum lieferte quantitativ das Produkt (0.14 g, 0.5 mmol) in Form eines gelben Öls.

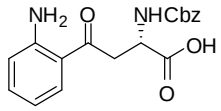
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.38-7.36 [m, 5H, CH_{arom}], 6.19 [bs, 1H, C*H*], 5.80 [s, 1H, C*H*], 5.26 [s, 2H, CH_2], 1.49 [s, 9H, CH_3].



(*S*)-2-(Benzoxycarbonylamino)-4-((2-formamidophenyl)oxo)-buttersäure 105

Die Synthese erfolgte nach AAV 9 (Edukt: **104**, 0.10 g, 0.3 mmol). Als Rohprodukt wurde ein gelbes Öl erhalten (0.17 g), welches nicht säulenchromatographisch gereinigt werden konnte. Das Öl wurde daraufhin in CH_2Cl_2 aufgenommen und die organische Phase mit verdünnter HCl (1 M) gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Gemisch per HPLC getrennt (RP18, 35% Acetonitril in Wasser, 0.1% TFA, 3 mL/min, 240 nm). Dies lieferte das gewünschte Produkt **105** (1 mg, 0.003 mmol, 1%) sowie das deformylierte Nebenprodukt **106** (1 mg, 0.003 mmol, 1%).

^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 8.59 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.5 Hz, 1H, CH_{arom}], 8.41 [s, 1H, *H*CON], 8.05 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.1 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.60 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.4 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.34-7.23 [m, 7H, CH_{arom}, N*H*], 5.10 [s, 2H, OCH_2], 4.76 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 5.4 Hz, 1H, C*H*NH], 3.64-3.61 [m, 2H, CH_2CH].

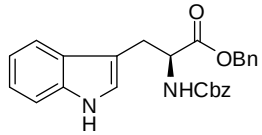


(*S*)-2-(Benzoxycarbonylamino)-4-((2-aminophenyl)oxo)buttersäure 106

^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.77 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.8 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.36-7.25 [m, 7H, CH_{arom}, N*H*], 6.78 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.3 Hz, 1H, CH_{arom}], 6.65 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.6 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.10 [s, 2H, OCH_2], 4.74-4.71 [m, 1H, C*H*CH$_2$], 3.60 [dd, $^2J(^1H,^1H)$ = 17.5 Hz, $^3J(^1H,^1H)$ = 6.4 Hz, 1H, CHCH_2], 3.49 [dd, $^2J(^1H,^1H)$ = 17.5 Hz, $^3J(^1H,^1H)$ = 4.5 Hz, 1H, CHCH_2].

^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 200.1 [*C*OCH$_2$], 175.3 [*C*OOH], 158.5 [N*C*OO], 151.6, 138.2 [C_{arom}], 135.7 [*C*H$_{arom}$], 135.4 [C_{arom}], 132.2, 129.5, 129.0, 128.8, 118.9, 117.1 [*C*H$_{arom}$], 67.7 [O*C*H$_2$], 51.5 [CH$_2$*C*H], 41.9 [*C*H$_2$CH].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{18}H_{18}N_2O_5$ $[M+H]^+$ = 343.1288, gef. 343.1292.

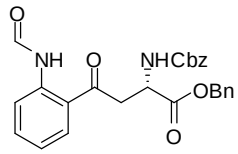


(S)-2-(Benzoxycarbonylamino)-3-(1H-indol-3-yl)propionsäure-benzylester 107

Die Synthese erfolgte nach AAV 7. Das Produkt wurde in quantitativer Ausbeute in Form eines beigefarbenen Feststoffes erhalten und konnte ohne Reinigung weiter umgesetzt werden.

^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.51 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.35-7.27 [m, 9H, CH_{arom}], 7.17-7.15 [m, 2H, CH_{arom}], 7.09 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.2 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.01-6.97 [m, 2H, CH_{arom}], 5.04 [s, 4H, OCH_2], 4.55 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.4 Hz, 6.5 Hz, 1H, CH_2CH], 3.26 [dd, $^2J(^1H,^1H)$ = 14.5 Hz, $^3J(^1H,^1H)$ = 6.3 Hz, 1H, CH_2CH], 3.16 [dd, $^2J(^1H,^1H)$ = 14.5 Hz, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.6 Hz, 1H, CH_2CH].

^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 173.9, [CO_2], 158.4 [NCO_2], 138.2, 138.1, 137.1, 134.4, 132.0, 130.4 [C_{arom}], 129.5, 129.2, 129.0, 128.8, 124.6, 122.5, 119.9, 119.2, 112.4 [CH_{arom}], 110.6 [C_{arom}], 67.6 [OCH_2], 56.8 [CH_2CH], 28.8 [CH_2CH].



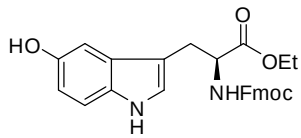
(*S*)-2-(Benzoxycarbonylamino)-4-((2-formamidophenyl)oxo)-buttersäurebenzylester 108

Die Synthese erfolgte nach AAV 9 (Edukt: **107**, 0.43 g, 1.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes (0.63 g gelbes Öl, Hexan/Ethylacetat, v/v 2:1) lieferte das gewünschte Produkt in Form eines gelben Öls (0.19 g, 0.4 mmol, 41%).

^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 8.89 [bs, 1H, N*H*], 8.54 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.4 Hz, 1H, CH_{arom}], 8.31 [s, 1H, *H*CON], 7.90 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.9 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.51 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.4 Hz, 7.6 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.31-7.24 [m, 10H, CH_{arom}], 7.14 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.6 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.16-5.05 [m, 4H, OCH_2], 4.84-4.81 [m, 1H, C*H*NH], 3.66-3.54 [m, 2H, CH_2CH].

^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 202.3 [$COCH_2$], 172.8 [COO], 162.3 [H*C*ON], 158.3 [N*C*OO], 140.1, 138.0, 137.0 [C_{arom}], 135.9, 132.2, 129.5, 129.4, 129.2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.8, 124.6 [CH_{arom}], 123.7 [C_{arom}], 122.6 [CH_{arom}], 68.1, 67.7 [OCH_2], 51.4 [CH_2CH], 42.7 [CH_2CH].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{26}H_{24}N_2O_6$ $[M+H]^+$ = 461.1707, gef. 461.1697.



2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-3-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)propionsäureethylester 112

111 (2.21 g, 5.0 mmol) wurde in dest. Ethanol (20 mL) gelöst und mit EDC (1.05 g, 5.5 mmol) versetzt. Nach 12 h Rühren bei RT wurde die klare gelbe Lösung im Vakuum eingeengt und der Rückstand in Ethylacetat (15 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde nacheinander mit HCl (1 M, 10 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im

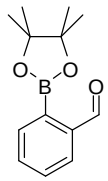
Vakuum eingeengt. Das Rohprodukt (2.0 g, gelber schaumiger Feststoff) wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat, v/v 3:2), wodurch das gewünschte Produkt (0.662 g, 1.4 mmol, 28%) in Form eines farblosen, schaumigen Öls erhalten wurde.

^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.77 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.5 Hz, 2H, CH_{arom}], 7.59 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.5 Hz, 2H, CH_{arom}], 7.37 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.4 Hz, 2H, CH_{arom}], 7.27 [q, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.2 Hz, 2H, CH_{arom}], 7.17 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.7 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.01 [s, 1H, CH_{arom}], 6.95 [d, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.1 Hz, 1H, CH_{arom}], 6.68 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.6 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.2 Hz, 1H, CH_{arom}], 4.47 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 6.0 Hz, 8.0 Hz, 1H, C*H*NH], 4.32-4.17 [m, 5H, CH_2CH$_3$, OCH_2C*H*], 3.21 [dd, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = 14.6 Hz, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.9 Hz, 1H, CH_2CHNH], 3.08 [dd, $^{2}J(^{1}H,^{1}H)$ = 14.5 Hz, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.2 Hz, 1H, CH_2CHNH], 1.16 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.1 Hz, 3H, CH$_2$CH_3].

^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 174.2 [*C*O$_2$], 158.5 [N*C*O$_2$], 151.4 [C_{arom}OH], 145.3, 142.6, 133.0, 129.5 [C_{arom}], 128.8, 128.2, 126.4, 126.3, 125.3, 120.9, 112.8, 112.5 [*C*H$_{arom}$], 110.1 [C_{arom}], 103.4 [*C*H$_{arom}$], 68.1 [O*C*H$_2$CH], 62.3 [*C*H$_2$CH$_3$], 56.5 [*C*HNH], 49.0 [OCH$_2$*C*H], 28.8 [*C*H$_2$CHNH], 14.4 [*C*H$_3$].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{28}H_{26}N_2O_5$ $[M+H]^+$ = 471.1914, gef. 471.1923.

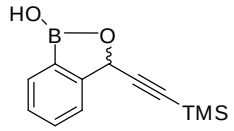
8.7 Synthese der Triazolderivate



2-(Pinakolylboron)benzaldehyd 127

Ortho-Formylphenylboronsäure **126** (1.0 g, 6.7 mmol) wurde in abs. THF/Pentan (20 mL, v/v 1:1) gelöst und mit Pinakol (0.8 g, 6.7 mmol) versetzt. Nach 2 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und quantitativ das gewünschte Produkt in Form eines farblosen Öls (1.5 g, 6.7 mmol) erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 10.53 [s, 1H, C*H*O], 7.96-7.93 [m, 1H, CH_{arom}], 7.86-7.84 [m, 1H, CH_{arom}], 7.56 [ddd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.3 Hz, 7.4 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 1.4 Hz, 2H, CH_{arom}], 1.38 [s, 12H, CH_3].



1-((2-Phenylboron)hydroxy)-3-trimethylsilylprop-2-in 128

A) Synthese aus **130**:

Das Brombenzol **130** (0.57 g, 2.0 mmol) wurde in abs. Toluol (10 mL) gelöst und auf -40 °C abgekühlt. Bei konstanter Temperatur und im Abstand von je 1 h wurden nacheinander MeLi (5% in Et_2O, 2.5 mL, 4.0 mmol), *t*-BuLi (1.7 M in Pentan, 2.4 mL, 4.0 mmol) und Triisopropylborat (2.3 mL, 10.0 mmol) zugegeben. Die gelartige Mischung wurde langsam auf RT erwärmt und für 12 h gerührt. Es wurde mit Ethylacetat (20 mL) verdünnt und die organische Phase zweimal mit verdünnter HCl (1 M) gewaschen. Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferte ein braunes Öl (0.50 g), das säulenchromatographisch gereinigt wurde (Hexan/Ethylacetat, v/v 4:1). Es wurden das gewünschte Produkt **128** (0.17 g, 0.7 mmol, 37%) sowie Reste des Edukts **130** isoliert (0.14 g, 0.5 mmol, 25%).

B) Synthese aus **127**:

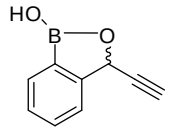
Die Synthese erfolgte nach AAV 11 (Edukt: **127**, 0.76 g, 3.3 mmol), die Reaktion wurde jedoch in Diethylether durchgeführt. Das erhaltene Rohprodukt (0.55 g) wurde säulenchromatographisch getrennt (CH_2Cl_2) und lieferte das gewünschte Produkt in Form eines farblosen Feststoffes (0.32 g, 1.4 mmol, 43%). Eine analytische Probe wurde durch Umkristallisation in Pentan erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.77 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.3 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.55 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.4 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.49 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.2 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.42 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.2 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.98 [s, C*H*OH], 5.89 [s, 1H, C*H*OH], 0.19 [s, 9H, CH_3].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 153.8 [C_{arom}], 131.7, 130.5, 128.1, 121.9 [CH_{arom}], 101.9 [*C*CSi], 91.7 [C*C*Si], 71.5 [*C*HO], -0.3 [CH_3].

^{11}B-NMR (128 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 32.1.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{12}H_{15}BO_2Si$ $[M-H]^-$ = 229.0862, gef. 229.0859.



1-((2-Phenylboron)hydroxy)prop-2-in 129

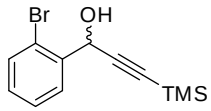
128 (0.21 g, 0.9 mmol) wurde mit LiOH (0.03 g, 1.4 mmol) in H_2O/THF (15 mL, v/v 1:2) gelöst und für 12 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in CH_2Cl_2 (20 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit verdünnter HCl (1 M) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Einengen der Lösung im Vakuum lieferte das gewünschte Produkt (0.13 g, 0.8 mmol, 93 %). Eine analytische Probe wurde durch Umkristallisation in Pentan erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.77 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.3 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.56 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.4 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.49 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.5 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.43 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.3 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.97 [s, C*H*OH], 5.88 [d, $^4J(^1H,^1H)$ = 2.0 Hz, 1H, C*H*OH], 5.88 [bs, 1H, O*H*], 2.62 [d, $^4J(^1H,^1H)$ = 2.3 Hz, 1H, CC*H*].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 153.5 [C_{arom}], 131.8, 130.6, 128.3, 121.8 [CH_{arom}], 80.8 [*C*CH], 74.6 [C*C*H], 70.8 [*C*HOH].

^{11}B-NMR (128 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 32.4.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_9H_7BO_2$ $[M+H]^+$ = 159.0612, gef. 159.0612.

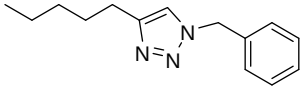


1-((2-Bromphenyl)hydroxy)-3-trimethylsilylprop-2-in 130

Die Synthese erfolgte nach AAV 11 (Edukt: **33**, 0.35 mL, 3.0 mmol). Das Produkt wurde quantitativ und analysenrein als farbloses Öl (0.92 g, 3.0 mmol) erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.78 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.8 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 1.7 Hz, 1H, C*H*$_{arom}$], 7.56 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.0 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 1.2 Hz, 1H, C*H*$_{arom}$], 7.37 [dt, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.6 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 1.2 Hz, 1H, C*H*$_{arom}$], 7.20 [dt, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.8 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 1.7 Hz, 1H, C*H*$_{arom}$], 5.79 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 5.4 Hz, 1H, C*H*], 2.56 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 5.5 Hz, 1H, O*H*], 0.20 [s, 9H, CH_3].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 139.2 [C_{arom}], 133.0, 129.9, 128.7, 127.8 [CH_{arom}], 123.0 [C_{arom}Br], 103.7 [*C*CSi], 92.0 [C*C*Si], 64.5 [*C*HOH], -0.3 [CH_3].

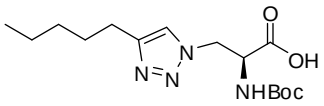


1-Benzyl-4-pentyl-1H-1,2,3-triazol 133

Die Synthese erfolgte nach AAV 12 (Edukte: **131**, 0.1 mL, 1.0 mmol und **132**, 0.13 g, 1.0 mmol). Erhalten wurde nur das gewünschte Isomer **133** (0.22 g, 0.9 mmol, 95%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.21 [s, 3H, C*H*$_{arom}$], 7.14 [s, 3H, C*H*$_{arom}$], 5.35 [s, 2H, NC*H*$_2$], 2.56 [s, 2H, C*H*$_2$], 1.53 [s, 2H, C*H*$_2$], 1.20 [s, 4H, C*H*$_2$], 0.76 [s, 3H, C*H*$_3$].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{14}H_{19}N_3$ $[M+H]^+$ = 230.1652, gef. 230.1647.

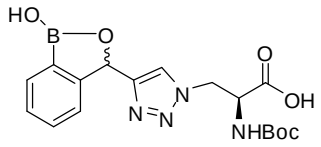


(*S*)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-(4-pentyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propionsäure 135

Die Synthese erfolgte nach AAV 12 (Edukte: **131**, 0.1 mL, 1.0 mmol und **120**, 0.23 g, 1.0 mmol). Säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes (0.30 g, CH_2Cl_2/MeOH, v/v 100:1) lieferte das gewünschte Produkt in Form eines farblosen Schaums (0.21 g, 0.9 mmol, 90%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 11.47 [bs, 1H, CO_2H], 7.40 [bs, 1H, C*H*$_{arom}$], 5.51 [bs, 1H, C*H*NH], 4.82 [bs, 1H, NC*H*$_2$], 4.58 [bs, 1H, NC*H*$_2$], 2.61 [bs, 2H, C*H*$_2$], 1.56 [bs, 2H, C*H*$_2$], 1.23 [bs, 4H, C*H*$_2$], 0.80 [bs, 3H, C*H*$_3$].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{15}H_{26}N_4O_4$ $[M+H]^+$ = 327.2027, gef. 327.2026.



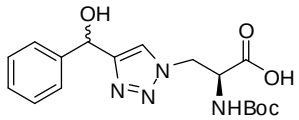
(*S*)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-(4-((2-phenylboron)hydroxy)-methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propionsäure 137

Die Synthese erfolgte nach AAV 12 (Edukte: **129**, 0.03 g, 0.3 mmol und **120**, 0.08 g, 0.3 mmol), das Reaktionsgemisch wurde jedoch zusätzlich mit CsF (0.26 g, 1.3 mmol) versetzt. Zweifache säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes (0.09 g, CH_2Cl_2/MeOH, v/v 100:15) lieferte das gewünschte Produkt **138** (0.02 g, 0.04 mmol, 13%) sowie das deboronierte Zersetzungsprodukt **139** (0.01 g, 0.04 mmol, 18%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.75-7.72 [m, 1H, C*H*$_{arom}$], 7.48 [bs, 1H, C*H*$_{arom}$], 7.17-7.14 [m, 3H, C*H*$_{arom}$], 6.14 [bs, 1H, C*H*O], 4.88 [m, 1H, C*H*$_2$, verdeckt von MeOH], 4.66-4.60 [m, 1H, C*H*$_2$], 4.35-4-32 [m, 1H, C*H*NH], 1.36 [s, 9H, C*H*$_3$].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 130.4, 127.5, 123.5, 122.6 [*C*H$_{arom}$], 80.4 [*C*(CH$_3$)$_3$], 75.2 [*C*HO], 56.9 [*C*HNH], 52.9 [*C*H$_2$], 28.7 [*C*H$_3$] (quarternäre C auf Grund zu geringer Signalintensität nicht zu erkennen).

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{17}H_{21}BN_4O_6$ $[M+Na]^+$ = 411.1446, gef. 411.1437.



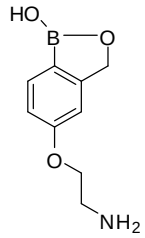
(*S*)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-(4-(hydroxyphenyl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propionsäure 138

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.68 [s, 1H, CH_{arom}], 7.42 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.4 Hz, 2H, CH_{arom}], 7.33 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.3 Hz, 2H, CH_{arom}], 7.26 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.3 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.89 [s, 1H, C*H*OH], 4.86 [m, 1H, CH_2], 4.67-4.63 [m, 1H, CH_2], 4.34-4.33 [m, 1H, C*H*NH], 1.37 [s, 9H, CH_3].

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 176.2 [*C*O_2H], 157.4 [N*C*O_2], 152.6, 144.3 [C_{arom}], 129.5, 128.8, 127.8, 124.3 [*C*H_{arom}], 80.7 [*C*$(CH_3)_3$], 70.2 [*C*HOH], 57.1 [*C*HNH], 53.0 [*C*H_2], 28.8 [*C*H_3].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{17}H_{22}N_4O_5$ $[M+H]^+$ = 363.1663, gef. 363.1668.

8.8 Synthese der Linkerderivate



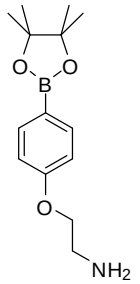
5-(2-Aminoethoxy)-2-boronbenzylalkohol 141

Die Synthese erfolgte nach AAV 10 (Edukt: **148**, 0.09 g, 0.3 mmol). Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne Reinigung weiter umgesetzt.

^{1}H-NMR (200 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.58 (d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.8 Hz, 1H, CH_{arom}), 6.98 (s, 1H, CH_{arom}), 6.95 (d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.8, CH_{arom}), 4.99 (s, 2H, CH_2O), 4.26 (t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 4.9 Hz, OC$H_2$$CH_2$), 3.37 (t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 4.9 Hz, 2H, OCH_2CH_2).

^{13}C-NMR (50 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 162.1 (C_{arom}O), 157.9 (C_{arom}), 132.7 (*C*H_{arom}), 121.1 (C_{arom}B), 116.0, 107.5 (*C*H_{arom}), 72.0 (OCH_2CH_2), 65.3 (*C*H_2O), 40.2 (OCH_2CH_2).

^{11}B-NMR (128 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 31.9.

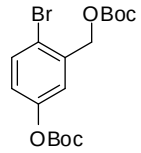


4-(2-Aminoethoxy)pinakolylphenylboronsäure 163

Die Synthese erfolgte nach AAV 10 (Edukt: **162**, 0.11 g, 0.3 mmol). Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne Reinigung weiter umgesetzt.

^{1}H-NMR (200 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.71 (d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.6 Hz, 2H, CH_{arom}), 6.99 (d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.6 Hz, 2H, CH_{arom}), 4.24 (t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 4.9 Hz, 2H, OCH_2), 3.36 (t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 4.9 Hz, CH_2N), 1.32 (s, 12H, CH_3).

^{13}C-NMR (50 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 162.0 (C_{arom}O), 137.6 (CH_{arom}), 122.6 (C_{arom}B), 114.9 (CH_{arom}), 84.9 ($C(CH_3)_2$), 65.0 (OCH_2), 40.1 (CH_2N), 25.1 ($C(CH_3)_2$).



2-Brom-5-(*tert*-butoxycarbonyloxo)benzylether-*tert*-butylcarbonat 145

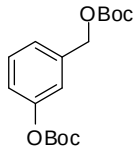
2-Brom-5-cyanomethoxybenzaldehyd **35** (240 mg, 1 mmol) wurde in abs. THF (10 mL) suspensiert und mit LAH (190 mg, 5 mmol) versetzt. Die Mischung wurde 20 h am Rückfluss erhitzt und anschließend auf RT abgekühlt. Es wurde 1 M NaOH (20 mL) zugegeben und die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat (je 15 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wurde in abs. *tert*-Butanol (17 mL) gelöst und mit Boc_2O (260 mg, 1.2 mmol) sowie einer Spatelspitze DMAP versetzt. Es wurde 24 h bei 30 °C gerührt. Nach Zugabe von weiterem Boc_2O (340 mg, 1.6 mmol) wurde erneut für 60 h bei 30 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/EE, v/v, 19:1). Es wurden Verbindung **145** (135 mg, 0.3 mmol, 34%) und **144** (59 mg, 0.2 mmol, 18%) als farblose Öle erhalten.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.59 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.7 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.22 [d, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.8 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.05 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.7 Hz, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.8 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.12 [s, 2H, CH_2], 1.52 [s, 9H, $C(CH_3)_3$], 1.48 [s, 9H, $C(CH_3)_3$].

^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 154.5, 152.8, 152.1 [$C_{arom}O$, CO_3], 138.1 [C_{arom}], 134.7, 123.8, 123.3 [CH_{arom}], 119.7 [CBr], 84.8, 83.6 [$C(CH_3)_3$], 68.4 [CH_2], 28.1, 27.9 [$C(CH_3)_3$].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{17}H_{23}BrO_6$ $[M+Na]^+$ = 425.0576, gef. 425.0579.

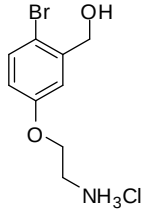


3-(*tert*-Butoxycarbonyloxo)benzylether-*tert*-butylcarbonat 144

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.39 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.9 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.24 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 7.9 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.14 [d, $^4J(^1H,^1H)$ = 1.9 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.10 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.1 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 2.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.08 [s, 2H, CH_2], 1.53 [s, 9H, $C(CH_3)_3$], 1.47 [s, 9H, $C(CH_3)_3$].

^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 154.9, 153.4, 152.7 [$C_{arom}O$, CO_3], 139.4 [C_{arom}], 130.7, 126.2, 122.2, 121.8 [CH_{arom}], 68.5 [CH_2], 27.8, 27.7 [$C(CH_3)_3$].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{17}H_{24}O_6$ $[M+Na]^+$ = 347.1471, gef. 347.1472.



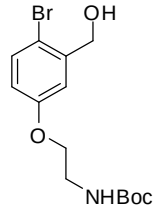
5-(2-Aminoethoxy)-2-brombenzylalkohol Hydrochlorid 146

Die Synthese erfolgte nach AAV 5 (Edukt: **35**, 0.24 g, 1.0 mmol). Das gewünschte Produkt wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten (0.47 g) und wurde ohne Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 7.52 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.8 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.07 [d, $^4J(^1H,^1H)$ = 3.1 Hz, 1H, CH_{arom}], 6.85 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.8 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 3.1 Hz, 1H, CH_{arom}], 4.63 [s, 2H, CH_2OH], 4.25 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 4.8 Hz, 2H, OCH_2CH_2N], 3.40 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 4.8 Hz, 1H, OCH_2CH_2N].

^{13}C-NMR (100 MHz, D_2O): δ (ppm) = 155.1 [$C_{arom}O$], 138.2 [C_{arom}], 131.5, 113.4 [CH_{arom}], 111.7 [CBr], 62.0, 61.4, 35.7 [CH_2].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_9H_{12}BrNO_2$ $[M+H]^+$ = 246.0124, gef. 246.0112.



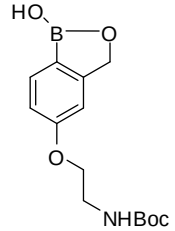
2-Brom-5-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethoxy)benzylalkohol 147

Die Synthese erfolgte nach AAV 6 aus dem Rohprodukt **146**. Säulenchromatographische Reinigung des erhaltenen farblosen Öls (0.31 g, CH_2Cl_2/MeOH, v/v 10:1) lieferte das gewünschte Produkt in Form eines farblosen Öls (0.31 g, 0.9 mmol, 88%).

^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 7.40 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.7 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.14 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 3.1 Hz, 1H, CH_{arom}], 6.77 [dd, $^3J(^1H,^1H)$ = 3.0 Hz, $^4J(^1H,^1H)$ = 8.7 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.49 [s, 1H, N*H*], 4.60 [s, 2H, CH_2OH], 4.00 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 5.6 Hz, 2H, OCH_2], 3.42 [t, $^3J(^1H,^1H)$ = 5.6 Hz, 2H, CH_2N], 1.44 [s, 9H, CH_3].

^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 160.0 [C_{arom}O], 158.6 [NCO_2], 142.9 [C_{arom}], 134.1 [CH_{arom}], 115.9 [C_{arom}Br], 115.5, 113.1 [CH_{arom}], 80.3 [$C(CH_3)_3$], 68.2 [OCH_2], 64.6 [CH_2OH], 41.0 [CH_2N], 28.8 [CH_3].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{14}H_{20}BrNO_4$ $[M+H]^+$ = 368.0468, gef. 368.0479.



2-Boron-5-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethoxy)benzylalkohol 148

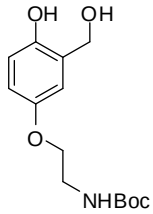
Es wurde Edukt **147** (0.35 g, 1.0 mmol) in abs. Toluol (10 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde eine Isopropylmagnesiumchloridlösung (14% in THF, 5 mL, 5.0 mmol) zugegeben und die Lösung für 20 min gerührt. Dann wurde *tert*-BuLi (1.7 M in Pentan, 6.3 mL, 10.0 mmol) zugegeben und für 10 min gerührt. Es entstand eine neongelbe Lösung. Nach Zugabe von Triisopropylborat (2.3 mL, 10.0 mmol) wurde über Nacht gerührt, wobei eine farblose Suspension entstand. Diese wurde in destilliertes Wasser gegeben und mit halbkonzentrierter Schwefelsäure auf pH-Wert 2 angesäuert. Die Lösung wurde dreimal mit Ethylacetat (je 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit destilliertem Wasser (10 mL) neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/EtOAc, v/v 2:1). Dies lieferte das gewünschte Produkt (0.117 g, 0.4 mmol, 40%) in Form eines farblosen Feststoffes, sowie die beiden Zersetzungsprodukte **149** (43 mg, 0.2 mmol, 15%) und **150** (45 mg, 0.2 mmol, 17%) in Form farbloser Öle.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.64 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.1, 1H, CH_{arom}], 6.90 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$= 8.2, 1H, CH_{arom}], 6.82 [s, 1H, CH_{arom}], 5.25 [s, 1H, NH], 5.03 [s, 2H, CH_2OB], 4.06 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$= 5.1, 2H, OCH_2], 3.55 [q, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.0, 2H, CH_2N], 1.45 [s, 9H, CH_3].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 161.4 [C_{arom}O], 156.4 [C_{arom}], 155.9 [NCO_2], 131.8, 114.8, 106.2 [CH_{arom}], 79.7 [$C(CH_3)_3$], 70.8 [CH_2OB], 67.2 [OCH_2], 40.0 [CH_2N], 28.4 [CH_3].

^{11}B-NMR (128 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 32.2.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{14}H_{20}BNO_5$ $[M+Na]^+$ = 316.1327, gef. 316.1337.

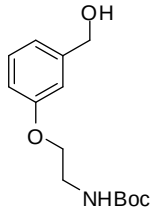


5-(2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)ethoxy)-2-hydroxybenzylalkohol 149

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 6.76 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.7, 1H, CH_{arom}], 6.68 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.2, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 6.59 [d, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.7, 1H, CH_{arom}], 5.07 [bs, 1H, N*H*], 4.74 [s, 2H, CH_2OH], 3.89 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$= 5.0, 2H, OCH_2],3.44-3.45 [m, 2H, CH_2N], 1.43 [s, 9H, CH_3].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 156.1 [NCO_2], 151.8 [C_{arom}O], 150.0 [C_{arom}OH], 126.2 [C_{arom}], 116.8, 114.8, 114.1 [CH_{arom}], 79.6 [$C(CH_3)_3$], 67.7 [OCH_2], 63.8 [CH_2OH], 40.1 [CH_2N], 28.3 [CH_3].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{14}H_{21}NO_5$ $[M+Na]^+$ = 306.1312, gef. 306.1306.

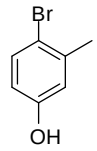


3-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethoxy)benzylalkohol 150

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.25 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.7, 1H, CH_{arom}], 6.95 [s, 1H, CH_{arom}], 6.92 [d, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.1, 1H, CH_{arom}], 6.80 [dd, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.1, $^{4}J(^{1}H,^{1}H)$ = 2.0 Hz, 1H, CH_{arom}], 5.05 [bs, 1H, N*H*], 4.66 [s, 2H, CH_2OH], 4.01 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.0, 2H, OCH_2], 3.51-3.52 [m, 2H, CH_2N], 1.44 [s, 9H, CH_3].

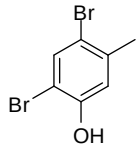
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 158.8 [$C_{arom}O$], 155.9 [NCO_2], 142.7 [C_{arom}], 129.6, 119.4, 113.5, 112.8 [CH_{arom}], 79.5 [$C(CH_3)_3$], 67.0 [OCH_2], 65.0 [CH_2OH], 40.0 [CH_2N], 28.3 [CH_3].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{14}H_{21}NO_4$ $[M+Na]^+$ = 290.1363, gef. 290.1351.



4-Brom-3-methylphenol 153

m-Kresol **152** (0.21 mL, 2.0 mmol) wurde in 1,3-Dioxan (1 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Es wurde langsam Brom (0.1 mL, 2.0 mmol) hinzugetropft und bis zur Entfärbung bei 0 °C gerührt (ca. 30 min). Die Reaktion wurde durch Zugabe ges. Natriumsulfitlösung (10 mL) unterbrochen und die Mischung mit Dichlomethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit 2 M Natronlauge gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zum farblosen Öl eingeengt. Mittels ^{1}H-NMR-Analyse wurde ein Produktverhältnis von 82% Mono-, 17% Di- und 1% Tribromiertes Produkt bestimmt. Die präparative Trennung durch HPLC ergab das gewünschte monobromierte Produkt **153** (102 mg, 0.55 mmol, 28%), die dibromierten Produkte **154** und **155** (0.03 g, 0.1 mmol, 5%) sowie das tribromierte Produkt **156** (1 mg, 0.003 mmol, 0.1%) im Verhältnis 82:17:1 (Integration der Peakflächen im HPLC-Chromatogramm, 254 nm) in Form kristalliner Feststoffe.

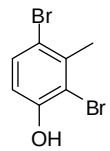


4,6-Dibrom-3-methylphenol 154

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.58 [s, 1H, CH_{arom}], 6.90 [s, 1H, CH_{arom}], 5.45 [bs, 1H, O*H*], 2.30 [s, 1H, CH_3].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 151.4 [*C*OH], 139.0 [*C*CH_3], 134.2, 117.8 [*C*H_{arom}], 115.2, 107.4 [*C*Br], 22.6 [*C*H_3].

HPLC (RP18, 250 x 8.0 mm ID, 5 µm Partikel, 3 mL/min, 10 zu 60% MeCN in 20 min mit H_2O, 254 nm): t_r = 19.2 min.

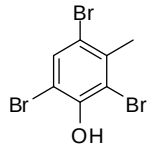


2,4-Dibrom-3-methylphenol 155

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.38 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.7 Hz, 1H, CH_{arom}], 6.78 [d, $^3J(^1H,^1H)$ = 8.7 Hz, 1H, CH_{arom}], 4.87 [bs, 1H, O*H*], 2.55 [s, 1H, CH_3].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 151.7 [*C*OH], 137.4 [*C*CH_3], 132.0 [*C*H_{arom}], 115.0 [*C*Br], 114.4 [*C*H_{arom}], 113.7 [*C*Br], 24.0 [*C*H_3].

HPLC (RP18, 250 x 8.0 mm ID, 5 µm Partikel, 3 mL/min, 10 zu 60% MeCN in 20 min mit H_2O, 254 nm): t_r = 19.2 min.

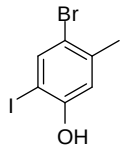


2,4,6-Tribrom-3-methylphenol 156

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.66 [s, 1H, C*H*$_{arom}$], 5.94 [bs, 1H, OH], 2.53 [s, 3H, C*H*$_3$].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 148.8, 137.7 [C_{arom}], 134.1 [*C*H_{arom}], 115.0, 113.1, 106.8 [C_{arom}], 24.0 [*C*H_3].

HPLC (RP18, 250 x 8.0 mm ID, 5 µm Partikel, 3 mL/min, 10 zu 60% MeCN in 20 min mit H_2O, 254 nm): t_r = 25.4 min.

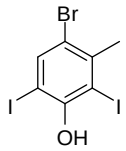


4-Brom-2-iod-5-methylphenol 157

4-Brom-3-methylphenol **153** (0.10 g, 0.53 mmol) wurde in Methanol (10 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Die Lösung wurde langsam mit Chloriodid (0.03 mL, 0.58 mmol) versetzt und über Nacht auf RT erwärmt. Nach 17 h wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. Natriumsulfitlösung unterbrochen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurde mit Dichlormethan versetzt und die organische Phase mit Wasser gewaschen. Trocknen über Natriumsulfat und Einengen der Lösung im Vakuum ergab das Rohprodukt als farblosen Feststoff. Mittels ^{1}H-NMR-Analyse wurde ein Produktverhältnis von 1:2 (Mono- zu Diiodiertes Produkt) ermittelt. Die säulenchromatographische Trennung mit PE/EE (v/v, 9:1) ergab das gewünschte Produkt **157** (33 mg, 0.11 mmol, 20%) als leicht gelbes Öl sowie das diiodierte Nebenprodukt **158** als gelben Feststoff (93 mg, 0.21 mmol, 40%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.76 [s, 1H, C*H*$_{arom}$], 6.89 [s, 1H, C*H*$_{arom}$], 5.22 [bs, 1H, O*H*], 2.32 [s, 3H, C*H*$_3$].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 154.1, 140.1 [C_{arom}], 139.9, 116.8 [*C*H_{arom}], 115.8, 82.1 [C_{arom}], 22.7 [*C*H_3].

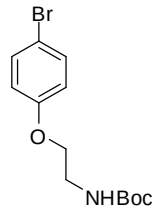


4-Brom-2,6-diiod-3-methylphenol 158

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.88 [s, 1H, C*H*$_{arom}$], 5.85 [s, 1H, O*H*], 2.65 [s, 3H, C*H*$_3$].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 153.2 [*C*OH], 141.8 [*C*CH_3], 140.8 [*C*H$_{arom}$], 114.1 [*C*Br], 90.3, 78.2 [*C*I], 29.9 [*C*H_3].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_7H_5BrI_2O$ $[M-H]^-$ = 436.7540, gef. 436.7527.



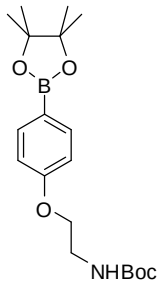
4-(2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)ethoxy)brombenzol 162

Die Synthese erfolgte nach AAV 6 aus dem Rohprodukt **161**. Das gewünschte Produkt wurde in Form eines hellgelben Öls erhalten (9.4 g, 29.8 mmol, 74% über 2 Stufen). Auf Grund ausreichender Reinheit wurde das Produkt ohne zusätzliche Reinigung weiter umgesetzt.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.27 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 9.0 Hz, 2H, C*H*$_{arom}$], 6.76 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 9.0 Hz, 2H, C*H*$_{arom}$], 5.39 [s, 1H, N*H*], 3.88 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.6 Hz, 2H, OC*H*$_2$], 3.31 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.6 Hz, 2H, C*H*$_2$N], 1.34 [s, 9H, C*H*$_3$].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 159.5 [*C*$_{arom}$O], 158.6 [N*C*OO], 113.3, 117.7 [*C*H$_{arom}$], 113.9 [*C*Br], 80.3 [*C*$(CH_3)_3$], 68.2 [O*C*H_2], 40.9 [*C*H_2N], 28.8 [C(*C*$H_3)_3$].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{13}H_{18}BrNO_3$ $[M+Na]^+$ = 338.0362, gef. 338.0366.



4-(2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)ethoxy)pinakolylphenylboronsäure 163

Es wurde Edukt **162** (3.17 g, 10.0 mmol) in abs. Toluol (50 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe einer MeMgCl-Lösung (22% in Hexan, 16.5 mL, 50.0 mmol) wurde die Lösung für 15 min gerührt. Es entstand eine dunkelbraune, klare Lösung. Dann wurde *tert*-BuLi (1.7 M in Hexan, 60 mL, 100.0 mmol) zugegeben und für weitere 5 min gerührt. Es

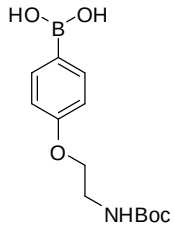
entstand eine neongelbe Lösung. Nach Zugabe von Isopropylpinakolylborat (10 mL, 50.0 mmol) wurde langsam auf RT erwärmt und anschließend 160 min bei konstanter Temperatur gerührt, wodurch eine hellgelbe Lösung entstand. Diese wurde in dest. Wasser gegeben und mit halbkonzentrierter HCl auf pH-Wert 2 bis 4 angesäuert. Die Lösung wurde fünfmal mit Ethylacetat (je 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit dest. Wasser neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingeengt. Es entstanden 3.80 g eines hellgelben Öls als Rohprodukt, welches säulenchromatographisch gereinigt wurde (Hexan/Ethylacetat, v/v 4:1). Dies lieferte das gewünschte Produkt **163** (1.31 g, 3.6 mmol, 36%) sowie die entschützte Verbindung **164** (1.12 g, 4.0 mmol, 40%) in Form farbloser Öle.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.74 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.5 Hz, 2H, CH_{arom}], 6.87 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.5 Hz, 2H, CH_{arom}], 4.99 [s, 1H, N*H*], 4.04 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.0 Hz, 2H, OCH_2], 3.53 [q, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 4.8 Hz, 2H, CH_2N], 1.44 [s, 9H, CH_3], 1.33 [s, 12H, CH_3].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 161.1 [C_{arom}O], 155.9 [NCO_2], 136.6 [CH_{arom}], 121.1 [C_{arom}B], 113.8 [CH_{arom}], 83.6 [$C(CH_3)_2$], 79.6 [$C(CH_3)_3$], 70.0 [OCH_2], 40.1 [CH_2N], 28.4 [C(CH_3)$_3$], 24.9 [C(CH_3)$_2$].

^{11}B-NMR (128 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 31.0.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{19}H_{30}BNO_5$ $[M+Na]^+$ = 386.2109, gef. 386.2101.



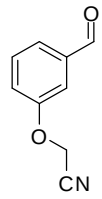
4-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethoxy)phenylboronsäure 164

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δppm) = 7.78 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.6 Hz, 2H, CH_{arom}], 6.90 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 8.6 Hz, 2H, CH_{arom}], 5.01 [s, 1H, N*H*], 4.06 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.0 Hz, 2H, OCH_2], 3.55 [q, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.0 Hz 2H, CH_2N], 1.45 [s, 9H, CH_3].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 161.1 [C_{arom}O], 155.9 [NCO_2], 135.9 [CH_{arom}], 121.1 [C_{arom}B], 113.8 [CH_{arom}], 79.6 [$C(CH_3)_3$], 70.0 [OCH_2], 40.1 [CH_2N], 28.4 [C(CH_3)$_3$].

^{11}B-NMR (128 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 48.0.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{13}H_{20}BNO_5$ $[M+Na]^+$ = 304.1327, gef. 304.1339.



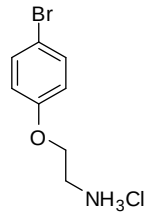
2-(3-Formylphenoxy)acetonitril 166

Die Synthese erfolgte nach AAV 4 aus 3-Hydroxybenzaldehyd **41** (7.3 g, 60.0 mmol). Das erhaltene Rohprodukt (11.1 g) konnte ohne Reinigung weiter umgesetzt werden.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 9.99 [s, 1H, C*H*O], 7.61 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.5 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.54 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 7.8 Hz, 1H, CH_{arom}], 7.47-7.46 [m, 1H, CH_{arom}], 7.29-7.26 [m, 1H, CH_{arom}], 4.85 [s, 2H, CH_2].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 191.3 [*C*HO], 157.0 [C_{arom}O], 138.0 [C_{arom}], 130.7, 125.6, 121.9 [*C*H$_{arom}$], 114.6 [*C*N], 113.2 [*C*H$_{arom}$], 53.5 [*C*H$_2$].

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_9H_7NO_2$ $[M+H]^+$ = 162.0550, gef. 162.0558.



4-(2-Aminoethoxy)brombenzol Hydrochlorid 161

Synthese nach AAV 5 (Edukt: **160**, 16.9 g, 79.7 mmol). Das erhaltene Rohprodukt wurde in Form eines hellbraunen Feststoffes erhalten (20.1 g) und konnte ohne Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt werden.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.41 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 9.0 Hz, 2H, CH_{arom}], 6.86 [d, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 9.1 Hz, 2H, CH_{arom}], 4.17 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.0 Hz, 2H, OCH_2], 3.33 [t, $^{3}J(^{1}H,^{1}H)$ = 5.0 Hz, 2H, CH_2N].

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 156.8 [C_{arom}O], 132.4, 116.5 [*C*H$_{arom}$], 113.3, [C_{arom}Br], 64.1 [O*C*H$_2$], 38.9 [*C*H$_2$N].

8.9 Durchführung des ARS-Assay

Reaktionslösungen wurden unter Verwendung destillierter Lösungsmittel in 1 ml Eppendorffgefäßen aus Polyethylen. hergestellt. Der pH-Wert PBS-gepufferter Lösungen (pH = 7.2 – 7.4) wurde mit Hilfe eines pH-Meters überprüft und nötigenfalls korrigiert. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung und 24 h nach Herstellung der Lösung durchgeführt um eine vollständige Einstellung des Gleichgewichts zu gewährleisten.

8.9.1 Erstes Gleichgewicht

Für das erste Bindungsgleichgewicht wurden ARS, die jeweilige Boronsäure und der Phosphatpuffer aus Natriumdihydrogenphosphat und Di-Kaliumhydrogenphosphat so angesetzt, dass die Endkonzentration an ARS $1 \cdot 10^{-4}$ M und die des Phosphatpuffers 0.1 M betrug. Die Verdünnungsreihen bestanden aus zehn verschiedenen Konzentrationen an Boronsäure (0.2 bis 200 Äquivalente bezogen auf ARS). Als Anregungswellenlänge wurden für alle Experimente λ = 468 nm festgelegt.

8.9.1.1 Küvettengerät

Folgende Emissionswellenlängen wurden gemessen: PBA λ = 592 nm, FPBA λ = 585 nm, MPBA λ = 591 nm. Die Fluoreszenzspektren wurden im Bereich von 500 nm bis 650 nm aufgenommen. Die Lösungen wurden vor Messbeginn für 24 h bei 4 °C gelagert.

8.9.1.2 HPLC

Bei den wasserunlöslichen Rezeptoren wurde destilliertes Methanol als Lösungsmittel eingesetzt. Von jeder Zusammensetzung wurden 500 µl Lösung hergestellt. Die gewählte Emissionswellenlänge betrug in allen Fällen λ = 592 nm. Die Lösungen wurden vor Messbeginn für 24 h bei Messtemperatur (ca. 27 °C) gelagert.

8.9.2 ARS-Assay: Zweites Gleichgewicht

Zu den Lösungen mit $9 \cdot 10^{-6}$ M ARS, $2 \cdot 10^{-3}$ M Rezeptor und einem 0.1 M Phosphatpuffer wurden innerhalb von acht bis zehn Messpunkten 10 – 10.000 Äquivalente an Zucker titriert (bezogen auf ARS).

8.9.2.1 Küvettengerät

Die Lösungen wurden vor Messbeginn für 24 h bei 4 °C gelagert.

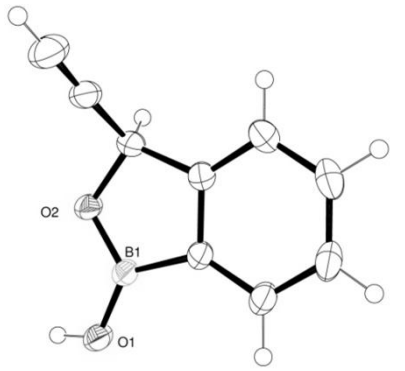
8.9.2.2 HPLC

Je nach vorhandener Substanzmenge wurden von jeder Zusammensetzung zwischen 100 und 500 µL Lösung hergestellt. Die Lösungen wurden vor Messbeginn für 24 h bei Messtemperatur (ca. 27 °C) gelagert.

9 Anhang

9.1 Röntgenkristallstrukturdaten

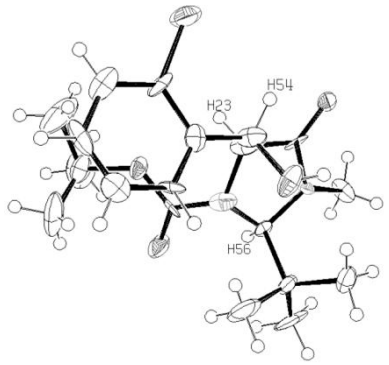
9.1.1 Verbindung 129



Summenformel	$C_9H_7BO_2$
Molekulargewicht	157.96 g/mol
Messtemperatur	193(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	Triklin
Raumgruppe	P-1
Zellparameter	a = 6.1190(12) Å, α = 110.54(3)°
	b = 7.1280(14) Å, β = 93.64(3)°
	c = 9.884(2) Å, γ = 96.00(3)°
Volumen	399.14(14) $Å^3$
Z	2
Dichte	1.314 Mg/m^3
Absorptionskoeffizient	0.090 mm^{-1}
F(000)	164
Kristallgröße	0.44 x 0.24 x 0.16 mm
θ range	3.08 to 28.04°
Zahl der Reflexe, gesamt / unabhängig	3492 / 1747[R(int) = 0.0457]
Absorptionskorrektur	keine
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F^2
Goodness-of-fit on F^2	1.107
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0631, ωR2 = 0.1893
R indices (all data)	R1 = 0.0758, ωR2 = 0.1999

Atom	x	y	z	U (eq)
B(1)	6378(4)	-2046(3)	908(2)	27(1)
C(1)	6687(3)	283(3)	1630(2)	28(1)
C(2)	8349(4)	1844(3)	1755(2)	33(1)
C(3)	8026(4)	3825(3)	2491(3)	40(1)
C(4)	6073(4)	4263(3)	3110(3)	41(1)
C(5)	4402(4)	2723(3)	2998(2)	36(1)
C(6)	4735(3)	757(3)	2252(2)	29(1)
C(7)	3141(3)	-1158(3)	1957(2)	29(1)
C(8)	2519(3)	-1413(3)	3303(2)	33(1)
C(9)	2003(4)	-1556(4)	4386(3)	45(1)
O(1)	7782(2)	-3249(2)	175(2)	34(1)
O(2)	4309(2)	-2795(2)	1158(2)	30(1)

9.1.2 Verbindung 51



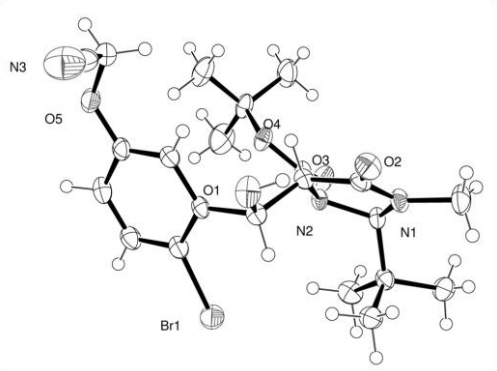
Summenformel	$C_{20}H_{29}BrN_2O_4$
Molekulargewicht	441.36 g/mol
Messtemperatur	293(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	cc (9)
Zellparameter	a = 26.994(5) Å, α = 90°
	b = 9.5963(19) Å, β = 116.80(3)°
	c = 18.199(4) Å, γ = 90°
Volumen	4208.0(14) $Å^3$
Z	8
Dichte	1.393 Mg/m^3
Absorptionskoeffizient	1.980 mm^{-1}

F(000)	1840
Kristallgröße	0.16 x 0.24 x 0.16 mm
θ range	2.51 to 28.08°
Zahl der Reflexe, gesamt / unabhängig	18963 / 9401 [R(int) = 0.0660]
Absorptionskorrektur	keine
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F^2
Goodness-of-fit on F^2	0.926
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0499, ωR2 = 0.1191
R indices (all data)	R1 = 0.0954, ωR2 = 0.1389

Atom	**x**	**y**	**z**	**U (eq)**
Br(1)	11378(1)	5613(2)	10346(1)	37(1)
Br(1A)	11370(5)	5762(18)	10242(11)	181(9)
Br(2)	1086(1)	10623(2)	702(1)	55(1)
C(1)	10661(4)	6226(12)	9556(8)	33(3)
C(2)	10441(4)	7266(11)	9820(7)	36(3)
C(3)	9895(5)	7734(14)	9259(10)	52(4)
C(4)	9610(5)	7170(12)	8518(10)	42(3)
C(5)	9845(3)	6109(12)	8282(7)	29(2)
C(6)	10392(4)	5582(12)	8805(8)	27(3)
C(7)	10647(2)	4395(10)	8526(6)	24(2)
C(8)	10568(3)	3053(10)	8871(6)	24(2)
C(9)	10871(4)	1878(11)	8694(6)	25(2)
C(10)	9947(4)	1157(10)	8073(5)	24(2)
C(11)	9523(4)	1261(13)	7120(7)	34(3)
C(12)	9824(5)	1463(13)	6588(7)	41(3)
C(13)	9194(6)	-61(16)	6877(6)	65(5)
C(14)	9100(6)	2408(19)	6992(9)	100(6)
C(15)	9700(3)	2516(11)	8984(7)	26(2)
C(16)	9635(5)	3612(13)	10156(9)	36(3)
C(17)	10015(8)	4620(20)	10798(11)	88(7)
C(18)	9059(7)	4110(20)	9660(12)	70(4)
C(19)	9635(6)	2264(15)	10571(9)	52(4)
C(20)	10672(5)	-503(13)	8112(10)	56(4)
C(21)	1799(5)	11228(12)	1448(8)	33(3)
C(22)	2057(5)	12336(13)	1238(9)	51(3)
C(23)	2554(5)	12792(12)	1744(8)	42(3)
C(24)	2838(4)	12130(14)	2517(9)	39(3)
C(25)	2575(5)	11060(13)	2742(8)	38(3)
C(26)	2080(5)	10597(12)	2226(8)	26(2)

C(27)	1834(4)	9420(11)	2479(6)	32(2)
C(28)	1901(4)	7954(9)	2141(5)	20(2)
C(29)	1598(4)	6808(10)	2357(7)	26(2)
C(30)	2549(3)	6222(10)	2996(6)	28(2)
C(31)	2941(4)	6331(11)	3925(7)	28(2)
C(32)	3270(5)	4947(12)	4173(8)	50(3)
C(33)	3340(4)	7556(10)	4101(7)	34(2)
C(34)	2656(5)	6561(15)	4455(8)	55(4)
C(35)	2774(4)	7489(10)	2053(6)	28(2)
C(36)	2795(6)	8578(14)	879(9)	37(3)
C(37)	2807(8)	7219(18)	458(10)	67(5)
C(38)	3363(8)	9250(20)	1343(13)	84(6)
C(39)	2418(10)	9620(20)	274(12)	96(8)
C(40)	1790(3)	4481(11)	2917(7)	31(3)
N(1)	1959(3)	5871(9)	2777(6)	27(2)
N(2)	2446(3)	7495(9)	2474(6)	25(2)
N(3)	10500(4)	843(10)	8254(5)	29(2)
N(4)	9986(3)	2433(9)	8540(5)	19(2)
O(1)	11370(3)	1815(8)	8921(4)	27(2)
O(2)	10406(2)	4381(7)	7694(4)	33(2)
O(3)	2051(3)	9397(8)	3360(3)	42(2)
O(4)	1096(3)	6834(9)	2141(6)	38(2)
O(5)	3183(3)	6815(10)	2241(6)	37(2)
O(6)	2554(3)	8399(9)	1427(5)	26(2)
O(7)	9294(4)	1787(12)	8817(7)	51(3)
O(8)	9916(3)	3401(9)	9610(6)	33(2)

9.1.3 Verbindung 57



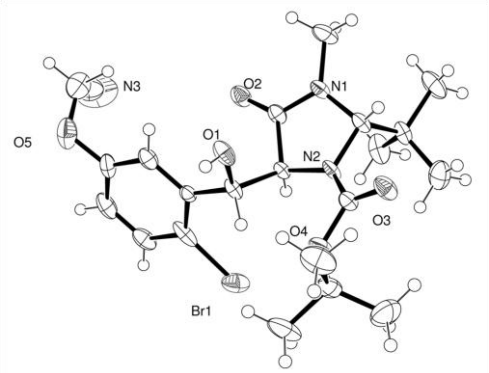
Summenformel	$C_{22}H_{30}BrN_3O_5$
Molekulargewicht	496.40 g/mol
Messtemperatur	193(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å

Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	P2(1)/c
Zellparameter	a = 14.067(3) Å, α = 90°
	b = 9.0656(18) Å, β = 93.51(3)°
	c = 18.269(4) Å, γ = 90°
Volumen	2325.3(8) $Å^3$
Z	4
Dichte	1.418 Mg/m^3
Absorptionskoeffizient	1.805 mm^{-1}
F(000)	1032
Kristallgröße	0.80 x 0.48 x 0.40 mm
θ range	2.51 to 27.01°
Zahl der Reflexe, gesamt / unabhängig	18587 / 4788 [R(int) = 0.0647]
Absorptionskorrektur	keine
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F^2
Goodness-of-fit on F^2	1.079
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0555, ωR2 = 0.1588
R indices (all data)	R1 = 0.0670, ωR2 = 0.1689

Atom	**x**	**y**	**z**	**U (eq)**
Br(1)	4616(1)	6916(1)	3922(1)	43(1)
C(1)	3739(2)	6004(3)	3233(2)	27(1)
C(2)	4118(2)	5146(4)	2692(2)	32(1)
C(3)	3527(3)	4381(4)	2202(2)	33(1)
C(4)	2543(2)	4482(3)	2251(2)	26(1)
C(5)	2167(2)	5324(3)	2790(2)	24(1)
C(6)	2759(2)	6128(3)	3288(2)	23(1)
C(7)	2293(2)	7046(3)	3858(2)	23(1)
C(8)	1867(2)	8504(3)	3523(2)	21(1)
C(9)	1334(2)	9337(4)	4094(2)	24(1)
C(10)	2517(2)	10971(3)	3748(2)	24(1)
C(11)	3423(2)	11317(3)	4244(2)	26(1)
C(12)	3534(3)	10274(4)	4898(2)	32(1)
C(13)	3367(3)	12916(4)	4524(3)	41(1)
C(14)	4296(3)	11209(4)	3787(2)	35(1)
C(15)	2690(2)	9826(3)	2564(2)	25(1)
C(16)	2341(3)	8790(3)	1344(2)	29(1)
C(17)	1816(4)	7391(4)	1102(2)	45(1)

C(18)	3353(4)	8768(7)	1113(3)	56(1)
C(19)	1790(4)	10128(4)	1060(3)	48(1)
C(20)	1200(3)	11817(5)	4579(3)	41(1)
C(21)	1013(3)	3718(4)	1751(2)	35(1)
C(22)	694(3)	2665(5)	2299(3)	40(1)
N(1)	1673(2)	10695(3)	4156(2)	27(1)
N(2)	2561(2)	9605(3)	3302(2)	21(1)
N(3)	428(3)	1824(5)	2702(3)	62(1)
O(1)	1538(2)	6189(3)	4118(2)	34(1)
O(2)	673(2)	8802(3)	4421(2)	34(1)
O(3)	3081(2)	10909(3)	2340(2)	37(1)
O(4)	2336(2)	8714(2)	2154(1)	27(1)
O(5)	2011(2)	3728(3)	1716(2)	33(1)

9.1.4 Verbindung 58



Summenformel	$C_{25}H_{38}BrN_3O_6$
Molekulargewicht	556.49 g/mol
Messtemperatur	193(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	triklin
Raumgruppe	P-1
Zellparameter	a = 11.326 (2) Å, α = 85.81(3)°
	b = 11.419 (2) Å, β = 80.44(3)°
	c = 11.424 (2) Å, γ = 75.46(3)°
Volumen	1409.6(5) $Å^3$
Z	2
Dichte	1.311 Mg/m^3
Absorptionskoeffizient	1.499 mm^{-1}
F(000)	584

Kristallgröße	0.56 x 0.44 x 0.36 mm
θ range	2.63 to 28.12°
Zahl der Reflexe, gesamt / unabhängig	12660 / 6238 [R(int) = 0.0524]
Absorptionskorrektur	keine
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F^2
Goodness-of-fit on F^2	1.056
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0628, ωR2 = 0.1729
R indices (all data)	R1 = 0.0844, ωR2 = 0.1868

Atom	**x**	**y**	**z**	**U (Eq)**
Br(1)	1441(1)	4429(1)	4195(1)	46(1)
C(1)	2519(4)	3571(3)	2926(4)	38(1)
C(2)	2634(4)	2322(3)	2914(4)	36(1)
C(3)	3382(4)	1666(3)	2001(4)	39(1)
C(4)	4019(3)	2243(3)	1097(4)	31(1)
C(5)	3914(3)	3482(3)	1098(4)	28(1)
C(6)	3156(3)	4161(3)	2012(3)	21(1)
C(7)	2966(3)	5533(3)	1978(3)	24(1)
C(8)	3639(3)	5941(3)	2877(3)	20(1)
C(9)	5035(3)	5627(3)	2464(3)	23(1)
C(10)	4525(3)	7627(3)	3075(3)	25(1)
C(11)	4667(3)	7842(3)	4368(4)	30(1)
C(12)	4799(5)	6676(4)	5126(4)	45(1)
C(13)	5812(5)	8333(5)	4348(5)	50(1)
C(14)	3544(5)	8773(4)	4925(5)	47(1)
C(15)	2363(3)	8140(3)	2836(3)	24(1)
C(16)	186(3)	8487(3)	2652(4)	34(1)
C(17)	-608(4)	7587(4)	2720(6)	53(1)
C(18)	367(4)	9034(5)	1403(5)	52(1)
C(19)	-325(4)	9410(5)	3582(6)	58(1)
C(20)	6709(3)	6664(4)	2048(4)	39(1)
C(21)	6010(4)	1414(4)	79(4)	45(1)
C(22)	6500(4)	639(5)	1048(5)	51(1)
C(23)	8784(7)	3145(10)	2790(7)	109(3)
C(24)	8985(6)	3288(12)	1541(7)	135(5)
C(25)	10133(7)	3248(12)	880(9)	129(4)
N(1)	5445(3)	6622(3)	2514(3)	27(1)
N(2)	3386(3)	7255(2)	3017(3)	24(1)
N(3)	6880(5)	33(6)	1799(6)	95(2)
O(1)	3369(3)	6009(2)	857(2)	31(1)
O(2)	5651(2)	4638(2)	2137(3)	33(1)

O(3)	2382(2)	9187(2)	2644(3)	34(1)
O(4)	1368(2)	7693(2)	2927(3)	30(1)
O(5)	4724(3)	1559(3)	162(3)	48(1)
O(6)	7994(3)	3734(5)	953(4)	68(1)

9.2 Bindungskonstanten

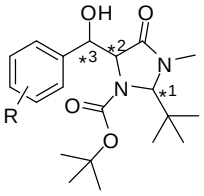
9.2.1 Küvettengerät

	K_a [M^{-1}] MPBA	**K_a [M^{-1}] PBA**	**K_a [M^{-1}] FPBA**
ARS	3400 ± 200	2850 ± 140	17700 ± 800
Catechol	1690 ± 150	1700 ± 130	17100 ± 1100
Fructose	200 ± 20	385 ± 20	4200 ± 350
R- Mandelsäure	200 ± 20	90 ± 20	620 ± 100
Ribose	65 ± 15	74 ± 3	760 ± 70
Galactose	20 ± 5	32 ± 1	300 ± 20
Glucose	< 1	16 ± 14	90 ± 15

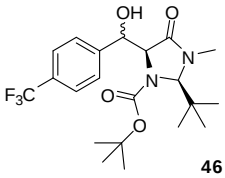
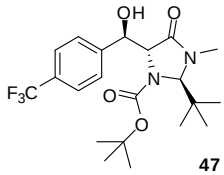
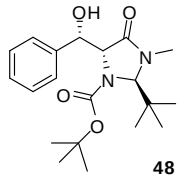
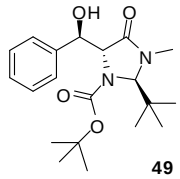
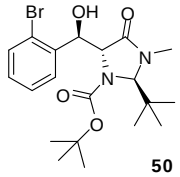
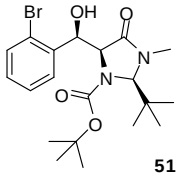
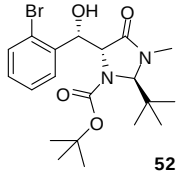
9.2.2 HPLC

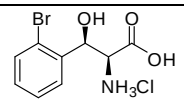
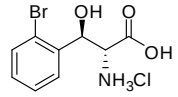
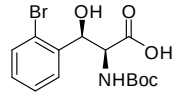
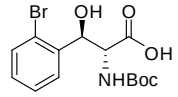
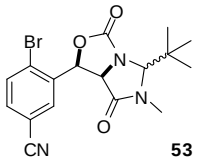
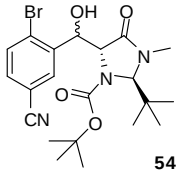
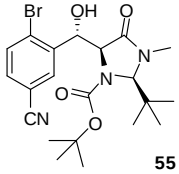
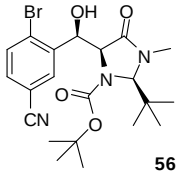
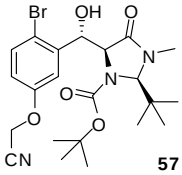
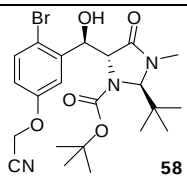
	K_a [M^{-1}] in PBS			**K_a [M^{-1}] in MeOH**		
	PBA	**141**	**PBA**	**M-Box-rig**	**T-Box-flex**	**T-Br-rig**
ARS	349 ± 9	603 ± 25	2472 ±100	813 ± 30	874 ± 50	0
Fructose	55 ± 11	100 ± 22	0	0	0	0
Galactose	15 ± 10	0	-	-	-	-
Glucose	0	0	-	-	-	-
Lactose	0	0	-	-	-	-
Maltose	0	0	-	-	-	-
Mannose	0	7 ± 5	-	-	-	-
Melezitose	0	0	-	-	-	-
Melibiose	0	35 ± 2	-	-	-	-
Raffinose	0	0	-	-	0	-
Ribose	32 ± 10	51 ± 5	-	0	-	-
Saccharose	0	56 ± 19	-	-	-	-

9.3 Ausbeuten und ^{1}H-NMR-Daten der Aldole 46-58



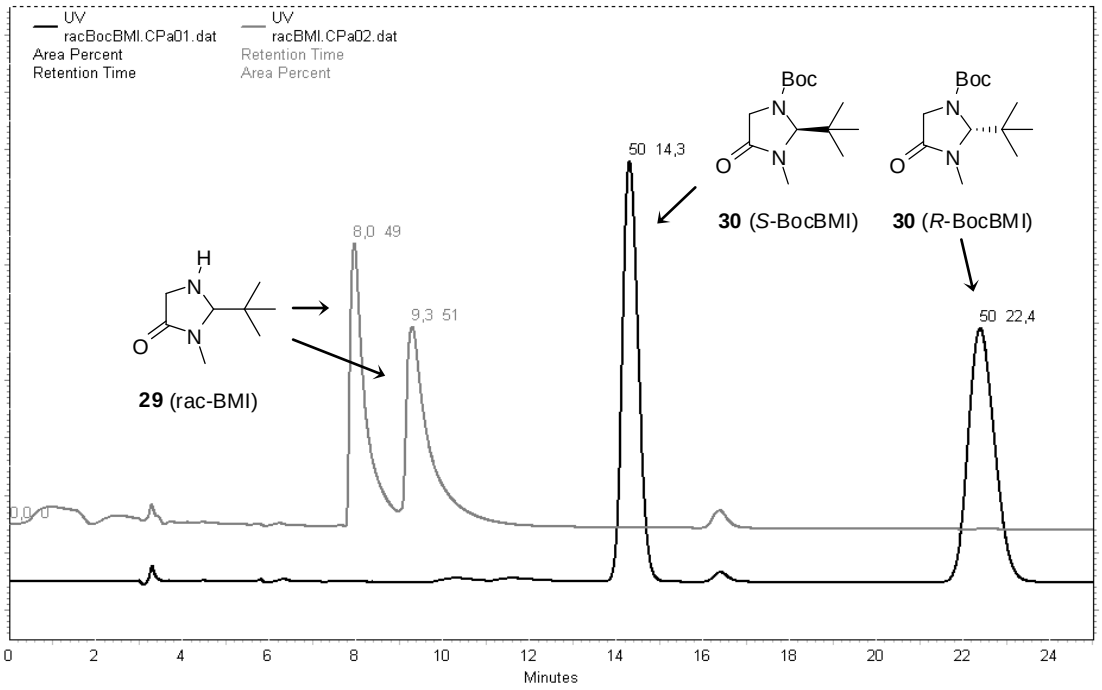
n.b.	Konfiguration nicht bestimmbar
d.r.	Diastereomerenverhältnis, bezogen auf erhaltene Ausbeute
kin/TD	kinetische/thermodynamische Reaktionsführung
[a]	Konfiguration vermutet

Aldol	d.r.	Ausbeute	Lm.	H3-H2	H2-H1	δ H3 [^{3}J]	δ H2 [^{3}J]	δ H1
 **46**	74%	46% (kin)	DMSO-d_6	n.b.	*cis*	5.59 [bs]	4.37 [bs]	4.87
 **47**	26%			(*anti*)[a]	*trans*	5.05 [3.3]	4.18 [3.3]	4.88
 **48**	65%	59% (TD)	DMSO-d_6	(*syn*) [a]	*trans*	5.17 [5.7]	4.49 [5.7]	4.56
 **49**	35%			(*anti*) [a]	*trans*	4.93 [3.4]	4.14 [3.4]	4.86
 **50**	16-17%	87% (kin)	DMSO-d_6	*anti*	*trans*	5.46 [2.6]	4.55 [bs]	5.00
 **51**	38-49%			*syn*	*cis*	5.26 [3.9]	4.32 [3.3]	4.89
 **52**	34-45%			*syn*	*trans*	5.93 [bs]	4.21 [bs]	5.09

 **61**	-	-	D_2O	*syn*	-	5.49 [3.1]	4.46 [3.2]	-
 **62**	-	-	D_2O	*anti*	-	5.71 [3.4]	4.42 [3.4]	-
 **63**	-	-	D_2O	*syn*	-	5.01 [5.2]	4.33 [5.3]	-
 **64**	-	-	D_2O	*anti*	-	5.40 [2.0]	4.41 [2.2]	-
 **53**	-	- (TD)	$CDCl_3$	*anti*	n.b.	6.13 [9.4]	4.78 [9.3]	4.78
 **54**	-	18% (TD)	$CDCl_3$	n.b.	*trans*	4.75 [4.7]	4.51 [4.8]	4.92
 **55**	67%	30% (kin)	$CDCl_3$	(anti)[a]	*cis*	6.34 [bs]	4.48 [bs]	5.06
 **56**	33%			(syn)[a]	*cis*	5.40 [8.7]	4.30 [8.8]	4.90
 **57**	-	3% (kin)	$CDCl_3$	*anti*	*cis*	5.31 [6.8]	4.38 [6.8]	4.98
 **58**	-			*anti*	*trans*	6.24 [bs]	4.46 [s]	5.06

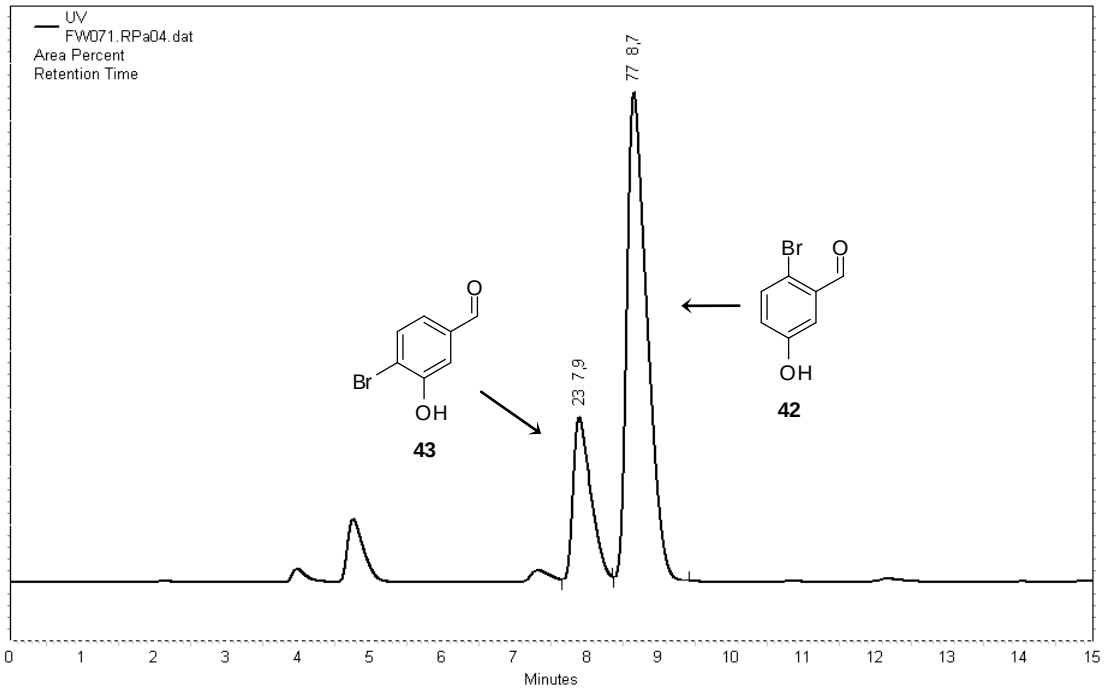
9.4 Chromatogramme

9.4.1 Racematspaltung der Verbindungen 29 und 30



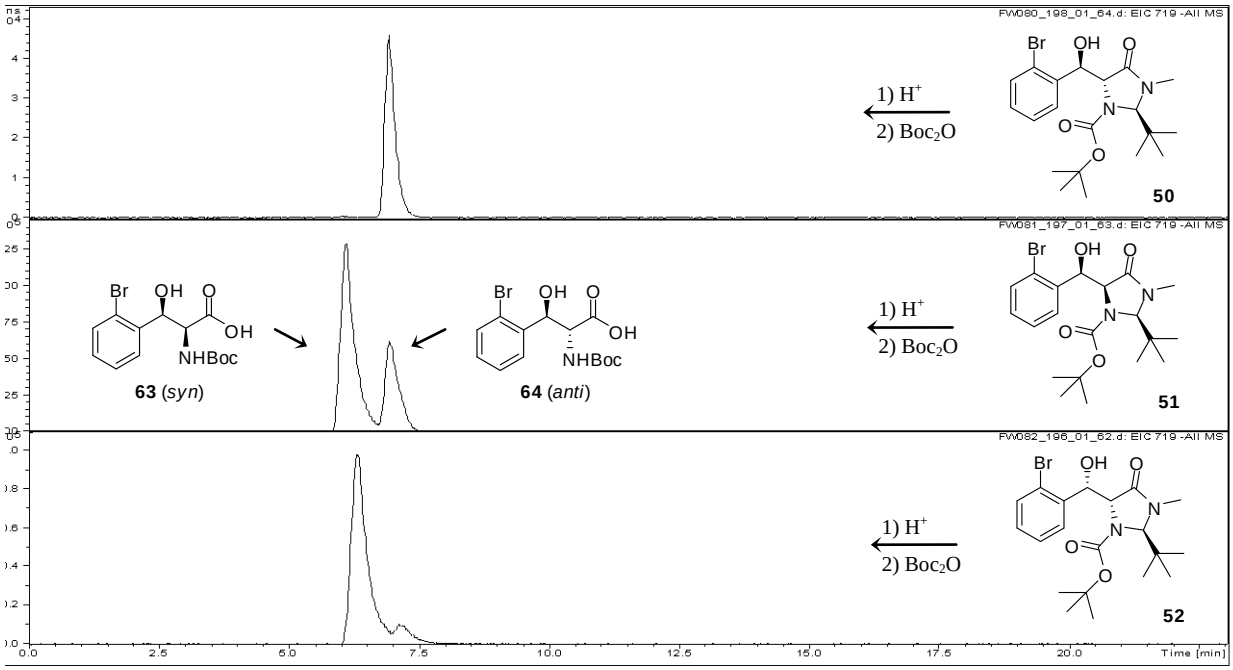
Chromatogramm 1: Trennung der Stereoisomere von Verbindung 29 und 30 durch chirale HPLC (Daicel Chiralpak IC, 30% ^{i}PrOH in Hexan, 1 mL/min, 210 nm).

9.4.2 Regioisomerenverhältnis der Verbindungen 42 und 43



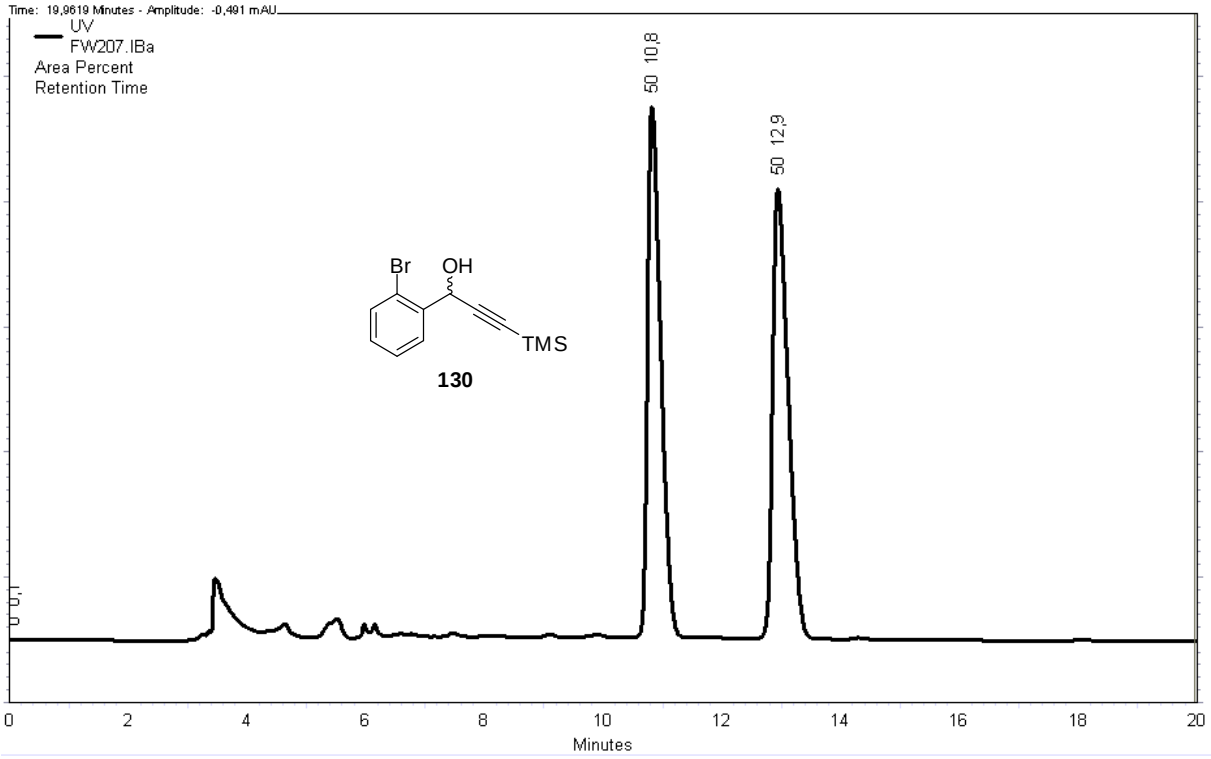
Chromatogramm 2: Trennung der Regioisomere 42 und 43 durch analytische HPLC (Standard RP18 gel, 20 zu 60% CH_3CN in 15 min, 1 mL/min, 254 nm).

9.4.3 Epimerisierungsgrad der Aldole 50-52



Chromatogramm 3: Trennung der Diastereomere 63 und 64 nach Hydrolyse und Schützung der Aldole 50-52 (Chromolith RP18e, 40 zu 60% CH_3CN in 20 min, Massenspur m/z = 719).

9.4.4 Racematspaltung der Verbindung 130



Chromatogramm 4: Trennung der Stereoisomere von Verbindung 130 durch chirale HPLC (Daicel Chiralpak IB, 1% ^{i}PrOH in Hexan, 1 mL/min, 254 nm).

9.5 Gefahrstoffe

Verbindung	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26
Acetonitril (MeCN)	F, Xn	11-20/21/22-36	16-36/37
Azobis(isobutyronitril) (AIBN)	E, Xn	2-11-20/22-52/53	39-41-47-61
Aluminiumchlorid	C	34	28-45-7/8
Benzylbromid	Xi	36/37/38	2-39
Boran	F, Xi	11-14/15-19-36/37/38	7/8-16-29-33
Bortrifluorid-Etherat	T+, C	14-26-35	(1/2-)9-26-28-36/37/39-45
Brom	T+, N, C	26-35-50	7/9-26-45-61
Bromacetonitril	T	23/24/25-36/37/38	45-24/25
N-Bromsuccinimid (NBS)	Xn	22-36/37/38	26-36/37/39
Bromwasserstoff	C	34-37	7/9-23-26-36/37/39-45
tert-Butanol	F, Xn	11-20	9-16
tert-Butylbromid	F	11	16-33
n-Butyllithium (2.5 M in Hexan)	F, C, N	14/15-17-34-48/20-51/53-62	6-16-26-36/37/39-45-61-62
tert-Butyllithium (1.7 M in Hexan)	C, Xn, N	12-14/15-17-34-51/53-65-66-67	7/8-9-16-26-29-33-36/37/39-45-61-62
Carbobenzoxylchlorid (Cbz-Cl)	T, C, N	45-20-34-48/22-50/53	53-26-36/37/39-45-60-61
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Celite	Xn	68/20	22
Dibenzoylperoxid (DBP)	E, Xi	3-7-36-43	2-3/7-14-36/37/39
Dibromethan	T, N	45-23/24/25-36/37/38-51/53	53-45-61
Diisobutylaluminium-hydrid (DIBAL)	F, C	14/15-17-35	16-26-36/37/39-43-45
Dichlormethan (DCM)	Xn	40	23-24/25-36/37
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Dimethoxypropan (DMP)	F, Xi	36/37/38	16-26-37/39
Dimethylformamid (DMF)	T	61-E20/21-36	53-45
Dimethylsulfid	F, Xn	11-22-36/38	16-26-37/39
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Xi	36/38	26
1,4-Dioxan	F, Xn	11-19-36/37-40-66	9-16-36/37-46

Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)	T	22-24-41-43	24-26-37/39-45
Diisopropylamin	F, C	11-20/22-34	(1/2-)16-26-36/37/39-45
Diisopropylethylamin (Dipea)	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45-61
4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP)	T+	25-27-36/37/38	26-28-36/37/39-45
Diphenylphosphorylazid (DPPA)	T	23/24/25-36/37/38	26-36/37/39-45
Di-*tert*-Butyldicarbonat (Boc_2O)	T+	10-26-36/38-43	28.1-36/37-45
Ethylacetat (EE)	F, Xi	11-36-66-67	16-26-33
N-Ethyl-*N'*-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid (EDC)	Xi	37/38-41	26-36/37/39
Chlorameisensäure-(9-fluorenylmethyl)-ester (Fmoc-Cl)	C	34	26-27-36/37/39-45
2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluoro-phosphat (HBTU)	Xi	36/37/38	26
Hexan	F, Xn, N	11-38-48/20-51/53-62-65-67	9-16-29-33-36/37-61-62
Hydroxybenzotriazol (HOBt)	F	5-11-44	7/9-16-33
Iod	Xn, N	20/21-50	(2-)23-25-61
Iodmonochlorid	C, Xi	34-37	26-36/37/39-45
Isopropanol	F, Xi	11-36-67	(2-)7-16-24/25-26
Isopropylmagnesiumchlorid (Lithiumchloridkomplex, 14% in THF)	C, F	11-14/15-19-34	7/8-16-33-36/37/39-43B-45
Isopropanol	F, Xi	11-36-67	7-16-24/25-26
Kaliumcarbonat	Xi	36/37/38	36
Kaliumhydrogensulfat	C	34-37	26-36/37/39-45
Kaliumhydroxid	C	22-35	26-36/37/39-45
Kalium-*tert*-butanolat	F, C	11-14-22-35	8-16-26-36/37-39-43.3-45
Kupferbromid	Xi	36/37/38	24/25
Kupfersulfat	Xn, N	22-36/38-50/53	(2-)22-60-61
Lithiumaluminiumhydrid (LAH)	F	15	24/25-43-7/8
Lithiumhydroxid	C	22-35	26-36/37/39-45
Mesylchlorid (MsCl)	T+, C, N	21/22-26-34-37-52/53	26-28A-36/37/39-45
Methanol	F, T	11-23/24/25-39	7-16-36/37-45
Methylamin	F+, Xn	12-20-37/38-41	(2-)16-26-39
Methyllithium	C, Xn	12-14/15-17-19-22-34-66-67	7/8-9-16-26-29-33-36/37/39-45

Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28-45-60-61
Natriumhydrogensulfit	Xn	22-31	25-46
Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
Natriumnitrit	O, T, N	8-25-50	(1/2-)45-61
Ozon	T+, C, O	8-26-34-40	17-26-38-50
Petrolether 50-70 (PE)	F, Xn	11-52/53-65	9-16-23.2-24-33-62
Konz. Salzsäure	C	34-37	26-36/37/39-45
Konz. Schwefelsäure	C	35	26-30-45
Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF)	T	25-32	26-37/39
Tetrachlorkohlenstoff	T, N	23/24/25-40-48/23-52/53-59	23.2-36/37-45-59-61
Tetrahydrofuran (THF)	F, Xi	11-19-36/37	16-29-33
2,2,2-Trichloracetimidsäure-*tert*-Butylester (TAB)	Xi	10-36/37/38	16-26-37/39
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	(1/2-)3-16-26-29-36/37/39-45
Trifluoressigsäure (TFA)	C	20-35-52/53	(1/2-)9-26-27-28-45-61
Trimethylsilyl-Diazomethan	F+, Xn	12-19-22-66-67	9-16-29-33
Toluol	F, Xn	11-20	16-25-29-33
para-Toluolsulfonsäure (*p*TsOH)	Xi	36/37/38	(2-)26-37
Tosylchlorid (TsCl)	C	34	26-36/37/39-45
Trimethylsilylacetylen	F	11	16
Triisopropylborat	-	10	9-16-33
Wasserstoffperoxid	C	22-37/38-41	3-28-36/39-45
Zink	F, N	15-17-50/53	43-46-60-61

10 Literaturverzeichnis

(1) Schrader, T.; Hamilton, A. D. *Functional synthetic receptors*; Wiley-VCH: Weinheim, 2005.
(2) James, T. D.; Phillips, M. D.; Shinkai, S. *Boronic acids in saccharide recognition*; RSC Publishing: Cambridge, 2006.
(3) Ernst, B.; Magnani, J. L. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, *8*, 661.
(4) Li, H. J.; d'Anjou, M. *Curr Opin Biotech* **2009**, *20*, 678.
(5) Oppenheimer, S. B.; Alvarez, M.; Nnoli, J. *Acta Histochem* **2008**, *110*, 6.
(6) Gabius, H. J.; Siebert, H. C.; Andre, S.; Jimenez-Barbero, J.; Rudiger, H. *Chembiochem* **2004**, *5*, 741.
(7) Suzuki, H.; Katori, Y.; Takasaka, T. *Acta Oto-Laryngol* **1996**, *116*, 12.
(8) Lindhorst, T. K. *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*; 2nd, rev. and updated ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2003.
(9) Alberts, B. *Molecular biology of the cell*; 4th ed.; Garland Science: New York, 2002.
(10) Sato, Y.; Endo, T. *Geriatr Gerontol Int* **2010**, *10*, S32.
(11) Weinbaum, S.; Tarbell, J. M.; Damiano, E. R. *Annu Rev Biomed Eng* **2007**, *9*, 121.
(12) Hollingsworth, M. A.; Swanson, B. J. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 45.
(13) Sears, P.; Wong, C. H. *Cell Mol Life Sci* **1998**, *54*, 223.
(14) Pries, A. R.; Secomb, T. W.; Gaehtgens, P. *Pflug Arch Eur J Phy* **2000**, *440*, 653.
(15) Linden, S. K.; Sutton, P.; Karlsson, N. G.; Korolik, V.; McGuckin, M. A. *Mucosal Immunol* **2008**, *1*, 183.
(16) Bratosin, D.; Mazurier, J.; Tissier, J. P.; Estaquier, J.; Huart, J. J.; Ameisen, J. C.; Aminoff, D.; Montreuil, J. *Biochimie* **1998**, *80*, 173.
(17) Varki, A. *Nature* **2007**, *446*, 1023.
(18) Stockert, R. J.; Morell, A. G.; Scheinbe.Ih *Science* **1974**, *186*, 365.
(19) Bratosin, D.; Mazurier, J.; Debray, H.; Lecocq, M.; Boilly, B.; Alonso, C.; Moisei, M.; Motas, C.; Montreuil, J. *Glycoconjugate J* **1995**, *12*, 258.
(20) Turrini, F.; Arese, P.; Jie, Y.; Low, P. S. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 23611.
(21) Barre, A.; Bourne, Y.; Van Damme, E. J. M.; Peumans, W. J.; Rouge, P. *Biochimie* **2001**, *83*, 645.
(22) Ono, M.; Hakomori, S. *Glycoconjugate J* **2003**, *20*, 71.
(23) Malashkevich, V. N.; Singh, M.; Kim, P. S. *P Natl Acad Sci USA* **2001**, *98*, 8502.
(24) Scanlan, C. N.; Offer, J.; Zitzmann, N.; Dwek, R. A. *Nature* **2007**, *446*, 1038.
(25) Singh, R.; Barden, A.; Mori, T.; Beilin, L. *Diabetologia* **2001**, *44*, 129.
(26) Huflejt, M.; Bovin, N. V. *Glycobiology* **2009**, *19*, 1292.
(27) Cartron, J. P.; Colin, Y. *Transfus Clin Biol* **2001**, *8*, 163.
(28) Holst, O. *Fems Microbiol Lett* **2007**, *271*, 3.
(29) van de Veerdonk, F. L.; Kullberg, B. J.; van der Meer, J. W. M.; Gow, N. A. R.; Netea, M. G. *Curr Opin Microbiol* **2008**, *11*, 305.
(30) Cummings, R. D.; Nyame, A. K. *Bba-Mol Basis Dis* **1999**, *1455*, 363.
(31) Aarnoudse, C. A.; Vallejo, J. J. G.; Saeland, E.; van Kooyk, Y. *Curr Opin Immunol* **2006**, *18*, 105.
(32) Singhal, A.; Hakomori, S. *Bioessays* **1990**, *12*, 223.
(33) Zhang, S. L.; Zhang, H. S.; CordonCardo, C.; Reuter, V. E.; Singhal, A. K.; Lloyd, K. O.; Livingston, P. O. *Int J Cancer* **1997**, *73*, 50.
(34) Zhang, S. L.; CordonCardo, C.; Zhang, H. S.; Reuter, V. E.; Adluri, S.; Hamilton, W. B.; Lloyd, K. O.; Livingston, P. O. *Int J Cancer* **1997**, *73*, 42.
(35) Kannagi, R.; Izawa, M.; Koike, T.; Miyazaki, K.; Kimura, N. *Cancer Sci* **2004**, *95*, 377.
(36) Dube, D. H.; Bertozzi, C. R. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, *4*, 477.
(37) Pudelko, M.; Bull, J.; Kunz, H. *Chembiochem* **2010**.

(38) Brocke, C.; Kunz, H. *Bioorgan Med Chem* **2002**, *10*, 3085.
(39) Chavakis, E.; Choi, E. Y.; Chavakis, T. *Thromb Haemostasis* **2009**, *102*, 191.
(40) Vonandrian, U. H.; Chambers, J. D.; Mcevoy, L. M.; Bargatze, R. F.; Arfors, K. E.; Butcher, E. C. *P Natl Acad Sci USA* **1991**, *88*, 7538.
(41) Lindhorst, T. K. *Chemie in unserer Zeit* **2000**, *34*, 38.
(42) Boyd, W. C.; Shapleigh, E. *Science* **1954**, *119*, 419.
(43) Barkaigolan, R.; Mirelman, D.; Sharon, N. *Arch Microbiol* **1978**, *116*, 119.
(44) Ashwell, G.; Morell, A. G. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **1974**, *41*, 99.
(45) Nowell, P. C. *Cancer Res* **1960**, *20*, 462.
(46) Sharon, N.; Lis, H. *Science* **1989**, *246*, 227.
(47) Boraston, A. B.; Bolam, D. N.; Gilbert, H. J.; Davies, G. J. *Biochem J* **2004**, *382*, 769.
(48) Hashimoto, H. *Cell Mol Life Sci* **2006**, *63*, 2954.
(49) Guillen, D.; Sanchez, S.; Rodriguez-Sanoja, R. *Appl Microbiol Biot* **2010**, *85*, 1241.
(50) Palaniyar, N. *Innate Immun* **2010**, *16*, 131.
(51) Han, B. W.; Herrin, B. R.; Cooper, M. D.; Wilson, I. A. *Science* **2008**, *321*, 1834.
(52) Erbacher, A.; Gieseke, F.; Handgretinger, R.; Muller, I. *Hum Immunol* **2009**, *70*, 308.
(53) Wallis, R. *Immunobiology* **2002**, *205*, 433.
(54) Guce, A. I.; Clark, N. E.; Salgado, E. N.; Ivanen, D. R.; Kulminskaya, A. A.; Brumer, H.; Garman, S. C. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 3625.
(55) Drickamer, K. *J Biol Chem* **1988**, *263*, 9557.
(56) Lee, R. T.; Ichikawa, Y.; Fay, M.; Drickamer, K.; Shao, M. C.; Lee, Y. C. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 4810.
(57) Weis, W. I.; Taylor, M. E.; Drickamer, K. *Immunol Rev* **1998**, *163*, 19.
(58) Villeneuve, S.; Souchon, H.; Riottot, M. M.; Mazie, J. C.; Lei, P.; Glaudemans, C. P. J.; Kovac, P.; Fournier, J. M.; Alzari, P. M. *P Natl Acad Sci USA* **2000**, *97*, 8433.
(59) Burmeister, W. P.; Ruigrok, R. W. H.; Cusack, S. *Embo J* **1992**, *11*, 49.
(60) Wilson, I. A.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Nature* **1981**, *289*, 366.
(61) Ambrosi, M.; Cameron, N. R.; Davis, B. G. *Org Biomol Chem* **2005**, *3*, 1593.
(62) Weis, W. I.; Drickamer, K. *Structure* **1994**, *2*, 1227.
(63) Yaoi, K.; Kondo, H.; Hiyoshi, A.; Noro, N.; Sugimoto, H.; Tsuda, S.; Mitsuishi, Y.; Miyazaki, K. *J Mol Biol* **2007**, *370*, 53.
(64) Branderhorst, H. M.; Ruijtenbeek, R.; Liskamp, R. M. J.; Pieters, R. J. *Chembiochem* **2008**, *9*, 1836.
(65) Kitov, P. I.; Sadowska, J. M.; Mulvey, G.; Armstrong, G. D.; Ling, H.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Bundle, D. R. *Nature* **2000**, *403*, 669.
(66) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. *Curr Opin Chem Biol* **2000**, *4*, 696.
(67) Zhang, X.; Boyce, M.; Bhattacharya, B.; Schein, S.; Roy, P.; Zhou, Z. H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 6292.
(68) Vasta, G. R. *Nat Rev Microbiol* **2009**, *7*, 424.
(69) Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Accounts Chem Res* **1995**, *28*, 321.
(70) Dam, T. K.; Brewer, C. F. *Biochemistry-Us* **2008**, *47*, 8470.
(71) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chem Rev* **2002**, *102*, 555.
(72) Rabinovich, G. A.; Toscanol, M. A.; Jackson, S. S.; Vasta, G. R. *Curr Opin Struc Biol* **2007**, *17*, 513.
(73) Brewer, C. F.; Miceli, M. C.; Baum, L. G. *Curr Opin Struc Biol* **2002**, *12*, 616.
(74) Tecle, T.; White, M. R.; Sorensen, G.; Gantz, D.; Kacak, N.; Holmskov, U.; Smith, K.; Crouch, E. C.; Hartshorn, K. L. *Biochem J* **2008**, *412*, 323.
(75) Hakansson, K.; Reid, K. B. M. *Protein Sci* **2000**, *9*, 1607.
(76) Imberty, A.; Mitchell, E. P.; Wimmerova, M. *Curr Opin Struc Biol* **2005**, *15*, 525.
(77) Chandra, N. R.; Ramachandraiah, G.; Bachhawat, K.; Dam, T. K.; Surolia, A.; Vijayan, M. *J Mol Biol* **1999**, *285*, 1157.
(78) Sanchez, J. F.; Lescar, J.; Chazalet, V.; Audfray, A.; Gagnon, J.; Alvarez, R.; Breton, C.; Imberty, A.; Mitchell, E. P. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 20171.

(79) Fukuda, K.; Mizuno, H.; Atoda, H.; Morita, T. *Biochemistry-Us* **2000**, *39*, 1915.
(80) Fan, E. K.; Merritt, E. A.; Verlinde, C. L. M. J.; Hol, W. G. J. *Curr Opin Struc Biol* **2000**, *10*, 680.
(81) He, Y. N.; Olson, R. *J Struct Biol* **2010**, *169*, 6.
(82) Bourne, Y.; Zamboni, V.; Barre, A.; Peumans, W. J.; Van Damme, E. J. M.; Rouge, P. *Structure* **1999**, *7*, 1473.
(83) Walker, J. R.; Nagar, B.; Young, N. M.; Hirama, T.; Rini, J. M. *Biochemistry-Us* **2004**, *43*, 3783.
(84) Geijtenbeek, T. B. H. *Xenotransplantation* **2005**, *12*, 368.
(85) Pieters, R. J. *Org Biomol Chem* **2009**, *7*, 2013.
(86) Parera Pera, N.; Branderhorst, H. M.; Kooij, R.; Maierhofer, C.; van der Kaaden, M.; Liskamp, R. M.; Wittmann, V.; Ruijtenbeek, R.; Pieters, R. J. *Chembiochem* **2010**, *11*, 1896.
(87) Cao, Y.; Stosiek, P.; Springer, G. F.; Karsten, U. *Histochem Cell Biol* **1996**, *106*, 197.
(88) Feizi, T. *Nature* **1985**, *314*, 53.
(89) Astronomo, R. D.; Burton, D. R. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9*, 308.
(90) Irazoqui, F. J.; Lopez, P. H. H.; Mandel, U.; Nores, G. A. *Mol Immunol* **2002**, *38*, 825.
(91) Kijimoto-Ochiai, S. *Cell Mol Life Sci* **2002**, *59*, 648.
(92) Zelensky, A. N.; Gready, J. E. *Febs J* **2005**, *272*, 6179.
(93) Weis, W. I.; Drickamer, K. *Annu Rev Biochem* **1996**, *65*, 441.
(94) Drickamer, K. *Nature* **1992**, *360*, 183.
(95) Stanca-Kaposta, E. C.; Gamblin, D. P.; Screen, J.; Liu, B.; Snoek, L. C.; Davis, B. G.; Simons, J. P. *Phys Chem Chem Phys* **2007**, *9*, 4444.
(96) Diaz, M. D.; Fernandez-Alonso, M. D.; Cuevas, G.; Canada, F. J.; Jimenez-Barbero, J. *Pure Appl Chem* **2008**, *80*, 1827.
(97) Terraneo, G.; Potenza, D.; Canales, A.; Jimenez-Barbero, J.; Baldridge, K. K.; Bernardi, A. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 2890.
(98) Bernardi, A.; Arosio, D.; Potenza, D.; Sanchez-Medina, I.; Mari, S.; Canada, F. J.; Jimenez-Barbero, J. *Chem-Eur J* **2004**, *10*, 4395.
(99) Dhanawat, M.; Shrivastava, S. K. *Mini-Rev Med Chem* **2009**, *9*, 169.
(100) Sharon, N.; Lis, H. *Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2* **2001**, *491*, 1.
(101) Davis, A. P.; Wareham, R. S. *Angewandte Chemie* **1999**, *111*, 3160
(102) Mazik, M. *Chem Soc Rev* **2009**, *38*, 935.
(103) Aoyama, Y.; Tanaka, Y.; Toi, H.; Ogoshi, H. *J Am Chem Soc* **1988**, *110*, 634.
(104) Poh, B. L.; Tan, C. M. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 9581.
(105) Goto, H.; Furusho, Y.; Yashima, E. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 9168.
(106) Villalonga, R.; Cao, R.; Fragoso, A. *Chem Rev* **2007**, *107*, 3088.
(107) Hacket, F.; Coteron, J. M.; Schneider, H. J.; Kazachenko, V. P. *Can J Chem* **1997**, *75*, 52.
(108) Striegler, S.; Gichinga, M. G. *Chem Commun* **2008**, 5930.
(109) Alpturk, O.; Rusin, O.; Fakayode, S. O.; Wang, W. H.; Escobedo, J. O.; Warner, I. M.; Crowe, W. E.; Kral, V.; Pruet, J. M.; Strongin, R. M. *P Natl Acad Sci USA* **2006**, *103*, 9756.
(110) Kunick, C.; Ott, I. *Angewandte Chemie* **2010**, *9999*, NA.
(111) Domingo, J. L. *J Toxicol Env Health* **1994**, *42*, 123.
(112) Peletskaya, E. N.; Glinsky, V. V.; Glinsky, G. V.; Deutscher, S. L.; Quinn, T. P. *J Mol Biol* **1997**, *270*, 374.
(113) Landon, L. A.; Zou, J.; Deutscher, S. L. *Mol Divers* **2004**, *8*, 35.
(114) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346*, 818.
(115) Robertson, D. L.; Joyce, G. F. *Nature* **1990**, *344*, 467.
(116) Tuerk, C.; Gold, L. *Science* **1990**, *249*, 505.
(117) Masud, M. M.; Kuwahara, M.; Ozaki, H.; Sawai, H. *Bioorgan Med Chem* **2004**, *12*, 1111.
(118) Jeong, S.; Eom, T. Y.; Kim, S. J.; Lee, S. W.; Yu, J. *Biochem Bioph Res Co* **2001**, *281*, 237.

(119) Mazik, M.; Cavga, H. *J Org Chem* **2006**, *71*, 2957.
(120) Ferrand, Y.; Klein, E.; Barwell, N. P.; Crump, M. P.; Jimenez-Barbero, J.; Vicent, C.; Boons, G. J.; Ingale, S.; Davis, A. P. *Angew Chem Int Edit* **2009**, *48*, 1775.
(121) Ferrand, Y.; Crump, M. P.; Davis, A. P. *Science* **2007**, *318*, 619.
(122) Lorand, J. P.; Edwards, J. O. *J Org Chem* **1959**, *24*, 769.
(123) Bishop, M.; Shahid, N.; Yang, J. Z.; Barron, A. R. *Dalton T* **2004**, 2621.
(124) Iwatsuki, S.; Nakajima, S.; Inamo, M.; Takagi, H. D.; Ishihara, K. *Inorg Chem* **2007**, *46*, 354.
(125) Rietjens, M.; Steenbergen, P. A. *Eur J Inorg Chem* **2005**, 1162.
(126) Berube, M.; Dowlut, M.; Hall, D. G. *J Org Chem* **2008**, *73*, 6471.
(127) Ito, H.; Kono, Y.; Machida, A.; Mitsumoto, Y.; Omori, K.; Nakamura, N.; Kondo, Y.; Ishihara, K. *Inorg Chim Acta* **2003**, *344*, 28.
(128) van den Berg, R.; Peters, J. A.; van Bekkum, H. *Carbohydr Res* **1994**, *253*, 1.
(129) Jin, S.; Cheng, Y. F.; Reid, S.; Li, M. Y.; Wang, B. H. *Med Res Rev* **2010**, *30*, 171.
(130) James, T. D.; Sandanayake, K. R. A. S.; Shinkai, S. *Nature* **1995**, *374*, 345.
(131) Kotoku, N.; Guo, X. H.; Arai, M.; Kobayashi, M. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 4152.
(132) Mader, H. S.; Wolfbeis, O. S. *Microchim Acta* **2008**, *162*, 1.
(133) Yan, J.; Fang, H.; Wang, B. H. *Med Res Rev* **2005**, *25*, 490.
(134) James, T. D.; Shinkai, S. *Top Curr Chem* **2002**, *218*, 159.
(135) Lauer, M.; Böhnke, H.; Grotstollen, R.; Salehnia, M.; Wulff, G. *Chem Ber-Recl* **1985**, *118*, 246
(136) Collins, B. E.; Sorey, S.; Hargrove, A. E.; Shabbir, S. H.; Lynch, V. M.; Anslyn, E. V. *J Org Chem* **2009**, *74*, 4055.
(137) Zhu, L.; Shabbir, S. H.; Gray, M.; Lynch, V. M.; Sorey, S.; Anslyn, E. V. *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 1222.
(138) Zhu, L.; Anslyn, E. V. *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 3676.
(139) Wright, A. T.; Zhong, Z. L.; Anslyn, E. V. *Angew Chem Int Edit* **2005**, *44*, 5679.
(140) Zhong, Z. L.; Anslyn, E. V. *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 9014.
(141) Liang, X. F.; James, T. D.; Zhao, J. Z. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1309.
(142) Zhao, J. Z.; James, T. D. *J Mater Chem* **2005**, *15*, 2896.
(143) Chi, L.; Zhao, J. Z.; James, T. D. *J Org Chem* **2008**, *73*, 4684.
(144) James, T. D.; Sandanayake, K. R. A. S.; Shinkai, S. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1994**, *33*, 2207.
(145) James, T. D.; Sandanayake, K. R. A. S.; Iguchi, R.; Shinkai, S. *J Am Chem Soc* **1995**, *117*, 8982.
(146) Jin, S.; Zhu, C. Y.; Li, M. Y.; Wang, B. H. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 1596.
(147) Jin, S.; Zhu, C. Y.; Cheng, Y. F.; Li, M. Y.; Wang, B. H. *Bioorgan Med Chem* **2010**, *18*, 1449.
(148) Li, M. Y.; Lin, N.; Huang, Z.; Du, L. P.; Altier, C.; Fang, H.; Wang, B. H. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 12636.
(149) Merrifield, R. B. *J Am Chem Soc* **1963**, *85*, 2149.
(150) Snyder, H. R.; Reedy, A. J.; Lennarz, W. J. *J Am Chem Soc* **1958**, *80*, 835.
(151) Aromando, R. F.; Trivillin, V. A.; Heber, E. M.; Pozzi, E.; Schwint, A. E.; Itoiz, M. E. *Oral Oncol* **2010**, *46*, 355.
(152) Sivaev, I. B.; Bregadze, V. I. *Arkivoc* **2008**, 47.
(153) Kabalka, G. W.; Yao, M. L.; Marepally, S. R.; Chandra, S. *Appl Radiat Isotopes* **2009**, *67*, S374.
(154) Kane, R. C.; Bross, P. F.; Farrell, A. T.; Pazdur, R. *Oncologist* **2003**, *8*, 508.
(155) Coutts, S. J.; Kelly, T. A.; Snow, R. J.; Kennedy, C. A.; Barton, R. W.; Adams, J.; Krolikowski, D. A.; Freeman, D. M.; Campbell, S. J.; Ksiazek, J. F.; Bachovchin, W. W. *J Med Chem* **1996**, *39*, 2087.
(156) Jones, B.; Adams, S.; Miller, G. T.; Jesson, M. I.; Watanabe, T.; Wallner, B. P. *Blood* **2003**, *102*, 1641.

(157) Lai, J. H.; Liu, Y. X.; Wu, W. G.; Zhou, Y. H.; Maw, H. H.; Bachovchin, W. W.; Bhat, K. L.; Bock, C. W. *J Org Chem* **2006**, *71*, 512.
(158) Kettner, C. A.; Shenvi, A. B. *J Biol Chem* **1984**, *259*, 15106.
(159) Wright, A. T.; Griffin, M. J.; Zhong, Z. L.; McCleskey, S. C.; Anslyn, E. V.; McDevitt, J. T. *Angew Chem Int Edit* **2005**, *44*, 6375.
(160) Edwards, N. Y.; Sager, T. W.; McDevitt, J. T.; Anslyn, E. V. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 13575.
(161) Collins, B. E.; Anslyn, E. V. *Chem-Eur J* **2007**, *13*, 4700.
(162) Zou, Y. J.; Broughton, D. L.; Bicker, K. L.; Thompson, P. R.; Lavigne, J. J. *Chembiochem* **2007**, *8*, 2048.
(163) Duggan, P. J.; Offermann, D. A. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 109.
(164) Pal, A.; Berube, M.; Hall, D. G. *Angew Chem Int Edit* **2010**, *49*, 1492.
(165) Lotan, R.; Skutelsky, E.; Danon, D.; Sharon, N. *J Biol Chem* **1975**, *250*, 8518.
(166) Dowlut, M.; Hall, D. G. *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 4226.
(167) Lennarz, W. J.; Snyder, H. R. *J Am Chem Soc* **1960**, *82*, 2172.
(168) Rock, F. L.; Mao, W. M.; Yaremchuk, A.; Tukalo, M.; Crepin, T.; Zhou, H. C.; Zhang, Y. K.; Hernandez, V.; Akama, T.; Baker, S. J.; Plattner, J. J.; Shapiro, L.; Martinis, S. A.; Benkovic, S. J.; Cusack, S.; Alley, M. R. K. *Science* **2007**, *316*, 1759.
(169) Baker, S. J.; Zhang, Y. K.; Akama, T.; Lau, A.; Zhou, H.; Hernandez, V.; Mao, W. M.; Alley, M. R. K.; Sanders, V.; Plattner, J. J. *J Med Chem* **2006**, *49*, 4447.
(170) Seebach, D.; Sting, A. R.; Hoffmann, M. *Angew Chem Int Edit* **1996**, *35*, 2708.
(171) Fitzi, R.; Seebach, D. *Angewandte Chemie* **1986**, 363
(172) Nasipuri, D.; Samaddar, A. K.; Datta, I. *J Chem Soc Perk T 1* **1979**, 3034.
(173) Cody, J.; Fahrni, C. J. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11099.
(174) Clive, D. L. J.; Tao, Y.; Khodabocus, A.; Wu, Y. J.; Angoh, A. G.; Bennett, S. M.; Boddy, C. N.; Bordeleau, L.; Kellner, D.; Kleiner, G.; Middleton, D. S.; Nichols, C. J.; Richardson, S. R.; Vernon, P. G. *J Am Chem Soc* **1994**, *116*, 11275.
(175) Beja, A. M.; Paixao, J. A.; Silva, M. R.; da Veiga, L. A.; Gonsalves, A. M. D. R.; Serra, A. C. *Acta Crystallogr C* **2000**, *56*, 354.
(176) van Otterlo, W. A. L.; Michael, J. P.; Fernandes, M. A.; de Koning, C. B. *Tetrahedron Lett* **2004**, *45*, 5091.
(177) Blank, S.; Seebach, D. *Liebigs Ann Chem* **1993**, 889
(178) Zheng, N.; Armstrong, J. D.; Eng, K. K.; Keller, J.; Liu, T.; Purick, R.; Lynch, J.; Hartner, F. W.; Volante, R. P. *Tetrahedron-Asymmetr* **2003**, *14*, 3435.
(179) Kopp, F.; Wunderlich, S.; Knochel, P. *Chem Commun* **2007**, 2075.
(180) Snyder, H. R.; Kuck, J. A.; Johnson, J. R. *J Am Chem Soc* **1938**, *60*, 105.
(181) Korich, A. L.; Iovine, P. M. *Dalton T* **2010**, *39*, 1423.
(182) Takeda, K.; Akiyama, A.; Nakamura, H.; Takizawa, S.; Mizuno, Y.; Takayanagi, H.; Harigaya, Y. *Synthesis-Stuttgart* **1994**, 1063.
(183) Gibson, F. S.; Bergmeier, S. C.; Rapoport, H. *J Org Chem* **1994**, *59*, 3216.
(184) Han, G.; Tamaki, M.; Hruby, V. *J Pept Res* **2001**, *58*, 338.
(185) Tabanella, S.; Valancogne, I.; Jackson, R. F. W. *Org Biomol Chem* **2003**, *1*, 4254.
(186) Jackson, R. F. W.; Wishart, N.; Wood, A.; James, K.; Wythes, M. J. *J Org Chem* **1992**, *57*, 3397.
(187) Heiss, C.; Anderson, J.; Phillips, R. S. *Org Biomol Chem* **2003**, *1*, 288.
(188) Nguyen, P.; Corpuz, E.; Heidelbaugh, T. M.; Chow, K.; Garst, M. E. *J Org Chem* **2003**, *68*, 10195.
(189) Keck, G. E.; Truong, A. P. *Org Lett* **2002**, *4*, 3131.
(190) Pilli, R. A.; Russowsky, D.; Dias, L. C. *J Chem Soc Perk T 1* **1990**, 1213.
(191) Danieli, B.; Giovanelli, P.; Lesma, G.; Passarella, D.; Sacchetti, A.; Silvani, A. *J Comb Chem* **2005**, *7*, 458.
(192) Ousmer, M.; Boucard, V.; Lubin-Germain, N.; Uziel, J.; Auge, J. *Eur J Org Chem* **2006**, 1216.

(193) Jin, S.; Choudhary, G.; Cheng, Y. F.; Dai, C. F.; Li, M. Y.; Wang, B. H. *Chem Commun* **2009**, 5251.
(194) Link, A. J.; Vink, M. K. S.; Tirrell, D. A. *Nat Protoc* **2007**, *2*, 1879.
(195) Link, A. J.; Vink, M. K. S.; Tirrell, D. A. *Nat Protoc* **2007**, *2*, 1884.
(196) Isaad, A. L.; Barbetti, F.; Rovero, P.; D'Ursi, A. M.; Chelli, M.; Chorev, M.; Papini, A. M. *Eur J Org Chem* **2008**, 5308.
(197) Roth, S.; Thomas, N. R. *Synlett* **2010**, 607.
(198) Link, A. J.; Vink, M. K. S.; Tirrell, D. A. *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 10598.
(199) Kiick, K. L.; Saxon, E.; Tirrell, D. A.; Bertozzi, C. R. *P Natl Acad Sci USA* **2002**, *99*, 19.
(200) Panda, G.; Rao, N. V. *Synlett* **2004**, 714.
(201) Kuang, G. C.; Michaels, H. A.; Simmons, J. T.; Clark, R. J.; Zhu, L. *J Org Chem* **2010**, *75*, 6540.
(202) Durka, K.; Kurach, P.; Lulinski, S.; Serwatowski, J. *Eur J Org Chem* **2009**, 4325.
(203) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org Lett* **2004**, *6*, 2853.
(204) Chassaing, S.; Sido, A. S. S.; Alix, A.; Kumarraja, M.; Pale, P.; Sommer, J. *Chem-Eur J* **2008**, *14*, 6713.
(205) Lipshutz, B. H.; Taft, B. R. *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 8235.
(206) Yamaguchi, K.; Oishi, T.; Katayama, T.; Mizuno, N. *Chemistry* **2009**, *15*, 10464.
(207) Meng, X.; Xu, X.; Gao, T.; Chen, B. *Eur J Org Chem* **2010**, *2010*, 5409.
(208) Mothana, S.; Grassot, J. M.; Hall, D. G. *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, *49*, 2883.
(209) Mulla, H. R.; Agard, N. J.; Basu, A. *Bioorg Med Chem Lett* **2004**, *14*, 25.
(210) Hermann, G. J.; Annis, M. C.; Peter, D. E. A.; Corrales, M.; Diaz, L.; Goodnow, R. A. *Synthesis-Stuttgart* **2008**, 221.
(211) Connors, K. A. *Binding constants : the measurement of molecular complex stability*; Wiley: New York, 1987.
(212) Wu, W. H.; Greene, C. *Clin Chem* **1986**, *32*, 1193.
(213) Shoji, E.; Freund, M. S. *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 12486.
(214) Arnold, F. H.; Zheng, W. G.; Michaels, A. S. *J Membrane Sci* **2000**, *167*, 227.
(215) Gabai, R.; Sallacan, N.; Chegel, V.; Bourenko, T.; Katz, E.; Willner, I. *J Phys Chem B* **2001**, *105*, 8196.
(216) Lim, S. H.; Musto, C. J.; Park, E.; Zhong, W. X.; Suslick, K. S. *Org Lett* **2008**, *10*, 4405.
(217) Pringsheim, E.; Terpetschnig, E.; Piletsky, S. A.; Wolfbeis, O. S. *Adv Mater* **1999**, *11*, 865.
(218) Kennedy, G. R.; How, M. J. *Carbohyd Res* **1973**, *28*, 13.
(219) Imada, T.; Murakami, H.; Shinkai, S. *J Chem Soc Chem Comm* **1994**, 1557.
(220) Yan, J.; Springsteen, G.; Deeter, S.; Wang, B. H. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11205.
(221) Norrild, J. C.; Eggert, H. *J Chem Soc Perk T 2* **1996**, 2583.
(222) Nicholls, M. P.; Paul, P. K. C. *Org Biomol Chem* **2004**, *2*, 1434.
(223) Rohovec, J.; Maschmeyer, T.; Aime, S.; Peters, J. A. *Chem-Eur J* **2003**, *9*, 2193.
(224) Springsteen, G.; Wang, B. H. *Chem Commun* **2001**, 1608.
(225) Springsteen, G.; Wang, B. H. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5291.
(226) Adamczyk-Wozniak, A.; Brzozka, Z.; Cyranski, M. K.; Filipowicz-Szymanskaa, A.; Klimentowska, P.; Zubrowska, A.; Zukowski, K.; Sporzynski, A. *Appl Organomet Chem* **2008**, *22*, 427.
(227) Hoeg-Jensen, T. *Qsar Comb Sci* **2004**, *23*, 344.
(228) Fitzi, R.; Seebach, D. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 5277.
(229) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. *J Org Chem* **1997**, *62*, 7512.
(230) Shao, Y. M.; Yang, W. B.; Peng, H. P.; Hsu, M. F.; Tsai, K. C.; Kuo, T. H.; Wang, A. H.; Liang, P. H.; Lin, C. H.; Yang, A. S.; Wong, C. H. *Chembiochem* **2007**, *8*, 1654.
(231) Barkin, J. L.; Faust, M. D.; Trenkle, W. C. *Org Lett* **2003**, *5*, 3333.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

(Ort, Datum) (Unterschrift)