Festphasensynthese von Muramyldipeptiden an isomeren Trialkoxybenzylamin-Harzen

Solid Phase Synthesis of Muramyl Dipeptides on Isomeric Trialkoxybenzylamine Resins

Hans-Jürgen Kohlbau^a, Jochen Tschakert^a, Raed A. Al-Qawasmeh^a, Tanveer Ahmad Nizami^a, Abdul Malik^{a,**}, Wolfgang Voelter^{a,*}

^a Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen Instituts der Universität Tübingen, Hoppe-Seyler-Straße 4, D-72076 Tübingen

Z. Naturforsch. 53b, 753-764 (1998); received May 7, 1998

Muramyl Peptides, Solid Phase Glycopeptide Synthesis, Peptide Amide Synthesis, Glycopeptides

New isomeric trialkoxybenzylamine resins are developed coupling phthalimidomethyl-3,5dimethoxyphenols to the Merrifield resin, followed by subsequent treatment with hydrazine. The generated benzylamine function allows DCC coupling with the carboxyl function of amino acids and peptides which are removed as amides after treatment with trifluoroacetic acid. These new trialkoxybenzylamine resins allow expeditious syntheses of peptide amides and glycopeptide amides as is demonstrated for muramyl peptides and analogues.

Einleitung

Das *N*-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (MDP) ist ein Fragment des Zellwandpeptidoglykans Murein von Bakterien. Seit längerem ist bekannt, daß das Muramyldipeptid (MDP) die kleinste Einheit ist, die eine Immunantwort auslöst [1]. Eine markante Teilstruktur von MDP ist der in Zellgeweben weniger häufige Aminosäurerest D-Isoglutamin, welcher für die biologische Aktivität der Verbindung [2–4] essentiell ist. Aufgrund der biologischen Wirkung haben mehrere Arbeitsgruppen Synthesestrategien für Muramylpeptide beschrieben [5–14].

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Benzylaminanker entwickelt, welcher sich hervorragend zur Synthese von Peptidamiden eignet. Bei der Ankerdarstellung durch Einführung von Methylaminofunktionen in einen 3,5-Dimethoxyphenolkern entstehen vier Substitutionsprodukte (o; p;o,o und o,p), die rein isoliert und charakterisiert werden. Drei der vier Derivate werden mit dem Chlormethyl-Harz (Merrifield-Harz) umgesetzt und erfolgreich in der Festphasensynthese von MDP (Glycopeptidamiden) verwendet.

Die im Folgenden dargestellte Synthese von Muramyldipeptiden gliedert sich in vier Teilbereiche: 1. Synthese der Ankergruppierungen mit Kupplung des Ankers an das Merrifield-Harz; 2. Darstellung der Glykokomponenten; 3. Festphasensynthese der Benzyl-*N*-acetyl-muramyldipeptidderivate und Abspaltung der Syntheseprodukte vom Harz; 4. Entfernung der Schutzgruppen, chromatographische Reinigung der Endprodukte und deren spektroskopische Charakterisierung.

1. Synthese der Ankergruppen

Die Synthese der Ankergruppierung erfolgt durch Reaktion von 3,5-Dimethoxyphenol mit *N*-Chlormethylphthalimid in Gegenwart von wasserfreiem Zinkchlorid. Bei dieser Friedel-Crafts-Alkylierung werden neben zwei Monoalkyl- zwei Disubstitutionsprodukte gebildet. Eine dreifache Substitution an 3,5-Dimethoxyphenol ist nicht zu beobachten. Die Trennung der entstandenen Produkte ist durch Säulenchromatographie mit Chloroform/Essigester (95:5, v/v) möglich. Es werden so nacheinander 2-Phthalimidomethyl-3,5-dimethoxyphenol (**1a**), 2,6-Di-(phthalimidomethyl)-3,5-dimethoxyphenol (**2a**), 2,4-Di-(phthalimido-

D

0932-0776/98/0700-0753 \$06.00 © 1998 Verlag der Zeitschrift für Naturforschung. All rights reserved.

^{*} Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Dr. h.c. W. Voelter.

^{**} On leave from H. E. J. Research Institute of Chemistry, University of Karachi, Karachi-75270, Pakistan.

methyl)-3,5-dimethoxyphenol (**2b**) und 4-Phthalimidomethyl-3,5-dimethoxyphenol (**1b**) isoliert.





Es werden die Verbindungen **1a** und **1b** an ein Harz mit 1,34 mmol Chlormethylgruppen pro Gramm und die Produkte **2a** und **2b** an ein Harz mit 0,75 mmol Chlormethylgruppen pro Gramm unter Basenzusatz (Natriummethanolat) geknüpft. Durch anschließende Hydrazinolyse wird die Benzylaminoankergruppe dargestellt. Die so erhaltenen polymeren Träger (**3a-d**) werden für die Festphasensynthese eingesetzt, wobei die Kupplungseffizienz durch den Ninhydrintest nach Kaiser [15] überprüft wurde.

2. Darstellung der Zuckerkomponenten

Die Synthese der am anomeren C-Atom und an C-4 und C-6 blockierten N-Acetyl-muraminsäure (6) erfolgt in einer dreistufigen Reaktion. N-Acetyl-glucosamin wird nach Fischer benzyliert [16,17]. Die Benzylierung wird deshalb gewählt, weil die Benzylschutzgruppe unter milden Bedingungen hydrogenolytisch abgespalten werden kann. Außerdem lassen sich Substanzen mit aromatischen Systemen bei chromatographischer



1a: R₁=CH₂-Phthalimido, R₂, R₃=H 1b: R₃=CH₂-Phthalimido, R₁, R₂=H 2a: R₁, R₂=CH₂-Phthalimido, R₃=H 2b: R₁, R₃=CH₂-Phthalimido, R₂=H 3a: R₄=CH₂NH₂, R₅, R₆=H 3b: R₆=CH₂NH₂, R₄, R₅=H 3c: R₄, R₅=CH₂NH₂, R₆=H 3d: R₄, R₆=CH₂NH₂, R₅=H

Schema 2. Kupplung der Ankerverbindungen **1a**, **1b**, **2a**, **2b** an das Merrifield-Harz und anschließende Hydrazinolyse zur Darstellung von **3a-d**.

Trennung sehr gut UV-spektroskopisch bei 254 nm detektieren. Aufgrund des anomeren Effekts entsteht das α-Anomere, das aufgrund der äquatorialen Stellung der Substituenten in der ⁴C₁-Konformation vorliegt, wie auch die NMR-Daten bestätigen [18]. Die nachfolgende Umsetzung des Benzylglykosids zum Benzyl-N-acetyl-4,6-O-4 benzylidenderivat 5 erfolgt mit α, α -Dimethoxytoluol in Gegenwart von p-Toluolsulfonsäure [19]. 5 wird dann mit D,L-a-Chlorpropionsäure unter Zusatz von Natriumhydrid umgesetzt. Trotz des Einsatzes der razemischen Säure, entsteht bei der stereoselektiven Reaktion hauptsächlich das Muraminsäurederivat mit einem D-Lactylrest. Das als Nebenprodukt entstehende L-Isomere (ca. 5%)

kann durch Umkristallisation aus heißem Methanol vom D-Isomeren abgetrennt werden [20,21].



Schema 3. Darstellung von Benzyl-*N*-acetyl-2-amino-2desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-(D-1-carboxyethyl)- α -Dglucopyranosid (**6**) aus N-Acetylglucosamin.

3. Festphasensynthese

Die Festphasensynthesestrategie, wonach sämtliche Möglichkeiten an enantiomeren Aminosäurekombinationen dargestellt wurden, ist aus Abb. 1 ersichtlich.



Bz-N-Ac-Mur-Ala-isoGln

Abb. 1. Festphasensyntheseschema zur Darstellung von Benzyl-*N*-acetyl-muramyl-alanyl isoglutamin.

Die Kupplung wird mit DCC/HOBt durchgeführt. Die Abspaltung der temporären Fmoc-Gruppe erfolgt mit Piperidin in DMF. Jeder Kupplungsschritt wird durch den Ninhydrintest [15] auf Vollständigkeit überprüft. Die Abspaltung der geschützten Zielverbindung erfolgt mit TFA unter Zusatz von Thioanisol. Die Zeiten für die Abspaltungsreaktionen sind unterschiedlich und liegen zwischen 1,5 h und 5 h. Die Isolierung der Reinprodukte erfolgt durch HPLC und die Charakterisierung hauptsächlich durch ¹H-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie. Die neben dem Hauptprodukt bei der Synthese entstandenen Nebenprodukte werden ebenfalls isoliert und durch Massenspektrometrie größtenteils identifiziert. In Abb. 2 sind die RP-HPLC-Chromatogramme der Syntheseprodukte und in Tab. I die Zuordnungen verschiedener Fraktionen zu Haupt- bzw. Nebenprodukten mittels FAB-MS zusammengestellt.

Gewinnung der Syntheseprodukte

a. Benzyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-Disoglutamin (**7a**)

7a wird nach dem allgemein beschriebenen Syntheseschema 2 auf dem Harz **3a** dargestellt. Die Abspaltungsreaktion wird 1.5 h lang durchgeführt. Das Rohprodukt wird durch RP-HPLC aufgereinigt (Abb. 2), und das Hauptprodukt sowie einige Nebenprodukte werden durch FAB-MS identifiziert (Tab. I). Wie aus Tab. I zu sehen ist, fallen neben dem gewünschten Hauptprodukt Nebenprodukte an, bei denen keine komplette Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte. Ein Teil des Hauptproduktes wird bei der Abspaltung zu Benzvl-N-acetvl-muraminsäure hydrolysiert. Darüberhinaus wird das Isomuramylderivat gefunden. Die Identifizierung des Reinproduktes Benzyl-Nacetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (7a) erfolgt durch ¹H-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie.

b. Benzyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-Lisoglutamin (**7b**)

Die Synthese des L-Isoglutamin-Diastereomeren von MDP erfolgt ebenfalls auf dem Harz 3a. Die Abspaltung vom Harz erfolgt hier in 2 h, um den Anteil an nicht vollständig deblockiertem Produkt zu verringern. Das nach der Abspaltung erhaltene Rohprodukt wird mittels RP-HPLC gereinigt (Abb. 2), und das Hauptprodukt sowie einige Nebenprodukte werden durch FAB-MS identifiziert (Tab. I). Durch Verlängerung der Abspaltungsreaktionszeit ist, im Gegensatz zur Synthese von 7a, der Anteil an unvollständig deblockierten Benzyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-L-isoglutamin-Derivaten geringer, gleichzeitig beobachtet man jedoch einen Anstieg des Hydrolyseproduktes Benzyl-N-acetyl-muraminsäure. Außerdem wird hier das Isomuramylderivat isoliert. Die Identifizierung des Reinproduktes Benzyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-L-isoglutamin (7b) erfolgt durch ¹H-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie.

c. Benzyl-N-acetyl-muramyl-D-alanyl-Lisoglutamin (**7c**)

Die Synthese dieses MDP-Derivates wird auf dem Harz 3d durchgeführt. Die Abspaltung vom Harz erfolgt innerhalb von 3,5 h. Das nach der Abspaltung erhaltene Rohprodukt wird mittels RP-HPLC gereinigt (Abb. 2), und das Hauptprodukt sowie einige Nebenprodukte werden durch FAB-MS identifiziert (Tab. I). Bei der Synthese entsteht zu einem geringen Teil Benzyl-N-acetylmuramyl-D-alanyl-L-glutaminsäure. Nebenprodukte, die auf unvollständige Deblockierung bei der Abspaltung schließen lassen, treten kaum auf. Der Gehalt der durch Hydrolyse entstandenen Benzyl-N-acetyl-muraminsäure ist im Vergleich zu den anderen Synthesen gestiegen. Die Retentionszeit des Isomuramylderivats weicht nicht sehr stark von der des Hauptprodukts ab, so daß hier das L-Isomere nur als Schulter des Hauptproduktpeaks im HPLC Chromatogramm beobachtet wird. Die Identifizierung des Reinproduktes Benzyl-N-acetyl-D-alanyl-L-isoglutamin (7c) erfolgt durch ¹H-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie.

d. Benzyl-N-acetyl-muramyl-D-alanyl-D-isoglutamin (**7d**)

Die Synthese dieses MDP-Derivates erfolgt auf dem Harz **3b**. Das Rohprodukt wird nach 5h Abspaltung isoliert. Neben dem Hauptprodukt fallen kaum Nebenprodukte an (Abb. 2; Tab. I). Nach fünfstündiger Abspaltung ist kein unvollständig deblockiertes Derivat zu detektieren. Fernerhin tritt unter diesen Bedingungen kein Isomuramylderivat auf. Die Identifizierung des Reinproduktes Benzyl-*N*-acetyl-muramyl-D-alanyl-D-isoglutamin (**7d**) erfolgt durch ¹H-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie.

Alle vier Benzyl-N-acetyl-alanyl-isoglutamin-Isomeren (**7a-d**) zeigen ähnliche ¹H-NMR-Spektren und besitzen ähnliche Retentionszeiten im HPLC.

Darstellung und Charakterisierung der *N*-Acetylmuramyldipeptide (8a-d)

Die Benzylgruppe der Benzyl-N-acetyl-muramyldipeptid-Isomeren **7a-d** wird durch katalytische Hydrierung mit Wasserstoff und Palladium



Schema 4. Struktur der isomeren Benzyl-*N*-acetyl-muramyl-alanyl-isoglutamin (**7a-d**).

auf Aktivkohle als Katalysator entfernt, wobei die freien *N*-Acetyl-muramyldipeptide **8a-d** entstehen. Alle vier Derivate fallen bei den Hydrierungen in hoher Reinheit an.



Schema 5. Struktur der isomeren N-Acetyl-muramylalanyl-isoglutamin Derivate (8a-d).

Werden die entstandenen Produkte durch HPLC getrennt, dann zeigen sämtliche Verbindungen je zwei Peaks mit einer charakteristischen Intensitätsverteilung von *ca.* 1:2. Nach Trennung der beiden Fraktionen und Rechromatographie derselben werden identische Chromatogramme erhalten. Durch Mutarotation liegt ein Gleichgewicht zwischen den α - und β -Anomeren im Verhältnis von 2:1 vor [22–23], wie in Abb. 3 am Beispiel von *N*-Acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (**8a**) gezeigt wird.

Wie diese Beispiele zeigen, eignet sich besonders die Ankergruppe **3d** hervorragend für die Festphasensynthese von Glykopeptidamiden oder Peptidamiden, welche durch "klassische" Metho-



Abb. 2. RP-HPLC von Rohprodukten, der durch Festphasensynthese erhaltenen enantiomeren MDP-Derivate (**7a-d**), nach ihrer acidolytischen (TFA/Thioanisol; 95:5) Abspaltung vom Harz. Chromatogramme: **A: 7a; B: 7b; C: 7c; D: 7d.** Chromatographische Bedingungen: Säule: Li-Chrospher[®] RP-18 5 μ m; Eluenten: A: 0.05% TFA in H₂O (v/v), B: TFA/H₂O/CH₃CN 0.05:40:60 (v/v); Gradient: 0–1 min (95% A), 1–31 min (95–5% A); Flußrate 1 ml/ min; Detektion bei $\lambda = 214$ nm.

den nur über eine Vielzahl von Synthesestufen zugänglich sind.

Experimentelles

Schmelzpunkte werden mit einer Schmelzpunktbestimmungsapparatur nach Dr. Tottoli der Firma Büchi (Büchi 510), Schweiz, oder einer Digital Melting Point Apparatur der Firma Bachofer, Reutlingen, gemessen. Sie sind nicht korrigiert. Die Drehwerte werden mit einem LEP-AZ Polarimeter der Firma Zeiss, Jena, ermittelt. Die Elementaranalysen werden mit einem CHN-O-RA-PID-Gerät der Firma Heraeus, Hanau, durchgeführt. Für die Dünnschichtchromatographie werden DC-Fertigplatten, beschichtet mit Kieselgel 60 Tab. I. Identifizierung von Haupt- und ausgewählten Nebenfraktionen in den RP-HPLC-Chromatogrammen (siehe Abb. 2) mit Hilfe von FAB-MS (Gerät: Varian MAT-711 der Firma Finnigan, Bremen), unter Angabe von Retentionszeiten, *m/z*-Werten und Strukturzuordnungen.

Chromato- gramm	Fraktion Nr.	Retentions- zeit (min)	<i>m/z</i> (FAB-MS)	Strukturzuordnung
A	1	17.4	583.9	Benzy-N-acetyl-muramyl-L-analyl- D-isoglutamin (7a), [M+H] ⁺
	2	18.29	583.9	Isomuramylderivat
	3	20.95	384.1	M (7a)-(-L-Ala-D-iGlu)
	4	27.48	639.5	M (7a)+(-tBu)
В	1	1686	583.3	Benzy-N-acetyl-muramyl-L-alanyl- L-isoglutamin (7b), [M+H] ⁺
	2	17.61	583.3	Isomuramylderivat
	3	18.23	384.1	M (7b)-(-L-Ala-L-iGlu)
C	1	17.32	584.3	Benzy-N-acetyl-muramyl-D-alanyl- L-isoglutaminsäure
	2	18.25	583.2	Benzy-N-acetyl-muramyl-D-alanyl- L-isoglutamin (7c), [M+H] ⁺
	3	18.52	583.2	Isomuramylderivat
	4	22.13	384.2	M (7c)-(-D-Ala-L-iGlu)
D	1	17.52	583.2	Benzy-N-acetyl-muramyl-D-alanyl- D-isoglutamin (7d), [M+H] ⁺
	2	18.30	583.1	Isomuramylderivat



Abb. 3. HPLC des synthetischen *N*-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (**8a**). **B**: Rechromatogramm der Fraktion Nr.1 von **A** nach 30-minütigem Stehen im Eluenten. **C**: Rechromatogramm der Fraktion 2 von **A** nach 1-stündigem Stehen im Eluenten. Chromatographische Bedingungen: Säule: LiChrospher[®] RP-18 5 µm; Eluenten: A: 0.05% TFA in H₂O (v/ v), B: TFA/H₂O/CH₃CN 0.05:40:60 (v/v); Gradient: 0-1 min (95% A),1-31 min (95-5% A); Flußrat 1 ml/min; Detektion bei λ =214 nm.

Brought to you by | provisional account Unauthenticated Download Date | 6/5/15 2:02 AM F₂₅₄, der Firma Merck, Darmstadt, benutzt. Folgende Laufmittelsysteme werden verwendet (jeweils v/v): A = MeOH/EE (1:4), B = *n*-BuOH/ H₂O/AcOH (4:1:1), C = CHCl₃/EE (95:5), D = CHCl₃/ MeOH/C₆H₆/H₂O (8:8:8:1). Die Chromatogramme werden mit UV-Licht bei λ = 254 nm visualisiert und/oder durch Ninhydrin oder Chlortoluidin angefärbt.

Selbstgepackte Säulen mit Kieselgel 60 (63-200 µm Korngröße) der Firma Merck, Darmstadt, werden für die Reinigung der Produkte verwendet. Zur präparativen HPLC-Trennung der Rohprodukte wurde folgende Einheit verwendet: BT-8100 Pumpe, BT-8200 HPLC UV/VIS Detektor, C-R6A CHROMATOPAC-Integrator (alle Geräte von der Firma Eppendorf Biotronik, Maintal) und eine SS 250 1/2" / 10 Nucleosil® 7 C18-Säule (Macherey-Nagel, Düren). Zur analytischen Überprüfung der Reinheit wird folgende HPLC-Anlage eingesetzt: BT-8100 Pumpe, BT-8200 HPLC UV/VIS Detektor, BT-8300 System-Controller, C-R6A CHROMATOPAC-Integrator (alle Geräte von der Firma Eppendorf Biotronik, Maintal) und eine LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μ m (4 × 250 mm) Säule (Merck, Darmstadt). Zur Aufnahme der IR-Spektren werden KBr-Presslinge hergestellt, die 1 mg Substanz pro 200 mg KBr enthalten. Die Messung erfolgt mit dem Gerät Acculab^{T. M.} 4 der Firma Beckman, München. Für die Aufnahme der NMR-Spektren werden folgende Geräte der Firma Bruker, Karlsruhe, eingesetzt: Bruker AC-250 (¹H-NMR: 250 MHz; ¹³C-NMR: 63 MHz) und Bruker WM-400 (¹H-NMR: 400 MHz; ¹³C-NMR: 100 MHz). Als interner Standard dient Tetramethylsilan. Die FD- und FAB-Massenspektren werden mit dem Varian MAT-711 der Firma Finnigan, Bremen, aufgenommen. Hydrierungen erfolgen in einer Hydrierapparatur der Firma Bachofer, Reutlingen. Als Lösungsmittel dient Methanol mit katalytischen Mengen Essigsäure. Der Wasserstoffdruck wird auf 2.5 atm eingestellt. Als Hydrierkatalysator wird 10% Palladium auf Aktivkohle der Firma Merck, Darmstadt, verwendet. Die Lösungsmittel werden nach den üblichen Vorschriften getrocknet und über eine 140 cm Vigreuxkolonne destilliert. Die Aufbewahrung erfolgt über einem 4 A Molekularsieb (Fa. Merck, Darmstadt).

Natriumhydrid (80-proz. Suspension in Paraffin) und *p*-Toluolsulfonsäure werden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. *N*-Acetylglucosamin, *N*,*N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), *N*-Hydroxybenzotriazol (HOB*t*), Thioanisol, 3,5-Dimethoxyphenol und *N*-Chlormethylphthalimid sind Produkte der Firma Fluka, Buchs, Schweiz. Die Chlormethyl-Harze (Merrifield-Harze) mit der Beladung von 0.75 mmol/g bzw. 1.34 mmol/g sind Produkte der Firma Bio-Rad, München. Fmoc-Aminosäuren wurden von der Firma Bachem, Heidelberg und alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Darstellung der Ankergruppierungen für die Festphasensynthesen Reaktion von 3,5-Dimethoxyphenol mit N-Chlormethylphthalimid

3.08 g (0.02 mol) 3,5-Dimethoxyphenol und 3.91 g (0.02 mol) N-Chlormethylphthalimid werden in 50 ml Benzol gelöst und dann wird 0.27 g (0.004 mol) ZnCl₂ (wasserfrei) zugegeben [24]. Das Gemisch wird 18 h bei R.T. gerührt. Nach dieser Zeit werden nochmals 0.27 g ZnCl₂ zugegeben, und es wird für weitere 5 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Entfernung des Benzols im Vakuum wird der Rückstand in 100 ml Chloroform gelöst und dreimal mit je 100 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Toluol/Petrolether (1:2, v/v) gewaschen. Die entstandenen Friedel-Crafts-Alkylierungsprodukte werden über eine selbstgepackte Kieselgelsäule chromatographisch getrennt. Als Elutionsmittel wird ein Chloroform/ Ethylacetat-Gemisch (95:5, v/v) verwendet. Folgende vier Produkte werden nacheinander isoliert: 2-Phthalimidomethyl-3,5-dimethoxyphenol (1a),2,6-Di-(phthalimido-methyl)-3,5-dimethoxyphenol (2a), 2,4-Di-(phthalimidomethyl)-3,5-dimethoxyphenol (2b) und 4-Phthalimidomethyl-3,5-dimethoxyphenol (1b).

Gesamtausbeute: 1a, 1b, 2a und 2b: 89%.

2-Phthalimidomethyl-3,5-dimethoxyphenol (1a): Ausb. 2.4 g (32%), farblose Kristalle, Schmp.: 161 °C (Lit. [25] 168 °C), $R_f^c = 0.52$; IR (KBr), ν_{max} (cm⁻¹): 3280, (OH), 2960 / 2850, (CH), 1700 / 1770 (C=O), 1600 (C=C), 900 / 800 (CH_{aromat}); ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 8.38$ (s, 1H, OH), 7.86–7.62 (m, 4H, aromat. H), 6.13 (d, $J_{o,p} = 2.4$ Hz, 1H, o-H_{phenol}), 5.98 (d, $J_{p,o} = 2.4$ Hz, 1H, p-H_{phenol}), 4.76 (s, 2H, CH₂), 3.74 (s, 3H, OMe), 3.69 (s, 3H, OMe); FD-MS, m/z (rel. Int): 313.5 (100) [M]⁺, 156.3 (18) [M]²⁺.

C₁₇H₁₅NO₅ (313.31) Ber. C 65.18 H 4.79 N 4.47%, Gef. C 64.64 H 4.94 N 4.91%. 4-Phthalimidomethyl-3,5-dimethoxyphenol (1b): Ausb. 1.6 g (22%), farblose Kristalle, Schmp.: 204 °C (Lit. [24] 204 °C); R_f^c = 0.09; IR (KBr), ν_{max} (cm⁻¹): 3460 (OH), 2940 / 2840 (CH), 1700 / 1760 (C=O), 1600 (C=C), 900 / 810 / 700 (CH_{aromat}); ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.79–7.63 (m, 4H, aromat H), 6.01 (s, 2H, o-H_{phenol.}, o-H_{phenol.}), 4.85 (s, 2H, CH₂), 3.72 (s, 6H, OMe); FD-MS *m*/*z* (rel. Int.): 313.5 (100) [M]⁺.

C₁₇H₁₅NO₅ (313.31) Ber. C 65.18 H 4.79 N 4.47%, Gef. C 64.89 H 4.98 N 5.13%.

2,6-Di-(phthalimidomethyl)-3,5-dimethoxyphenol (**2a**): Ausb. 0.9 g (16%), hellgelbe Kristalle, Schmp.: 201 °C (Lit. [24] 209 °C), $R_f^c = 0.32$; IR (KBr), ν_{max} (cm⁻¹): 3260 (OH), 2940 / 2850 (CH), 1690 / 1780 (C=O), 1600 (C=C), 900 / 810 / 710 (CH_{aromat}.); ¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 8.59$ (s, 1H, OH), 7.92–7.65 (m, 8H, aromat. H), 6.04 (s, 1H, p-H_{phenol}.), 4.89 (s, 4H, CH₂), 3.79 (s, 6H, OMe); FD-MS, m/z (rel. Int.): 472.3 (100) [M]⁺.

 $C_{26}H_{20}N_2O_7$ (472.45)

Ber. C 66.10 H 4.24 N 5.93%, Gef. C 65.79 H 4.85 N 6.31%.

2,4-Di-(phthalimidomethyl)-3,5-dimethoxyphenol (**2b**): Ausb. 1.1 g (19%), gelbe Kristalle, Schmp.: 183 °C (Lit. [24] 189 °C), $R_f^c = 0.19$; IR (KBr), ν_{max} (cm⁻¹): 3460 (OH), 2960 / 2860 (CH), 1700 / 1760 (C=O), 1600 (C=C), 900 / 820 / 720 (CH_{aromat}); ¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 7.86-7.63$ (m, 8H, aromat. H), 6.34 (s, 1H, *o*-H_{phenol}), 4.85 (s, 2H, CH₂), 4.82 (s, 2H, CH₂), 3.98 (s, 3H, OMe), 3.74 (s, 3H, OMe); FD-MS, *m/z* (rel.Int.): 472.3 (100) [M]⁺.

 $C_{26}H_{20}N_2O_7$ (472.45)

Ber. C 66.10 H 4.24 N 5.93%, Gef. C 65.75 H 4.79 N 5.52%.

Kupplung der Ankergruppen mit dem Polystyrolharz und anschließende Hydrazinolyse

Die Verbindungen **1a**, **1b**, **2a** und **2b** werden auf ein Chlormethyl-Harz (Merrifield-Harz) gekuppelt. Die Beladung des Harzes für die Reaktion mit **1a** und **1b** beträgt 1.34 mmol Chlormethylgruppen pro Gramm Harz, die Beladung des Harzes bei der Reaktion von **2a** und **2b** beträgt 0.75 mmol/g. Die Reaktionen werden nach Lit. [24] durchgeführt: Jeweils 0.94 g (3 mmol) **1a** bzw. **1b** werden mit 0.8 g (14.8 mmol) Natriummethylat und 1.9 g des Merrifield-Harzes (Beladung 1.34 mmol/g) in 20 ml DMF bei 60 °C 18 h lang gerührt. 0.9 g (2 mmol) 2a bzw. 2b werden jeweils mit 0.5 g (9.3 mmol) Natriummethylat und 2 g des Merrifield-Harzes (Beladung 0.75 mmol/g) in 20 ml DMF bei 60 °C 18 h lang gerührt. Nach den einzelnen Kupplungsreaktionen werden die Harze filtriert und mit DMF, MeOH und DCM in dieser Reihenfolge dreimal gewaschen. Die Harze werden in 20 ml EtOH suspendiert und mit 10 ml Hydrazinhydrat 18 h bei 85 °C unter Rückfluß gekocht. Danach werden die Harze abgesaugt und mit DMF, MeOH und DCM gewaschen (jeweils dreimal). Nach Trocknung im Vakuum wird die freie Aminogruppe mittels Ninhydrintest [15] detektiert; Ausb. (bezogen auf den theoretischen Massenzuwachs bei quantitativer Einführung der Ankereinheit): 1.81 g 2-Benzyloxy-4,6-dimethoxybenzylamin-Harz (3a; 80%), 1.74 g 4-Benzyloxy-2,6-dimethoxy-benzylamin-Harz (3b; 77%), 1.63 g 2-Benzyloxy-4,6-dimethoxy-3-methylamin-benzylamin-Harz (3c; 72%) und 1.72 g 4-Benzyloxy-2,6dimethoxy-3-methylamin-benzylamin-Harz (**3d**: 76%).

Darstellung von Benzyl-N-acetyl-2-amino-2desoxy-4,6-O-benzyliden-3-O-(D-1-carboxyethyl)α-D-glucopyranosid (6)

Benzyl-N-acetyl-D-glucosamin (4): In 115 ml Benzylalkohol wird solange HCl-Gas eingeleitet, bis eine 2-proz. Lösung (w/w) entsteht. Anschlie-Bend werden analog Lit. [17] 10 g (0.045 mol) N-Acetylglucosamin zugegeben und die Lösung 3 h bei 100 °C unter Rückfluß gekocht. Zu der nun dunkelbraunen Lösung werden 100 ml Benzol gegeben. Diese Mischung tropft man unter starkem Rühren zu 320 ml abs. Ether, wobei sich eine leicht bräunliche Kristallmasse abscheidet. Das ausgefallene Rohprodukt wird über eine Glasfritte abgesaugt und mit Ether gewaschen. Nach Trocknung über NaOH wird das Produkt aus heißem Ethanol umkristallisiert; Ausbeute 11 g (78%), weiße Kristalle, Schmp.: 178 °C (Lit. [17] 180 °C); $[\alpha]_{\rm D} = +153.7^{\circ} (c = 1 \text{ in Wasser}) \{\text{Lit. [17]} + 158^{\circ}\}$ (c = 1 in Wasser); $R^{D}_{f} = 0.63$; IR (KBr), ν_{max} (cm^{-1}) : 3300 (OH), 3050 / 2940 (CH), 1650 (C= O); ¹H-NMR (DMSO-d₆): $\delta = 7.79$ (d, $J_{NH,2} =$ 8.32 Hz, 1H, NH), 7.32 (m, 5H, aromat. H), 5.00 (d, $J_{1,2} = 5.32$ Hz, 1H, 1-H), 4.69 (d, $J_{\text{gem.}} =$ 12.12 Hz, 1H, PhCHH'), 4.66 (d, 1H, PHCHH'), 4.42 - 4.39 (m, 2H, 3-OH, 4-OH), 4.33 (t, J_{OH,CH2} = 5.00 Hz, 1H, 6-OH), 3.46-3.41 (m, 6H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 6'-H), 1.82 (s, 3H, CH₃); ¹³C-NMR $(DMSO-d_6): \delta = 174.9 C_{Amid}, 143.4, 133.6, 133.0,$ 132.9 Caromat., 101.4 C-1, 78.6 C-5, 76.4, 76.1 C-3/

C-4, 73.2, 66.3 C-6, C_{Benzyl}, 59.23 C-2, 28.0 C_{Me}; FAB-MS, m/z (rel. Int.): 312.2 (78) [M+H]⁺, 204.0 (100) [M+H-Benzylalkohol]⁺.

 $\begin{array}{c} C_{15}H_{21}NO_6 \ (311.33) \\ \text{Ber. } C \ 57.88 \\ \text{Gef. } C \ 56.94 \\ \text{H} \ 6.60 \\ \text{N} \ 4.02\%. \end{array}$

Benzyl-N-acetyl-2-amino-2-desoxy-4,6-O-benzyliden- α -D-glucopyranosid (5): 1 g p-Toluolsulfonsäure \times H₂O wird durch mehrmaliges Lösen in Aceton/Toluol mit anschließendem Abziehen des Lösungsmittels sämtliches Kristallwasser entzogen und dadurch wasserfreie p-Toluolsulfonsäure gewonnen. Nun wird analog der Vorschrift zur Darstellung von Daunosamin [19] verfahren: Im 500 ml Rundkolben mit Blaugel/CaCl₂-Trockenrohr werden 10 g (0.032 mol) 4 in 200 ml DMF mit 5.86 g (0.038 mol) α, α -Dimethoxytoluol und 0.12 g (0.7 mmol) p-Toluolsulfonsäure (wasserfrei) bei 70 °C erhitzt. Nach 3 h ist die Reaktion abgeschlossen (DC-Kontrolle) und das Reaktionsgemisch wird zu 500 ml Eiswasser, welches 4 g NaHCO₃ enthält, unter starkem Rühren getropft. Dabei fällt eine voluminöse Kristallmasse aus. Nach Absaugen und Waschen mit Wasser wird das Produkt erst an Luft und anschließend über P2O5 getrocknet; Ausb. 10.5 g (82%), bräunliche Kristalle, Schmp.: 254 °C (Lit. [25] 257 °C), $[\alpha]_{D}^{20}$ $+114^{\circ}$ (c = 1 in Pyridin) {Lit. [26] $+114^{\circ}$ (c = 1 in Pyridin)}; $R_f^D = 0.81$; IR (KBr), ν_{max} (cm⁻¹): 3300 (OH), 3040 / 3070 (CH), 2950 (CH), 1645 (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 7.83 (d, $J_{NH,2}$ = 8.28 Hz, 1H, NH), 7.30-7.14 (m, 10H, aromat. H), 5.46 (s, 1H, $H_{acetalisch}$), 5.04 (d, $J_{1,2}$ = 5.46 Hz, 1H, 1-H), 4.64 (d, $J_{OH,3}$ = 3.08 Hz, 1H, OH), 4.55 (d, $J_{gem.}$ = 12.52 Hz, 1H, PhCHH'), 4.34 (d, $J_{gem} = 1252$ Hz, 1H, PhCHH'), 3.98-3.35 (m, 6H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 6'-H), 1.69 (s, 3H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ = 169.4 C_{Amid}, 137.6, 128.7, 128.5, 127.9, 127.4, 127.0, 126.6, 126.3 C_{aromat.}, 100.8 C-1, 96.9 Cacetalisch, 82.0 C-5, 68.5, 67.9, 67.2 C-3, C-6 C_{Benzvl}, 62.8 C-4, 54.2 C-2, 22.5 C_{Me}; FAB-MS, m/z (rel. Int.): 799.7 (2) [2M+H]+, 400.3 (43) [M+H]+, 292.1 (14) [M+H-Benzylalkohol]⁺.

 $C_{22}H_{25}NO_6$ (399.44)

Ber. C 66.17 H 6.27 N 3.51%, Gef. C 65.63 H 6.27 N 3.14%.

Benzyl-N-acetyl-2-amino-2-desoxy-4,6-O-benzyliden-3-O-(D-1-carboxyethyl)- α -D-glucopy-ranosid (6): Nach einem kombinierten Verfahren der in den Zitaten [21,27] angegebenen Vorschriften werden zu einer Lösung von 4 g (0.01 mol) 5 in 200 ml 1,4-Dioxan bei 60 °C 0.6 g (0.02 mol) Natriumhydridsuspension (80-proz. in Paraffin) gegeben. Das Gemisch wird auf 95 °C erwärmt und bei dieser Temperatur 1 h gerührt. Nach Abkühlung auf 60 °C werden 4.4 g (0.04 mol) \pm - α -Chlorpropionsäure zugetropft. Dabei fällt eine große Menge fein kristallines Natriumchlorid aus, so daß das Gemisch erst wieder nach ca. 10 min gerührt werden kann. Dann werden nochmals 1.5 g (0.05 mol) der Natriumhydridsuspension vorsichtig zugegeben und das Gemisch 18 h bei 60 °C gerührt. Zur Aufarbeitung werden vorsichtig unter Eiskühlung 200 ml Wasser zugegeben. Nach zweimaligem Waschen mit n-Hexan wird die Lösung mit 6 N HCl auf pH 3 angesäuert. Dabei fällt das Produkt als farblose Kristallmasse aus. Das Rohprodukt wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über P₂O₅ wird aus heißem Methanol umkristallisiert, wobei das entstandene L-Isomere abgetrennt werden kann; Ausb. 3.5 g (74%), farblose Kristalle, Schmp.: 241 °C (Lit. [21] 243 °C); $[\alpha]_{\rm D} = +104.8^{\circ} (c = 1 \text{ in Methanol}) \{\text{Lit. } [21] +98^{\circ} \}$ (c = 1 in Methanol); $R_f^D = 0.54$; IR (KBr), ν_{max} (cm⁻¹): 3300 (OH), 3080 (CH_{aromat}), 2940 (CH), 1720 (C=O_{Säure}), 1650 (C=O_{Amid}) cm⁻¹; ¹H-NMR $(DMSO-d_6): \delta = 7.53 - 7.32$ (m, 11H, aromat. H, NH), 5.58 (s, 1H, $H_{acetalisch}$), 4.90 (d, $J_{1,2}$ = 3.84 Hz, 1H, 1-H), 4.74 (d, J_{gem.} = 11.54 Hz, 1H, PhCHH'), 4.60 (d, $J_{\text{gem}} = 11.54$ Hz 1H, PhCHH'), 4.29–3.75 (m, 7H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 6'-H, H_{Lactvl}), 1.98 (s, 3H, Me_{Acetyl}), 1.33 (d, $J_{CH3, Lactyl} = 6.88$ Hz, 3H, Me_{Lactyl}); ¹³C-NMR (DMSO-d₆), *J*-moduliertes Spinccho: $\delta = 175.3(-) C_{Carboxyl}$, 169.4(-) C_{Amid}, 137.0–125.0 C_{aromat}, 100.3(+) C-1, 96.8(+) C_{Acetyl}, 81.6(+) C-4, 75.9(+) C_{Lactyl}, 75.1 C-3, 69.0(-), 67.9(-). C-6, C_{Benzyl}, 62.9(+) C-5, 53.5(+) C-2, 22.6(+) C_{Me-Acetyl}, 18.7(+) C_{Me-Lactyl}; FAB-MS, m/z (rel. Int.): 472.4 (57) [M+H]+, 454.3 (7) [M+H-H₂O]⁺, 426.1 (7) [M+H-HCOOH]⁺, 364.1 (100) [M+H-Benzylalkohol]⁺.

 $\begin{array}{c} C_{25}H_{29}NO_8 \ (471.51) \\ \text{Ber. C } 63.69 \\ \text{Gef. C } 63.16 \\ \text{H } 6.31 \\ \text{N } 3.34\%. \end{array}$

Allgemeine Vorschrift zur Festphasensynthese der Muramyldipeptide

1 g Harz (**3a**, **3b**, **3c** oder **3d**) werden mit 550 mg (4.07 mmol) HOBt, 920 mg (4.47 mmol) DCC und 1.7 g (4.02 mmol) Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH 3h lang oder mit 180 mg (1.33 mmol) HOBt, 360 mg (1.75 mmol) DCC und 570 mg (1.34 mmol) Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH 5h bei R.T. gekuppelt. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 20-proz.

Piperidin in DMF (v/v) erfolgt die Umsetzung mit 1.25 g (4.02 mmol) Fmoc-L-Ala-OH oder Fmoc-D-Ala-OH in Gegenwart von 550 mg (4.07 mmol) HOBt und 920 mg (4.47 mmol) DCC innerhalb von 3h bei R.T. Nach Entfernung der α -Aminoschutzgruppe erfolgt die Kupplung mit 630 mg (1.34 mmol) Benzyl-*N*-acetyl-2-amino-2-desoxy-4,6-O-benzyliden-3-O-(D-1-carboxyethyl)- α -Dglucopyranosid (6) in Gegenwart von 180 mg (1.33 mmol) HOBt und 360 mg (1.75 mmol) DCC an das Peptidharz. Nach jedem erfolgten Reaktionsschritt wird das Harz mit DMF/MeOH (1:1, v/v), DMF und DCM jeweils dreimal gewaschen. Die Abspaltung des Muramyldipeptids vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung permanenter Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren erfolgt mit 20 ml TFA/Thioanisol (95:5 v/v) innerhalb von 5 h. Nach beendeter Abspaltungsreaktion wird das Harz abgetrennt und die Lösung im Vakuum bei R.T. eingeengt. Der Rückstand wird in 3 ml $H_2O/$ AcOH (99:1 v/v) aufgenommen und das Rohprodukt mit abs. Ether bei 0 °C ausgefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit abs. Ether gewaschen. Nach HPLC-Trennung (Bedingungen: Säule: SS 250 $\frac{1}{2}$ "/10 Nucleosil[®] 7 C₁₈; Eluenten: A: 0.05% TFA/H₂O (v/v), B: TFA/H₂O/CH₃CN 0.05:60:40 (v/v); Gradient: 0-5 min 95% A, 6-51 min linear 95-5% A; Flußrate: 2.5 ml/min; Detektion bei $\lambda = 214$ nm) und Lyophilisation der Fraktionen erhält man die Reinprodukte.

Benzyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglut-

amin (7a): Die Festphasensynthese wird mit dem 2-Benzyloxy-4,6-dimethoxy-benzylamin-Harz (3a) durchgeführt. Die Abspaltungsdauer des Produktes vom Harz beträgt 1.5 h; Ausb. 250 mg (53.3%), farbloses Lyophilisat, Schmp.: 152 °C; $[\alpha]_D^{20} =$ +22.2° (c = 0.2 in Wasser), $R_f^b = 0.74$; ¹H-NMR $(DMSO-d_6): \delta = 8.32 (d, J = 7.00 Hz, 1H, NH),$ 7.93-7.89 (m, 2H, 2 × NH), 7.23-6.93 (m, 7H, aromat. H, NH₂), 4.50 (d, $J_{\text{gem.}} = 12.3 \text{ Hz}, 1\text{H}, \text{Ph}H\text{H}'$), 4.43 (d, $J_{1.2}$ = 3.5 Hz, 1H, 1-H), 4.26 (d, J_{gem} =12.3 Hz 1H, PhHH'), 4.02 (q, $J_{Lactyl,Me-Lactyl} = 7.00$ Hz, 1H, H_{Lactvl}), 3.96–3.92 (m, 2H, H_{Ala}, Hα_{-iGln}), 3.75 (m, 1H, 2-H), 3.48 (d, $J_{6.6}$ = 10.7 Hz, 1H, 6-H), 3.36 (d, $J_{6,6} = 10.7$ Hz, 1H, 6'-H), 3.34–3.21 (m, 3-H, 4-H, 5-H, 3-OH, 4-OH, H₂O), 2.00 (t, Jγ_{-iGln}, $\beta_{-iGln} = 7.7 \text{ Hz}, 2\text{H}, \gamma_{iGln}\text{-}\text{CH}_2), 1.82 \text{ (m, 1H, }\beta_{iGln}\text{-}$ CHH'), 1.66 (s, 3H, Me_{Acetyl}), 1.48 (m, 1H, β_{iGln} -CHH'), 1.06 (d, $J_{\text{Me-Lactyl,Lactyl}} = 7.00 \text{ Hz}$, 3H, Me_{Lactyl}), 0.99 (d, $J_{Me-Ala,Ala} = 6.90$ Hz, 3H, Me_{Ala}); FAB-MS, m/z (rel. Int.): 583.61 (58) [M+H]⁺, 475.0 (16) [M+H-Benzylalkohol]⁺, 437.0 (12) [M+H-Isoglutamin]⁺, 329.2 (34) [M+H-Benzylalkohol-Isoglutamin]⁺, 289.0 (62) $[M-H_2]^{2+}$.

 $\begin{array}{c} C_{26}H_{38}N_4O_{11}\ (582.61)\\ \text{Ber. C } 53.61 \ \text{H } 6.53 \ \text{N } 9.62\%,\\ \text{Gef. C } 56.79 \ \text{H } 6.98 \ \text{N } 10.58\%. \end{array}$

Benzyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-L-isoglutamin (7b): Die Festphasensynthese wird am 2-Benzyloxy-4,6-dimethoxy-benzylamin-Harz (3a) durchgeführt. Die Abspaltung des Produktes vom Harz wird innerhalb von 2 h durchgeführt; Ausb. 260 mg (60.4%), farbloses Lyophilisat, Schmp.: 141 °C; $[\alpha]_{\rm D}^{20} = +4.9^{\circ} (c = 0.2 \text{ in Wasser}); R_f^{\rm b} = 0.72; {}^{1}\text{H-}$ NMR (DMSO-d₆): $\delta = 8.11$ (m, 2H, 2 × NH), 7.57 (d, J = 7.5 Hz, 1H, NH), 7.37–7.30 (m, 5H, aromat. H), 7.09 (s, 2H, NH₂), 4.73 (d, $J_{1,2} = 3.1$ Hz, 1H, 1-H), 4.65 (d, $J_{\text{gem.}} = 12.5$ Hz, 1H, PhHH'), 4.46 $(d, J_{gem} = 12.5 \text{ Hz}, 1\text{H}, \text{PhH}H'), 4.32 - 4.12 \text{ (m, 3H,}$ $H_{Lactvl}, H_{Ala}, H\alpha_{-iGln}$, 3.80 (m, 1H, 2-H), 3.66 (m, 1H, 6-H), 3.55–3.48 (m, 2H, 4-H,6'-H), 3.45–3.25 (m,4H, 3-H, 5-H, 3-OH, 4-OH, H₂O), 2.19 (t, $J_{\gamma-iGln, \beta-iGln} = 7.5 \text{ Hz}, 2\text{H}, \gamma_{iGln}-\text{CH}_2), 1.93 \text{ (m, 1H,}$ β_{iGln} -CHH'), 1.79 (s, 3H, Me_{Acetyl}), 1.75 (m, 1H, β_{iGln} -CHH'), 1.25 (d, $J_{Me-Lactyl,Lactyl} = 6.68$ Hz, 3H, Me_{Lactyl}), 1.22 (d, $J_{Me-Ala,Ala} = 7.07$ Hz, 3H, Me_{Ala}); FAB-MS, m/z (rel. Int.): 605.3 (6) [M+Na]⁺, 583.3 (35) [M+H]⁺, 475.2 (7) [M+H-Benzylalkohol]⁺, 437.1 (5) [M+H-Isoglutamin]⁺, 289.7 (21) [M-H₂]²⁺.

 $C_{26}H_{38}N_4O_{11}$ (582.61)

Ber. C 53.61 H 6.53 N 9.62%, Gef. C 51.27 H 5.87 N 10.29%.

Benzyl-N-acetyl-muramyl-D-alanyl-L-isoglutamin (7c): Für die Festphasensynthese wird das 4-Benzyloxy-2,6-dimethoxy-3-methylamin-benzylamin-Harz (3d) verwendet. Die Abspaltungsdauer des Produktes vom Harz beträgt 3.5 h; Ausb. 180 mg (52.4%), farbloses Lyophilisat, Schmp.: 138 °C; $[\alpha]_{D}^{20}$ +29.7° (c = 0.2 in Wasser); $R_{f}^{B} = 0.75$; ¹H-NMR (DMSO-d₆): $\delta = 8.68$ (d, J = 6.8 Hz, 1H, NH), 8.28-8.24 (m, 2H, $2 \times$ NH), 7.59-7.22 (m, 7H, aromat. H, NH₂), 4.91 (d, $J_{1,2}$ = 3.4 Hz, 1H, 1-H), 4.84 (d, J_{gem.}= 12.45 Hz, 1H, PhHH'), 4.61 (d, $J_{\text{gem}} = 12.45$ Hz 1H, PhHH'), 4.46–4.32 (m, 3H, H_{Lactyl} , H_{Ala} , $H\alpha_{-iGln}$), 4.04 (m, 1H, 2-H), 3.98 (d, $J_{6,6} = 10.5$ Hz, 1H, 6-H), 3.84 (d, $J_{6,6'} = 10.5$ Hz 1H, 6'-H), 3.75-3.46 (m, 3-H, 4-H, 5-H, 3-OH, 4-OH, H₂O), 2.37 (t, $J\gamma_{-iGln}$, β_{-iGln} = 7.8 Hz, 2H, γ_{iGln} -CH₂), 2.13 (m, 1H, β_{iGln} -CHH'), 1.96 (s, 3H, Me_{Acetyl}), 1.87 (m, 1H, β_{iGln} -CHH'), 1.42 (d, $J_{\text{Me-Lactyl,Lactyl}} = 6.7 \text{ Hz}, 3\text{H}, \text{Me}_{\text{Lactyl}}$, 1.39 (d, $J_{\text{Me-Ala,Ala}} = 7.0$ Hz, 3H, Me_{Ala}); FAB-MS, m/z(rel. Int.): 583.2 (60) [M+H]⁺, 475.0 (7) [M+H-Benzylalkohol]⁺, 437.0 (12) [M+H-Isoglutamin]⁺.

$C_{26}H_{38}N_4C$	D ₁₁ (582.6	1)	
Ber.	C 53.61	H 6.53	N 9.62%,
Gef.	C 50.98	H 5.88	N 9.23%.

Benzyl-N-acetyl-muramyl-D-alanyl-D-isoglutamin (7d): Zur Festphasensynthese wird das 4-Benzyloxy-2,6-dimethoxy-benzylamin-Harz (3b) eingesetzt. Die Abspaltung des Produktes vom Harz erfolgt in 5 h; Ausb. 160 mg (43.6%), farbloses Lyophilisat, Schmp.: 157 °C; $[\alpha]_D^{20} = +34.3^\circ$ (c = 0.2 in Wasser); $R_f^{B} = 0.74$; ¹H-NMR (DMSO-d₆): $\delta = 8.13$ (d, J = 7.00 Hz, 1H, NH), 7.81 (d, J = 8.00 Hz, 1H,NH), 7.60 (d, J = 7.3 Hz, 1H, NH), 7.17-6.88 (m, 7H, aromat. H, NH₂), 4.66 (d, $J_{1,2} = 3.3$ Hz, 1H, 1-H), 4.47 (d, $J_{\text{gem.}} = 12.5$ Hz, 1H, PhHH'), 4.29 (q, $J_{\text{Lactyl,Me-Lactyl}} = 6.88 \text{ Hz}, 1\text{H}, \text{H}_{\text{Lactyl}}, 4.24 \text{ (d},$ $J_{\text{gem}} = 12.5 \text{ Hz} 1 \text{H}, \text{PhH}H'$), 4.17-4.00 (m, 2H, $H_{Ala}, H_{\alpha-iGln}$, 3.50 (m, 1H, 2-H), 3.45 (d, $J_{6,6}$ = 10.3 Hz, 1H, 6-H), 3.35-3.13 (m, 3-H, 4-H, 5-H, 6'-H, 3-OH, 4-OH, H₂O), 2.03 (t, $J\gamma_{-iGln}$, β_{-iGln} = 6.74 Hz, 2H, γ_{iGln} -CH₂), 1.74 (m, 1H, β_{iGln} -CHH'), 1.64 (s, 3H,Me_{Acetyl}), 1.58 (m, 1H, β_{iGln} -CHH'), 1.07 (d, $J_{\text{Me-Lactyl,Lactyl}} = 6.88$ Hz, 3H, Me_{Lactyl}), 1.05 (d, $J_{Me-Ala,Ala} = 7.12$ Hz, 3H, Me_{Ala}); FAB-MS, m/z (rel. Int.): 621.1 (7) $[M+K]^+$, 605.2 (15) $[M+Na]^+$, 583.2 (44) $[M+H]^+$, 475.2 (20) $[M+H^-$ Benzylalkohol]⁺, 437.1 (19) [M+H-Isoglutamin]⁺.

 $C_{26}H_{38}N_4O_{11}$ (582.61)

Ber. C 53.61 H 6.53 N 9.62%, Gef. C 53.40 H 6.89 N 9.58%.

Allgemeine Vorschrift zur Hydrierung der Benzyl-N-acetyl-muramyldipeptide

Die isolierten Benzyl-N-acetyl-muramyldipeptide 7a-d werden jeweils in 5 ml Methanol/AcOH (99:1, v/v) gelöst. Es wird eine Spatelspitze Palladium auf Aktivkohle (10-proz.) als Katalysator hinzugegeben und dann in einer Hydrierapparatur jeweils 18 h lang hydriert. Nach Abfiltration des Katalysators über Celite wird die Lösung unter Vakuum eingeengt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Reinheitskontrolle der isolierten N-Acetyl-muramyldipeptid-Isomeren 8a-d erfolgt durch HPLC. Wie die HPLC-Untersuchungen zeigen, fallen die Muramyldipeptidderivate in hoher Reinheite an (Chromatographische Bedingungen: Säule: LiChrospher[®] RP-18 5 µm; Eluenten: A: 0.05% TFA in H_2O (v/v), B: TFA/ H_2O/CH_3CN 0.05:40:60 (v/v); Gradient: 0-1 min 95% A, 1-31 min linear 95-5% A; Flußrate 1 ml min; Detektion bei λ = 214 nm).

N-Acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (8a): 230 mg (0.40 mmol) Benzyl-N-acetyl-muramyl-Lalanyl-D-isoglutamin (7a) werden hydriert; Ausb. 170 mg (87.4%), farbloses Lyophilisat, Schmp.: 192 °C (Lit. [28] 190–194 °C); $[\alpha]_{\rm D}^{20} = +30.8^{\circ}$ (c = 0.2 in Wasser) {Lit. $[29] + 33^{\circ} (c = 0.5 \text{ in Wasser})$; $R_f^{\rm B} = 0.25$; ¹H-NMR (D₂O): $\delta = 5.17$ (d, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, 1H, 1-H), 4.40–4.27 (m, 2H, H_{Lactyl} , $H_{\alpha-iGln}$), 4.23 (q, $J_{Ala,Me-Ala} = 6.72$ Hz, 1H, H_{Ala}), 4.00–3.49 (m, 6H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 6'-H), 2.48 (t, $J_{\gamma-iGln, \beta-iGln} = 7.2$ Hz, 2H, γ_{iGln} -CH₂), 2.22 (m, 1H, β_{iGln} -CHH'), 1.99 (s, 3H, Me_{Acetvl}), 1.97 (m, 1H, β_{iGln} -CHH'), 1.08 ($J_{Me-Lactyl, Lactyl} = 7.20$ Hz, 3H, Me_{Lactyl}), 1.03 (d, $J_{Me-Ala,Ala} = 6.72$ Hz, 3H, Me_{Ala} ; FAB-MS; m/z (rel. Int.): 514.9 (8) [M+Na]⁺, 493.0 (61) [M+H]⁺, 475.0 (29) [M+H- H_2O^+ , 347.1 (21) [M+H-Isoglutamin]⁺.

 $\begin{array}{c} C_{19}H_{32}N_4O_{11} \ (492.48) \\ \text{Ber. } C \ 46.34 \\ \text{Gef. } C \ 49.46 \\ \text{H} \ 6.98 \\ \text{N} \ 11.38\%, \end{array}$

N-Acetyl-muramyl-L-alanyl-L-isoglutamin (**8b**): 220 mg (0.38 mmol) Benzyl-N-acetyl-muramyl-Lalanyl-L-isoglutamin (7b) werden hydriert; Ausb. 155 mg (83.3%), farbloses Lyophilisat, Schmp.: 186 °C; $[\alpha]_D^{20} = +19.4^\circ$ (c = 0.2 in Wasser) (Lit. [30] $+16^{\circ}$ (c = 0.5 in Wasser); $R_f^{\rm B} = 0.23$; ¹H-NMR (D₂O): δ = 5.16 (d, $J_{1,2}$ = 3.5 Hz, 1H, 1-H), 4.36-4.22 (m, 3H, H_{Lactyl}, H_{Ala, HiGln}), 3.97 $(dd, J_{2,3} = 10.4 \text{ Hz} J_{2,1} = 3.5 \text{ Hz}, 1\text{H}, 2\text{-H}), 3.93 \text{-}$ 3.48 (m, 5H, 3-H 4-H 5-H 6-H 6'-H), 2.47 (td, $J_{\gamma-iGln, \beta-iGln} = 7.38$ Hz, $J_{\gamma-iGln, \alpha-iGln} = 2.70$ Hz, 2H, γ_{iGln} -CH₂), 2.14 (m, 1H, β_{iGln} -CHH'), 1.99 (m, 1H, β_{iGln} -CHH'), 1.98 (s, 3H, Me_{Acetyl}), 1.42 (d, $J_{\text{Me-Lactyl,Lactyl}} = 7.30$ Hz, 3H, Me_{Lactyl}), 1.39 (d, $J_{\text{Me-Ala,Ala}} = 6.80$ Hz, 3H, Me_{Ala}); FAB-MS, m/z (rel. Int.): 531.0 (99) [M+K]⁺, 515.0 (74) [M+Na]⁺, 493.0 (52) [M+H]⁺, 475.0 (36) [M+H- H_2O^{+} , 329.0 (75) [M+H-H₂O-Isoglutamin]⁺.

 $\begin{array}{c} C_{19}H_{32}N_4O_{11} \ (492.48) \\ \text{Ber. C } 46.34 \quad \text{H } 6.50 \quad \text{N } 11.38\%, \\ \text{Gef. C } 46.68 \quad \text{H } 6.71 \quad \text{N } 11.43\%. \end{array}$

N-Acetyl-muramyl-D-alanyl-L-isoglutamin (8c): 150 mg (0.26 mmol) Benzyl-*N*-acetyl-muramyl-Dalanyl-L-isoglutamin (7c) werden hydriert; Ausb. 105 mg (82.8%), farbloses Lyophilisat, Schmp.: 188 °C; $[a]_D^{-0} = +40.6^{\circ} (c = 0.2 \text{ in Wasser})$ {Lit. [31] +51° (c = 0.5 in Essigsäure)}; $R_f^B = 0.25$; ¹H-NMR (D₂O): $\delta = 5.26$ (d, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, 1H, 1-H), 4.43– 4.31 (m, 3H, H_{Lactyl}, H_{Ala}, H_{iGln}), 4.05 (dd, $J_{2,3} =$ 10.3 Hz, $J_{2,1} = 3.4$ Hz, 1H, 2-H), 3.91 (m, 2H, 6-H, 6'-H), 3.79 (dd, $J_{4,3} = 10.1$ Hz, $J_{4,5} = 10.1$ Hz, 1H, 4-H), 3.66 (dd, $J_{3,2} = 10.3$ Hz, $J_{3,4} = 10.3$ Hz, 1H, 3-H), 3.56 (m, 1H, 5-H), 2.52 (t, $J\gamma_{-iGln}\beta_{-iGln} = 7.4$ Hz, 2H, γ_{iGln} -CH₂), 2.21 (m, 1H, β_{iGln} -CHH'), 2.09 (m, 1H, β_{iGln} -CHH'), 2.07 (s, 3H, Me_{Acetyl}), 1.54 (d, $J_{Me-Lactyl,Lactyl} = 7.2$ Hz, 3H, Me_{Lactyl}), 1.47 (d, $J_{Me-Ala,Ala} = 6.8$ Hz, 3H, Me_{Ala}); LD-MS, m/z (rel. Int.): 532 (26) [M+K]⁺, 515 (33) [M+Na]⁺.

 $\begin{array}{c} C_{19}H_{32}N_4O_{11} \ (492.48) \\ \text{Ber. C } 46.34 \quad \text{H } 6.50 \quad \text{N } 11.38\%, \\ \text{Gef. C } 44.92 \quad \text{H } 6.23 \quad \text{N } 10.83\%. \end{array}$

N-Acetyl-muramyl-D-alanyl-D-isoglutamin (8d) 140 mg (0.24 mmol) Benzyl-*N*-acetyl-muramyl-D-alanyl-D-isoglutamin (7d) werden hydriert; Ausb. 90 mg (76.0%), farbloses Lyophilisat, Schmp.: 197 °C; $[\alpha]_{D}^{0} = +57.30^{\circ} (c = 0.2 \text{ in Wasser})$ {Lit. [31] +68° (c = 0.5 in Essigsäure)}; $R_{f}^{B} = 0.21$; ¹H-NMR (D₂O): $\delta = 5.10$ (d, $J_{1,2} = 3.48$ Hz, 1H, 1-H), 4.29

- F. Audibert, L. Chédid, P. Lefrancier, J. Choay, Cellular Immunology 21, 243 (1976).
- [2] E. Lederer, L. Chédid, Immunological Approaches to Cancer Therapeutics, Herausgeber E. Mihich, 108 (1982).
- [3] A. Adam, E. Lederer, Med. Res. Rev. 4, 111 (1984).
- [4] P. Lefrancier, E. Lederer, Fortschr. d. Chem. Org. Naturst. 40, 1 (1981).
- [5] S. Kotani, Y. Watanabe, F. K¹ toshita, T. Shimono, I.Morisaki, T. Shiba, S. Kusumoto, Y. Tarumi, K. Ikenaka, Biken J. 18, 105 (1975); C. A.83 (19), 161981 z.
- [6] P. Lefrancier, M. Derrien, X. Jamet, J. Choay, E. Lederer, F. Audibert, M. Parant, F. Parant, L. Chédid, J. Med. Chem. 25, 87 (1982).
- [7] T. Furuya, Y. Kumazawa, H. Takimoto, T. Nagumo, M. Kiso, A. Hasegawa, K. Nomoto, Int. J. Immunopharmacol. 13, 573 (1991).
- [8] P. Breton, C. Petit, M. T. Bousser, M. Monsigny, R. Mayer, A. C. Roche, Oncol. Res. 4, 103 (1992).
- [9] I.Azuma, H. Okumura, I. Saiki, M. Kiso, A. Hasegawa, Y. Tanio, Y. Yamamura, Infect. Immun. 33, 834 (1981).
- [10] E. B. Fraser-Smith, T. R. Matthews, Infect. Immun. 34, 676 (1981).
- [11] E. Lederer, J. Med. Chem. 23, 819 (1980).
- [12] H. Paulsen, P. Himpkamp, T. Peters, Liebigs Ann. Chem. 664 (1986).
- [13] P. Walder, E. Buchar, Z. Machkova, T. Vrba, M. Flegel, I. Janku, K. Masek, Immunopharmacol. Immunotoxicol. 13, 101 (1991).
- [14] K. Dzierzbicka, A. M. Kolodziejczyk, D. Sosnowska, A. Mysliwski in Peptides 1992 (Hrsg: C. H. Schneider, A. N. Eberle) S. 889, ESCOM Leiden (1993).
- [15] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, Anal. Biochem. 34, 595 (1970).

(q, $J_{\text{Lactyl,Me-Lactyl}} = 6.93$ Hz, 1H, H_{Lactyl}), 4.26– 4.15 (m, 2H, H_{Ala} , $H\alpha_{\text{-iGln}}$), 3.81 (dd, $J_{2,3} = 10.4$ Hz, $J_{2,1} = 3.48$ Hz, 1H, 2-H), 3.78–3.37 (m, 5H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H, 6'-H), 2.39 (t, $J_{\gamma\text{-iGln},\beta\text{-iGln}} = 6.6$ Hz, γ_{iGln} -CH₂), 2.05 (m, 1H, β_{iGln} -CHH'), 1.91 (s, 3H, Me_{Acetyl}), 1.90 (m, 1H, β^{-}_{iGln} -CHH'), 1.30 (d, $J_{\text{Me-Lactyl,Lactyl}} = 6.93$ Hz, 3H, Me_{Lactyl}), 1.27 (d, $J_{\text{Me-Ala,Ala}} = 6.58$ Hz, 3H, Me_{Ala}); FAB-MS, m/z(rel. Int.): 531.0 (8) [M+K]⁺, 516.1 (16) [M+Na]⁺, 493.1 (65) [M+H]⁺, 475.2 (32) [M+H-H₂O]⁺, 347.1 (12) [M+H-Isoglutamin]⁺.

C₁₉H₃₂N₄O₁₁ (492.48)

Ber. C 46.34 H 6.50 N 11.38%, Gef. C 46.26 H 6.94 N 11.94%.

Dank

Wir danken dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

- [16] E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1145 (1895).
- [17] A. Arendt, A. Koodziejczyk, T. Sokoowska, Roczniki Chemii Ann. Soc. Chim. Polonorum 48, 1707 (1974).
- [18] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 2. Auflage 148 (1984).
- [19] D. Horton, W. Weckerle, Carbohydr. Res. 44, 227 (1975).
- [20] R. W. Jeanloz, E. Walker und P. Sinaÿ, Carbohydr. Res. 6, 184 (1968).
- [21] T. Osawa, R. W. Jeanloz, J. Org. Chem. 30, 448 (1965).
- [22] T. D. J. Halls, M. S. Raju, E. Wenkert, M. Zuber, P. Lefrancier, E. Lederer, Carbohydr. Res. 81, 173 (1980).
- [23] D. Erne, pers. Mitteilung, Fa. Bachem, Heidelberg (1992).
- [24] J. Shao, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen (1992).
- [25] R. Kuhn, H. H. Baer, A. Seeliger, Liebigs Ann. Chem. 236 (1958).
- [26] P. H. Gross, R. W. Jeanloz, J. Org. Chem. **32**, 2759 (1967).
- [27] M. Imoto, S. Kageyama, S. Kusumoto, M. Kohno, K. Matsumoto, S. Hashimoto, A. Tohgo, T. Shiba, Bull. Chem. Soc. Jpn. 57, 3207 (1986).
- [28] P. K. Misra, W. Haq, S. B. Katti, K. B. Mathur, J. Chem. Research (S), 374 (1988).
- [29] Analytical Data Sheet zu MDP, Firmenschrift Fa. Bachem, Heidelberg.
- [30] S. Kusumoto, Y. Tarumi, K. Ikenaka, T. Shiba, Bull. Chem. Soc. Jpn. 49, 533 (1976).
- [31] P. Lefrancier, J. Choay, M. Derrien, I. Lederman, Int. J. Pep. Protein Res. 9, 249 (1977).