## Darstellung funktionalisierter Mono- und Disaccharid-Derivate und Untersuchung ihrer Rolle bei inter- sowie intrazellulären Erkennungsprozessen

### Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades am Department Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

> vorgelegt von Eugen Beketow aus Karaganda/Kasachstan

> > Hamburg 2010

- 1. Gutachter: Prof. Dr. J. Thiem
- 2. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer

Tag der Disputation: 26. November 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2004 bis November 2010 im Arbeitskreis von Prof. Dr. J. Thiem am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg gefertigt. Die biochemischen Untersuchungen wurden im Arbeitskreis Prof. T. Braulke am Universitätskrankenhaus Eppendorf durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. J. Thiem möchte ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung, den gewährten wissenschaftlichen Freiraum und die freundliche und großzügige Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit danken.

## Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. Ladungstragende Kohlenhydrate in biologischen Systemen	1
1.2. Untersuchungen der Rolle sulfatierter Kohlenhydrate bei	
Erkennungsprozessen auf der Zelloberfläche	4
1.3. Mucopolysaccharid-Speichererkrankungen und chemische Chaperone	6
1.4. Nojirimycin als Glycosidaseninhibitor	8
2. Aufgabenstellung	10
3. Synthese der Thiobutylglycoside	12
3.1. Glycosylierungen	13
3.1.1. Glucoside und Galactoside	13
3.1.2. Lactosid	15
3.1.3. N-Acetylglucosamin-Derivat	17
3.2. Thiole, Disulfide und Thioacetate	18
4. Untersuchungen zur Sulfatierung	20
4.1. 6- <i>O</i> -Sulfate	20
4.2. 3- <i>O</i> -Sulfate	21
4.3. 3'- und 6'-Sulfatierung am Lactosid	25
4.3. <i>N</i> -Sulfatierung	27
5. AFM-Messungen	28
5.1. Methode	28
5.2. Ergebnisse	32
6. Glucosamin-Derivate	39
6.1. Vorbereitung der Derivatisierung	40
6.2. Derivatisierungen am Stickstoff.	41
6.2.1. <i>N</i> -Methylsulfonamid	41
6.2.2. <i>N</i> -Methansulfonat	42
6.2.3. <i>N</i> -Phosphat	43

7. 1,2-Dideoxy-2-sulfamido-nojirimycin	45
7.1. 1,2-Dideoxy-2-acetamido-nojirimycin	46
7.2. N-Sulfatierung	51
0. European etische Unterne ehren eine	5.4
8. Enzymatische Untersuchungen	54
8.1. Messmethode	57
8.2. Ergebnisse	58
9. Zusammenfassung	61
10 Summary	63
	00
11 Experimentaller Teil	65
11. Experimentener Ten	03
12. Sicherheitshinweise	110
13. Literatur	111

#### **<u>1. Einleitung</u>**

#### 1.1. Ladungstragende Kohlenhydrate in biologischen Systemen

Mit fortschreitender Erforschung der Kohlenhydrate als Teil der Biosphäre stieg das Interesse an ladungstragenden Mono- und Polysacchariden. Die Carboxylat-, Phosphat- oder Sulfat-Gruppen tragenden Saccharide sind an einer Vielzahl von Prozessen im lebenden Organismus beteiligt. Dazu zählen z.B. die energiereichen Nucleosidtriphosphate ATP (Adenosintriphosphat), UTP (Uridintriphosphat), CTP (Cytidintriphosphat) und GTP (Guanosintriphosphat), die als Coenzyme agieren. Die Monosaccharid-6-phosphate sind wichtige Zwischenprodukte bei Kohlenhydrat-Stoffwechsel-Prozessen (Abb. 1).



Abbildung 1: Phosphatierte Kohlenhydratderivate.

Carboxylat-Gruppen finden sich unter anderem bei Neuramin- und Uronsäuren. Die Neuraminsäure ist ein Bestandteil von Glycoproteinen und Glycolipiden. (Abb. 2)



Abbildung 2: N-Acetylneuraminsäure.

Als Beispiel für eine Uronsäure dient die Glucuronsäure, die unter anderem als Bestandteil in Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Dermatansulfat und Heparin auftritt (Abb. 3).<sup>[1]</sup>



Abbildung 3: Beispiele für Kohlenhydrate mit Carboxylat- und Sulfatgruppen.

Bei den in Abbildung 2 und 3 gezeigten Strukturen sind neben Carboxylat-Gruppen auch Sulfat-Gruppen anwesend. Die Anzahl der Beispiele für sulfatierte Kohlenhydrate in lebenden Organismen ist groß. Das wohl wichtigste Beispiel für sulfatierte Glykosaminoglykane ist das hochsulfatierte Heparin, dessen Rolle bei der Blutgerinnung seit langer Zeit bekannt ist. Es tritt in den Granula der Mastzellen entlang der Arterienwände auf. Heparin ist variabel sulfatiert, durchschnittlich ergeben sich zweieinhalb Sulfatreste pro Disaccharideinheit (Abb.4).<sup>[1]</sup>



Abbildung 4: Heparinstruktureinheit.

Auch im Immunsystem kommt den sulfatierten Kohlenhydraten eine wichtige Rolle zu. Damit Leukozyten, die weißen Blutkörperchen, an die geschädigte Stelle gelangen, müssen sie den Blutkreislauf verlassen und dafür an der Oberfläche von Endothelzellen entlang der Blutgefäße binden. Daran beteiligt sind Selektine, eine Gruppe von Kohlenhydrat-bindenden Proteinen, und ihre Glykoproteinliganden. Endothelzellen produzieren auf ihrer Oberfläche Selektine. Alle Selektine erkennen und binden Zelloberflächen-Glykoproteine mit folgender Oligosaccharidstruktur (Sialyl-LewisX-Ligand) (Abb. 5).<sup>[1-3]</sup>



Abbildung 5: Struktureinheit eines sulfatierten Sialyl-LewisX-Liganden

Die gegenseitige Selektin-Oligosaccharid-Erkennung zwischen Leukozyten und Endothelzellen erlaubt es den Leukozyten, die Gefäßwand zu durchdringen und sich am Entzündungsherd zu sammeln.<sup>[4]</sup>

Sulfatierte Polysaccharide sind ebenfalls von Bedeutung für die Behandlung von AIDS (Syndrom der erworbenen Immunschwäche). Durch HIV (menschliches Immunschwäche-Virus) wird das menschliche Immunsystem irreparabel zerstört, eine Behandlung muss so früh wie möglich erfolgen, um Überlebenschancen zu verbessern. Zu den antiviralen Chemotherapeutika, die möglicherweise für die AIDS-Behandlung eingesetzt werden können, gehört das synthetische Hoe/Bay 946, ein Xylanpolysulfat (Abb. 6).<sup>[5, 54, 55]</sup> Seine genaue Wirkungsweise ist noch nicht bekannt. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass die Wirksamkeit auf die Anwesenheit der Sulfatgruppen am Kohlenhydrat zurückzuführen ist, da die Sulfationen den ionischen Charakter erhöhen und die elektrostatischen Wechselwirkungen des Moleküls mit anderen Molekülen ändern.



Abbildung 6: Struktureinheit von Xylanpolysulfat.

Ein auf Xylanpolysulfat basierendes Medikament namens Elmiron® wird seit einigen Jahren in den USA gegen die interstitielle Zystitis eingesetzt.<sup>[6, 54]</sup>

# 1.2 Untersuchungen der Rolle sulfatierter Kohlenhydrate bei Erkennungsprozessen auf der Zelloberfläche

Eine der großen Herausforderungen in der modernen bioorganischen Chemie stellt das Verstehen der molekularen Basis von interzellulären Wechselwirkungen dar. Die Erkennungsprozesse auf der Zelloberfläche sind von großer Bedeutung für Medizin, denn daraus lässt sich z.B. die Chemie der bakteriellen Erkrankungen ableiten. Außerdem ist prinzipielles Verständnis der Erkennungsmechanismen ein Schlüssel bei der Entwicklung von neuen und verträglichen Präparaten zur Bekämpfung von Krankheiten.

Die Glykokalix ist die äußere Barriere, die eine Zelle von ihrer Umgebung abschirmt. Sie besteht zum größten Teil aus Kohlenhydratderivaten und kontrolliert den selektiven Molekülund Ionenaustausch zwischen den Zellen. Dies kann zum Beispiel über die Ionenaustauschkanäle geschehen. Dabei entscheidet der Anteil der Hydratationsenergie darüber, ob ein Ion in die Zelle hineingeschleust wird oder nicht.<sup>[7]</sup> Aber auch ohne die Ionenkanäle werden Ionen und Moleküle erkannt und transportiert. Es gibt bisher keine genauen Informationen über die Mechanismen solcher Erkennungsprozesse, aber sehr wohl Vermutungen, wie diese funktionieren könnten.<sup>[7]</sup>

Die Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkung wurde lange Zeit als schwach beschrieben und für wenig bedeutend gehalten. Dass diese Wechselwirkung nicht desto trotz sehr wichtig ist, zeigten Bucior *et al.* in einer Arbeit über Erkennung von Perlen durch verschiedene Schwammarten, in der sie die Rolle der Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkung und ihrer Spezifität in Verbindung mit Ca<sup>+</sup>-Ionen in Zellorganisation beschrieben haben.<sup>[67]</sup>

Außerdem haben FTIR (Fourier-Transformation Infrarot) - spektroskopische Untersuchungen einer Myelinhülle gezeigt, dass Ca<sup>2+</sup>-Ionen und Sulfatgruppen von Cerebrosidsulfat (Glykolipidenart) miteinander wechselwirken.<sup>[8]</sup>

Da auch in der Glykokalix ladungstragende Kohlenhydrate anwesend sind, liegt die Vermutung nahe, dass die Erkennung und somit die Vermittlung von Ionen und Molekülen in die Zelle durch die Anwesenheit von Anionen (unter anderem auch Sulfationen) und ihrer Wechselwirkung mit Gegenionen (z.B. Ca<sup>2+</sup>) ermöglicht werden könnte. Ähnlich funktioniert der so genannte "Second Messenger" – Mechanismus, bei dem Ca<sup>2+</sup>-Ionen als Folgeglieder einer Signalkette auftreten.<sup>[9,10]</sup>

Es ist von großer Bedeutung, diesen Mechanismus und sein Ausmaß verstehen zu können, denn dann wäre es möglich, allgemeine Rückschlüsse über die Wechselwirkung der geladenen Teilchen, aber auch ungeladener Teilchen auf der Zelloberfläche zu ziehen.

Da es außer biochemischen Methoden kaum Verfahren gibt, intra- und interzelluläre Wechselwirkungen unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, um die Frage nach Erkennungsmechanismen zu beantworten, kommen synthetische Mimetika zur Anwendung. Natürliche Prozesse können damit simuliert werden. Somit können mit Hilfe der physikalischen Methoden die Wechselwirkungen zwischen entsprechenden Ionen und Molekülen untersucht werden.

Eine solcher Methoden ist die Rasterkraft-Mikroskopie (Englisch AFM: Atomic force microscopy oder auch SPM: scanning probe microscopy).<sup>[11]</sup> Dabei wird die zu untersuchende Substanz auf zwei Oberflächen (einer mobilen und einer stationären) immobilisiert. Die mobile Oberfläche wird sehr dicht und kontrolliert an der stationären in "Force Mode" (ohne in physischen Kontakt zu kommen) entlang geführt, wobei die übereinander liegenden Moleküle miteinander wechselwirken können.<sup>[12,13]</sup> Die Wechselwirkung kann als Kraft-Abstand-Kurve aufgezeichnet werden (Abb. 7).



Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Rasterkraftexperimentes im "Force Mode". Moleküle werden auf Oberflächen immobilisiert, die sich kontrolliert annähern. Eine Kraft-Abstand-Kurve kann mit dem AFM aufgezeichnet werden.

Das Experiment wird unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Sämtliche Faktoren, die in einem lebenden Organismus eine Rolle spielen, werden simuliert und die Wertgrenzen berücksichtigt. Das betrifft vor allem den pH-Wert, die Konzentrationen von Ionen in der Lösung (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) und die Umgebungstemperatur.

Die auf diese Weise ermittelte Kraft-Abstand-Kurve ist charakteristisch wie ein Fingerabdruck für jedes miteinander wechselwirkende Molekülenpaar. Der Kurvenverlauf ändert sich in Abhängigkeit von der chemischen Natur (Struktur und Funktionalität), stereochemischen Faktoren (wie z.B. Anomere, Epimere), sowie Ladungen und der Anwesenheit von Fremdionen (wie z.B. Puffern, Ca<sup>2+</sup>-Ionen).

Bis jetzt finden sich in der Literatur der Kohlenhydrate nur AFM-Experimente mit Derivaten ohne Ladung. Die Sulfat-haltigen Mimetika erlauben möglicherweise weitere wichtige Erkenntnisse auf dem Gebiet der interzellulären Erkennungsprozesse.

#### 1.3. Mucopolysaccharid-Speichererkrankungen und chemische Chaperone

Chaperone<sup>[14]</sup> (nach engl./franz. chaperone "Anstandsdame") sind Proteine, die die Faltung und Oligomerisierung neusynthetisierter Proteine kontrollieren. Der Faltungsprozess von Proteinen im Reagenzglas kann spontan ablaufen, benötigt aber sehr viel Zeit. In der Zelle muss die Faltung von einer Protein-Maschinerie, den sogenannten "molekularen Chaperonen" vermittelt werden. Die Expression einiger molekularer Chaperone wird unter Stressbedingungen für die Zelle (z.B. bei erhöhter Temperatur oder chemischem Stress) induziert oder verstärkt, weshalb diese Proteine aus historischen Gründen den Namen Hitzeschockproteine (Hsp) bekamen. Die Bezeichnung Hsp ist insofern irreführend, weil Chaperone auch unter Normalbedingungen sehr wichtige Funktionen wahrnehmen. Sie sorgen für eine ATP-abhängige Rückfaltung denaturierter Proteine und erhöhen das Überleben des betroffenen Organismus. Instabile Proteinkonformationen mit starker Neigung zur Aggregation werden durch Bindung von Chaperonen an der Aggregation gehindert, multimeren ordnungsgemäß gefaltet und können nachfolgend zu Komplexen zusammengelagert werden. Außerdem können Chaperone an der "Reparatur" fehlgefalteter Proteinketten und am Transport von cytosolischen Proteinen in subzelluläre Kompartimente (z.B. Mitochondrien) beteiligt sein, da Proteine im gefalteten Zustand die Membran nicht passieren können.

Die Mucopolysaccharidose Typ IIIA<sup>[15,16]</sup> (MPS IIIA) ist eine autosomal-rezessiv vererbte lysosomale Speichererkrankung, die auf eine Defizienz des lysosomalen Enzyms Heparan-*N*-Sulfatase bzw. Sulfamidase zurückzuführen ist. Die Sulfamidase wird am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und cotranslational während der Translokation in das Lumen des ER glycosyliert und gefaltet. Nach Verlassen des ERs erfolgt im Golgi-Apparat die weitere Prozessierung der *N*-gebundenen Zuckerketten. Besonders wichtig ist die Generierung von Mannose-6-phosphat(Man6P)-Resten an *high-mannose-type*-Oligosacchariden. Die Man6P-reste dienen als Erkennungssignal für den weiteren Rezeptorabhängigen Transport der Sulfamidase vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen.

Aufgrund einer Mutation im Sulfamidase-Gen kann es zu einer fehlerhaften Faltung der Sulfamidase durch den Austausch, Verlust oder zusätzliche Aminosäuren in der Peptidkette kommen. Diese Mutanten werden in den meisten Fällen im Endoplasmatischen Retikulum zurückbehalten und anschließend abgebaut. Andere Mutationen beeinflussen den Transport, die Stabilität im sauren Milieu des Lysosoms, oder direkt die enzymatische Aktivität.<sup>[64]</sup> Es gibt einige Patienten, bei denen die Mutation mit einer Restaktivität (1-3% der gesunden Kontrollen) assoziiert ist und deren Krankheitsverlauf weniger schnell verläuft.<sup>[65]</sup> Die fehlende Sulfamidaseaktivität führt zur Störung im Abbau von Heparansulfat, das sich vermehrt in den Lysosomen ansammelt. Die Zahl der Lysosomen nimmt zu, schädigt die übrigen Zellbestandteile und beeinträchtigt biochemische Prozesse. Die Krankheit betrifft Kinder, die schon kurz nach der Geburt die ersten klinischen Symptome wie Hyperaktivität, Aggressivität, Schlafstörung und Retardierung der sprachlichen und motorischen Entwicklung zeigen. Mentale Beeinträchtigungen und progressive neurologische Degenerationen führen meist in der zweiten Lebensdekade zum Tod.

Zur Behandlung lysosomaler Speicherkrankheiten standen bis vor kurzer Zeit lediglich symptomatische Maßnahmen zur Verfügung. In den vergangenen 15 Jahren wurden jedoch für einzelne dieser Erkrankungen, die nicht das Hirn betreffen, Enzymersatztherapien entwickelt. Dabei werden Patienten zeitlebens rekombinante Enzyme injiziert, was zur Stabilisierung und teilweise auch Rückbildung der peripheren Organdefekte führt.<sup>[16,66]</sup>

Bei dem Einsatz von chemischen Chaperonen handelt es sich um einen alternativen Ansatz zur Therapie, der die Enzymsubstitutionstherapie bei lysosomalen Speicherkrankheiten bei einzelnen Patienten mit enzymatischer Restaktivität ersetzen könnte. Chemische Chaperone sind kleine Moleküle, die die Faltungsrate erhöhen oder die Stabilität des aktiven Zentrums des Enzyms unterstützen. In der Mehrheit der Studien, vor allem bei den bereits klinisch angewandten, werden Zuckermimetika benutzt, die eigentlich Inhibitoren der jeweiligen lysosomalen Glycosidasen sind. Diese Inhibitoren müssen in niedrigen "sub-inhibitorischen" Konzentrationen verwendet werden, um die Konformation des mutanten Enzyms zu stabilisieren und seinen Abbau zu verhindern.<sup>[62]</sup>

Polyole, Alditole, freie Aminosäuren und Methylamine können ebenfalls als chemische Chaperone dienen.<sup>[17]</sup>

#### 1.4. Nojirimycin als Glycosidaseninhibitor

Die Entdeckung verschiedener, natürlich vorkommender Zuckeranaloga mit Glycosidaseinhibierenden Eigenschaften führte zu einem großen Interesse an diesen Verbindungen und der Entwicklung von Therapeutika auf Kohlenhydratbasis, die bei der Behandlung von Stoffwechselerkrankungen und in der antiviralen, antibakteriellen, sowie in der Antitumortherapie eingesetzt werden können.<sup>[18-21]</sup> Als Beispiele hierfür sind *N*-Hydroxyethyl-1-desoxynojirimycin **2**, 1-Desoxynojirimycin **3** und *N*-Butyl-1-desoxynojirimycin **4** zu nennen (Abb. 9).<sup>[22]</sup>



Abbildung 9: Nojirimycinanaloga mit Glycosidase inhibierender Wirkung.

Nojirimycin und 1-Desoxynojirimycin waren die ersten in der Natur gefundenen Zuckeranaloga, bei denen der acetalische Sauerstoff gegen eine Iminogruppe ausgetauscht ist.<sup>[22]</sup> Sie wurden unter anderem von *H. Paulsen* untersucht.<sup>[23,24]</sup> Bei Nojirimycin **1** handelt es sich um ein Antibiotikum, das zuerst aus *Streptomyces*-Stämmen isoliert werden konnte. Es konnte später auch aus verschiedenen *Bacillus*-Stämmen und aus den Blättern des Maulbeerbaumes erhalten werden.<sup>[22]</sup>

Für Nojirimycin und dessen Analoga ist eine Vielzahl von Synthesen bekannt. So beschrieben *Moutel* und *Shipman* eine Synthese des Nojirimycins ausgehend von 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-D-glucopyranose.<sup>[25]</sup> *Kajimoto* et al. synthetisierten 1-Desoxy-nojirimycin und Analoga durch Aldolase katalysierte Reaktionen mit anschließender Pd-katalysierter reduktiver Aminierung.<sup>[26]</sup>

Das Nojirimycinanalogon 2-Acetamido-1,2-didesoxynojirimycin **93** ist ein wirksamer Inhibitor für *N*-Acetylglucosamidasen (Abb. 10).<sup>[27]</sup>



Abbildung 10: 2-Acetamido-1,2-didesoxynojirimycin (93).

#### 2. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Synthese schwefelhaltiger Kohlenhydratderivate, die zum einen als Modellverbindungen zur Untersuchung interzellulärer Erkennungsprozesse mittels AFM und zum anderen als Inhibitoren für das Enzym Sulfamidase eingesetzt werden sollen.

So soll im ersten Teil der Arbeit eine Reihe der Mono- und Disaccharide dargestellt werden, die an bestimmten Positionen Sulfatgruppen tragen und deren Aglykone aus mit Thioacetatendenden C4-Ketten sich kovalent an Goldoberflächen knüpfen lassen (Abb.11).



Abbildung 11: Zu synthetisierende Saccharid-Sulfate.

Die erhaltenen Verbindungen sollen systematisch durch "simulierte interzelluläre Wechselwirkungen" mittels AFM untersucht werden, um ihre charakteristischen Wechselwirkungen zur Struktur und Aktivität zu korrelieren.

Ferner ist die Synthese von Verbindungen mit sulfat- und phosphatähnlichen Gruppen am Stickstoff der Aminogruppe von D-Glucosamin (Abb.12) sowie eines Sulfamidonojirimycin-Analogons (Abb. 13) geplant. Diese Verbindungen sind mögliche Inhibitoren des Enzyms Sulfamidase und sollen auf ihre Inhibitoraktivität mittels Enzymassays getestet werden.



Abbildung 12: Zu synthetisierende D-Glucosamin-Derivate.



Abbildung 13: 1,2-Dideoxy-2-sulfamido-nojirimycin.

#### 3. Synthese der Thiobutylglycoside

Üblicherweise werden Sulfatierungen an Hydroxygruppen am Ende der Synthese durchgeführt, um somit mögliche Komplikationen in Form unerwünschter Hydrolyse oder Nebenreaktionen zu vermeiden. Deswegen wurden als erstes Thiobutylglycoside dargestellt, um diese dann in den Sulfatierungsversuchen einzusetzen.

Der Weg zu den Thiobutylglycosiden führte über die entsprechenden Chlorbutylderivate. Anschließend wurde Chlor durch Acetylthio- bzw. Dithiogruppierung substituiert (Abb.14).

#### Glucoside, Galactoside und Lactoside



Abbildung 14: Synthesewege zum Thioacetat.

#### **3.1.** Glycosylierungen

#### 3.1.1. Glucoside und Galactoside

Um möglichst viel Information durch AFM-Messungen zu gewinnen, sollten nicht nur die Positionen der Sulfatgruppen im gegebenen Saccharid variiert werden, sondern auch die Konfiguration am anomeren Zentrum. Die Glycosylierungen sollten somit anomerenrein verlaufen. Die meisten bekannten Methoden, wie die Koenigs-Knorr-Methode<sup>[28]</sup> oder das Trichloracetimidat-Verfahren<sup>[29]</sup> liefern bei Glucose und Galactose  $\beta$ -Glycoside. Durch die Methode von Brigl<sup>[30]</sup> und Lemieux<sup>[31]</sup> lassen sich auch die  $\alpha$ -Glycoside selektiv darstellen. Einfacher wäre es allerdings, ohne weitere Umwege die beiden Anomere in nur einer Synthese mit möglichst wenigen Schritten zu erhalten. Dabei bot sich die Fischer-Glycosylierung an, die in nur einem Schritt  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomere liefert.<sup>[32,33]</sup> Als Alkohol-Komponente diente dabei 4-Chlor-1-butanol, das mit seiner C4-Kette den passenden Linker zur späteren Gold-Anknüpfung lieferte (Abb. 15).



Abb. 15: Fischer-Glycosylierung mit D-Glucose und D-Galactose.

Die Reaktion lief in 4-Chlor-1-butanol, das sowohl als Reaktand als auch als Lösungsmittel diente, bei 60 °C unter Zugabe von katalytischer Menge konz. HCl ab. Ausgehend von D-Glucose (**28**) wurde ein entsprechendes  $\alpha/\beta$ -Gemisch von 4'-Chlorbutyl-D-glucopyranosid (**30**) mit 67%-ger Gesamtausbeute erhalten. Die unter denselben Bedingungen durchgeführte Umsetzung von D-Galactose (**29**) lieferte die beiden Anomere von 4'-Chlorbutyl-D-glucopyranosid (**32**) in einer Ausbeute von 33 %.

Allerdings ließen sich die Anomerengemische in beiden Fällen nicht quantitativ anomerenrein trennen. Um dieses Problem zu lösen, wurde das jeweilige Anomerengemisch derivatisiert. Die Derivatisierung erfolgte in zwei Richtungen. Zum einen, durch die Schützung aller freien Hydroxygruppen beim Glucosid **30** und Galactosid **32** mit Acetylresten. Die Veresterung erfolgte bei Raumtemperatur in Pyridin unter Zugabe eines dreifachen Überschusses an Essigsäureanhydrid pro OH-Gruppe (Abb. 16).



Abbildung 16: Acetylierung vom Glucosid und Galactosid.

Die Umsetzung des Glucosids erfolgte in einer Gesamtausbeute von 91 %. Durch eine besonders sorgfältige säulenchromatographische Trennung gelang es, die beiden Anomere anzutrennen, so dass sich nach dem ersten Anlauf die Gesamtausbeute wie folgt verteilte: 23 %  $\alpha$ -Anomer, 8 %  $\beta$ -Anomer und 60 % Anomerengemisch, das weiterhin getrennt werden könnte. Im Falle des Galactosids betrug die Gesamtausbeute 84 % und nach der Antrennung ergab sich: 47 %  $\alpha$ -Anomer, 5 %  $\beta$ -Anomer und 32 % Anomerengemisch.

Die zweite Derivatisierung erfolgte durch eine 4,6-Benzylidenierung am Glucosid **30**, was für spätere Syntheseschritte nötig war (Abb. 17).



Abbildung 17: 4,6-Benzylidenierung am Glucosid.

Das Glucosid **30** wurde bei 60 °C in Tetrahydrofuran mit dem Benzaldehyddimethylacetal unter saurer Katalyse umgesetzt. Die Reaktion zum geschützten Derivat **31** verlief in einer Gesamtausbeute von 66 %.

Das so gewonnene Anomerengemisch ließ sich säulenchromatographisch trennen, so dass nach der ersten Trennung zu 39 %  $\alpha$ -Anomer, zu 17 %  $\beta$ -Anomer sowie zu 10 % Anomerengemisch erhalten wurde, wobei das letzte weiter getrennt werden könnte.

Die reinen, acetylgeschützten Anomere **30** $\alpha$ , $\beta$  und **32** $\alpha$ , $\beta$  wurden nun nach Zemplén <sup>[34]</sup> entschützt (Abb. 18).



Abbildung 18: Entschützung der peracetylierten Glycoside.

Die benzylidengeschützten Glucoside  $31\alpha$  und  $31\beta$  wurden ohne Entschützung für weitere Syntheseschritte eingesetzt.

#### 3.1.2. Lactosid

Eine Fischer-Glycosylierung bei Disacchariden kann problematisch werden, da unter diesen Bedingungen (Wärme, Säure und Spuren von Wasser) die glycosidische Bindung nicht unbedingt standhält. Zwar konnten Cheetham *et al.* diese Methode erfolgreich bei verschiedenen Disacchariden mit unterschiedlichen Alkoholen einsetzen,<sup>[35]</sup> der Versuch, die Methode für Lactose mit 4-Chlor-1-butanol zu adaptieren, erbrachte allerdings nicht den gewünschten Erfolg. Nach der Umsetzung wurden größtenteils Monosaccharid-Glycoside im Reaktionsgemisch identifiziert. Die klassische Koenigs-Knorr-Methode<sup>[28]</sup> lieferte schon im ersten Schritt nur bescheidene Ausbeute, so dass nach Alternativen gesucht wurde. Koto *et al.* entwickelten eine Methode, bei der aus einem freien Disaccharid in drei Schritten ein ungeschütztes Disaccharid-Glycosid entsteht.<sup>[36]</sup> Diese Methode vereint einige bisher bekannte Glycosylierungen und lässt die einzelnen Schritte ohne Aufarbeitung nacheinander ablaufen. Im ersten Schritt wird peracetyiert und die anomere Position bromiert, wie bei der Koenigs-Knorr-Methode. Daraufhin wird unter Lewis-Säure-Aktivierung mit FeCl<sub>3</sub> glycosyliert, wobei die Wahl des Lösungsmittels darauf Einfluss hat, ob  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Produkt entsteht. Anschließend wurde nach Zemplén deacetyliert (Abb. 19).



Abbildung 19: Darstellung des Lactosids 65 nach Koto et al.

Diese Methode brachte als Ergebnis das  $\beta$ -Lactosid **65** in einer Ausbeute von 19% über drei Stufen.

Einen kurzen Weg zur Disaccharid-Glycosid-Darstellung, lieferte die Bortrifluorid-Etherat-Methode. Dabei handelt es sich um eine modernere Glycosylierungsmethode, bei der die Aktivierung durch den Bortrifluorid-Diethylether-Komplex geschieht.<sup>[37]</sup> Die Reaktion lief in abs. Dichlormethan bei Raumtemperatur ab, als Akzeptor diente wieder 4-Chlor-1-butanol (Abb. 20).



Abbildung 20: Darstellung des Lactosid 65 nach der Borfluorid-Etherat-Methode.

Die Ausbeute betrug 31%, und nach der anschließenden Zemplén-Deacetylierung (93%) lag die Gesamtausbeute bei 28%.

#### 3.1.3. Glycosylierung am N-Acetylglucosamin

Beim *N*-Acetylglucosamin wurde ebenfalls die Fischer-Glycosylierung angewendet, wobei fast ausschließlich das  $\alpha$ -Anomer enstand (Abb. 20a):



Abbildung 20a: Fischer-Glycosylierung von N-Acetylglucosamin.

Wie bei Glucose und Galactose, wurde die Reaktion bei 60° C in 4-Chlor-1-butanol durchgeführt. Um das Reaktionsgleichgewicht zu Gunsten des thermodynamischen Produkts zu verschieben, wurde das Reaktionsgemisch 48 Stunden erhitzt. Somit konnte neben Spuren vom  $\beta$ -Anomer das  $\alpha$ -Anomer in einer Ausbeute von 30% erhalten werden.

#### 3.2. Thiole, Disulfide und Thioacetate

Eine Immobilisierung an Goldoberflächen kann über Thiole, Thioacetate oder Disulfide geschehen. Für AFM-Experimente werden hierbei Alumosilikate des natürlich vorkommenden Minerals *Mica Muscovite* mit Gold beschichtet und so atomar flache Goldstandards zur Immobilisierung erhalten.<sup>[39,40]</sup> Da mit einer freien Thiogruppe im Molekül die Gefahr der unerwünschten Nebenreaktionen steigt, wurden Thioacetate bzw. Disulfide dargestellt.

Die Thioacetylgruppe lässt sich durch Reaktion des Chlorids mit Thioacetat einführen.<sup>[38]</sup> Dabei wird das C4-Atom des Aglykons durch Thioacetat angegriffen und das Chloratom nach einem S<sub>N</sub>2-Mechanismus substituiert (Abb. 21).



Abbildung 21: Bildung des Thioacetats.

Nach dieser Methode wurden Thioacetat-Derivate von Glucose ( $52\alpha/\beta$ ), Galactose ( $54\alpha/\beta$ ) und Lactose (66) dargestellt. Die Reaktion lief in trockenem Dimethylformamid ab, als Reaktionspartner diente Kaliumthioacetat, das im zweifachen Überschuss zugegeben wurde (Abb. 22).



Abbildung 22: Darstellung der Thioacetate.

Die Ausbeute lag bei Monosacchariden zwischen 62 % und 78 %, wobei die Ausbeuten der Galactoside niedriger waren. Bei dem Lactosid betrug die Ausbeite 39 %. Die Substitution des Chlorids konnte sehr deutlich an der Verschiebung des C4'-Signals im <sup>13</sup>C-Spektrum von 45 ppm auf etwa 29 ppm sowie der Anwesenheit der Methyl-Gruppe beobachtet werden. Das Signal des Carbonylkohlenstoffes wurde nicht beobachtet, was wegen der Relaxation des Carbonyl-C-Atoms nicht ungewöhnlich ist.

Bei dem Glucosamin musste die Methode modifiziert werden. Generell gibt es zwei Möglichkeiten, zum gewünschten Molekül mit Thio- und Aminofunktion zu gelangen: zuerst die Acetylgruppe am Stickstoff abspalten, gefolgt von Thioacetylierung, und die umgekehrte Reihenfolge. Im ersten Fall könnte es möglicherweise zu Komplikationen zwischen dem Thioacetat und freien Aminogruppe sowie der Herabsetzung der Löslichkeit des Eduktes im DMF kommen. Im umgekehrten Fall wären im zweiten Schritt beide Acetylgruppen abgespalten, was für spätere Sulfatierung aufgrund der Nucleophilie der freien Thiogruppe störend wäre. Allerdings lassen sich freie Thiole leicht zu Dithio-Dimeren oxidieren, was eine Art Auto-Schützung der Thiofunktion ist und gleichzeitig keine Probleme für die AFM-Messung darstellt. Somit wurde ein Glucosamin-Derivat mit einer Thiofunktion auf diesem Wege dargestellt (Abb. 23).



Abbildung 23: Einführung der Thiofunktion beim Glucosamin-Derivat

Die Reaktion mit Thioacetat im DMF verlief nach dem bereits beschriebenen Mechanismus in einer Ausbeute von 69 %. Desweiteren wurden die beiden Acetylgruppen im stark basischen Milieu bei 100 °C abgespalten. Das entstandene Thiol **85** wurde anschließend mit Luftsauerstoff zum Disulfid **86** oxidiert. Die Gesamtausbeute über zwei Reaktionsschritte betrug 63 %.

#### 4. Untersuchungen zur Sulfatierung

Die meisten in der Natur vorkommenden Kohlenhydrat-Sulfate sind 4-*O*-, 3-*O*-, 6-*O*- und 2-*N*-Sulfate. Die letzten drei wurden für die AFM-Versuche ausgewählt, so dass die Synthesen in die entsprechenden Richtungen vorzusehen waren. Um selektive Derivatisierungen durchzuführen, bedarf es normalerweise einer Schutzgruppen-Strategie. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch die unterschiedlichen Reaktivitäten einzelner OH- und NH<sub>2</sub>-Gruppen ausgenutzt, um am effizientesten zu den Zielmolekülen zu gelangen und dabei so wenig wie möglich von Schutzgruppen Gebrauch zu machen.

#### 4.1. 6-0-Sulfate

Die deutlich größere Reaktivität der primären OH-Gruppe an der Position C6 gegenüber den restlichen OH-Gruppen in einem Kohlenhydrat (abgesehen von der anomeren, die in diesem Fall nicht frei ist) lässt eine selektive Sulfatierung ganz ohne Einsatz von Schutzgruppen allein durch die Temperatursteuerung der Reaktion zu. So konnten die Glucosid- und Galactosid-6-*O*-sulfate bei Raumtemperatur erhalten werden, ohne dass dabei weitere Positionen sulfatiert wurden (Abb. 24).



 $\alpha$ , **59** $\alpha$ : R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = OH, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SAc  $\beta$ , **59** $\beta$ : R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = OH, R<sup>3</sup> = O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SAc, R<sup>4</sup> = H  $\alpha$ , **55** $\alpha$ : R<sup>1</sup> = OH, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SAc  $\beta$ , **55** $\beta$ : R1 = OH, R<sup>2</sup> = H, R<sup>4</sup> = O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SAc, R<sup>3</sup> = H

Abbildung 24: Direktsynthese der 6-O-Sulfate.

Die Reaktionen verliefen in Pyridin, das ausreichende Basizität besitzt um die O-H-Bindung zu lockern und somit die Nucleophilie des Sauerstoffs zu erhöhen. Als Sulfatierungsreagenz agierte der Schwefeltrioxid-Trimethylamin-Komplex (Abb. 25).



Abbildung 25: Bildung des Sulfats.

Anschließend wurde das Trimethylammoniumkation mit einer Ionenaustauschersäule gegen das Natriumkation ersetzt, was den physiologischen Bedingungen näher kommt. Folgende Ausbeuten wurden erzielt:  $55\alpha - 63 \%$ ,  $55\beta - 39 \%$ ,  $59\alpha - 64 \%$ ,  $59\beta - 59 \%$ .

#### 4.2. 3-O-Sulfate

Die selektive Veresterung an der Position C3 eines Monosaccharids erfordert normalerweise mehrere vorbereitende Schritte. So kann im Falle der Glucose durch Einführung zweier Isopropyliden-Schutzgruppen die Position C3 als einzige OH-frei erhalten werden, die dann mit dem gewünschten Rest versehen werden kann. Anschließend werden die beiden Isopropyliden-Gruppen abgespalten und im vorliegenden Fall die Glycosylierung und die Substitution des Chlorids durchgeführt.

Im Falle der Galactose liefert die Diisopropyliden-Schützung nur die 6-OH-freie Verbindung. Der Weg der klassischen Schutzgruppenchemie führt über Orthoester-Bildung an C1 und C2 sowie Benzylidenschützung an C4 und C6. Nach der erfolgten Sulfatierung müssten logischerweise alle Schutzgruppen wieder entfernt werden.

Ausgehend von einem Glucal bzw. Galactal mit darauffolgender Schützung der Positionen C4 und C6 lässt sich ebenfals eine selektive Derivatisierung an Position C3 realisieren (Abb. 25a).<sup>[41]</sup>



Abbildung 25a: Glucal und Galactal.

Aber auch da bedarf es nach der erfolgten Sulfatierung noch weiterer Schritte in Form von Glycosylierung und Entschützung.

Wegen der Empfindlichkeit der Sulfatgruppe sollte allerdings ihre Einführung möglichst zuletzt geschehen. Abhilfe schafft der Einsatz der Stannyliden-Methode, die bei der Galactose an den Positionen C3 und C4 eine temporäre Schutzgruppe erzeugt, wobei eine Differenzierung der Nucleophilie der beiden am Stannylidenacetal beteiligten Sauerstoffe beobachtet wird.<sup>[42]</sup>

Dies ist auf die Bildung von Dimeren zurückzuführen, die auch in der Gasphase stabil sind. Dabei findet ein Elektronendichtetransfer zu dem an der Dimerisierung nicht beteiligten Sauerstoff statt, dessen Nukleophilie dadurch erhöht wird (Abb. 26).



Abbildung 26: Mechanismus der Bildung eines Stannylidenacetals.

Auf dieser Weise wird in der Galactose die Nukleophilie des Sauerstoffs an der Position 3-OH erhöht, so dass die Sulfatierung nach dem in der Abbildung 24 gezeigten Schema in neutralem Milieu nur dort abläuft (Abb. 27):



**54α, 60α**:  $R^1 = H$ ,  $R^2 = O(CH_2)_4SAc$ **54β, 60β**:  $R^1 = O(CH_2)_4SAc$ ,  $R^2 = H$ 

Abbildung 27: Stannyliden-gesteuerte 3-Sulfatierung der Galactose.

Der erste Schritt der Reaktion lief bei 65° C in trockenem Methanol ab, wobei das Stannylidenacetal an den Positionen C3 und C4 entstand. Diese Zwischenstufe wurde nicht isoliert, da solche Zinn-Komplexe sehr empfindlich sind. Daraufhin wurde das Lösungsmittel gegen abs. THF getauscht und das Sulfatierungsreagenz zugesetzt. Anschließend wurde das Trimethylammoniumkation gegen das Natriumkation an einer Ionenaustauschersäule ausgetauscht. Die Ausbeute für das  $\alpha$ -Anomer betrug 63% und für das  $\beta$ -Anomer 65%.

Im Falle der Glucose konnte diese Methode nicht angewendet werden, da aufgrund der äquatorial-äquatorial Stellung der OH-Gruppen an Positionen C3 und C4 eine Behinderung für die Bildung des Stannylidenacetals vorliegt. So würde es zur Bildung eines Produktgemisches aus verschiedenen Mono- und Polysulfaten kommen. Langston et al. haben eine gewisse Selektivität bei der Bildung von 2- und 3-Sulfaten bei Monosacchariden beobachtet, sofern die Positionen C4 und C6 geschützt sind.<sup>[43]</sup> Beim Einsatz von Dibutylzinnoxid zur temporären Schützung der Positionen C2 und C3 wird im Falle Glucose fast ausschließlich die 2-OH-Funktion aktiviert, was zur Bildung des 2-Sulfats führt. Bei der direkten Sulfatierung kommt es zum Produktgemisch aus 2- und 3-Sulfaten sowie 2,3-Disulfaten. Diese kombinatorische Methode wurde hier eingesetzt, um das an 3-OH sulfatierte Glucosid 61 zu erhalten. Die direkte Sulfatierung in Pyridin ergab nur 2-Sulfat und 2,3-Disulfat. Dies könnte zwei Gründe haben: zum einen wird die Position 3-OH-Position durch die Benzylidengruppe an C4 sterisch eingeengt (bei Galactose ist die Bildung des 3-Sulfats begünstigt). Zum anderen kommt es wahrscheinlich insbesondere beim  $\alpha$ -Anomer zur Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der 2-OH-Gruppe und dem Sauerstoff an C1 (Abb. 28), wodurch die Nucleophilie der 2-OH-Gruppe gesteigert und durch das basische Pyridin nochmals unterstützt wird.



Abbildung 28: Wasserstoffbrücke zwischen C1 und C2.

In der Tat wurden bei dem  $\beta$ -Anomer Spuren des 3-Sulfats gefunden. Beim Wechsel des Lösungsmittels zum neutralen DMF entsteht ein höherer Anteil des 3-Sulfats, wobei beim  $\beta$ -Anomer die Ausbeute noch höher ausfällt (Abb. 29).



Abbildung 29: Direkte Sulfatierung von 56.

So wurde die Umsetzung bei erhöhter Temperatur und längeren Reaktionszeit als bei der Umsetzung in Pyridin durchgeführt, wobei sich die in der Abbildung 29 aufgeführten Produktgemische ergaben. Das 3-Sulfat wurde im Fall des  $\alpha$ -Anomers zu 17% und beim  $\beta$ -Anomer zu 22% gewonnen. Dies wurde durch die Verschiebung der C3- sowie H3-Signale in <sup>13</sup>C- bzw. <sup>1</sup>H-Spektren detektiert. Bei der säulenchromatographischen Reinigung wurde das saure Kieselgel mit Triethylamin gepuffert, um eine sauer katalysierte Abspaltung der Sulfat-Gruppe zu verhindern, was in einem Kationaustausch resultierte: in beiden Spektren wurden keine Spuren von Trimethylammonium-, wohl aber größere Mengen von Triethylammonium-Ionen gefunden. Dies war von geringer Bedeutung, da nach dem Abspalten der Benzyliden-Schutzgruppe das organische Kation gegen Na<sup>+</sup> ausgetauscht wurde. Auf die Charakterisierung des 2-Sulfats sowie des 2,3-Disulfats wurde nicht weiter eingegangen, da das 3-Sulfat im Vordergrund stand.

Im nächsten Schritt wurde bei den beiden Sulfaten  $61\alpha$  und  $61\beta$  die Benzyliden-Schutzgruppe entfernt und das Kation ausgetauscht. Zunächst wurde mit verdünnter Schwefelsäure das Benzyliden-Acetal gespalten (Abbildung 30).



**61** $\alpha$ , **62** $\alpha$ : R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SAc **61** $\beta$ , **62** $\beta$ : R<sup>1</sup> = O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SAc, R<sup>2</sup> = H

Abbildung 30: Abspaltung der Benzyliden-Schutzgruppe.

Anschließend wurde das Triethylammonium- gegen das Natriumkation ausgetauscht. Die Ausbeute für das  $\alpha$ -Anomer betrug 56% und für das  $\beta$ -Anomer 51%.

#### 4.3. 3'- und 6'-Sulfatierung am Lactosid

Da das Lactosid als terminale Zuckerkomponente den Galactoserest trägt und genau da die Sulfatgruppen entstehen sollten, gleichen die Sulfatierungsmethoden denen des Galactosids.

Das <u>3'-Sulfat</u> wurde selektiv durch den Einsatz von Dibutylzinnoxid als Aktivator der 3-OH-Position der Galactose erhalten. Ähnliche Reaktionen an Di- und Trisacchariden wurden bereits von A. Lubineau und R. Lemoine beschrieben.<sup>[2,3,44]</sup> Nach dem bereits beschriebenen Mechanismus (s. Abb. 26) wurde das Lactosid temporär als Stannylidenacetal geschützt und mit dem Schwefeltrioxid-Trimethylamin-Komplex umgesetzt (Abb. 31).



Abbildung 31: 3'-Sulfatierung am Lactosid.

Die Schützung lief bei 65° C in abs. Methanol ab, wobei das 3',4'-Stannylidenacetal entstand. Diese Zwischenstufe wurde nicht isoliert, da solche Zinn-Komplexe sehr empfindlich sind. Daraufhin wurde das Lösungsmittel gegen abs. THF getauscht und das Sulfatierungsreagenz zugesetzt. Anschließend wurde das Trimethylammoniumkation gegen das Natriumkation an einer Ionenaustauschersäule ersetzt. Die Ausbeute für das 3'-Sulfat **67** betrug 33%.

Bei der <u>6'-Sulfatierung</u> wurde wieder der Reaktivitätsunterschied der einzelnen OH-Gruppen im Lactosidmolekül ausgenutzt. Im Gegensatz zu Monosacchariden sind aber hier zwei primäre OH-Gruppen vorhanden, welche die Selektivität der Sulfatierung verringern könnte. Durch experimentelle Ermittlung der Reaktionsbedingungen konnte die Sulfatierung in Richtung des 6'-Sulfat geleitet werden, so dass ein 6,6'-Disulfat nur in Spuren entstand (Abb. 32).



Abbildung 32: Selektive 6'-Sulfatierung des Lactosids.

Die Reaktion verlief bei 0° C in Pyridin und wurde nach 48 Stunden abgebrochen. Anschließend wurde das Trimethylammoniumkation gegen das Natriumkation an einer Ionenaustauschersäule ersetzt.

Das 6'-Sulfat **68** wurde in einer Ausbeute von 17% gewonnen. Der Grund für die relativ niedrige Ausbeute könnte das frühzeitige Abbrechen der Reaktion sein, was zu der 6'-Selektivität beigetragen hat.

#### 4.4. 2-N-Sulfat

Bei der Sulfatierung der freien Aminogruppe wurde deren deutlich höhere Nucleophilie gegenüber den primären und sekundären Hydroxy-Gruppen zu Nutze gemacht. So verlief die Reaktion bereits bei -40 °C in Pyridin. Als Sulfatierungsreagenz diente wieder der Schwefeltrioxid-Trimethylamin-Komplex (Abb. 33).



Abbildung 33: Darstellung des N-Sulfats.

Hierbei wurden keine Spuren von Sulfatierung an anderen Positionen beobachtet. Anschließend wurde das Trimethylammoniumkation gegen das Natriumkation ausgetauscht. Die Gesamtausbeute betrug 42 %.

#### 5. AFM-Messungen

## 5.1. Methode<sup>[45,69]</sup>

#### 5.1.1. Technik

Das Kernstück der AFM-Methode stellt das Rastermikroskop dar (Abb.34).



Abbildung 34: Aufbau eines Rasterkraftmikroskops.

Das Gerät ist auf einem Lichtmikroskop montiert. Ein Laserstrahl wird durch ein Prisma auf den Nadelhalter ausgelenkt, und das reflektierte Licht durch einen Spiegel auf das Messfeld, bestehend aus vier Photodetektoren, geführt. Die Probe sitzt unterhalb des Cantilevers (""cantilever engl. für "Nadelhalter") auf einem Piezoscanner, der sich durch elektrische Stimulation ausdehnt oder zusammenzieht und so die Probe relativ zum Cantilever führt. Das Rasterscannen der Oberfläche und die auf die Probe ausgeübte Kraft werden über ein Feedback-Signal des "Controllers" zum Piezoscanner kontrolliert und durch die Software bzw. den Operator gesteuert.

Mit dem Rasterkraftmikroskop werden Oberflächen aus beliebigen Werkstoffen (in diesem Fall aus Gold) mit Hilfe einer scharfen Spitze (ebenfalls aus Gold), die rund 200 µm lang ist und deren Spitzenradius weniger als 10 nm beträgt, untersucht. Die Spitze befindet sich am freien Ende eines hoch elastischen und empfindlichen Federarms, der eine Länge von 100 bis 200 µm hat. Wenn die Spitze rasterartig über die Oberfläche geführt wird (X,Y-Richtung), kommt es aufgrund von topographischen Unterschieden zur Auslenkung der Nadel in Z-Richtung oder zur Torsion des Cantilevers. Diese Auslenkungen werden optisch gemessen: Ein Laserstrahl wird auf das Ende des Nadelhalters gerichtet und auf ein Messfeld reflektiert (Abb.35).



Abbildung 35: Aufbau der AFM-Messung.

Das Messfeld besteht aus vier lichtempfindlichen Photodetektoren (A, B, C, D), von denen jeder einzelne etwa ein Viertel des Messfeldes ausfüllt. Bei einer vertikalen Auslenkung der Nadel verschiebt sich der reflektierte Lichtpunkt vom Quadranten B in Richtung A. Um eine möglichst empfindliche Messung zu bekommen, wird die Differenz der Lichtintensitäten auf jeweils gegenüberliegen Quadranten gemessen, also A-B und C-D. Die optische Registrierung der Nadelbewegung ergibt eine zusätzliche Vergrößerung von etwa 1000x. Die Auflösung des Rasterkraftmikroskops erreicht damit den sub-Ångström-Bereich.

Es wird zwischen "Contact"- und "Non-contact"-Verfahren unterschieden. Beim Kontaktverfahren befindet sich der Cantilever in physischen Kontakt mit der Oberfläche während des Rasterscannens und die Auslenkung der Nadel als topographisches Bild aufgezeichnet wird. Hierbei ist die x,y-Richtung in nm/µm und die z-Richtung, d.h. die

topographische Höhe, zur besseren Visualisierung farbig kodiert (nm). Hellere Farben repräsentieren hierbei "hohe" (>nm) und dunkle Farben "flache" Topographien (< nm). Im "non-contact" Modus wird der Cantilever kontrolliert in unmittelbare Nähe zur Oberfläche gebracht und danach seiner Interaktion mit der Oberfläche überlassen, die z.B. elektrostatischer, chemischer oder sterischer Natur sein kann. Der Sensor (die Nadel) fühlt sprichwörtlich die Oberflächenbeschaffenheit. Die Daten werden in Form einer Kraft-Abstandskurve aufgezeichnet und lösen Kräfte im Nanonewton/Nanometer Bereich auf. Die Oberfläche d. h. die Probenvorbereitung ist hierbei ein kritischer Faktor, da diese maßgeblich zum Erscheinungsbild der Interaktion(en) beiträgt.

#### 5.1.2. Versuchsaufbau<sup>[68]</sup>

Um vergleichbare d.h. optimierte Ergebnisse bei Raster-Kraft-Messungen zu erzielen, sollte die Goldoberfläche homogen und im Idealfall atomar flach sein, um an jedem Punkt der Oberfläche reproduzierbare Kraft-Kurven zu erhalten. Es werden dabei Mica (Alumosilicat) - templated Gold-Oberflächen eingesetzt.<sup>[39,40]</sup> Die im Experiment verwendete Oberflächen wurden mittels AFM charakterisiert (Abb. 36).



Abbildung 36: [A] – Die AFM-Topographie zeigt die atomar-flache Goldoberfläche, die einen Höhenunterschied von nur 1.8 +/- 0.2 nm über eine Fläche von  $40x40 \ \mu\text{m}^2$  aufweist. [B] - 400-fache Vergrößerung.

Der weitere Versuchsablauf ist in der Abbildung 37<sup>[69]</sup> schematisch dargestellt. Nach der erfolgreichen Synthese werden die Goldoberflächen und der Gold-Tip mit den entsprechenden Verbindungen beschichtet, indem das Schwefelatom des Verbindungsaglykons (engl. spacer oder tether) eine kovalente Bindung mit dem Gold eingeht.



Abbildung 37: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

Die Abbildung 38 zeigt eine Kraft-Abstand-Kurve am Beispiel eines Systems aus Gold und einem Glucosid mit vier Sulfat-Gruppen.<sup>[70]</sup>



Abbildung 38: Beispiel einer Kraft-Abstand-Kurve.
### 5.2 Messergebnisse

Bei der Auswertung der statistischen Daten zeigten sich in den Arbeiten von Tsiper<sup>[71]</sup> und Ray *et al.*<sup>[72]</sup> reproduzierbare signifikante Energiebarrieren, die die interglycosidische Wasserstoffbrücken-bindungen (Entstehung des Quadrupols, Polarisation, Anziehung und Ablösung) durchlaufen. Diese Barrieren spiegeln sich in einer Kraft-Abstand-Kurve bei Annäherung zweier OH-freien Saccharide wider.<sup>[73,74,75]</sup>

Die ersten Versuche wurden mit ungeladenen (nicht sulfatierten) Glucosiden  $52\alpha$  und  $52\beta$  durchgeführt und sind bereits beschrieben.<sup>[68]</sup> Neben anomerenreinen Verbindungen wurde auch ein  $\alpha/\beta$ -Gemisch vermessen, um festzustellen, ob einzelne Wechselwirkungen in einem Gemisch zu detektieren und zu identifizieren sind. In Abbildung 39 ist schematisch gezeigt, auf welche Weise die Glucoside in eine (oder mehrere) Wechselwirkung treten können.



Abbildung 39: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen individueller Moleküle (ideale Probe).

Im Idealfall würde ein Molekül am Tip auf ein Molekül auf der Goldplatte treffen. In Realität ist der Sensor eher sphärisch aufgrund der multiplen Belegung, und es kommt daher vermutlich zur Überlappung mehrer bzw. vieler Wechselwirkungen, was die Auswertung nochmals erschwert.

Die Abbildung 40 zeigt die einzelnen Kurven sowie ein Vergleichsbild mit allen gemessenen Verbindungen.



Abbildung 40: Kraft-Abstand-Kurven von nicht-sulfatierten Glucosiden 52α und 52β.

Die abgebildeten Kurven präsentieren das statistisch gemittelte Ergebnis (n = 100 pro System) der homogenen ( $\alpha/\alpha$ ;  $\beta/\beta \alpha\beta/\alpha\beta$ ) und heterogenen Systeme ( $\alpha/\beta$ ), sowie deren inverse Setups und zeigen die Annäherung des Tips – die sogenannte *incoming curve*. Da bei der Entfernung des Tips (*outgoing curve*) die zusätzlichen Adhäsionskräfte entstehen und überwunden werden müssen, werden diese Daten nicht ausgewertet, in der Regel geschieht dieses nur bei *Force-Pulling*-Experimenten bei z.B. Polymeren.<sup>[76]</sup>

Die Auswertung der Kurven zeigte bis zur drei Energie-Peaks (Energiebarrieren), die aufgrund der Geometrie und Größenordnung bestimmten Wechselwirkungen zugeordnet werden konnten (siehe Abb. 40) und die sich auch im Anomerengemisch wiederfinden. Sie treten bei denselben Abständen auf, die Kräfte sind allerdings durch mehrere weitere Wechselwirkungen im Gemisch abgeschwächt. Außerdem fällt auf, dass die  $\alpha/\alpha$ -Wechselwirkung deutlich früher anfängt (bereits bei 14.5 nm) als  $\beta/\beta$  (bei ca. 10 nm). Als Anfang der  $\alpha/\beta$ -Wechselwirkung wurden knapp 14 nm detektiert. Desweiteren zeigt die  $\alpha/\alpha$ -Wechselwirkung zum Teil doppelt so hohe Kräfte wie die  $\beta/\beta$ -Wechselwirkung.

Diese Faktoren zeigen somit, dass trotz des flexiblen Thiobutyl-Spacers schon allein die Konfiguration am anomeren Zentrum ( $\alpha$  oder  $\beta$ ) direkten Einfluss auf den nanoscopischen Verlauf der Interaktion zwischen zwei Kohlenhydratmolekülen hat und *in vivo* auf dem makroskopischen, multivalenten Level addierend zum Tragen kommt.

Ein weiterer Aspekt war, welche Auswirkungen die Anwesenheit geladener funktioneller Gruppen im Molekül auf die Wechselwirkungen hat. Im weiteren Versuch wurden bei derselben Anordnung zusätzlich die Verbindungen  $62\alpha$  und  $62\beta$  vermessen, die an der Position C3 eine Sulfat-Gruppe tragen.

Die Abbildung 41 demonstriert Kraft-Abstand-Kurven von Systemen, in denen ein am C3-Atom sulfatiertes Glucosid ( $62\alpha$  oder  $62\beta$ ) mit einem OH-freien Glucosid ( $52\alpha$  oder  $52\beta$ ) in Wechselwirkung trat. Zu sehen sind sowohl Tip-Annäherungs- als auch Tip-Entfernungskurven, wobei wieder nur die ersten ausgewertet wurden.

Den deutlichsten Unterschied zu den ungeladenen Molekülen liefern wieder die Systeme, bei denen einer der Wechselwirkungspartner ein  $\alpha$ -Anomer ist. Beim System **52** $\beta$ /62 $\alpha$  tritt die Wechselwirkung bereits bei einer Entfernung von 27 nm auf, was eine Verdopplung des Abstandes im Vergleich zum nicht-sulfatierten System bedeutet. Bei **52\alpha/62\alpha** und **52\alpha/62\beta** sind es 20 nm. Aber auch 13 nm, die bei **52\beta/62\beta** beobachtet wurden, bedeuten einen 30 %igen Anstieg der Sensibilität gegenüber den ungeladenen Molekülen.

Auch bei der Anziehungskraft liegen die  $\alpha$ -haltige Systeme vorn, bei  $52\alpha/62\alpha$  liegt die maximale Auslenkung bei knapp 4 nN gegenüber  $52\beta/62\beta$  mit ca. 1nN und dem nichtsulfatierten System  $52\alpha/52\alpha$  mit 2,4 nN.



Abbildung 41: Rasterkraft Kurven für Systeme mit geladenen und ungeladenen Glucosiden ( $52\alpha/\beta$  und  $62\alpha/\beta$ ). In Blau der statistisch relevante Verlauf der *incoming*-Kurve (n = 100). In Grün die *outgoing*-Kurve.

Wie schon bei ungeladenen Systemen, wird auch hier die besondere Bedeutung der Konfiguration am C1-Atom beobachtet. Möglicherweise liegt es daran, dass aufgrund der axialen Anordnung der C-O-Bindung an C1 das  $\alpha$ -Glucosid insgesamt etwas kürzer ist, als das  $\beta$ -Glucosid, so dass Tip und Oberfläche insgesamt näher zueinander kommen können, wobei die äußersten Gruppen sich freier "fühlen" können.

Die zweite wichtige Beobachtung ist, dass ein "geladen/ungeladen"-System bei größeren Abständen zu wechselwirken anfängt. Das elektrostatische Feld der negativ geladenen Sulfatgruppe "*spürt*" das Proton der Hydroxygruppe des Partners aus deutlich größerer Entfernung im Vergleich zu Hydroxyl-Hydroxyl-Wechselwirkungen.

Im letzten Versuch wurden die an Position C3 sulfatierten Glucoside  $62\alpha$  und  $62\beta$  gegen sich selbst und gegeneinander vermessen. Abbildung 42 zeigt die entstandenen Kraft-Abstand-Kurven.

Hierbei kehrt sich das Bild um: das  $\alpha/\alpha$ -System liefert die kleinste Wechselwirkungsentfernung und die kleinsten Kräfte, offenbar ist das längere Molekül ( $\beta$ ) hier im Vorteil.

Dies hängt möglicherweise mit der Anwesenheit der beiden Sulfatgruppen zusammen, da die beiden negativen Ladungen sich abstoßen und bei einem längeren Molekül mehr Raum zum Ausweichen hätten. Optimal ist es wohl bei einem  $\alpha/\beta$ -System, indem der Abstand mit 25 nm noch größer ist, als bei dem System mit einer Sulfatgruppe. Auch das  $\beta/\beta$ -System konnte sich mit 17 nm gegenüber dem System mit einer Sulfatgruppe verbessern. Offenbar stören sich die beiden Sulfatgruppen bei den Wechselwirkungen mit den Protonen bei dieser Anordnung am wenigsten.

Die maximalen Kraftauslenkungen bleiben mit <1 nN bei allen drei gemessenen Systemen relativ klein.



Abbildung 42: Kraft-Abstand-Kurven von 3-sulfatierten Glucosiden  $62\alpha$  und  $62\beta$  gegen sich selbst und gegeneinander.

Zusammengefasst haben die ersten Rasterkraft-Experimente am Beispiel von Verbindungen  $52\alpha/\beta$  und  $62\alpha/\beta$  gezeigt, dass die Konfiguration am anomeren Zentrum und die Anwesenheit der geladenen Gruppen einen erheblichen und meßbaren Einfluss auf die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen zwei Kohlenhydratmolekülen haben und so auf einen biologisch relevanten Mechanismus hindeuten.

Um zu klären, inwiefern diese Ergebnisse auf interzelluläre Wechselwirkungen übertragbar sind, bedarf es noch weiterer AFM-Versuche mit variabel sulfatierten Mono- und Disacchariden. Unter anderem kommen hierfür die Verbindungen  $54\alpha/\beta$ ,  $55\alpha/\beta$ ,  $59\alpha/\beta$ ,  $60\alpha/\beta$ , 66, 67, 68, 80 und 86 infrage, die im Laufe dieser Arbeit synthetisiert wurden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war dies wegen der Zahl der Messungen und der Auswertung der Datensätze nicht mehr durchzuführen.

Als besonders zeitaufwendig und problematisch erwies sich die Auswertung der verschiedenen Datensätze aus nicht standardisierten Dateiformaten, die aus verschiedenen Versionen der Gerätehersteller-Software resultierten. Im weiteren Verlauf der Forschungen auf diesem Gebiet müßte zur vereinfachten Auswertung und zum Errechnen der statistisch relevanten Wechselwirkungen ein Auswertungsprogramm z.B. mit Igor Pro<sup>[77]</sup> erstellt werden.

# 6. Glucosamin-Derivate

In diesem Teil der Arbeit wurden Verbindungen synthetisiert, die für das Enzym Sulfamidase als mögliches Substrat dienen könnten (siehe Einleitung). Da sie alle Glucosamin als Basis haben, wurde zuerst die Ausgangsverbindung **75** dargestellt, die dann in entsprechenden Derivatisierungen zu den gewünschten Zielmolekülen **79**, **81** und **82** umgesetzt wurde (Abb. 43).



Abbildung 43: Syntheseweg zu den Glucosaminderivaten.

### 6.1. Vorbereitung der Derivatisierung

Im ersten Schritt wurde der anomere Kohlenstoff im *N*-Acetyl-D-glucosamin geschützt, damit an dieser sehr reaktiven Position keine Nebenreaktionen ablaufen. Die Wahl fiel auf die Benzylgruppe, da diese den notwendigen Reaktionsbedingungen standhält und anschließend milde reduktiv wieder entfernt werden kann. Die Einführung erfolgte durch Fischer-Glycosylierung. Wie bereits im Kapitel 3.1.1. beschrieben, wurde der zu glycosylierende Zucker (*N*-Acetyl-D-glucosamin) im entsprechenden Alkohol (Benzylalkohol) suspendiert und unter saurer Katalyse bei 100 °C umgesetzt. Bedingt durch die lange Reaktionszeit von 45 Stunden, entstand ausschließlich das thermodynamisch begünstigte  $\alpha$ -Anomer (Abb. 44).



Abbildung 44: Bildung von Benzyl- $\alpha$ -D-N-acetyl-glucosaminid.

Die Ausbeute betrug 84 % und war somit besser als bei den Glycosylierungen von Glucose und Galactose.

Im zweiten Schritt wurde die Acetylgruppe am Stickstoff abgespalten und somit die freie Aminogruppe erhalten. Die *N*-Acetate sind deutlich stabiler als die *O*-Acetate, so dass die Spaltung bei härteren Bedingungen stattfinden muss.<sup>[46]</sup> Sie kann sowohl im sauren als auch im basischen Milieu ablaufen.<sup>[46]</sup> Da die Säure die glycosidische Bindung gefährden würde, wurde die Abspaltung analog einer von Wong *et al.* beschriebenen Vorschrift basisch katalysiert (Abb. 45).<sup>[47]</sup>



Abbildung 45: Abspaltung der Acetylgruppe.

Die Ausbeute betrug 48 %, was dadurch bedingt war, dass Bariumsalze mit viel Aufwand abgetrennt werden mussten.

### 6.2. Derivatisierung am Stickstoff

Auch hier (vgl. **4.3.**) wurde die höhere Nucleophilie der Aminogruppe gegenüber den Hydroxygruppen zu Nutze gemacht, so dass es im Amin **75** keiner weiteren Schutzgruppen bedurfte. Die Reaktionen wurden bei tiefen Temperaturen (-40 °C – 0 °C) durchgeführt und als Substrate für die nucleophile Substitution agierten Chloride der entsprechenden Verbindungen. Die Reaktionen wurden in Pyridin durchgeführt, so dass das entstehende HCl abgefangen werden konnte (Abb. 46).



Z – Zuckerrest X – S oder P

Abbildung 46: Genereller Mechanismus der Derivatisierung am Stickstoff.

#### 6.2.1. N-Methylsulfonamid

Als Substrat für den nucleophilen Angriff des Stickstoffs diente hierbei Methansulfonsäurechlorid. Die Reaktion wurde bei -40 °C durchgeführt, da die Vorversuche zeigten, dass bei höheren Temperaturen auch die 6-*O*-Substitution stattfindet und bei tieferen Temperaturen die Reaktion kaum bis gar nicht abläuft (Abb. 47).



Abbildung 47: Darstellung des N-Methylsulfonyl-Derivats.

Auch bei der gewählten Temperatur wurde die Reaktion an C6 beobachtet, was die Ausbeute auf 48 % drückte. Außerdem blieben etwa 10 % Edukt zurück, weil einUnterschuß an Methansulfonsäurechlorid zum Einsatzkommen musste.

Anschließend wurde die anomerische Benzylgruppe hydrogenolytisch abgespalten. Die Reaktion wurde in Ethanol durchgeführt und der Wasserstoff zur besseren Wirkung durch die Reaktionslösung geleitet. Die Reaktion lief nahezu quantitativ ab (Abb. 48).



Abbildung 48: Hydrierung von 76.

### 6.2.2. N-Methylensulfonat

Um dieses Glucosamin-Derivat darzustellen, musste zuerst das Chlormethansulfonat erzeugt werden. Die Synthese wurde in der Arbeit von Schöllkopf *et al.* beschrieben.<sup>[48]</sup> Hierbei wird Dichlormethan mit Natriumsulfit umgesetzt und eines der Chloratome durch Sulfonat ersetzt (Abb. 49).



Abbildung 49: Bildung des Chlormethansulfonats.

Die Reaktion lief in einem Ethanol/Wasser-Gemisch in einem geschlossenen Reaktionsgefäß bei 100 °C in Anwesenheit von Kupfer(II)-chlorid als Katalysator, die Ausbeute betrug 81 % (Lit.<sup>[48]</sup> 85%) (Abb. 50).

$$\begin{array}{c} \mathsf{Na}_2\mathsf{SO}_3\\ \mathsf{EtOH/H}_2\mathsf{O}\\ \mathsf{CI} \qquad \mathsf{H} \quad \underbrace{\mathsf{CuCl}_2, 100 \ \mathfrak{C}}_{\mathsf{H} \quad \mathsf{O}} \stackrel{\oplus}{\longrightarrow} \stackrel{\bigcirc}{\to} \stackrel{\mathsf{H}}{\overset{\mathsf{H}}{\to}} \stackrel{\mathsf{CI}}{\overset{\mathsf{H}}{\to}} \mathsf{CI}\\ \mathsf{H} \quad \mathsf{CI} \quad \overset{\mathsf{NaCI}}{\overset{\mathsf{H}}{\to}} \stackrel{\mathsf{O}}{\overset{\mathsf{H}}{\to}} \stackrel{\mathsf{H}}{\overset{\mathsf{O}}{\to}} \stackrel{\mathsf{H}}{\overset{\mathsf{H}}{\to}} \mathsf{CI} \\ \begin{array}{c}\mathsf{H} \quad \mathsf{O} \\ \mathsf{H} \end{array} \stackrel{\mathsf{H}}{\overset{\mathsf{H}}{\to}} \mathsf{CI} \\ \overset{\mathsf{H}}{\overset{\mathsf{H}}{\to}} \mathsf{CI} \end{array}$$

Abbildung 50: Synthese von Natriumchlormethansulfonat.

Nun wurde das Chlorid 72 mit dem Amin 75 bei -20 °C in Pyridin umgesetzt (Abb. 51).



Abbildung 51: Darstellung des N-Methylensulfonats.

Die Ausbeute betrug 87 % und es wurde kein Nebenprodukt detektiert.

Das so gewonnene *N*-Methylensulfonat **77** wurde anschließend hydriert, um die Benzylgruppe an der anomeren Position zu entfernen. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur und Normaldruck in Wasser durchgeführt und ergab eine Ausbeute von 94% (Abb. 52).



Abbildung 52: Hydrierung von 77.

#### 6.2.3. N-Phosphat

Für die Bildung eines *N*-Phosphats kamen zwei Phosphorylierungsreagenzen in Frage: Diphenylphosphorylchlorid und Dibenzylphosphorylchlorid. Während das Diphenyl-Derivat einfach zu handhaben ist und in reiner Form geliefert wird, weist das Dibenzyl-Derivat Explosionsgefahr auf und wird als 10% ige Lösung in Benzol geliefert. Dies erschwert die Reaktion bei tiefen Temperaturen, da Benzol bei 5 °C gefriert. Damit wäre das Diphenyl-Derivat die bessere Wahl, da es erst bei deutlich tieferen Temperaturen erstarrt. Allerdings bereitet die spätere Abspaltung der beiden Phenylgruppen Probleme, da sie deutlich stabilere Bindungen eingehen und unter härteren Bedingungen (PtO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, 60 bar) entfernt werden müssen. Bei den Vorversuchen wurde festgestellt, dass dabei die P-N-Bindung zersetzt wird. Die Benzylgruppen lassen sich im Gegensatz unter deutlich milderen Bedingungen abspalten, so dass die Phosphorylierung mit dem Dibenzylphosphorylchlorid durchgeführt wurde (Abb. 53).



Abbildung 53: Darstellung des N-Phosphats.

Bei der relativ hoher Reaktionstemperatur bestand die Gefahr der Zweitsubstitution am C6, daher wurde die Reaktion nur solange durchgeführt, bis bei der dünnschichtchromatographischen Kontrolle ein zweiter Produktspot auftauchte. Dies erklärt die relativ niedrige Ausbeute von 44 %.

Im nächsten Schritt wurden die drei Benzylgruppen durch milde Hydrierung entfernt und anschließend die entstandene modifizierte Phosphorsäure mit einer NaOH-Lösung neutralisiert (Abb. 54). Die Gesamtausbeute betrug 77 %.



Abbildung 54: Hydrierung von 78.

## 7. 1,2-Dideoxy-2-sulfamido-nojirimycin

Die Darstellung der Zielverbindung **95** besteht generell aus zwei Teilen: der Synthese des bereits beschriebenen 1,2-Dideoxy-2-acetamido-nojirimycins  $(93)^{[26,49-53]}$  und der anschließenden Substitution der *N*-Acetyl- durch eine *N*-Sulfatgruppe. Die Verbindung **93** ist kommerziell verfügbar, ist allerdings extrem teuer (12 000 Euro/g), so dass eine Synthese unerlässlich war.

Bereits in den 60-er Jahren wurden die ersten Synthese von Imminozuckern beschrieben.<sup>[23]</sup> Den Zugang zu den *N*-Acetyl-nojirimycin-Derivaten zeigen die Arbeiten von Fleet *et al.*<sup>[49,50]</sup> Aufgrund ihrer Effizienz, wurde die Methode von Furneaux et al. eingesetzt.<sup>[27]</sup> Diese startet mit *N*-Acetyl-D-glucosamin, das zuerst in eine Furanose-Form überführt wird, um Position C5 frei zu bekommen. Diese wird dann selektiv oxidiert, um eine doppelte reduktive Aminierung an Positionen C1 und C5 mit anschließendem Ringschluß zu ermöglichen (Abb. 55).



Abbildung 55: Syntheseweg zum 1,2-Dideoxy-2-acetamido-nojirimycin (93).

Des Weiteren wird bei 93, wie bereits bei 71 und 73 (siehe 3.2. und 6.1.), die *N*-Acetyl-Gruppe abgespalten und anschließend eine *N*-Sulfatierung durchgeführt (siehe auch 4.3.) (Abb. 56).



Abbildung 56: Syntheseweg zum 1,2-Dideoxy-2-sulfamido-nojirimycin (95).

## 7.1. 1,2-Dideoxy-2-acetamido-nojirimycin

Im ersten Schritt wurde *N*-Acetyl-D-glucosamin in Anwesenheit von Eisen(III)chlorid mit Aceton umgesetzt. Dabei liefen zwei verschiedene Reaktionen ab.<sup>[56]</sup> Zum einen entsteht an den Positionen C5 und C6 eine Isopropyliden-Gruppe. Der Carbonylkohlenstoff des Acetons wird mit Eisen(III)chlorid positiviert und kann von den beiden OH-Gruppen an C5 und C6 angegriffen werden, wobei ein 1,3-Dioxolan-Ring entsteht (Abb. 57).



Abbildung 57: Bildung eines 1,3-Dioxolanringes an C5 und C6.

Zum anderen bildet sich an den Positionen C1 und C2 ein Oxazolinring. Durch Reaktion der anomeren OH-Gruppe mit einem weiteren Eisen(III)chlorid-Molekül entsteht ein Oxocarbeniumion, das durch den Carbonylsauerstoff der *N*-Acetylgruppe nucleophil angegriffen wird, und sich nach Deprotonierung das Oxazolin bildet (Abb. 58).



Abbildung 58: Bildung des Oxazolins.

Die Reaktion verlief im abs. Aceton, wobei die Reaktionslösung kurzzeitig auf 60 °C erhitzt wurde. Eisen(III)chlorid wurde stöchiometrisch zugegeben (Abb. 59).



N-Acetyl-D-glucosamin

Abbildung 59: Darstellung des Oxazolins 88.

Die Ausbeute am Rohprodukt betrug 44% (Lit.<sup>[27]</sup> 71%). Dieses wurde ohne Aufarbeitung der saueren Methanolyse unterworfen, um die entstandene Furanose-Form durch die Bildung des Methyl-glucofuranosids beizubehalten. Durch die Anwesenheit der Säure wird das Stickstoffatom protoniert, was die Spaltung des Oxazolinringes bewirkt. Das entstehende Oxocarbeniumion wird anschließend vom Sauerstoffatom des Methanols angegriffen und das überschüssige Proton abgespalten (Abb. 60).



Abbildung 60: Mechanismus der Methanolyse.

Diese Reaktion kann nur unter Ausschluss von Wasser ablaufen, da sonst das C1-Atom auch von Wasser angegriffen werden könnte und somit kein Furanosid mehr entstehen würde, wenn die Isopropyliden-Gruppe im nächsten Schritt abgespaltet würde. Außerdem wäre auch sie durch die saure Hydrolyse gefährdet. Die Umsetzung durchlief in abs. Methanol in Anwesenheit von *p*-Toluolsulfonsäure bei Raumtemperatur (Abb. 61).



Abbildung 61: Methanolyse von 88.

Nachdem die Reaktion laut Dünnschichtchromatographie-Kontrolle vollständig abgelaufen war, wurde die Reaktionslösung gleich dem nächsten Syntheseschritt unterworfen, der wässrigen sauren Hydrolyse, um die Isopropyliden-Gruppe an den Positionen C5 und C6 zu entfernen (Abb. 62).



Abbildung 62: Abspaltung der Isopropyliden-Gruppe.

Dafür wurde Wasser zugegeben und der pH-Wert mit p-Toluolsulfonsäure auf 2 eingestellt. Die Gesamtausbeute betrug 44 % (Lit.<sup>[27]</sup> 74 %) (Abb. 63).



Abbildung 63: Darstellung von 90.

Im nächsten Schritt sollte die C5-Position selektiv oxidiert werden. Generell kann die Oxidation einzelner Kohlenstoffe in einem Kohlenhydratmolekül auf mehreren Wegen erzielt werden. So bieten sich zum Beispiel die Swern- oder Dess-Marti-Oxidationen als moderne Oxidationsmethoden an.<sup>[57-59]</sup> Allerdings kann die Oxidation hier kaum in die gewünschte Richtung gelenkt werden, da die C6-Position eindeutig bevorzugt wäre. Der Einsatz von Zinn-Komplexen könnte dabei die nötige Selektivität gewähren. Gepaart mit Brom als mildem Oxidationsreagenz, lenkt Dibutylzinnoxid die Oxidation in die gewünschte Richtung (Abb. 64).



Abbildung 64: Mechanismus der selektiven Oxidation an C5.

Unter Abspaltung von Wasser bildet sich zuerst ein Stannyliden-Acetal (Intermediat 1) an den Positionen C5 und C6. Nach Zugabe von Brom entsteht vermutlich über einen Übergangszustand 1 nach Abspaltung von Dibutylzinnbromid (Bu<sub>2</sub>SnBr<sub>2</sub>) die Verbindung **91**.<sup>[60]</sup> Der bei der Reaktion als Nebenprodukt entstehende Bromwasserstoff wird anwesendes Tributylzinnmethoxid abgefangen, da bei einer zu hohen Säurekonzentration die Sn-O-Bindung des Stannyliden-Acetals gespalten wird.<sup>[61]</sup>



Abbildung 65: Oxidation an C5.

Der erste Schritt läuft in Methanol unter Rückfluss ab (Abb. 65). Dann wird das Lösungsmittel gewechselt und die eigentliche Oxidation bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **91** in einer Ausbeute von 50% (Lit.<sup>[27]</sup> 52%) erhalten werden.

Für die reduktive Aminierung, die zu einem Imminozucker führt, muss der Zucker offenkettig vorliegen. Dafür musste die glycosidische Methylgruppe abgespalten werden, welches durch saure Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure bei 60 °C erreicht werden konnte (Abb. 66).



Abbildung 66: Darstellung von 92.

Nach vollständiger Umsetzung (DC-Kontrolle) wurde der entstandene Ketoaldehyd ohne Aufarbeitung der reduktiven Aminierung unterworfen. Dabei wurden die beiden Carbonylgruppen nacheinander zuerst in ein Imin und dann mittels Cyanoborhydrid in ein Amin umgewandelt (Abb. 67).



Abbildung 67: Mechanismus der reduktiven Aminierung.

Die Reaktion wurde in Methanol bei -10° C gestartet und lief in sieben Tagen bei 0° C ab. Dabei diente Ammoniumacetat als Ammoniak-Spender (Abb.68).



Abbildung 68: Reduktive Aminierung von 92.

Die Ausbeute betrug 17 % (Lit.<sup>[27]</sup> 37 %). Möglicherweise hat das ständige Entweichen von Ammoniak aus der Reaktionslösung zu der relativ niedrigen Ausbeute beigetragen. Außerdem bereitete die Reinigung wegen der großen Polarität und des ausgeprägten basischen Charakters des Moleküls Schwierigkeiten.

### 7.2. N-Sulfatierung

Somit wurde in sechs Schritten 1,2-Dideoxy-2-acetamido-nojirimycin, ein Mitglied der Familie Iminozucker erhalten.<sup>[27]</sup> Um daraus einen Inhibitor für Sufamidase darzustellen, musste zuerst die *N*-Acetyl-Gruppe entfernt werden. Dies geschah in gleicher Weise wie bei *N*-Acetyl-glucosamin (siehe **3.2.** und **6.1.**), indem das Amid im stark basischen Milieu bei 100° C gespalten wurde (Abb. 69).



Abbildung 69: Abspaltung der N-Acetylgruppe.

Die Ausbeute betrug 45 %, was auch hier an der komplizierten Aufreinigung liegen könnte. Der letzte Schritt der Synthese war die Einführung der Sulfat-Gruppe an der primären 2-Aminogruppe. Wegen der großen Polarität löste sich das freie Amin **94** weder in Pyridin noch in DMF oder DMSO, so dass die bewährte Methode (siehe **4.3**.) nicht angewendet werden konnte. Wasser konnte wegen der Hydrolyseempfindlichkeit des Schwefeltrioxid-Trimethylamin-Komplexes als Sulfatierungsreagenzes nicht eingesetzt werden. Schließlich ist es gelungen, die Substanz durch Erwärmen in Methanol in Lösung zu bringen und anschließend die Reaktion bei 0° C durchzuführen (Abb.70).



Abbildung 70: Sulfatierung der primären Aminogruppe.

Die Reaktion wurde durch äquimolare Mengen an Imidazol katalysiert. Anschliessend wurde das Trimethylammoniumkation gegen das Natriumkation ausgetauscht. Die Gesamtausbeute betrug 50 %. Erneut bereitete die Reinigung Schwierigkeiten, da auch das Zielmolekül **95** eine sehr hohe Polarität und basischen Charakter aufweist. Dieses störte auch die Analyse der Substanz, es konnte weder ein MS- noch MALDI-TOF-Spektrum aufgenommen werden. Eine elementar analytische Untersuchung schlug fehl. Schon bei vorigen *N*-Sulfatierungen wurde festgestellt, dass die Einführung der Sulfat-Gruppe am Stickstoff kaum bis keine Änderung der chemischen Verschiebung in <sup>1</sup>H- oder <sup>13</sup>C-NMR-Untersuchung hervorruft. Und da die Substanz im deuterierten Dimethylsulfoxid als aprotischen Lösungsmittel nicht löslich ist, konnte das mögliche Fehlen substituierter Protonen nicht sichtbar gemacht werden.

Die erste Detektion lieferte die dünnschichtchromatographische Kontrolle, es entstand ein neuer Spot oberhalb des Edukt-Spots. Nach dem Auftreten eines zweiten Produkt-Spots wurde die Reaktion durch Wasserzugabe abgebrochen. Mittels NMR-Experimenten wurde in dieser zweiten Produkt-Fraktion ein 6-*O*-Sulfat detektiert. In der zuerst erschienen Produkt-Fraktion wurde kein *O*-Sulfat nachgewiesen. Die Anwesenheit der *N*-Sulfat-Gruppe wurde durch ein IR-Experiment bestätigt, wobei die charakteristische N-SO<sub>3</sub>-Schwingung bei 1188 cm<sup>-1</sup> auftrat.

### 8. Enzymatische Messungen

Sulfatasen katalysieren die Hydrolyse von Schwefelsäureester und spielen eine große Rolle in der Regulierung des Sulfatierungsstandes vieler funktionalisierter Moleküle im lebenden Organismus. Die Sulfatasensubstrate variieren von kleineren cytosolischen Steroiden bis hin zu sulfatierten Proteoglycanen.<sup>[80]</sup> Im Allgemeinen katalysieren Sulfatasen die Bioreaktionen nach folgendem Muster:



wobei X für O oder NH steht.

Für alle Sulfatasen charakteristisch ist die Anwesenheit eines FGly-Restes ( $\alpha$ -Formylglycin) im aktiven Zentrum, worauf ihre katalytische Wirkung beruht.<sup>[81]</sup> Die Abbildung 71 zeigt die Positionierung eines *O*-Sulfats im aktiven Zentrum einer Sulfatase mit den wichtigsten Wechselwirkungen, eingekreist ist der  $\alpha$ -Formylglycin.



Abbildung 71<sup>[80]</sup>: *O*-Sulfat im aktiven Zentrum einer Sulfatase, einige Bindungen sind nur schematisch dargestellt (z.B. Doppelbindungen im Sulfat).

Aktuell sind fünfzehn menschliche Sulfatasen bekannt.<sup>[80]</sup> Dazu gehören z.B. Arylsulfatasen A bis G (HARS<u>A</u>-HARS<u>G</u>), deren Substrate unter anderem Steriodsulfate, Dermatansulfat oder Chondroitinsulfat sind. Wegen der variablen Sulfatpositionen wird die Desulfatierung vom Heparansulfat gleich von mehreren Sulfatasen (u.a. Glucosamin-3-Sulfatase, Glucosamin-6-Sulfatase oder Glucuronat-2-Sulfatase) übernommen.

Eine besondere Stellung nimmt die Heparan-*N*-Sulfatase (oder Sulfamidase) ein, weil sie die Spaltung eines *N*-Sulfats (Sulfamid) und nicht eines *O*-Sulfats katalysiert.

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit werden Methoden zur Behebung der mangelnden Aktivität der Sulfamidase behandelt. Wie bereits erwähnt, führt ein Gendefekt dazu, dass das neuentstandene Enzym während seines Aufenthalts im Endoplasmatischen Retikulum (ER) nicht richtig gefaltet werden kann und deswegen gleich abgebaut wird.<sup>[64]</sup> Dieses bewirkt eine mangelnde Enzymaktivität (max. 3%) und als Folge die Anreicherung des Substrats (Heparansulfat) in Lysosomen, was in einer Krankheit namens Mucopolysaccharidose Typ IIIA resultiert, die zum Tode noch im Kinderalter führt. Es wird versucht, mit Hilfe der chemischen Chaperone die Faltung zu begünstigen, um somit dem neuentstandenen, mutanten Enzym das Verlassen des ERs zu ermöglichen. Eine Anhebung der Enzymaktivität auf 5 % könnte das Überleben gewährleisten.<sup>[78,79]</sup> Vier zuvor synthetisierte Verbindungen wurden zu diesen Zwecken auf die Chaperon-Wirkung getestet:



Abbildung 72: Mögliche Inhibitoren für die Sulfamidase.

Es wird davon ausgegangen, dass diese substratähnlichen Moleküle durch ihren Aufenthalt im aktiven Zentrum des mutanten Enzyms dieses stabilisieren und solange im ER aufhalten, bis es zur richtigen Faltung kommt und das Enzym das ER verlassen kann. Die Verbindungen **79**, **82** und **95** wurden im synthetischen Teil dieser Arbeit synthetisiert, beim **Inhibitor 1** handelt es sich um erworbenes Natriumsalz der 2-Desoxy-2-sulfamido-D-glucose.

## 8.1. Testmethode

Vor der Messung der Enzymaktivität mit einem Zellextrakt wurde der Proteingehalt darin nach der Bradford-Methode<sup>[82]</sup> bestimmt.

Die Enzymaktivität bzw. Inhibierung wurde mit Hilfe eines indirekten Verfahrens gemessen. Der Zellextrakt mit Sulfamidase (bzw. reine HARSB) wurde zuerst mit 4-Methylumbelliferyl-2-deoxy-2-suldamido- $\alpha$ -D-glucopyranosid (Abb. 73) als Substrat 17 Stunden bei 37 °C inkubiert.



Abbildung 73: 4-Methylumbelliferyl-2-deoxy-2-suldamido-α-D-glucopyranosid.

Diese Verbindung wird wegen ihres Aglykons oft bei den enzymatischen Messungen eingesetzt, weil es in der ungebundenen, nicht aber in der gebundenen Form fluoresziert. Nachdem die Desulfatierung am Stickstoff mittels einer Sulfatase (Sulfamidase oder Arylsulfatase B) vollzogen war, wurde das Aglykon mit Hilfe der  $\alpha$ -Glucosidase abgespalten (24 Stunden Inkubation, 37 °C) und danach die Fluoreszenz vom entstandenen 4-Methylumbelliferon gemessen. Da das sulfatierte Substrat von der  $\alpha$ -Glucosidase nicht erkannt und nur das desulfatierte Substrat hydrolysiert wird, konnte anhand der Fluoreszenzintensität der Grad der Desulfatierung und somit die restliche Aktivität der entsprechenden Sulfatase bestimmt werden (Abb. 74). Die potenziellen Inhibitoren wurden in verschiedenen Konzentrationen im ersten Schritt zugesetzt.



Abbildung 74: Enzymatische Umsetzungen zur Aktivitätsbestimmung.

Da die Fluoreszenzmessung keinen absoluten Wert gibt, sondern nur in Relation nützlich ist, wurden die Inhibitorversuche immer von Leerwerten begleitet, bei denen BSA (*bovine serum albumin*) anstatt Enzym zugesetzt wurde. Alternativ wurden Leerwerte ohne Inhibitor bestimmt, die den maximalen Umsatz widerspiegelten. Der Vergleich der Fluoreszenzwerte erlaubte schließlich, die relative Wirksamkeit der potenziellen Inhibitoren zu ermitteln.

## 8.2. Ergebnisse

Vier von der fünf vorgeschlagenen Verbindungen wurden auf ihre inhibierende Wirkung auf die Sulfamidase getestet (**79**, **82**, **95** und **Inhibitor 1**). Die Verbindung **81** musste aus technischen Gründen entfallen. Ebenfalls aus technischen und Kostengründen (Gewinnung von Zellextrakten der Wildtyp- und mutanten Sulfamidase) konnten nicht alle Messungen mit

derselben Enzympräparation durchgeführt werden. So wurde **Inhibitor 1** mit der rekombinanten Arylsulfatase B (HARSB), **79** und **82** mit einem die Wildtyp-Sulfamidase enthaltenden Zellextrakt und **95** mit einem Zellextrakt, der die Sulfamidase-Mutante Ser298Pro (Serin an der Position 298 durch Prolin ersetzt) enthielt, inkubiert.

Die Ergebnisse wurden in Form von Diagrammen zusammengefasst, die die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität (Konzentration des freigesetzten 4-Methylumbelliferons) von der eingesetzten Inhibitorkonzentration darstellen.

Der Inhibitor 1 wurde zum Kontrollzweck mit der Arylsulfatase B umgesetzt, um zu klären, ob eine Enzym-Substrat-Spezifizität vorliegt. Wie der untenstehenden Graphik entnommen werden kann, nimmt die Enzymaktivität bei einer Inhibitor-Endkonzentration (EK) von 500  $\mu$ M um etwa 25% ab. Dies bedeutet, dass dieser Inhibitor für die Arylsulfatase B als eher unspezifisch einzustufen ist.



Die Verbindungen **79** und **82** wurden mit einem Zellextrakt umgesetzt, der intakte, überexprimierte Sulfamidase (Wildtyp, WT) enthielt. Dabei sollte geklärt werden, ob die beiden Substanzen eine inhibierende Wirkung auf die Sulfamidaseaktivität ausüben. Wäre das der Fall, würde dies bedeuten, dass die Verbindungen das aktive Zentrum der Sulfamidase für einige Zeit blockieren, was bei dem mutanten, falsch gefalteten Enzym möglicherweise eine Stabilisierung und Zeitgewinn für eine richtige Faltung bedeuten könnte. Wie dem nachstehenden Diagramm entnommen werden kann, kommt es bei beiden Substanzen zur

Enzymaktivitätshemmung, um etwa 25% bei **79** und um etwa 55% bei **82** bei einer Endkonzentration von 100  $\mu$ M. Dies bedeutet, dass die Verbindung **82** durchaus als Inhibitor für Sulfamidase in Frage kommt und sich somit als mögliches Chaperon für das mutante Enzym eignet. Diese Substanz müßte allerdings noch auf ihre Spezifizät (Inhibition von Arylsulfatase B) und auf ihre Zellpermeabilität getestet werden.



Als einzige Verbindung, wurde **95** mit intakten Zellen inkubiert, die eine mutante Sulfamidase (Ser298Pro) überexprimieren. Dieser Versuchsansatz stellt die eigentliche Anwendungssituation für ein Sulfamidase-spezifisches Chaperon dar. Von dem wasserlöslichen Chaperon wird erwartet, dass es ungehindert in die Zelle eindringt und sich verteilt. Dabei kommt es im endoplasmatischen Retikulum mit der neusynthetisierten mutanten Sulfamidase (Ser298Pro) in Kontakt und bindet an das aktive Zentrum. Analog zu anderen Studien zur Anwendung chemischer Chaperone für lysosomale Hydrolasen verhindert die Bindung der Inhibitors/Chaperons den sofortigen Abbau der mutanten Sulfamidase, stabilisiert sie und ermöglicht für einen Teil des Enzyms die richtige Faltung und den Weitertransport zum Lysosom.

Am Ende der Inkubation intakter Zellen muss die Sulfamidaseaktivität ansteigen. Wie aus dem nachstehenden Diagramm hervorgeht, steigt die Enzymaktivität bei einer Endkonzentration von **95** 10  $\mu$ M um etwa 50% an.



Rein rechnerisch bedeutet das eine Anhebung der Restaktivität der mutanten Sulfamidase von ca. 3% auf 4.5% gegenüber der intakten Sulfamidase, allgemein gelten 5% als Überlebungsgrenze.<sup>[78,79]</sup>

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten ersten Versuche zur Anhebung der Aktivität der mutanten Sulfamidase sind nur als Stichproben zu werten. Aufbauend darauf verlangt es nach weiteren umfangreicheren Tests, die aber den Rahmen dieser Arbeit um ein Vielfaches überschreiten. Bis zum erfolgreichen Einsatz der beschriebenen Verbindungen als Chaperone müssen noch viele Fragen geklärt werden. Zuallererst müssen die untersuchten Substanzen unter gleichen Bedingungen mit der mutanten Sulfamidase umgesetzt werden, um zu klären, welche davon die effektivste ist. Dann sollten die Wirkungskonzentrationen untersucht werden, denn oft ist es nur ein schmaler Konzentrationsbereich, in dem die maximale Wirkung eines Inhibitors erreicht wird. Ausserdem muss geklärt werden, wie der jeweilige Inhibitor in der Zelle verstoffwechselt wird und wie stabil er unter verschieden pH-Werten ist, da diese sich in verschiedenen Teilen einer Zelle unterscheiden.

### 9. Zusammenfassung

Funktionalisierte Kohlenhydrat-Derivate sind an einer Vielzahl von Prozessen in lebenden Organismen beteiligt. Dazu zählen z.B. energiereiche Nucleosidtriphosphate, Sialin- und Uronsäuren sowie variabel sulfatierte Polysaccharide wie Heparin, Heparansulfat oder Xylanpolysulfat. Sulfatierte Kohlenhydrate sind unter anderem Bestandteile der Glycocalix, ihre Wechselwirkungen mit anderen Ionen und Molekülen spielen eine Rolle bei der Erkennung und somit der Interaktion von Ionen und Molekülen mit der Zelle.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe von Mono- und Disacchariden dargestellt, die anschließend mittels *atomic force microscopy* (AFM) untersucht wurden. Die auf D-Glucose, D-Galactose, D-Glucosamin und Lactose basierenden Glykoside ( $55\alpha/\beta$ ,  $59\alpha/\beta$ ,  $60\alpha/\beta$ ,  $62\alpha/\beta$ , 67, 68 und 80) haben ein Thiobutyl-Aglykon für die Verbindung zu der Goldoberfläche bei AFM-Messungen und tragen an verschiedenen Positionen je eine Sulfatgruppe. Die Syntheseroute bestand generell aus drei Teilen: zuerst wurden die freien Zucker glykosyliert, dann am Ende des Aglykons eine Thio-Funktion erzeugt und anschließend die anvisierten Positionen (C2, C3 und C6) selektiv sulfatiert.

Die AFM-Untersuchungen haben gezeigt, dass die Konfiguration am anomeren Zentrum und die Anwesenheit der geladenen Gruppen einen bedeutenden Einfluss auf die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen zwei Kohlenhydratmolekülen haben und so einen biologisch relevanten Mechanismus andeuten. Insgesamt konnte ein experimenteller Ansatz zur Simulation interzellulärer Wechselwirkungen am Beispiel von interglykosidischen Wechselwirkungen geladener und ungeladener Systeme aufgebaut und erste Systeme untersucht werden.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese möglicher Inhibitoren für das Enzym Heparan-*N*-sulfatase mit anschließenden enzymatischen Untersuchungen zu ihrer Wirksamkeit. Die Inhibition des im Endoplasmatischen Retikulum (ER) neuentstandenen Enzyms könnte im Falle einer Mutation zur korrekten Faltung verhelfen und somit eine Anreicherung von Heparansulfat als Substrat verhindern. Die synthetisierten Verbindungen basieren alle auf D-Glucosamin und die Derivatisierungen fanden an der 2-Aminogruppe statt (**79**, **81** und **82**). Des Weiteren wurde ein Imin-Analogon des D-Glucosamins synthetisiert (**93**) und anschließend in das *N*-Sulfat (**95**) überführt. Zum Vergleich wurde 2-Desoxy-2sulfamido-D-glucose (**Inhibitor 1**) wegen der größten Ähnlichkeit mit dem Substrat herangezogen. Die biochemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die dargestellten Verbindungen im unterschiedlichen Grad die Enzymreaktion beeinflussen: während **79** etwa 25% Inhibierung bewirkte, wurde bei **82** und **95** eine Hemmung der Enzymreaktion von rund 50 % detektiert. Sollten diese Ergebnisse auf einen klinischen Fall übertragbar sein, würde dies die Überlebungschancen für die an Mucopolysaccharidose Typ IIIA erkrankten Kinder erheblich erhöhen. Bis dahin müssen die getesteten Verbindungen noch weiteren Untersuchungen, z.B. hinsichtlich ihrer Spezifität und Zellpermeabilität, unterzogen werden.

### **10. Summary**

Functionalized carbohydrate derivatives are involved in a variety of processes in living organisms. These include for example energy-rich nucleoside triphosphates, sialic and uronic acids as well as variably sulfated polysaccharides such as Heparin, Heparan sulfate or Xylanepolysulfate. Sulfated carbohydrates are important components of the glycocalix. Their interactions with other ions and molecules play a role in the detection and therefore the of interaction ions and molecules within the cell. In the first part of this work, a series of mono- and disaccharides was shown, which were analyzed by atomic force microscopy (AFM). The glycosides based on D-glucose, Dgalactose, D-glucosamine and lactose ( $55\alpha/\beta$ ,  $59\alpha/\beta$ ,  $60\alpha/\beta$ ,  $62\alpha/\beta$ , 67, 68 and 80) have a thiobutyl aglycone for connection to the gold surface in AFM measurements and carry a sulfate group at different positions. The synthetic routes consisted generally of three parts: first free sugars were glycosylated, then a terminally thio-functionalized aglycone generated and finally (C2, C3 and C6) sulfated the target position selectively. The AFM studies showed that the configuration at the anomeric center and the presence of charged groups have a significant influence on the electrostatic interactions between two carbohydrate molecules, and suggest a biological relevant mechanism. Overall, an experimental approach for the simulation of intercellular interactions could build on the example of interaction of charged and uncharged interglycosidic interactions and the first systems could be studied.

The second part presents the synthesis of potential inhibitors of the enzyme Heparan Nsulfatase, followed by enzymatic studies of their efficiency. In the case of mutation and formation of a new enzyme in the endoplasmic reticulum (ER) its inhibition could promote correct folding and thus prevent an accumulation of Heparan sulfate as a substrate. The synthesized compounds are all based on D-glucosamine and the derivatization took place at the 2-amino group (**79**, **81** and **82**). Further, an imine analogue of D-glucosamine (**93**) was synthesized and then transferred into the N-sulfate (**95**). For comparison, 2-deoxy-2sulfamido-D-glucose (**Inhibitor 1**) was used for its wide similarity with the substrate. The biochemical studies showed that the synthesized compounds affect the enzymatic reaction by different degrees: whereas **79** showed approximately 25%, the data for **82** and **95** gave around 50% of inhibition of the enzyme reaction. Should these results be transferable to a clinical case, this would several increase of survival of children having Mucopolysaccharidosis type IIIA. In further studies the novel compounds must undergo examinations, e.g. in terms of specificity, cell permeability and others.

# **10. Experimenteller Teil**

# Allgemeine Arbeitsmethoden

## Dünnschichtchromatographie

Alle Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelfolie (Merck DC-Alufolien 60 F254) verfolgt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Absorption sowie durch Besprühen mit 10 %iger ethanolischen Schwefelsäure und anschließender Wärmebehandlung.

## Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Trennungen wurden nach dem Flash-Verfahren mit leichtem Stickstoffüberdruck an Kieselgel (230-400 mesh, Korngröße 0.040-0.063 mm, Merck) durchgeführt.

**Gelpermeationschromatographie** wurde an Biogel P2, Biogel P4 oder Sephadex G15 mit bidestilliertem Wasser als Laufmittel durchgeführt.

Schmelzpunktbestimmungen erfolgten an einem apotec-Schmelzpunktbestimmer.

**Der optische Drehwert** wurde mit einem Perkin-Elmer-Polarimeter 341 in 100 mm-Küvetten bei 20 °C ermittelt. Drehwerte wurden nur von anomerenreinen Verbindungen gemessen.

**Elementaranalysen** wurden in der Abteilung Zentrale Elementanalytik des Departments Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

# NMR-Spektroskopie

Alle dargestellten Verbindungen wurden mittels <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie an den Bruker Spektrometern AMX-400 (100 MHz bei <sup>13</sup>C) und DRX-500 (125 MHz bei <sup>13</sup>C) vermessen. Die genaue Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von <sup>1</sup>H<sup>1</sup>H-COSY, HMQC und gegebenenfalls HMBC-Experimenten.

Anomerenverhältnisse wurden über die integrierten Signale aus den <sup>1</sup>H-NMR Spektren bestimmt.

### Massenspektren

MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem Bruker Biflex III aufgenommen. Gemessen wurde in Positive Reflektor Mode. Als Matrix wurde Dithranol verwendet. FAB-Massenspektren wurden an einem VG Analytical 70-250S Massenspektrometer gemessen.

## **Allgemeine Arbeitsvorschriften**

## **AAV 1: Acetylierung**

Die OH-freie Verbindung wird in abs. Pyridin gelöst, gegebenenfalls unter Eiskühlung mit 3 Äq. Essigsäureanhydrid pro umzusetzender OH-Gruppe versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach vollständiger Reaktion wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand mehrmals mit Toluol codestilliert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Säulenchromatographie.

## AAV 2: Deacetylierung nach Zemplén

Die zu deacetylierende Verbindung wird in abs. Methanol gelöst und mit 1 M Natriummethanolat-Lösung versetzt bis ein pH-Wert von 8 erreicht ist. Nach vollständiger Umsetzung wird mit Amberlite IR 120 H<sup>+</sup> neutralisiert, filtriert und unter vermindertem Druck zur Trockne eingeengt. Gegebenenfalls erfolgt anschließend eine säulenchromatographische Reinigung.

## AAV 3: Katalytische Hydrierung

Zur katalytischen Hydrierung wird die Verbindung in dem angegebenen Lösungsmittel aufgenommen, mit Pd/C (10 %) versetzt und der Wasserstoff durch die Reaktionslösung geleitet. Nach vollständiger Umsetzung wird der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Gegebenenfalls erfolgt eine säulenchromatographische Reinigung mit dem jeweils angeführten Laufmittelgemisch.

## AAV 4: Glycosylierung nach Fischer

Das zu glycosylierende Monosaccharid wird im Überschuss des jeweiligen Alkohols suspendiert und mit einer katalytischen Menge konzentrierter Salzsäure versetzt. Die Suspension wird bei der angegebenen Temperatur 24 Stunden gerührt. Nach erfolgter DC-Kontrolle wird die entstandene Lösung eingeengt und die Rohsubstanz einer säulenchromatographischen Reinigung mit dem jeweils angeführten Laufmittelgemisch unterzogen.

## AAV 5: Nukleophile Substitution mit Kaliumthioacetat

Das jeweilige Chlorid wird in der angegebenen Menge abs. DMF gelöst und mit einem zweifachen Überschuss an Kaliumthioacetat versetzt. Die Suspension wird 24 Stunden bei RT gerührt, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand an Kieselgel mit dem jeweils angeführten Laufmittelgemisch gereinigt.

## AAV 6: Sulfatierung an C-6 eines Monosaccharids

Das jeweilige Monosaccharid wird in der angegebenen Menge abs. Pyridin gelöst und mit 1.5-fachem Überschuss an Schwefeltrioxid-Trimethylamin-Komplex versetzt. Die Lösung wird 16 Stunden bei RT gerührt, eingeengt und Pyridinreste mit Toluol codestilliert. Der Rückstand wird anschließend an Kieselgel mit dem jeweils angeführten Laufmittelgemisch gereinigt und das Kation an Amberlite IR120 (Na<sup>+</sup>-Form) ausgetauscht.
#### **Spezielle Arbeitsvorschriften**

#### 4'-Chlorbutyl-D-glucopyranosid (30)

1.6 g (8.9 mmol) D-Glucose und 25 ml (0.25 mol) 4-Chlor-1-butanol wurden bei 60 °C nach AAV 4 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 8:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 1.6 g (67 %) Gelber Sirup Anomerenverhältnis  $\alpha/\beta = 3:1$ C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>ClO<sub>6</sub> (270.71 g/mol) Ber.: C 44.47 H 7.07 Gef.: C 44.35 H 7.37



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 4.82 (d, 1H, H1α), 4.29 (d, 1H, H1β), 3.91 (m, 1H, H6aα), 3.83 (m, 1H, H1'aα), 3.71 (m, 1H, H6bα), 3.67 (dd, 1H, H3α), 3.63 (m, 2H, H4'α), 3.60 (m, 1H, H4α), 3.52 (m, 1H, H1'bα), 3.43 (dd, 1H, H2α), 3.31 (m, 1H, H5α), 1.93 (m, 2H, H3'α), 1.84 (m, 2H, H2'α).

 ${}^{3}J_{1,2(\alpha)} = 3.6, {}^{3}J_{1,2(\beta)} = 7.9, {}^{3}J_{2,3(\alpha)} = 6.1, {}^{3}J_{3,4(\alpha)} = 5.9, {}^{3}J_{5,6a(\alpha)} = 2.0$  Hz.

#### <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

 $\delta$  [ppm] = 104.8 (C1β), 100.6 (C1α), 75.5 (C4α), 74.2 (C3α), 73.9 (C2α), 72.1 (C5α), 68.7 (C1'α), 63.2 (C6α), 46.1 (C4'α), 31.2 (C3'α), 28.5 (C2'α).

#### 4'-Chlorbutyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid (30 $\alpha$ )

2.16 g (4.92 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-4'-chlorobutyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid (**33** $\alpha$ ) wurden nach AAV 2 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 7:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 1.24 g (4.59 mmol, 93 %) Hellgelbes Öl  $C_{10}H_{19}ClO_6$  (270.71 g/mol)  $R_f = 0.25$  (Methanol/Dichlormethan 1:7)  $[\alpha]_{546}^{20} = +105^{\circ}$  (c = 0.5, MeOH)



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 4.95 (d, 1H, H1), 3.88 (dd, 1H, H6a), 3.71-3.77 (m, 4H, H-1'a, H6b, H5, H4), 3.68 (t, 2H, H4'), 3.55-3.62 (m, 2H, H1'b, H2), 3.45 (dd, 1H, H3), 1.85-1.97 (m, 2H, H3'), 1.74-1.85 (m, 2H, H2').

 ${}^{3}J_{1,2} = 3.8$ ,  ${}^{3}J_{2,3} = 9.4$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 9.5$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 98.5 (C1), 73.5 (C5), 72.2 (C4), 71.7 (C3), 69.9 (C2), 67.8 (C1'), 60.9 (C6), 45.7 (C4'), 21.2 (C3'), 26.6 (C2').

## 4'-Chlorbutyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (30 $\beta$ )

0.75 g (1.69 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-4'-chlorobutyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (**33** $\beta$ ) wurden nach AAV 2 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 7:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 0.434 g (1.61 mmol, 95 %) Hellgelbes Öl  $C_{10}H_{19}ClO_6$  (270.71 g/mol)  $R_f = 0.25$  (Methanol/Dichlormethan 1:7)  $[\alpha]_{546}^{20} = -35^\circ$  (c = 0.5, MeOH)



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 4.29 (d, 1H, H1β), 3.91 (m, 1H, H6a), 3.83 (m, 1H, H1'a), 3.71 (m, 1H, H6b), 3.67 (dd, 1H, H3), 3.63 (m, 2H, H4'), 3.60 (m, 1H, H4), 3.52 (m, 1H, H1'b), 3.43 (dd, 1H, H2), 3.31 (m, 1H, H5), 1.93 (m, 2H, H3'), 1.84 (m, 2H, H2').

 ${}^{3}J_{1,2} = 7.9$ ,  ${}^{3}J_{2,3} = 6.1$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 8.9$ ,  ${}^{3}J_{5,6a} = 2.0$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 104.8 (C1), 75.5 (C4), 74.2 (C3), 73.9 (C2), 72.1 (C5), 68.7 (C1'), 63.2 (C6), 46.1 (C4'), 31.2 (C3'), 28.5 (C2').

# 4'-Chlorbutyl-4,6-*O*-benzyliden-α-D-glucopyranosid (31α) und 4'-Chlorbutyl-4,6-*O*benzyliden-β-D-glucopyranosid (31β)

2.25 g (8.31 mmol) **30** wurden in 20 ml THF gelöst und mit 1.8 ml (12.1 mmol) Benzaldehyddimethylacetal versetzt. Nach Zugabe katalytischer Menge *para*-Toluolsulfonsäure wurde der Ansatz drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde 1 ml Triethylamin zugegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether/Essigester 1:1) gereinigt.

Es wurden Verbindungen  $31\alpha$  und  $31\beta$  sowie Anomerengemisch 31 in einer Gesamtausbeute von 66 % erhalten.

#### 31α

Ausbeute: 1.15 g (3.2 mmol, 39 %)  $C_{17}H_{23}ClO_6$  (358.81 g/mol) Gelblicher Sirup  $[\alpha]_{546}^{20} = +108^{\circ}$  (c = 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) MALDI-TOF (Dithranol, positive mode): m/z = 381.9 [M + Na]<sup>+</sup>



#### <sup>1</sup>**H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 7.55 – 7.35 (m, 5H, Benzyliden Phenyl), 5.54 (s, 1H, Benzyliden CH), 4.91 (d, 1H, H1), 4.28 (dd, 1H, H6a), 3.93 (vt, 1H, H3), 3.85 (m, 1H, H5), 3.78 (m, 2H, H1'), 3.74 (vt, 1H, H6b), 3.65 (m, 2H, H4'), 3.61 (dd, 1H, H2), 3.51 (vt, 1H, H4), 1.87 /m, 2H, H3'), 1.81 (m, 2H, H2').

$${}^{3}J_{1,2} = 3.8$$
,  ${}^{3}J_{2,3} = 9.4$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 9.1$ ,  ${}^{3}J_{4,5} = 9.1$ ,  ${}^{3}J_{5,6a} = 4.4$ ,  ${}^{3}J_{5,6b} = 10$ ,  ${}^{2}J_{6a,6b} = 10.0$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 129.7 / 128.7 / 126.7 (Benzyliden Phenyl), 102.3 (Benzyliden CH), 99.2 (C1), 81.3 (C4), 73.3 (C2), 72.2 (C3), 69.3 (C6), 68.3 (C1'), 62.3 (C5), 45.2 (C4'), 29.7 (C3'), 27.3 (C2').

# $31\alpha/\beta$ -Anomerengemisch

Ausbeute: 0.29 g (0.8 mmol, 10 %) C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>ClO<sub>6</sub> (358.81 g/mol) Gelblicher Sirup



# 31β

Ausbeute: 0.49 g (1.4 mmol, 17 %)  $C_{17}H_{23}ClO_6$  (358.81 g/mol) Gelblicher Sirup  $[\alpha]_{546}^{20} = -48^{\circ}$  ( c= 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) MALDI-TOF (Dithranol, positive mode):  $m/z = 381.78 [M + Na]^{+}$ 



# <sup>1</sup>**H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 7.52 – 7.32 (m, 5H, Phenyl), 5.53 (s, 1H, Benzyliden CH), 4.39 (d, 1H, H1), 4.33 (dd, 1H, H6a), 3.97 – 3.89 (ddd, 1H, H5), 3.86 – 3.75 (m, 2H, H3, H1'a), 3.64 – 3.42 (m, 6H, H6b, H4'a-b, H2, H4, H1'b), 1.93 – 1.84 (m, 2H, H3'), 1.84 – 1.76 (m, 2H, H2').

 ${}^{3}J_{1,2} = 7.8$ ,  ${}^{3}J_{2,3} = 9.4$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 9.2$ ,  ${}^{3}J_{4,5} = 9.7$ ,  ${}^{3}J_{5,6a} = 4.8$ ,  ${}^{2}J_{6a,6b} = 10.4$  Hz.

## <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 129.7 - 126.7 (Phenyl), 103.5 (C1), 102.3 (Benzyliden CH), 80.9 (C4), 74.9 (C2), 73.6 (C3), 69.9 (C6), 69.1 (C1'), 66.8 (C5), 45.1 (C4'), 29.6 (C3'), 27.4 (C2').

#### 4'-Chlorbutyl-D-galactopyranosid (32)

15.0 g D-Galactose (83 mmol) und 75 ml (0.75 mol) 4-Chlor-1-butanol wurden bei 60 °C nach AAV 4 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 8:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 7.5 g (27 mmol, 33 %) Anomerenverhältnis  $\alpha/\beta = 3:1$ Gelber Sirup C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>ClO<sub>6</sub> (270.71 g/mol) Ber.: C 44.47 H 7.07 Gef.: C 44.38 H 7.27



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 5.05 (d, 1H, H1α), 4.50 (d, 1H, H1β), 4.05 (m, 1H, H6aα), 3.93 (dd, 1H, H4α), 3.87 (m, 1H, H6bα), 3.84 (m, 1H, H1'aα), 3.81 (m, 1H, H3α), 3.77 (t, 2H, H4'α), 3.70 (dd, 1H, H2α), 3.66 (m, 1H, H5α), 3.64 (m, 1H, H1'bα), 3.61 (dd, 1H, H2β), 1.98 (m, 2H, H3'α), 1.89 (m, 2H, H2'α).

$${}^{3}J_{1,2(\alpha)} = 3.6, \; {}^{3}J_{1,2(\beta)} = 7.9, \; {}^{3}J_{2,3(\alpha)} = 6.1, \; {}^{3}J_{2,3(\beta)} = 7.2, \; {}^{3}J_{3,4(\alpha)} = 3.9 \text{ Hz}.$$

# <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

 $\delta$  [ppm] = 103.1 (C1β), 98.6 (C1α), 75.5 (C4α), 73.2 (C3α), 71.3 (C2β), 71.1 (C2α), 69.9 (C5α), 68.7 (C1'α), 61.6 (C6α), 45.7 (C4'α), 29.2 (C3'α), 26.6 (C2'α).

#### 4'-Chlorbutyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (32 $\alpha$ )

3.9 g (8.8 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-4'-chlorbutyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**34** $\alpha$ ) wurden nach AAV 2 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 7:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 2.3 g (8.5 mmol, 96 %) Farbloses Öl  $C_{10}H_{19}ClO_6$  (270.71 g/mol)  $R_f = 0.38$  (Dichlormethan/ Methanol 6:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +144^{\circ}$  (c = 0.5, MeOH)



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 4.94 (d, 1H, H1), 3.97 (d, 1H, H4), 3.92 (vt, 1H, H5), 3.86–3.80 (m, 2H, H2, H3), 3.80–3.70 (m, 3H, H1'a, H6a,b), 3.66 (t, 2H, H4'), 3.56 (m, 1H, H1'b), 1.87 (m, 2H, H3'), 1.77 (m, 2H, H2').

 ${}^{3}J_{1,2} = 3.3$ ,  ${}^{3}J_{2,3} = 9.4$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 3.7$ ,  ${}^{3}J_{4,5} = 9.1$ ,  ${}^{3}J_{5,6a} = 6.1$ ,  ${}^{3}J_{3',4'} = 6.4$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 98.6 (C1), 71.3 (C5), 69.9 (C3), 69.6 (C4), 68.7 (C2), 67.9 (C1'), 61.6 (C6), 45.7 (C4'), 29.2 (C3'), 26.6 (C2').

## 4'-Chlorbutyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (32 $\beta$ )

1.9 g (4.3 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-4'-chlorbutyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (**34** $\beta$ ) wurden nach AAV 2 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 7:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 1.16 g (4.3 mmol, 97 %) Farbloses Öl  $C_{10}H_{19}ClO_6$  (270.71 g/mol)  $R_f = 0.36$  (Dichlormethan/ Methanol 6:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = -4.3^\circ$  (c = 0.5, MeOH)



#### <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 4.50 (d, 1H, H1), 4.05 (m, 1H, H6a), 3.93 (dd, 1H, H4), 3.87 (m, 1H, H6b), 3.84 (m, 1H, H1'a), 3.81 (m, 1H, H3), 3.77 (t, 2H, H4'), 3.66 (m, 1H, H5), 3.64 (m, 1H, H1'b), 3.61 (dd, 1H, H2), 1.98 (m, 2H, H3'), 1.89 (m, 2H, H2').

$${}^{3}J_{1,2} = 7.9$$
,  ${}^{3}J_{2,3} = 7.2$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 3.9$ ,  ${}^{3}J_{4,5} = 9.1$ ,  ${}^{3}J_{5,6a} = 6.1$ ,  ${}^{3}J_{3',4'} = 6.4$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 103.1 (C1), 75.5 (C4), 73.2 (C3), 71.3 (C2), 69.9 (C5), 68.7 (C1'), 61.6 (C6), 45.7 (C4'), 29.2 (C3'), 26.6 (C2').

#### 4'-Chlorbutyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranosid (33)

5.94 g (21.9 mmol) 4`-Chlorbutyl-D-glucopyranosid (**30**) wurden in 30 ml Pyridin nach AAV 1 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat 3:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Es wurden Verbindungen  $33\alpha$  und  $33\beta$  sowie das Anomerengemisch  $33\alpha/\beta$  in einer Gesamtausbeute von 91 % erhalten.

#### 33α

Ausbeute: 2.24 g (5.1 mmol, 23 %) Hellgelbes Öl  $C_{18}H_{27}ClO_{10}$  (438.85 g/mol)  $R_f = 0.15$  (Petrolether/Ethylacetat 3:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +120^{\circ}$  (c = 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) MALDLTOF (Dithranol positive mod



MALDI-TOF (Dithranol, positive mode):  $m/z = 461.73 [M + Na]^+$ 

# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 5.45 (dd, 1H, H3), 5.07 (d, 1H, H1), 5.04 (dd, 1H, H4), 4.87 (dd, 1H, H2), 4.25 (dd, 1H, H6a), 4.10 (dd, 1H, H6b), 3.96-4.02 (m, 1H, H5), 3.72-3.78 (m, 1H, H1'a), 3.60 (t, 2H, H4'), 3.43-3.50 (m, 1H, H1'b), 2.05 (12H, 4 x CH<sub>3</sub>), 1.84-1.92 (m, 2H, H3'), 1.74-1.81 (m, 2H, H2').

$${}^{3}J_{1,2} = 3.8$$
,  ${}^{3}J_{2,3} = 10.1$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 9.7$ ,  ${}^{3}J_{4,5} = 10.4$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 171.1 - 170.1 (4\*C=O), 96.1 (C1), 71.2 (C2), 70.6 (C3), 68.9 (C4), 68.2 (C1'), 67.7 (C5), 62.3 (C6), 44.9 (C4'), 29.7 (C3'), 27.1 (C2'), 21.4 - 21.1 (4\*CH<sub>3</sub>).

#### **33**α/β-Anomerengemisch

Ausbeute: 5.73 g (13.1 mmol, 60 %) Dunkelgelbes Öl C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>ClO<sub>10</sub> (438.85 g/mol)



# 33β

Ausbeute: 0.761 g (1.7 mmol, 8 %) Hellgelber dickflüssiger Sirup  $C_{18}H_{27}ClO_{10}$  (438.85 g/mol)  $R_f = 0.11$  (Petrolether/Ethylacetat 3:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = -2.8^{\circ}$  (c = 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)



MALDI-TOF (Dithranol, positive mode):  $m/z = 461.82 [M + Na]^+$ 

# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 5.45 (dd, 1H, H3), 5.08 (dd, 1H, H4), 4.97 (dd, 1H, H2), 4.50 (d, 1H, H1), 4.25 (dd, 1H, H6a), 4.12 (dd, 1H, H6b), 3.87-3.94 (m, 1H, H1'a), 3.66-3.71 (m, 1H, H5), 3.45-3.59 (m, 3H, H1'b, H4'), 2.05 (s, 12H, 4 x CH<sub>3</sub>), 1.78-1.86 (m, 2H, H3'), 1.67-1.76 (m, 2H, H2').

 ${}^{3}J_{1,2} = 8.1, {}^{3}J_{2,3} = 9.5, {}^{3}J_{3,4} = 9.4, {}^{3}J_{4,5} = 9.9$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 169.8, 169.7 (C=O), 101.2 (C1), 71.2 (C2), 70.6 (C3), 68.9 (C4), 68.2 (C1'), 67.7 (C5), 62.3 (C6), 45.1 (C4'), 29.5 (C3'), 27.1 (C2'), 21.14 - 20.10 (4\*CH<sub>3</sub>).

#### 4'-Chlorbutyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-galactopyranosid (34)

4.1 g (15 mmol) 4'-Chlorbutyl-D-galactopyranosid (32) wurden in 30 mL Pyridin nach AAV
1 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit
Petrolether/Ethylacetat 3:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Es wurden Verbindungen  $34\alpha$  und  $34\beta$  sowie das Anomerengemisch  $34\alpha/\beta$  in Gesamtausbeute von 84 % erhalten.

#### 34α

Ausbeute: 3.1 g (7 mmol, 47 %) Hellgelbes Öl  $C_{18}H_{27}ClO_{10}$  (438.85 g/mol)  $R_{f} = 0.18$  (Petrolether/Ethylacetat 3:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +145^{\circ}$  (c = 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) MALDI-TOF (Dithranol, positive mode): m/z = 461.81 [M + Na]<sup>+</sup>



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 5.45 (dd, 1H, H3), 5.33 (m, 1H, H2), 5.12 (d, 1H, H1), 5.10 (m, 1H, H6b), 4.20 (m, 1H, H4), 4.09 (m, 2H, H5, H6a), 3.74 (m, 1H, H1'a,), 3.57 (m, 2H, H4'), 3.45 (m, 1H, H1'b), 2.15–1.96 (4s, 12H, Ac-CH<sub>3</sub>), 1.86 (m, 2H, H3'), 1.75 (m, 2H, H2').

 ${}^{3}J_{1,2} = 3.8$ ,  ${}^{3}J_{2,3} = 10.3$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 4.1$ ,  ${}^{3}J_{4,5} = 5.7$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 170.9 (4\*C=O), 96.6 (C1), 68.6 (C3), 68.5 (C1'), 68.2 (C2), 68.0 (C4), 66.7 (C5), 62.2 (C6), 45.0 (C4'), 29.8 (C2'), 27.1 (C3'), 21.2 (4\*CH<sub>3</sub>).

## $34 \alpha/\beta \text{-Anomerengemisch}$

Ausbeute: 2.1 g (4.8 mmol, 32 %) Dunkelgelbes Öl C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>ClO<sub>10</sub> (438.85 g/mol)



# 34β

Ausbeute: 0.3 g (0.7 mmol, 5 %) Hellgelber dickflüssiger Sirup  $C_{18}H_{27}ClO_{10}$  (438.85 g/mol)  $R_f = 0.11$  (Petrolether/Ethylacetat 3:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = -2.7^{\circ}$  (c = 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)



MALDI-TOF (Dithranol, positive mode):  $m/z = 461.78 [M + Na]^+$ 

# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 5.13 (dd, 1H, H3), 5.01 (dd, 1H, H4), 4.91 (dd, 1H, H2), 4.42 (dd, 1H, H1), 4.05-4.20 (m, 2H, H6), 3.84 (m, 1H, H1'), 3.62 (m, 1H, H5), 3.42-3.52 (m, 3 H, H1', H4'), 2.01, 1.97, 1.95, 1.93 (4\*s, 12 H, 4\*Ac-CH<sub>3</sub>), 1.76 (m, 2 H, H3'), 1.66 (m, 2 H, H2').

 ${}^{3}J_{1,2} = 8.1, {}^{3}J_{2,3} = 9.6, {}^{3}J_{3,4} = 4.7, {}^{3}J_{4,5} = 3.4$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 101.2 (C1), 73.2 (C3), 72.2 (C5), 71.7 (-2), 69.5(C1'), 68.9 (C4), 62.4 (C6), 45.0 (C4'), 29.5 (C3'), 27.2 (C2'), 21.2-21.0 (4\*CH<sub>3</sub>).

# 4'-(Acetylthio)butyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid (52 $\alpha$ )

300 mg (1.1 mmol)  $30\alpha$  wurden nach AAV 5 in 10 ml abs. DMF umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 7:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 230 mg (0.74 mmol, 67 %) Hellgelber Sirup  $C_{12}H_{22}O_7S$  (310.36 g/mol)  $R_f = 0.51$  (Dichlormethan /Methanol 4:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +105^\circ (c = 0.5, MeOH)$ 



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 4.90 (d, 1 H, H1), 3.85 (dd, 1 H, H6a), 3.61-3.79 (m, 4 H, H6b, H1'a, H5, H4), 3.50-3.57 (m, 2 H, H2, H1'b), 3.40 (dd, 1 H, H3), 2.90 (t, 2 H, H4'), 2.35 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.60-1.77 (m, 4 H, H2', H3').

 ${}^{3}J_{1,2} = 3.8$ ,  ${}^{3}J_{2,3} = 9.1$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 9.9$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 98.5 (C1), 73.5 (C5), 72.1 (C4), 71.7 (C2), 69.9 (C3), 67.9 (C1'), 60.9 (C6), 30.4 (CH<sub>3</sub>), 29.0 (C4'), 28.1 (C3'), 25.9 (C2').

#### 4'-(Acetylthio)butyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (52 $\beta$ )

170 mg (0.63 mmol)  $30\beta$  wurden nach AAV 5 in 10 ml abs. DMF umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 7:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 153 mg (0.49 mmol, 78 %) Hellgelber Sirup  $C_{12}H_{22}O_7S$  (310.36 g/mol)  $R_f = 0.5$  (Dichlormethan/Methanol 4:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = -5.2^{\circ}$  (c = 0.5, MeOH)



## <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 4.43 (d, 1 H, H1), 3.94-3.87 (m, 2H, H6a, H1'a), 3.72-3.64 (m, 2H, H6b, H1'b), 3.50-3.33 (m, 3H, H3, H5, H4), 3.24 (dd, 1H, H2), 2.92 (t, 2 H, H4'), 2.36 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.71-1.61 (m, 4 H, H2', H3').

 ${}^{3}J_{1,2} = 8.2, \; {}^{3}J_{2,3} = 9.1 \text{ Hz}, \; {}^{3}J_{3,4} = 9.8 \text{ Hz}.$ 

<sup>13</sup>**C-NMR** (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 102.2 (C1), 75.9 (C5), 73.2 (C4), 71.4 (C2), 69.3 (C3), 67.6 (C1'), 60.2 (C6), 30.38 (CH<sub>3</sub>), 28.7 (C4'), 28.2 (C3'), 25.5 (C2').

#### 4'-(Acetylthio)butyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (54 $\alpha$ )

660 mg (2.4 mmol) **32α** wurden nach AAV 5 in 10 ml abs. DMF umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 7:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 470 mg (1.5 mmol, 62 %) Hellgelbes Öl  $C_{12}H_{22}O_7S$  (310.36 g/mol)  $R_f = 0.42$  (Dichlormethan/Methanol 6:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +117^{\circ}$  (c = 0.5, MeOH)



## <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 4.78 (d, 1H, H1), 3.97 (d, 1H, H4), 3.92 (t, 1H, H5,), 3.86–3.77 (m, 2H, H2, H3), 3.77–3.69 (m, 3H, H1'a, H6), 3.53 (m, 1H, H1'b), 2.92 (t, 2H, H4',), 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.75–1.64 (m, 4H, H2', H3').

 ${}^{3}J_{1,2} = 3.4$  Hz,  ${}^{3}J_{3,4} = 3.8$  Hz,  ${}^{3}J_{3',4'} = 6.8$  Hz,  ${}^{3}J_{5,6} = 6.2$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 98.6 (C1), 71.3 (C5), 69.9 (C3), 69.6 (C4), 68.7 (C2), 68.0 (C1'), 61.6 (C6), 30.4 (CH<sub>3</sub>), 29.0 (C4'), 28.1 (C3'), 25.9 (C2').

## 4'-(Acetylthio)butyl-\beta-D-galactopyranosid (54\beta)

235 mg (0.87 mmol)  $32\beta$  wurden nach AAV 5 in 10 ml abs. DMF umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 7:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 170 mg (0.55 mmol, 63 %) Hellgelbes Öl  $C_{12}H_{22}O_7S$  (310.36 g/mol)  $R_f = 0.55$  (Dichlormethan/Methanol 4:1)



 $[\alpha]_{546}^{20} = -11.2^{\circ} (c = 0.5, MeOH)$ 

## <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 4.37 (d, 1H, H1), 3.96-3.88 (m, 2H, H1'a, H4), 3.79-3.71 (m, 2H, H6), 3.69-3.61 (m, 3H, H1'b, H5, H3), 3.49 (m, 1H, H2), 2.91 (t, 2H, H4'), 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.73-1.62 (m, 4H, H2', H3').

 ${}^{3}J_{1,2} = 7.9$ ,  ${}^{3}J_{2,3} = 7.8$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 3.8$ ,  ${}^{3}J_{3,4'} = 6.9$ ,  ${}^{3}J_{5,6} = 6.2$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 103.1 (C1), 75.5 (C5), 73.1 (C3), 71.1 (C2), 70.1 (C1'), 69.0 (C4), 61.3 (C6), 30.4 (CH<sub>3</sub>), 28.9 (C4'), 28.2 (C2'), 25.6 (C3').

#### $Natrium-(4'-[acetylthio]butyl)-6-O-sulfo-\alpha-D-galactopyranosid~(55\alpha)$

470 mg (1.44 mmol) **54\alpha** wurden nach AAV 6 in 10 ml Pyridin umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 4:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 170 mg (0.55 mmol, 63 %) Hellgelbes Öl  $C_{12}H_{21}NaO_{10}S_2$  (412.41 g/mol)  $R_f = 0.55$  (Dichlormethan/Methanol 4:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +35.2^{\circ}$  (c = 0.5, MeOH)

# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 4.97 (d, 1H, H1), 4.24 (m, 1H, H6a), 4.2 (ddd, 1H, H5), 4.17 (dd, 1H, H6b), 4.05 (dd, 1H, H3), 3.89 (dd, 1H, H4), 3.85 (dd, 1H, H2), 3.76 (m, 1H, H1'a), 3.57 (m, 1H, H1'b), 2.96 (t, 2H, H4'), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.73 (m, 2H, H3'), 1.71 (m, 2H, H2').

 ${}^{3}J_{1,2} = 3.5, {}^{3}J_{2,3} = 6.7, {}^{3}J_{3,4} = 3.1, {}^{3}J_{4,5} = 3.1$  Hz.

## <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 98.8 (C1), 69.7 (C4), 69.4 (C5), 69.2 (C2), 68.5 (C3), 68.2 (C1'), 67.9 (C6), 30.4 (CH<sub>3</sub>), 29.1 (C4'), 28.1 (C2'), 25.9 (C3').

#### Natrium-(4'-[acetylthio]butyl)-6-O-sulfo- $\beta$ -D-galactopyranosid (55 $\beta$ )

135 mg (0.4 mmol) **54\beta** wurden nach AAV 6 in 10 ml Pyridin umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 3:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 64 mg (0.55 mmol, 39 %) Hellgelbes Öl  $C_{12}H_{21}NaO_{10}S_2$  (412.41 g/mol)  $R_f = 0.55$  (Dichlormethan/Methanol 4:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = -2.3^{\circ}$  (c = 0.5, MeOH)



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 4.4 (d, 1H, H1), 4.19 (dd, 1H, H6a), 4.17 (dd, 1H, H6b), 3.96 (dd, 1H, H4), 3.93 (m, 1H, H1'a), 3.9 (m, 1H, H5), 3.69 (m, 1H, H1'b), 3.65 (dd, 1H, H3), 3,49 (dd, 1H, H2), 2.92 (t, 2H, H4'), 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.69 (m, 2H, H3'), 1.67 (m, 2H, H2').

 ${}^{3}J_{1,2} = 7.8$ ,  ${}^{3}J_{2,3} = 7.9$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 3.6$ ,  ${}^{3}J_{4,5} = 3.3$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 102.9 (C1), 72.8 (C5), 70.8 (C3), 70.8 (C2), 70.1 (C6), 68.5 (C4), 67.2 (C1'), 30.2 (CH<sub>3</sub>), 28.8 (C4'), 28.1 (C3'), 25.4 (C2').

#### 4'-(Acetylthio)butyl-4,6-O-benzyliden- $\alpha$ -D-glucopyranosid (56 $\alpha$ )

750 mg (2.02 mmol) **31** $\alpha$  wurden in 8 mL *N*,*N*'-Dimethylformamid gelöst und mit 358 mg (3.10 mmol) Kaliumthioacetat versetzt. Das Reaktionsgemisch färbte sich rotbraun und wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Farbe schlug nach Orangebraun um. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in 10 mL H<sub>2</sub>O und 20 mL Dichlormethan aufgenommen, die Phasen getrennt und

die wässrige Phase zweimal mit je 5 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Das braune, zähe Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat 1:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 0.59 g (44 %) Gelber Sirup  $C_{19}H_{26}O_7S$  (398.47 g/mol)  $R_f = 0.24$  (Petrolether/Ethylacetat 1:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +19.1^{\circ}$  (c = 1.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

MALDI-TOF (Dithranol, positive mode):  $m/z = 421.52 [M + Na]^+$ 

# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

 $\delta$  [ppm] = 7.50-7.34 (m, 5 H, H<sub>arom.</sub>), 5.57 (s, 1 H, H<sub>Benzyliden</sub>), 5.18 (d, 1 H, OH-2), 4.95 (d, 1 H, OH-3), 4.70 (d, 1 H, H-1), 4.15 (dd, 1 H, H-6a), 3.75-3.53 (m, 4 H, H-6b, H-1'a, H-5, H-3), 3.45-3.25 (m, 3 H, H-1'b, H-4, H-2), 2.9 (t, 2 H, H-4'), 2.32 (s, 3 H, -CH<sub>3</sub>), 1.65-1.55 (m, 4 H, H-3', H-2').

 ${}^{3}J_{1,2} = 3.8$ ,  ${}^{3}J_{2,3} = 9.5$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 9.1$ ,  ${}^{3}J_{OH3,H3} = 5.9$ ,  ${}^{3}J_{6a,5} = 4.6$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

 $\delta$  [ppm] = 139.5 (quart., C<sub>arom</sub>) 129.2, 128.4, 126,7 (tert., C<sub>arom</sub>),101.2 (C<sub>Benzyliden</sub>), 99.8 (C1), 81.7 (C4), 72.7 (C2), 70.2 (C3), 68.5 (C6), 67.4 (C1'), 62.9 (C5), 30.9 (CH<sub>3</sub>), 28.5 (C2', C4'), 26.4 (C3').

## $4' \text{-} (Acetylthio) butyl \text{-} 4, 6 \text{-} \textit{O}\text{-} benzyliden \text{-} \beta \text{-} D\text{-} glucopyranosid~(56\beta)$

220 mg (0.58 mmol) **31** $\beta$  wurden in 8 mL *N,N'*-Dimethylformamid gelöst und mit 120 mg (1.10 mmol) Kaliumthioacetat versetzt. Die gelbe Reaktionslösung wurde 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt, die Farbe schlug nach Orangerot um. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in 10 mL H<sub>2</sub>O und 20 mL Dichlormethan aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase zweimal mit 5 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Das braune, zähe Rohprodukt wurde

säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat 1:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 0.15 g (32 %) Farbloser Sirup  $C_{19}H_{26}O_7S$  (398.47 g/mol)  $R_f = 0.46$  (Petrolether/Ethylacetat 1:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = -44^{\circ}$  (c = 1.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

MALDI-TOF (Dithranol, positive mode):  $m/z = 421.43 [M + Na]^+$ 

# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

 $\delta$  [ppm] = 7.58-7.42 (m, 5 H, H<sub>arom.</sub>), 5.45 (s, 1 H, H<sub>Benzyliden</sub>), 5.16 (d, 1 H, OH-2), 4.89 (d, 1 H, OH-3), 4.31 (d, 1 H, H-1), 4.25 (dd, 1 H, H-6a), 3.75-3.65 (m, 3 H, H-3, H-6b, H-1'a), 3.45-3.35 (m, 4 H, H-1'b, H-4, H-2, H-5), 2.91 (m, 2 H, H-4'), 2.24 (s, 3 H, -CH<sub>3</sub>), 1.65-1.55 (m, 4 H, H-3', H-2').

$${}^{3}J_{1,2} = 8.1, {}^{3}J_{2,3} = 9.3, {}^{3}J_{3,4} = 9.5, {}^{3}J_{OH3,H3} = 5.7, {}^{3}J_{6a,5} = 4.8$$
 Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

 $\delta \text{ [ppm]} = 139.5 \text{ (quart. C}_{\text{arom.}}\text{)}, 130.1, 129.6, 129.4, \text{ (tert. C}_{\text{arom.}}\text{)}, 103.2 \text{ (C1)}, 102.3 \text{ (C}_{\text{Benz}}\text{)}, 80.9 \text{ (C4)}, 75.9 \text{ (C2)}, 70.4 \text{ (C3)}, 69.9 \text{ (C1')}, 69.8 \text{ (C6)}, 69.1 \text{ (C5)}, 31.1 \text{ (CH}_3\text{)}, 29.1 \text{ (C3')}, 28.8 \text{ (C4')}, 26.7 \text{ (C2')}.$ 

#### Natrium-[4'-(acetylthio)butyl]-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glucopyranosid (59 $\alpha$ )

0.4 g (1.3 mmol)  $52\alpha$  wurden nach AAV 6 in 10 ml Pyridin umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 3:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 323 mg (0.78 mmol, 64 %) Hellgelbes Öl  $C_{12}H_{21}NaO_{10}S_2$  (412.41 g/mol)  $R_f = 0.55$  (Dichlormethan/Methanol 4:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +26.9^{\circ}$  (c = 0.5, MeOH)



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 4.9 (d, 1H, H1), 4.29 (dd, 1H, H6a), 4.22 (dd, 1H, H6b), 3.87 (m, 1H, H5), 3.76 (m, 1H, H1'a), 3.72 (dd, 1H, H3), 3.57 (dd, 1H, H2), 3.55 (m, 1H, H1'b), 3.45 (dd, 1H, H4), 2.93 (t, 2H, H4'), 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.72 (m, 2H, H3'), 1.69 (m, 2H, H2').

 ${}^{3}J_{1,2} = 3.8$ ,  ${}^{3}J_{2,3} = 6.7$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 9.4$ ,  ${}^{3}J_{5,6a} = 2.3$  Hz.

<sup>13</sup>**C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 98.6 (C1), 73.4 (C3), 71.5 (C2), 70.2 (C5), 69.8 (C4), 68.2 (C1'), 67.4 (C6), 30.4 (CH<sub>3</sub>), 28.9 (C4'), 28.1 (C3'), 25.8 (C2').

#### Natrium-[4'-(acetylthio)butyl]-6-O-sulfo-β-D-glucopyranosid (59β)

120 mg (0.39 mmol) **52\beta** wurden nach AAV 6 in 10 ml Pyridin umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 3:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 95 mg (0.23 mmol, 59 %) Hellgelbes Öl  $C_{12}H_{21}NaO_{10}S_2$  (412.41 g/mol)  $R_f = 0.55$  (Dichlormethan/Methanol 4:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = -5.1^{\circ}$  (c = 0.5, MeOH)



## <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 4.45 (d, 1H, H1), 4.32 (dd, 1H, H6a), 4.19 (dd, 1H, H6b), 3.91 (m, 1H, H1'a), 3.69 (m, 1H, H1'b), 3.65 (m, 1H, H5), 3.48 (dd, 1H, H3), 3.45 (dd, 1H, H4), 3,28 (dd, 1H, H2), 2.92 (t, 2H, H4'), 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.69 (m, 2H, H3'), 1.67 (m, 2H, H2').

 ${}^{3}J_{1,2} = 7.9, {}^{3}J_{2,3} = 8.1, {}^{3}J_{3,4} = 8.9, {}^{3}J_{4,5} = 9.1$  Hz.

δ [ppm] = 102.7 (C1), 76.1 (C3), 74.1 (C5), 73.4 (C2), 70.4 (C1'), 69.6 (C4), 67.4 (C6), 30.4 (CH<sub>3</sub>), 28.9 (C4'), 28.2 (C3'), 25.6 (C2').

#### Natrium-[4'-(acetylthio)butyl]-3-O-sulfo- $\alpha$ -D-galactopyranosid (60 $\alpha$ )

214 mg (0.66 mmol) **54** $\alpha$  und 170 mg (0.68 mmol) Dibutylzinnoxid wurden in 10 ml abs. Methanol suspendiert und mit 0.5 g Molekularsieb 4 Å versetzt. Die Suspension wurde fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Dann wurde Methanol entfernt, der trockene Rückstand in 10 ml THF aufgenommen, mit 167 mg (1.2 mmol) Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex versetzt und die Lösung weitere 30 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 4:1) gereinigt. Anschließend erfolgte ein Austausch des Kations an Amberlite IR120 (Na<sup>+</sup>-Form).

Ausbeute: 170 mg (0.55 mmol, 63 %) Hellgelbes Öl  $C_{12}H_{21}NaO_{10}S_2$  (412.41 g/mol)  $R_f = 0.55$  (Dichlormethan/Methanol 4:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +35.2^{\circ}$  (c = 0.5, MeOH)



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 5.02 (d, 1H, H1), 4.53 (m, 1H, H3), 4.35 (dd, 1H, H4), 3.99 (m, 1H, H5), 3.97 (dd, 1H, H2), 3.77 (m, 1H, H6), 3.76 (m, 1H, H1'a), 3.57 (m, 1H, H1'b), 2.61 (t, 2H, H4'), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.73 (m, 2H, H3'), 1.72 (m, 2H, H2').

 ${}^{3}J_{1,2} = 3.8$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 3.0$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 98.5 (C1), 78.3 (C3), 71.1 (C5), 68.0 (C1'), 67.9 (C4), 66.6 (C2), 61.5 (C6), 30.4 (CH<sub>3</sub>), 30.2 (C3'), 27.7 (C2'), 23.9 (C4').

#### Natrium-[4'-(acetylthio)butyl]-3-O-sulfo-\beta-D-galactopyranosid (60)

155 mg (0.49 mmol) **54\beta** und 125 mg (0.5 mmol) Dibutylzinnoxid wurden in 10 ml abs. Methanol suspendiert und mit 0.5 g Molekularsieb 4 Å versetzt. Die Suspension wurde fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde Methanol entfernt, der trockene Rückstand in 10 ml THF aufgenommen, mit 125 mg (0.9 mmol) Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex versetzt und die Lösung weitere 30 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 4:1) gereinigt. Anschließend erfolgte ein Austausch des Kations an Amberlite IR120 (Na<sup>+</sup>-Form).

Ausbeute: 130 mg (0.32 mmol, 65 %) Hellgelbes Öl  $C_{12}H_{21}NaO_{10}S_2$  (412.41 g/mol)  $R_f = 0.55$  (Dichlormethan/Methanol 4:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = -0.9^\circ$  (c = 0.5, MeOH)



## <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 4.51 (d, 1H, H1), 4.33 (m, 1H, H3), 4.29 (dd, 1H, H4), 3.95 (m, 1H, H1'a), 3.80 (m, 2H, H6), 3.75 (m, 1H, H5), 3.73 (m, 1H, H1'b), 3.65 (m, 1H, H2), 2.59 (t, 2H, H4'), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.75 (m, 2H, H2'), 1.69 (m, 2H, H3').

 ${}^{3}J_{1,2} = 8.1, {}^{3}J_{2,3} = 8.2, {}^{3}J_{3,4} = 3.8$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 102.8 (C1), 80.8 (C3), 75.1 (C5), 70.3 (C1'), 69.2 (C2), 67.3 (C4), 61.2 (C6), 29.9 (CH<sub>3</sub>), 29.9 (C3'), 27.9 (C2'), 23.9 (C4').

# Trimethylammonium-[4'-(acetylthio)butyl]-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-sulfo-α-Dglucopyranosid (61α)

840 mg (2.12 mmol) **56α** wurden in 50 ml DMF gelöst und 1 g Molekularsieb 4 Å versetzt. Dann wurden 500 mg (3.6 mmol) Schwefeltrioxid-Trimethylamin-Komplex zugegeben und die Suspension 24 Stunden bei 50° C gerührt. Anschließend wurde filtriert, das Filtrat eingeengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 12:1, 1% Triethylamin) gereinigt. Ausbeute: 188 mg (0.35 mmol, 17 %) Farbloser Sirup  $C_{19}H_{25}NaO_{10}S_2$  (537.64 g/mol)  $R_f = 0.85$  (Dichlormethan/Methanol 10:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +26^{\circ}$  (c = 0.5, MeOH)



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

 $\delta$  [ppm] = 7.50-7.34 (m, 5 H, H<sub>arom.</sub>), 5.51 (s, 1 H, H<sub>Benzyliden</sub>), 4.91 (d, 1 H, H1), 4.73-4.66 (m, 1H, H3), 4.25 (dd, 1H, H4), 4.13 (dd, 1 H, H6a), 3.77-3.55 (m, 4 H, H6b, H5, H1'a, H2), 3.49-3.41 (m, 1 H, H1'b), 2.83 (m, 2 H, H4'), 2.19 (s, 3 H, Ac-CH<sub>3</sub>), 1.67-1.55 (m, 4 H, H3', H2').

 ${}^{3}J_{1,2} = 3.5$ ,  ${}^{3}J_{2,3} = 9.5$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 9.5$ ,  ${}^{3}J_{4,5} = 9.3$ ,  ${}^{3}J_{5,6a} = 3.7$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

 $\delta$  [ppm] = 138.1 (quart., C<sub>arom</sub>) 128.4-126.5 (tert., C<sub>arom</sub>),101.3 (C<sub>Benzyliden</sub>), 98.3 (C1), 80.5 (C4), 76.1 (C3), 72.5 (C2), 68.8 (C6), 68.2 (C1'), 63.1 (C5), 29.4 (CH<sub>3</sub>), 28.5 (C2', C4'), 26.4 (C3').

# Trimethylammonium-[4'-(acetylthio)butyl]-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-sulfo-β-Dglucopyranosid (61β)

756 mg (1.9 mmol) **56** $\beta$  wurden in 50 ml DMF gelöst, mit 1 g Molekularsieb 4 Å und 450 mg (3.2 mmol) Schwefeltrioxid-Trimethylamin-Komplex versetzt und die Suspension 24 Stunden bei 50° C gerührt. Anschließend wurde filtriert, das Filtrat eingeengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 12:1, 1% Triethylamin) aufgereinigt.

Ausbeute: 225 mg (0.42 mmol, 22 %) Farbloser Sirup  $C_{19}H_{25}NaO_{10}S_2$  (537.54 g/mol)  $R_f = 0.85$  (Dichlormethan/Methanol 10:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = -37.5^{\circ}$  (c = 0.5, MeOH)



## <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 7.48-7.31 (m, 5 H, H<sub>arom</sub>), 5.47 (s, 1 H, H<sub>Benzyliden</sub>), 4.43-4.38 (m, 1H, H3), 4.33 (d, 1 H, H1), 4.23 (dd, 1H, H4), 4.14 (dd, 1 H, H6a), 3.69-3.62 (m, 2 H, H6b, H5), 3.58-3.49 (m, 2H, H1'a, H2), 3.42-3.35 (m, 1 H, H1'b), 2.86 (m, 2 H, H4'), 2.22 (s, 3 H, Ac-CH<sub>3</sub>), 1.72-1.59 (m, 4 H, H3', H2').

$${}^{3}J_{1,2} = 9.7, {}^{3}J_{2,3} = 9.4, {}^{3}J_{3,4} = 9.1, {}^{3}J_{4,5} = 8.9, {}^{3}J_{5,6a} = 3.9, {}^{3}J_{5,6b} = 8.8$$
 Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

 $\delta$  [ppm] = 134.9 (quart., C<sub>arom</sub>) 130.1 - 129.4 (tert., C<sub>arom</sub>), 103.3 (C1), 101.2 (C<sub>Benzyliden</sub>), 81.3 (C4), 75.9 (C3), 72.8 (C2), 68.8 (C6), 68.2 (C1'), 63.1 (C5), 29.4 (CH<sub>3</sub>), 28.5 (C2', C4'), 26.4 (C3').

#### Natrium-[4'-(acetylthio)butyl]-3-O-sulfo- $\alpha$ -D-glucopyranosid (62 $\alpha$ )

140 mg (0.26 mmol) **61** $\alpha$  wurden in 10 ml Methanol gelöst, mit 2 ml 0.5% iger Schwefelsäure versetzt und die Lösung 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Neutralisation mit 1N Natronlauge und Entfernung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 4:1) gereinigt. Anschließend erfolgte ein Austausch des Kations an Amberlite IR120 (Na<sup>+</sup>-Form).

Ausbeute: 60 mg (0.15 mmol, 56 %) Farbloser Sirup  $C_{12}H_{21}NaO_{10}S_2$  (412.41 g/mol) Masse: 514.2 (492.2 [TEA-Salz] + Na<sup>+</sup>)  $R_f = 0.29$  (Dichlormethan/Methanol 4:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +28.2^{\circ}$  (c = 0.5, MeOH)



## <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 5.17 (d, 1H, H1), 4.55-4.47 (m, 1H, H3), 3.75-3.63 (m, 2H, H6a, H1'a), 3.61 (m, 1H, H6b), 3.57-3.51 (m, 3H, H2, H4, H5), 3.47-3.39 (m, 1H, H1'b), 2.84 (t, 2H, H4'), 2.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.71-1.55 (m, 4H, H2', H3').

 ${}^{3}J_{1,2}$ = 3.5,  ${}^{3}J_{2,3}$ = 9.7 Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 98.6 (C1), 80.9 (C3), 73.7 (C5), 72.7 (C2), 71.9 (C4), 69.2 (C1'), 62.8 (C6), 30.9 (CH<sub>3</sub>), 30.1 (C4'), 30.0 (C2'), 27.9 (C3').

#### Natrium-[4'-(acetylthio)butyl]-3-O-sulfo- $\beta$ -D-glucopyranosid (62 $\beta$ )

120 mg (0.22 mmol) **61** $\beta$  wurden in 10 ml Methanol gelost, mit 2 ml 0.5% iger Schwefelsäure versetzt und die Lösung 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Neutralisation mit 1N Natronlauge und Entfernung von Lösungsmittel wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 4:1) gereinigt. Anschließend erfolgte ein Austausch des Kations an Amberlite IR120 (Na<sup>+</sup>-Form).

Ausbeute: 46 mg (0.11 mmol, 51 %) Farbloser Sirup  $C_{12}H_{21}NaO_{10}S_2$  (412.41 g/mol)  $R_f = 0.29$  (Dichlormethan/Methanol 4:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = -36.4^{\circ}$  (c = 0.5, MeOH)



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 4.67 (d, 1H, H1), 4.45-4.39 (m, 1H, H3), 3.95-3.84 (m, 2H, H6a, H1'a), 3.78-3.67 (m, 3H, H6b, H1'b, H4), 3.57-3.51 (m, 2H, H2, H5), 2.94-2.89 (m, 2H, H4'), 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.71-1.65 (m, 4H, H2', H3').

 ${}^{3}J_{1,2} = 7.6, {}^{3}J_{2,3} = 8.9, {}^{3}J_{3,4} = 8.9$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

δ [ppm] = 101.0 (C1), 82.1 (C3), 75.5 (C5), 72.9 (C2), 70.3 (C1'), 69.29 (C4), 60.9 (C6), 30.4 (CH<sub>3</sub>), 28.9 (C4'), 28.1 (C2'), 25.4 (C3').

# 4''-Chlorbutyl-4-*O*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosid (64)

3.5 g (5.2 mmol)  $\beta$ -Lactoseoctaacetat wurden in 50 ml abs. Dichlormethan gelöst, mit 1 g (9.2 mmol) 4-Chlor-1-butanol und 0.8 ml (7 mmol) Bortrifluorid-Diethylether-Komplex versetzt und 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Lösung mit 10 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt und weitere 30 min gerührt. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige zweimal mit je 30 ml Dichlormethan extrahiert, die vereinten organischen Extrakte mit 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether/Essigester 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.15 g (1.6 mmol, 31 %) Hellgelbes Öl  $C_{30}H_{43}ClO_{18}$  (727.1 g/mol)  $R_{f} = 0.31$  (Petrolether/Ethylacetat 1:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +3.3 \circ (c=0.5, CH_{2}Cl_{2})$ MALDI-TOF (Dithranol, positive mode): m/z = 750.1 [M + Na]<sup>+</sup>



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 5.33 (m, 1H, H4), 5.17 (vt, 1H, H3), 5.09 (dd, 1H, H2'), 4.93 (dd, 1H, H3'), 4.87 (dd, 1H, H2), 4.49-4.42 (m, 3H, H6'a, H1, H1'), 4.11-4.03 (m, 3H, H6'b, H6a, H6b), 3.88-3.84 (m, 2H, H5', H1''a), 3.77 (vt, 1H, H4), 3.57 (m, 1H, H5), 3.55-3.51 (m, 3H, H1''b, H4''), 2.13, 2.11, 2.05, 2.03, 1.95 (5\*s, 21H, CH<sub>3</sub>), 1.86-1.66 (m, 4H, H2'', H3'').

 ${}^{3}J_{1,2} = 8.2, {}^{3}J_{2,3} = 9.5, {}^{3}J_{3,4} = 9.1, {}^{3}J_{1,2} = 7.9, {}^{3}J_{2,3} = 10.4, {}^{3}J_{3,4} = 3.2$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 101.5 (C1), 100.9 (C1'), 76.7 (C4), 73.2 (C3), 73.1 (C5), 72.1 (C2), 71.4 (C3'), 71.1 (C5'), 69.6 (C2'), 69.4 (C1''), 67.0 (C4'), 62.4 (C6'), 61.2 (C6), 44.9 (C4''), 29.5 (C2''), 27.2 (C3''), 21.2-20.9 (7\*CH<sub>3</sub>).

#### 4"-Chlorbutyl-4-O-(β-D-galactopyranosyl)-β-D-glucopyranosid (65)

1.0 g (1.4 mmol) **64** wurden nach AAV 2 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 4:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 563 mg (1.3 mmol, 93 %) Hellgelbes Öl  $C_{16}H_{29}ClO_{11}$  (432.85 g/mol)  $R_f = 0.25$  (Dichlormethan/Methanol 3:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = + 6.2 \circ (c = 0.5, MeOH)$ MALDI-TOF (Dithranol, positive mode): m/z = 455.73 [M + Na]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 4.51 (d, 1H, H1), 4.48 (d, 1H, H1'), 4.02-3.93 (m, 3H, H6a, H1''a, H4'), 3.87-3.53 (m, 12H, H6b, H6'a-b, H1''b, H5, H5', H4, H3, H3', H4'', H2'), 3.37-3.31 (m, 1H, H2), 1.95-1.74 (m, 4H, H2'', H3'').

 ${}^{3}J_{1,2}$ = 8.1,  ${}^{3}J_{1,2}$ = 7.9 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 103.4 (C1'), 102.5 (C1), 78.9 (C4), 75.8 (C3), 75.2 (C3'), 74.9 (C2), 73.3 (C5), 73.0 (C5'), 71.4 (C2'), 70.2 (C1''), 69.0 (C4'), 61.5 (C6'), 60.6 (C6), 45.8 (C4''), 28.9 (C2''), 26.7 (C3'').

#### 4"-Acetylthiobutyl-4-O-(β-D-galactopyranosyl)-β-D-glucopyranosid (66)

280 mg (0.65 mmol) 65 wurden nach AAV 5 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 4:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 120 mg (0.25 mmol, 39 %) Gelblicher Sirup  $C_{18}H_{32}O_{12}S$  (472.5 g/mol)  $R_f = 0.29$  (Dichlormethan/Methanol 3:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = + 4.8^{\circ}$  (c = 0.5, MeOH) MALDI-TOF (Dithranol, positive mode): m/z = 495.58 [M + Na]<sup>+</sup>

#### <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 4.52-4.47 (m, 2H, H1,H1'), 4.03-3.91 (m, 3H, H6a, H1''a, H4'), 3.87-3.52 (m, 10H, H6b, H6'a-b, H1''b, H5, H5', H4, H3, H3', H2'), 3.37-3.31 (m, 1H, H2), 2.96 (t, 2H, H4''), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.75-1.64 (m, 4H, H2'', H3'').

$${}^{3}J_{1,2}=8.1, {}^{3}J_{1,2}=7.6, {}^{3}J_{2,3}=9.9, {}^{3}J_{2,3}=9.4, {}^{3}J_{3,4}=3.3$$
 Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 103.4 (C1'), 102.5 (C1), 78.9 (C4), 75.8 (C3), 75.2 (C3'), 74.9 (C2), 73.3 (C5), 73.0 (C5'), 71.4 (C2'), 70.3 (C1''), 69.0 (C4'), 61.5 (C6'), 60.6 (C6), 30.5 (CH<sub>3</sub>), 29.0 (C4''), 28.3 (C2''), 25.7 (C3'').

# Natrium-[4''-acetylthiobutyl-4-*O*-(3-*O*-sulfo-β-D-galactopyranosyl)-β-D-glucopyranosid] (67)

70 mg (0.15 mmol) **66** und 50 mg (0.2 mmol) Dibutylzinnoxid wurden in 10 ml abs. Methanol suspendiert und mit 0.5 g Molekularsieb 4 Å versetzt. Die Suspension wurde fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Dann wurde Methanol entfernt, der trockene Rückstand in 10 ml THF aufgenommen, mit 50 mg (0.36 mmol) Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex versetzt und die Lösung weitere 30 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 4:1) gereinigt. Anschließend erfolgte ein Austausch des Kations an Amberlite IR120 (Na<sup>+</sup>-Form). Ausbeute:

 $\begin{array}{c} \text{How of line}\\ 33 \text{ mg } (0.05 \text{ mmol, } 33 \%)\\ \text{Gelblicher Sirup}\\ \text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NaO}_{15}\text{S}_2 \ (574.55 \text{ g/mol})\\ \text{R}_{f} = 0.29 \ (\text{Dichlormethan/Methanol } 3:1)\\ \left[\alpha\right]_{546}^{20} = + 4.2^{\circ} \ (\text{c=0.5, MeOH}) \end{array}$ 

# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 4.53 (d, 1H, H1'), 4.45 (d, 1H, H1), 4.32 – 4.24 (m, 2H, H3', H4'), 3.98 – 3.88 (m, 2H, H6a, H1''a), 3.81-3.72 (m, 5H, H6b, H6'a, H1''b, H5, H5'), 3.69 – 3.51 (m, 4H, H6'b, H4, H3, H2'), 3.31-3.24 (m, 1H, H2), 2.77 – 2.72 (t, 2H, H4''), 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.79-1.67 (m, 4H, H2'', H3'').

 ${}^{3}J_{1,2} = 8.2, {}^{3}J_{1,2} = 7.5, {}^{3}J_{2,3} = 9.7, {}^{3}J_{2,3} = 9.8, {}^{3}J_{3,4} = 3.2 \text{ Hz}, {}^{3}J_{3,4} = 9.2 \text{ Hz}$ 

# <sup>13</sup>**C-NMR** (100 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 102.9 (C1'), 102.4 (C1), 80.4 (C3'), 78.7 (C4), 75.3 (C3), 75.1 (C2), 74.8 (C5), 73.2 (C5'), 71.4 (C2'), 70.4 (C1''), 69.5 (C4'), 61.3 (C6'), 60.5 (C6), 30.5 (CH<sub>3</sub>), 29.0 (C4''), 28.3 (C2''), 25.7 (C3'').

# Natrium-[4"-acetylthiobutyl-4-*O*-(6-*O*-sulfo-β-D-galactopyranosyl)-β-D-glucopyranosid] (68)

85 mg (0.18 mmol) **66** wurden in 5 ml abs. Pyridin gelöst, bei 0° C mit 36 mg (0.26 mmol) Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex versetzt und die Suspension 48 Stunden bei 0° C gerührt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser gestoppt, eingeengt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 3:1 als Elutionsmittel gereinigt. Anschließend wurde der Kation an Amberlite IR120 (Na<sup>+</sup>-Form) ausgetauscht. Ausbeute: 16 mg (0.03 mmol, 17 %) Gelblicher Sirup  $C_{18}H_{31}NaO_{15}S_2$  (574.55 g/mol)  $R_f = 0.29$  (Dichlormethan/Methanol 3:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = + 5.1^{\circ}$  (c=0.5, MeOH)

# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = übertragen von 66 4.51-4.44 (m, 2H, H1,H1'), 4.23 – 4.17 (m, 2H, H6'), 3.98-3.91 (m, 3H, H6a, H1''a, H4'), 3.83-3.75 (m, 4H, H6b, H1''b, H5, H5'), 3.66 – 3.51 (m, 3H, H4, H3, H2'), 3.36-3.32 (m, 1H, H2), 2.86 (t, 2H, H4''), 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.78-1.63 (m, 4H, H2'', H3'').

 ${}^{3}J_{1,2} = 8.2, {}^{3}J_{1',2'} = 7.5, {}^{3}J_{2',3'} = 9.9, {}^{3}J_{2,3} = 9.4, {}^{3}J_{3',4'} = 3.3, {}^{3}J_{3,4} = 8.7 \text{ Hz}$ 

# <sup>13</sup>**C-NMR** (100 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 103.9 (C1'), 102.8 (C1), 80.7 (C4), 75.2 (C3), 73.6 (C3'), 73.5 (C2), 73.4 (C5), 73.3 (C5'), 70.7 (C2'), 68.6 (C4'), 68.4 (C1''), 65.2 (C6'), 60.8 (C6), 30.9 (CH<sub>3</sub>), 28.7 (C4''), 28.6 (C2''), 26.2 (C3'').

## 4'-Chlorbutyl-2-acetamido-2-deoxy-a-D-glucopyranosid (70)

10 g (45 mmol) 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose und 30 ml (0.3 mol) 4-Chlor-1-butanol wurden bei 60 °C nach AAV 4 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 8:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 4.22 mg (6.8 mmol, 30 %) Weißer Feststoff  $C_{12}H_{22}CINO_6$  (311.76 g/mol) Smp.: 139 °C  $R_f = 0.29$  (Dichlormethan/Methanol 8:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +121^\circ$  (c = 0.5, MeOH)



#### <sup>1</sup>**H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):

δ [ppm] = 4.88 ( d, 1H, H-1), 3.89 (dd , 1H, H-2), 3.86 (dd, 1H, H-6a), 3.80-3.62 ( m, 6H, H-6b, H-3, H-5, H-1'a, H-4'), 3.55-3.44 (m, 2H, H-1'b, H-4), 2.04 (s, 3H, Ac-CH3), 1.91-1.82 (m, 2H, H-3'), 1.78-1.71 (m, 2H, H-2').

 ${}^{3}J_{1,2}$ = 3.6,  ${}^{3}J_{2,3}$ = 10.7,  ${}^{3}J_{6a,6b}$ = 12.2 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 100 MHz):

δ [ppm] = 174.7 (N-CO), 97.0 (C1), 72.2 (C5), 71.3 (C4), 70.3 (C3), 67.7 (C1'), 60.9 (C6), 54.1 (C2), 45.6 (C4'), 29.1 (C3'), 26.3 (C2'), 22.2 (Ac-CH3).

#### 4'-(Acetylthio)butyl-2-acetamido-2-deoxy-a-D-glucopyranosid (71)

2.69 g (8.6 mmol) **70** wurden nach AAV 5 in 30 ml abs. DMF umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch am Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 10:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 2.19 g (6.23 mmol, 69 %) Weißer Feststoff  $C_{14}H_{25}NO_7S$  (351.42 g/mol) Smp.: 108 °C  $R_f = 0.26$  (Dichlormethan/Methanol 8:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +126^\circ$  (c = 0.5, MeOH)



<sup>1</sup>**H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):

δ [ppm] = 4.88 ( d, 1H, H-1), 3.90 (dd , 1H, H-2), 3.87 (dd, 1H, H-6a), 3.82-3.67 ( m, 4H, H-3, H-5, H-6b, H-1'a), 3.55-3.45 (m, 2H, H-4, H-1'b), 2.94 (m, 2H, H-4'), 2.38 (s, 3H, S-COCH3), 2.04 (s, 3H, N-COCH3), 1.68 (m, 4H, H-2', H-3').

 ${}^{3}J_{1,2}$ = 3.6,  ${}^{3}J_{2,3}$ = 10.8 Hz.

## <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 100 MHz):

δ [ppm] = 202.1 (S-CO), 174.3 (N-CO), 96.6 (C1), 71.8 (C5), 70.9 (C4), 70.0 (C3), 67.4 (C1'), 60.5 (C6), 53.8 (C2), 30.0 (S-Ac-CH3), 28.56 (C4'), 27.54 (C2'), 25.55 (C3'), 21.86 (N-CO-CH3).

#### Natriumchlormethansulfonat (72)

6.3 g (50 mmol) Natriumsulfit, 3.2 ml (4.24 g, 50 mmol) Dichlormethan, 15 ml Wasser und 1.5 ml Ethanol wurden in einem Reagenzglas mit einem Gewindeverschluss zusammengegeben mit einer Spatelspitze Kupfer(II)-chlorid-dihydrat versetzt, das Glas dicht verschlossen und unter Rühren auf 100 °C erwärmt. Die Erwärmung fand in einem Alu-Block statt, was für bessere Durchmischung und Wärmeverteilung sorgte. Nach 24 h Reaktionszeit wurde eine Phasentrennung beobachtet, wobei sich in der unteren Phase ein Feststoff absetzte. Das Reaktionsgemisch wurde weitere 21 h gerührt, wonach das homogene Gemisch rosa gefärbt war. Dann wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand getrocknet und in Methanol aufgenommen. Anschließend wurde die Mischung heiß filtriert und das Filtrat eingeengt.

Ausbeute: 6.2 g (41 mmol), 81 %, bezogen auf Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> Leicht grünlicher Feststoff CH<sub>2</sub>ClNaO<sub>3</sub>S (152.53 g/mol) Smp.: 259 °C



<sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.45 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>**C-NMR** (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 54.6 (CH<sub>2</sub>).

#### Benzyl-2-acetamido-2-deoxy-α-D-glucopyranosid (73)

10 g (45 mmol) *N*-Acetyl-D-glucosamin wurden in 40 ml Benzylalkohol gelöst, mit 20 Tropfen konz. HCl versetzt und das Reaktionsgemisch 45 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit 50 mL Diethylether sowie 50 mL dest. Wasser verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt, zweimal mit Wasser extrahiert, die wässrigen Phasen

vereinigt und eingeengt. Der erhaltene braune Feststoff wurde mittels säulenchromatographischer Trennung an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (10:1  $\rightarrow$  12:1) als Laufmittel gereinigt.

Ausbeute: 11.79 g (38 mmol, 84 %) Weißer Feststoff  $C_{15}H_{21}NO_6$  (311.33 g/mol) Smp.: 182 °C  $R_f = 0.18$  (Dichlormethan/Methanol 8:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +178.9^\circ$  (c = 0.5, MeOH)

# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 7.45–7.40 (m, 5H, Har.), 4.92 (d, 1H, H1), 4.74 (dd, 1H, benzyl. Ha), 4.54 (dd, 1H, benzyl. Hb), 3.88–3.81(m, 2H, H2, H6a), 3.80–3.72(m, 3H, H6b, H3, H4), 3.48 (m,1H, H5), 1.95 (s, COCH<sub>3</sub>).

 ${}^{3}J_{1,2} = 3.6$ ,  ${}^{3}J_{2,3} = 10.7$ ,  ${}^{3}J_{3,4} = 8.7$ ,  ${}^{3}J_{4,5} = 8.9$ ,  ${}^{3}J_{5,6a} = 9.7$ ,  ${}^{2}J_{\text{Benzyl Ha,Hb}} = 11.9$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 174.7 (C=O), 137.3 (quart. Car), 129.1–128.7 (tert. Car), 96.2 (C1), 72.4 (C3), 71.2 (C4), 70.3 (C5), 70.0 (CH<sub>2</sub>-Benzyl), 60.8 (C6), 54.0 (C2), 22.1 (Ac-CH<sub>3</sub>).

#### Benzyl-2-amino-2-desoxy-D-α-glucopyranosid (75)

11.7 g (37.8 mmol) **73** wurden in 150 ml bidest. Wasser suspendiert, mit 17.1 g (54.1 mmol) Bariumhydroxid-octahydrat versetzt, fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt und weitere 66 Stunden bei RT gerührt. Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat zur Reinigung von Bariumsalzen portionsweise mit Trockeneis versetzt, so dass Bariumcarbonat ausfiel und erneut abfiltriert werden konnte. Schließlich wurde das Filtrat lyophylisiert und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol (6:1  $\rightarrow$  4:1) gereinigt. Ausbeute: 4.86 g (18.0 mmol, 48%) Amorphe gelbliche Substanz  $C_{13}H_{19}NO_5$  (269.29 g/mol)  $R_f = 0.15$  (Dichlormethan/Methanol 4:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +137.8^\circ$  (c = 0.5, MeOH)



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 7.45–7.40 (m, 5H, Har), 5.06 (d, 1H, H1), 4.58 (d, 1H, benzyl. Ha), 4.68 (m, 1H, benzyl. Hb), 3.81–3.62 (m, 4H, H6a, H6b, H4, H3), 3.43 (m, 1H, H5), 2.94 (dd, 1H, H2).

 ${}^{3}J_{1,2} = 3.8$ ,  ${}^{3}J_{2,3} = 10.3$ ,  ${}^{3}J_{4,5} = 9.3$ ,  ${}^{3}J_{5,6} = 9.8$ ,  ${}^{2}J_{6a,6b} = 12.1$ ,  ${}^{2}J_{Benzyl Ha,Hb} = 11.7 \text{ Hz}$ 

# <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, D<sub>2</sub>O):

 $\delta$  [ppm] = 137.2 (quart. Car), 129.1–128.8 (tert. Car), 97.4 (C1), 73.0 (C3), 72.6 (C4), 70.2 (CH<sub>2</sub>-Benzyl), 67.0 (C5), 60.7 (C6), 54.9 (C2).

#### Benzyl-2-(N-methylsulfonyl-amino)-2-desoxy-α-D-glucopyranosid (76)

810 mg (3 mmol) **75** wurden in 10 mL Pyridin gelöst, entgast und auf – 40 °C gekühlt. Nach der Zugabe von 300  $\mu$ l (3.8 mmol) Methansulfonsäurechlorid wurde das Reaktionsgemisch zwei Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von ca. 15 mL Wasser abgebrochen, auf RT erwärmt, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (4:1) gereinigt.

Ausbeute: 505 mg (1.45 mmol, 48 %) Amorphe gelbliche Substanz  $C_{14}H_{21}NO_7S$  (347.38 g/mol)  $R_f = 0.23$  (Dichlormethan/Methanol 4:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +115.3 \circ (c = 0.5, MeOH)$ MALDI-TOF (Dithranol, positive mode): m/z = 370.41 [M + Na]<sup>+</sup>



## <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 7.45–7.35 (m, 5H, Har), 5.21 (d, 1H, H1), 4.78 (d, 1H, benzyl. Ha), 4.68 (m, 1H, benzyl. Hb), 3.85 (d, 1H, H3), 3.76–3.72 (m, 2H, H6), 3.71 – 3.65 (m, 1H, H5), 3.48 (vt, 1H, H4), 3.12 (d, 1H, H2), 2.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

 ${}^{3}J_{1,2} = 3.8$ ,  ${}^{3}J_{2,3} = 10.5$ ,  ${}^{3}J_{4,5} = 9.5$ ,  ${}^{2}J_{\text{Benzyl Ha,Hb}} = 11.6 \text{ Hz}.$ 

# <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O):

 $\delta$  [ppm] = 136.8 (quart. Car), 128.9 – 128.6 (tert. Car), 95.6 (C1), 72.4 (C5), 71.0 (C3), 69.9 (benzyl. CH<sub>2</sub>), 69.6 (C4), 60.3 (C6), 54.2 (C2), 38.5 (CH<sub>3</sub>).

#### Natrium [benzyl-2-(N-sulfomethylen-amino)-2-desoxy-α-D-glucopyranosid] (77)

606 mg (2.25 mmol) **75** wurden in 10 mL Pyridin gelöst, entgast und auf – 20 °C gekühlt. Nach der Zugabe von 370 mg (2.43 mmol) **72** wurde das Reaktionsgemisch zwei Stunden gerührt, wobei die Temperatur des Kältebades langsam auf 0 °C anstieg. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von ca. 15 mL Wasser abgebrochen, auf RT erwärmt, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (6:1) gereinigt.

Ausbeute: 753 mg (1.95 mmol, 87 %) Amorphe, gelbliche Substanz  $C_{14}H_{20}NNaO_8S$  (385.37 g/mol)  $R_f = 0.18$  (Dichlormethan/Methanol 4:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +78.4^\circ$  (c = 0.5, MeOH)



#### <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 7.48–7.40 (m, 5H, Har), 5.18 (d, 1H, H1), 4.70 (d, 1H, benzyl. Ha), 4.62 (m, 1H, benzyl. Hb), 4.49 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-S), 3.83–3.76 (m, 3H, H3, H4, H6a), 3.74–3.69 (m, 1H, H6b), 3.48 (dt, 1H, H5), 3.22 (dd, 1H, H2).

$${}^{3}J_{1,2} = 3.6$$
,  ${}^{3}J_{2,3} = 10.4$ ,  ${}^{3}J_{4,5} = 9.4$ ,  ${}^{2}J_{\text{Benzyl Ha,Hb}} = 11.7 \text{ Hz}.$ 

# <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 129.2–128.9 (Car), 95.8 (C1), 72.6 (C3), 71.3 (C4), 70.2 (benzyl. CH<sub>2</sub>), 69.8 (C5), 60.5 (C6), 54.6 (CH<sub>2</sub>-S), 54.5 (C2).

#### Benzyl-2-desoxy-2-[(dibenzylphospho)amido)]-α-D-glucosid (78)

400 mg (1.5 mmol) **75** wurden in 10 ml Pyridin gelöst, entgast, auf 0 °C gekühlt und mit 16 ml (4.73 mmol) 10%iger Dibenzylphosphorylchlorid-Lösung in Benzol versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Stunden bei 0 °C gerührt und die Reaktion dann durch Zugabe von Wasser gestoppt. Nach dem Einengen wurde der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan /Methanol 15:1 als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 347 mg (0.65 mmol, 44 %) Farbloser Feststoff  $C_{37}H_{32}NO_8P$  (529.52 g/mol)  $R_f = 0.24$  (Dichlormethan/Methanol 15:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = +107.6 \circ (c = 0.5, MeOH)$ Smp.: = 154 °C MALDI-TOF (Dithranol, positive mode):  $m/z = 552.57 [M + Na]^+$ 

#### <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

 $\delta$  [ppm] = 7.23 - 7.41 (m, 15 H, H<sub>arom</sub>), 4.86 - 5.03 (m, 7 H, 3-OH, 4-OH, NH, H<sub>Bn2</sub>, H<sub>Bn3</sub>), 4.72 (d, 1 H, H1), 4.66 (d, 1 H, H<sub>Bn1a</sub>), 4.54 (dd, 1 H, 6-OH), 4.36 (d, 1 H, H<sub>Bn1b</sub>), 3.64 (m, 1 H, H6a), 3.55 - 3.38 (m, 3 H, H3, H6b, H5), 3.11-3.19 (m, 1 H, H4), 2.93 - 3.05 (m, 1 H, H2).

 ${}^{2}J_{\text{HBn1a, HBn1b}} = 12.2, {}^{3}J_{1,2} = 3.6, {}^{3}J_{2,3} = 9.9, {}^{3}J_{6a,5} = 4.3 \text{ Hz}.$ 

# <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

 $\delta \text{ [ppm]} = 137.4 - 138.1 \text{ (quart., } C_{\text{arom.}}\text{), } 128.7 - 127.8 \text{ (tert., } C_{\text{arom.}}\text{), } 98.1 \text{ (C1), } 73.4 \text{ (C5), } 72.4 \text{ (C3), } 71.2 \text{ (C4), } 68.3 \text{ (C}_{Bn1}\text{), } 67.2 \text{, } 66.9 \text{ (C}_{Bn2}\text{, } C_{Bn3}\text{), } 61.2 \text{ (C6), } 56.8 \text{ (C2).}$ 

# <sup>31</sup>**P-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): [ppm] = 9.44.

#### Natrium (2-desoxy-2-[N-methansulfonyl-amino]-D-glucopyranose) (79)

250 mg (0.65 mmol) **77** wurden nach AAV 3 in bidest. Wasser umgesetzt. Das Rohprodukt wurde an einer Sephadex-Säule mit Wasser/Methanol 1:1 als Elutionsmittel gereinigt und dann lyophylisiert.

Ausbeute: 180 mg (0.61 mmol, 94 %) Gelblicher Sirup  $C_7H_{14}NNaO_8S$  (295.24 g/mol)  $R_f = 0.03$  (Dichlormethan/Methanol 2:1) Anomerenverhältnis  $\alpha:\beta = 5:3$ 



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

 $\delta$  [ppm] = 5.44 (d, 1H, H1α), 4.93 (d, 1H, H1β), 4.49 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-S), 4.21–2.95 (m, 12 H, H2 α/β, H3 α/β, H4 α/β, H5 a/b, H6 α/β).

 ${}^{3}J_{1,2\alpha} = 3.8$ ,  ${}^{3}J_{1,2\beta} = 8.5$  Hz.

<sup>13</sup>**C-NMR** (101 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 95.6 (C1β), 90.2 (C1α), 77.4 (C3α), 74.7 (C3β), 72.7 (C4α), 71.6 – 70.6 (C5α, C5β, C4β), 61.3 (C6α), 61.1 (C6β), 58.2 (C2β), 55.3 (C2α), 54.6 (CH<sub>2</sub>-Sα).

#### Natrium [4',4''-dithio-bis(butyl-2-desoxy-2-sulfonamido-α-D-glucopyranosid)] (80)

97 mg (0.18 mmol) **86** wurden in 10 ml abs. Pyridin gelöst, auf -40° C abgekühlt und mit 56 mg (0.4 mmol) Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex versetzt. Die Suspension wurde zwei Stunden bei -40° C gerührt und die Reaktion anschließend durch Zugabe von Wasser abgebrochen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/Wasser (6:5:0.5) gereinigt. Anschließend erfolgte ein Austausch des Kations an Amberlite IR120 (Na<sup>+</sup>-Form).

Ausbeute: 60 mg (0.08 mmol, 43 %) Gelblicher Sirup  $C_{20}H_{38}N_2Na_2O_{16}S_4$  (736.76 g/mol)  $R_f = 0.09$  Dichlormethan/Methanol/Wasser (6:5:0.5)  $[\alpha]_{546}^{20} = +72.3 \circ (c = 0.5, MeOH)$ 



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 5.06 ( d, 1H, H1), 3.85 (dd, 1H, H6a), 3.79 (m, 1H, H3), 3.77 (m, 1H, H6b), 3.75 (m, H, H1'a), 3.69 (m, 1H, H5), 3.55 (m, 1H, H1'b), 3.46 (m, 1H, H4), 3.22 (dd, 1H, H2), 2.78 (t, 2H, H4'), 1.80-1.70 (m, 4H, H2', H3').

 ${}^{3}J_{1,2} = 3.6, {}^{3}J_{3,4} = 9.2, {}^{3}J_{4,5} = 9.7$  Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 95.5 (C1), 72.6 (C5), 70.5 (C3), 69.8 (C4), 68.3 (C1'), 60.7 (C6), 54.4 (C2), 38.0 (C4'), 27.9 (C2'), 25.5 (C3').

#### Natrium (2-desoxy-2-[N-phosphonamido]-D-glucopyranose) (81)

23 mg (0.04 mmol) wurden nach AAV 3 in Ethanol/Wasser 1:1 umgesetzt. Nach der Filtration wurde die Produkt-Lösung mit einer 0.1M NaOH-Lösung neutralisiert und eingedampft. Das Rohprodukt wurde an einer Sephadex-Säule mit Wasser/Methanol 1:1 als Elutionsmittel gereinigt und dann lyophylisiert.

Ausbeute: 7 mg (0.02 mmol, 50 %) Gelblicher Sirup  $C_6H_{12}NNa_2O_8P$  (303.11 g/mol)  $R_f = 0.09$  Dichlormethan/Methanol/Wasser (6:5:0.5) Anomerenverhältnis  $\alpha$ : $\beta = 5:2$ 

HO

# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 5.51 (d, 1H, H1α), 4.99 (d, 1H, H1β), 3.95-3.71 (m, 7H, H3α, H6aα, H6aβ, H5α, H5β, H4α, H3β), 3.57-3.51 (m, 3H, H6aβ, H6bβ, H4β), 3.35 (dd, 1H, H2α), 3.05 (dd, 1H, H2β).

 ${}^{3}J_{1,2(\alpha)} = 3.6, {}^{3}J_{1,2(\beta)} = 8.4, {}^{3}J_{2,3(\alpha)} = 10.7, {}^{3}J_{2,3(\beta)} = 10.7 \text{ Hz}.$ 

<sup>13</sup>**C-NMR** (101 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 93.1 (C1 $\beta$ ), 89.5 (C1 $\alpha$ ), 76.5 (C3 $\alpha$ ), 72.4 (C4 $\beta$ ), 71.9 (C4 $\alpha$ ), 70.1 (C5 $\alpha$ ), 60.8 (C6 $\beta$ ), 60.7 (C6 $\alpha$ ), 57.1 (C2 $\beta$ ), 54.6 (C2 $\alpha$ ).

<sup>31</sup>**P-NMR** (400 MHz,  $D_2O$ ): [ppm] = 0.03.

#### 2-Desoxy-2-(*N*-methylsulfonyl-amino)-D-glucopyranose (82)

105 mg (0.3 mmol) **76** wurden nach AAV 3 in Ethanol/Wasser 1:1 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde an einer Sephadex-Säule mit Wasser/Methanol 1:1 als Elutionsmittel gereinigt und dann lyophylisiert.

Ausbeute: 75 mg (0.29 mmol, 97 %) Gelblicher Sirup  $C_7H_{15}NO_7S$  (257.26 g/mol)  $R_f = 0.15$  Dichlormethan/Methanol/Wasser (6:5:0.5) MS (FAB, m/z): ber.: 257.26, gef.: 258.28 [M+H]<sup>+</sup> Anomerenverhältnis  $\alpha$ : $\beta$  = 3:1



# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

 $\delta$  [ppm] = 5.35 (d, 1H, H1α), 4.85 (d, 1H, H1β), 3.85 – 3.56 (m, 8H, H3 α/β, H5 α/β, H6 α/β), 3.45–3.36 (m, 2H, H4 α/β), 3.22 (d, 1H, H2α), 2.92 (d, 1H, H2β), 2.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

 ${}^{3}J_{1,2\alpha} = 3.6, {}^{3}J_{1,2\beta} = 8.6$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 93.2 (C1β), 89.5 (C1α), 76.5 (C4β), 71.9 (C5α), 71.4 (C3β), 69.9 (C3α), 68.9 (C4α), 60.7 (C6α), 57.1 (C2α), 54.7 (C2β), 38.8 (CH<sub>3</sub>).
# 4'-Thiobutyl-2-amino-2-deoxy-α-D-glucopyranosid (85) und 4',4''-Dithio-bis(butyl-2amino-2-desoxy-α-D-glucopyranosid) (86)

2.02 g (5.74 mmol) **71** wurden in 40 mL bidest.  $H_20$  gelöst, mit 7.05 g (22 mmol) Bariumhydroxid versetzt und der Ansatz 18 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde zwei Stunden Luftsauerstoff durch den Reaktionsansatz geleitet. Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat zur Reinigung von Bariumsalzen portionsweise mit Trockeneis versetzt, so dass Bariumcarbonat ausfiel und erneut abfiltriert werden konnte. Nach dem Einengen wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/Wasser (6:5:0.3) gereinigt.

Ausbeute: 0.96 g (3.6 mmol, 63 %) Weißer Feststoff  $C_{20}H_{40}N_2O_{10}S_2$  (532.67 g/mol) Smp.: 120 °C  $R_f = 0.22$  Dichlormethan/Methanol/Wasser (6:5:0.3)  $[\alpha]_{546}^{20} = +57.6$  ° (c = 0.5, MeOH) MALDI-TOF (Dithranol, positive mode): m/z = 555.73 [M + Na]<sup>+</sup>



<sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 5.18 ( d, 1H, H1), 3.96-3.90 (m , 2H, H3, H6a), 3.88-3.76 (m, 3H, H6b, H1'a, H5), 3.67-3.60 (m, 1H, H1'b), 3.59-3.52 (m, 1H, H4), 3.39 (dd, 1H, H2), 2.86 (t, 2H, H4'), 1.80-1.75 (m, 4H, H2', H3').

 ${}^{3}J_{1,2}$ = 3.7,  ${}^{3}J_{2,3}$ = 10.6 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 95.5 (C1), 72.6 (C5), 70.5 (C3), 69.8 (C4), 68.3 (C1'), 60.7 (C6), 54.4 (C2), 38.0 (C4'), 27.9 (C2'), 25.5 (C3').

#### 2-Methyl-(1,2-didesoxy-5,6-*O*-isopropyliden-α-D-glucofurano)-[2,1-d]-2-oxazolin (88)

20.0 g (90.7 mmol) *N*-Acetyl-D-glucosamin wurden in 300 ml abs. Aceton suspendiert und 29.5 g (0.184 mol) wasserfreies Eisen-(III)-chlorid hinzugegeben. Die Suspension wurde 20 min unter Rückfluss erhitzt, auf 0° C abgekühlt, 75 ml Diethylamin und weitere 200 ml abs. Aceton hinzugegeben und tropfenweise mit 43.5 g Natriumcarbonat in 250 ml Wasser versetzt. Unter vermindertem Druck wurden Aceton und Triethylamin bei 30 °C größtenteils entfernt, der Rückstand in etwas Wasser aufgenommen und acht Mal mit 100 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufarbeitung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 9.6 g (39.5 mmol, 44%) Lit.: 71% Braunes Öl  $C_{11}H_{17}NO_5$  (243.11 g/mol) MS (FAB, m/z): ber.: 243.11, gef.: 244.11 [M+H]<sup>+</sup>  $R_f = 0.67$  Dichlormethan/Methanol (10:1)



#### Methyl-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucofuranosid (90)

9.6 g (39.5 mmol) **88** wurden in 150 ml abs. Methanol gelöst und durch Zugabe von *p*-Toluolsulfonsäure ein pH-Wert von 3 eingestellt. Nach drei Stunden bei Raumtemperatur wurde die komplette Spaltung des Oxazolinringes detektiert, die Lösung mit 30 ml Wasser versetzt und weitere drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Neutralisation mit Triethylamin wurde die Lösung unter vermindertem Druck bei 25 °C eingeengt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol 8:1).

Ausbeute: 4.1 g (17.4 mmol, 44%) Lit. <sup>[27]</sup>: 74% Braunes Öl C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>6</sub> (235.23 g/mol) MS (FAB, m/z): ber.: 235.23, gef.: 236.2 [M+H]<sup>+</sup>  $R_f = 0.12$  Dichlormethan/Methanol (8:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = -52.3^{\circ}$  (c = 1, MeOH), Lit.<sup>[27]</sup>  $[\alpha]_{589}^{20} = -56^{\circ}$  (c = 1, MeOH)

## <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 4.94 (s, 1H, H1), 4.33 (dd, 1H, H3), 4.18-4.15 (m, 2H, H2, H4), 4.03 – 3.99 (m, 1H, H5), 3.90 (dd, 1H, H6), 3.74 (dd, 1H, H6), 3.40 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>).

 ${}^{3}J_{2-3} = 1.27, {}^{3}J_{3-4} = 4.58, {}^{3}J_{5-6a} = 2.7, {}^{3}J_{5-6b} = 5.7, {}^{2}J_{6a-6b} = 12.0$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 108.2 (C1), 81.4 (C4), 75.0 (C3), 70.7 (C5), 64.1 (C6), 62.9 (OCH<sub>3</sub>), 54.6 (C2), 21.3 (Ac-CH<sub>3</sub>).

#### Methyl-2-acetamido-2-desoxy-β-D-xylo-hexofuranosid-5-ulose (91)

3.82 g (16.2 mmol) **90** wurden in 200 ml abs. Methanol gelöst, mit 11 g (44 mmol) Dibutylzinnoxid und 2 g Molekularsieb 4 Å versetzt und vier Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 220 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 6.73 ml (23 mmol) Tributylzinnmethoxid und tropfenweise mit 3.5 g (22 mmol) Br<sub>2</sub> in 20 ml Dichlormethan versetzt. Anschließend wurden 1 ml Cyclohexen und 150 ml Petrolether zugetropft. Nach 10 h Stehen wurden die Lösung eingeengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol (9:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.9 g (8.1 mmol, 50%) Lit. <sup>[27]</sup>: 52% Weißer Feststoff C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>6</sub> (233.22 g/mol) Smp.: 175 °C (Lit. 180 – 185 °C) MS (FAB, m/z): ber.: 233.22, gef.: 234.24 [M+H]<sup>+</sup>  $R_f = 0.28$  Dichlormethan/Methanol (10:1)  $[\alpha]_{546}^{20} = -128^{\circ}$  (c = 1, MeOH), Lit. <sup>[27]</sup>  $[\alpha]_{589}^{20} = -137^{\circ}$  (c = 1, H<sub>2</sub>O)



## <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>):

δ [ppm] = 8.11 (NH), 5.43 (C3-OH), 4.93 (C6-OH), 4.81 (s, 1H, H1), 4.73 (d, 1H, H4), 4.28-4.22 (m, 3H, H3, H6), 4.01 (d, 1H, H2), 3.36 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 1.83 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>)

$${}^{3}J_{2-3} = 6.9, {}^{3}J_{3-4} = 5.4$$
 Hz.

## <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>):

δ [ppm] = 208.2 (C5), 169.1 (N<u>C</u>OCH<sub>3</sub>), 109.1 (C1), 86.4 (C4), 75.2 (C3), 66.7 (C6), 61.8 (C2), 54.9 (OCH<sub>3</sub>), 22.4 (Ac-CH<sub>3</sub>).

#### 2-Acetamido-1,2-didesoxy-nojirimycin (93)

1.8 g (7.7 mmol) **91** wurden in 50 ml 0.5%-ger Schwefelsäure gelöst und drei Stunden auf 60 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit Bariumhydroxid-octahydrat neutralisiert, zentrifugiert und das Filtrat lyophylisiert. Der so erhaltene Ketoaldehyd **92** wurde in 30 ml abs. Methanol gelöst und auf -10 °C abgekühlt. Eine Lösung aus 0.72 g (9.2 mmol) Ammoniumacetat und 0.8 g (12.8 mmol) Natriumcyanoborhydrid in 20 ml abs. Methanol, gekühlt auf -10 °C, wurde zugegeben und die resultierende Lösung sieben Tage bei 0 °C gehalten. Dann wurde sie eingeengt, und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol/Ammoniak (25%-ig) (12:8:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.26 g (1.3 mmol, 17%) Lit. [27]: 37%

 Weißer Feststoff
  $C_8H_{16}N_2O_4$  (204.22 g/mol)
 HO

 Smp. 220 °C (Lit. <sup>[27]</sup> 227 °C)
 HO

  $[\alpha]_{546}^{20} = + 12.8^{\circ}$  (c = 1, H<sub>2</sub>O), Lit. <sup>[27]</sup>  $[\alpha]_{589}^{20} = + 13.3^{\circ}$  (c = 1, H<sub>2</sub>O)
 MS (FAB, m/z): ber.: 204.22, gef.: 205.21 [M+H]<sup>+</sup>

  $R_f = 0.32$  Dichlormethan/Methanol/Ammoniak (12:8:1)
 HO



#### <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 3.83 (dd, 1H, H6a), 3.78-3.71 (m, 1H, H2), 3.66 (dd, 1H, H6b), 3.39 (dd, 1H, H3), 3.33 (dd, 1H, H4), 3.06 (dd, 1H, H1a), 2.63-2.56 (m, 1H, H5), 2.46 (dd, 1H, H1b), 1.98 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>)

 ${}^{2}J_{1a-1b} = 12.7, {}^{3}J_{1a-2} = 5.1, {}^{3}J_{1b-2} = 11.6, {}^{3}J_{2-3} = 9.1, {}^{3}J_{3-4} = 9.8, {}^{3}J_{5-6a} = 3.1, {}^{3}J_{5-6b} = 6.1, {}^{2}J_{6a-6b} = 11.8$  Hz.

### <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 174.4 (N<u>C</u>OCH<sub>3</sub>), 75.6 (C3), 71.6 (C4), 60.9 (C6), 60.4 (C5), 51.8 (C2), 46.7 (C1), 22.1 (Ac-CH<sub>3</sub>).

#### 2-Amino-1,2-didesoxy-nojirimycin (94)

0.18 g (0.88 mmol) **93** wurden in 10 ml dest. Wasser gelöst, mit 0.5 g (1.5 mmol) Bariumhydroxidoctahydrat versetzt und die Lösung fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der gebildete Niederschlag abfiltriert und das Filtrat zur Reinigung von Bariumsalzen portionsweise mit Trockeneis versetzt, so dass Bariumcarbonat ausfiel und erneut abfiltriert werden konnte. Schließlich wurde das Filtrat lyophylisiert und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol/Ammoniak (25%-ig) (12:8:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.065 g (0.4 mmol, 45%) Weißer Feststoff Smp: 198 °C (Lit.<sup>[63]</sup> 184 °C) C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (162.19 g/mol)  $[\alpha]_{546}^{20} = + 17.3^{\circ} (c = 1, H_2O)$ R<sub>f</sub> = 0.18 Dichlormethan/Methanol/Ammoniak (12:8:1)

<sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 3.81 (dd, 1H, H6a), 3.63 (dd, 1H, H6b), 3.24-3.15 (m, 2H, H4, H3), 3.06 (dd, 1H, H1a), 2.75-2.66 (m, 1H, H2), 2.58-2.51 (m, 1H, H5), 2.39 (dd, 1H, H1b).

$${}^{2}J_{1a-1b} = 12.4$$
,  ${}^{3}J_{1a-2} = 4.8$ ,  ${}^{3}J_{1b-2} = 11.1$ ,  ${}^{3}J_{5-6a} = 3.1$ ,  ${}^{3}J_{5-6b} = 6.3$ ,  ${}^{2}J_{6a-6b} = 11.8$  Hz.

<sup>13</sup>**C-NMR** (101 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 78.5 (C3), 71.8 (C4), 61.4 (C6), 60.7 (C5), 52.8 (C2), 48.5 (C1).

### 1,2-Dideoxy-2-sulfamido-nojirimycin (95)

10 mg (0.06 mmol) **94** wurden in 2 ml abs. Methanol gelöst, mit 5 mg (0.07 mmol) Imidazol versetzt und auf 0° C abgekühlt. Dann wurde die Lösung mit 18 mg (0.13 mmol)

Schwefeltrioxid-Trimethylamin-Komplex versetzt, die Suspension drei Stunden bei 0° C gerührt und die Reaktion anschließend durch Zugabe von Wasser abgebrochen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/Ammoniak (25%-ig) (12:8:1) gereinigt. Anschließend erfolgte ein Austausch des Kations an Amberlite IR120 (Na<sup>+</sup>-Form).

Ausbeute: 8 mg (0.03 mmol, 50 %) Gelbliche amorphe Substanz  $C_6H_{13}N_2NaO_6S$  (264.23 g/mol)  $[\alpha]_{546}^{20} = +14.1^{\circ}$  (c = 1, H<sub>2</sub>O)  $P_{a} = 0.12$  Disblormethen /Mathemal/Ammonials (12:8:1)



 $R_f = 0.12$  Dichlormethan/Methanol/Ammoniak (12:8:1)

# <sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 4.05 (dd, 1H, H6a), 3.98 (dd, 1H, H6b), 3.87 - 3.79 (m, 2H, H1a, H4), 3.73 (vt, 1H, H3), 3.41 - 3.35 (m, 1H, H2), 3.32-3.26 (m, 1H, H5), 3.21 (dd, 1H, H1b).

 ${}^{2}J_{1a-1b} = 13.8$ ,  ${}^{3}J_{1a-2} = 3.8$ ,  ${}^{3}J_{1b-2} = 6.5$ ,  ${}^{3}J_{5-6a} = 3.1$ ,  ${}^{3}J_{5-6b} = 6.3$ ,  ${}^{2}J_{6a-6b} = 11.8$  Hz.

# <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ [ppm] = 71.1 (C3), 68.5 (C4), 62.6 (C5), 58.7 (C6), 50.5 (C2), 44.5 (C1).

# 12. Gefahrenhinweise

	R-Sätze	S-Sätze Gefa	Gefahrensymbole	
Aceton	11-36-66-67	9-16-26	F, Xi	
Allylalkohol	10-23/24/25	36/37/39-38	T, N	
	36/37/38-50	45-61		
Benzylalkohol	20/22	26	Xn	
Chloroform	22-38-40-48/20/22	36/37	Xn	
Dichlormethan	40	23.2-24/25-36/37	Xn	
Diethylether	12-19-22-66-67	2-9-16-29-33	Xn, F+	
N,N-Dimethylformamid	61-E20/21-36	53-45	Т	
Ethylacetat	11-36-66-67	16-26-33	F, Xi	
Essigsäure	10-35	23.2-26-45	С	
Essigsäureanhydrid	10-20/22-34	26-36/37/39-45	С	
Ethanol	11	7-16	F	
Imidazol	22-34	22-26-36/37/39-45	С	
Lithiumhydrid	15-34	7/8-26-36/37/39	F, C	
		43-45		
Methanol	11-23/24/25-	7-16-36/37-45	F, T	
	39/23/24/25			
Natriumhydrid	15-34	7/8-26-36/37/39	F, C	
		43.6-45		
Natriumhydroxid	35	26-37/39-45	С	
Natriumsulfat		22-24/25		
Palladium / Aktivkohle	7-36/37/38	17-26-36	F, Xi	
Petrolether (50/70)	12-65	9-16-23.2-24-33-62	E F, Xn	
Pyridin	11-20/21/22	26-28.1	F, Xn	
Pyridinhydrochlorid	22-36/38	22	Xn	
Schwefelsäure	35	26-3045	С	
Toluol	11-20	16-25-29-33	F, Xn	

#### 13. Literatur

- [1] D. Voet, J. G. Voet, Biochemie, VCH, Weinheim, **1994**, 252-260.
- [2] A. Lubineau, J. Alais, R. Lemoine, J. Carbohydr. Chem. 2000, 19, 151-169.
- [3] A. Lubineau, R. Lemoine, Tetrahedron Letters **1994**, *35*, 8795-8796.
- [4] T. A. Springer, *Cell* **1994**, *76*, 301-314.
- [5] L. Biesert, H. Suhartono, I. Winkler, C. Meichsner, M. Helsberg, G. Hewlett, V. Klimetzek, K. Mölling, H.-D. Schlumberger, E. Schrinner, H. D. Brede, H. Rübsamen-Waigmann, *AIDS* 1988, 2, 449-457.
- [6] M. Simon, R. H. McClanahan, J. F. Shah, T. Repko, N. B. Modi, *Xenobiotica* 2005, 35, 775-784.
- [7] D. A. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Science* 1998, 280, 69-77.
- [8] J. M. Boggs, A. Menikh, G. Rangaraj, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 874–885.
- [9] C. Bowler, G. Neuhaus, H. Yamagata, N. Chua, *Cell* **1994**, *77*, 73-81.
- [10] A.Trewavasö, R. Malho, *Curr. Opin. Plant Biol.* **1998**, *1*, 428-433.
- [11] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, Phys. Rev. Lett. 1986, 56, 930-933.
- [12] A. Engel, H. E. Gaub, D. J. Muller, *Curr. Biol.* **1999**, *9*,133-136.
- [13] Y. Okabe, U. Akiba, M. Fujihira, Appl. Surf. Sci. 2000, 157, 398-404.
- [14] J.Koohlman, K.-H. Röhm, Taschenatlas der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 2003, 232-235 und 378-379.
- [15] Monatsschrift Kinderheilkunde, Springer Verlag, Berlin / Heidelberg, , 2006, 154, 10955-10961.
- [16] M. Beck, Deutsches Ärzteblatt 2001, 34-35, A-2188-2192.
- [17] W. J. Welch, C. R. Brown, Cell Stress & Chaperones 1996, 1, 109-115.
- [18] C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, Angew. Chem. 1995, 107, 453-474; Angew. Chem. Int. Ed. 1995, 34, 412-432.
- [19] S. Inouye, T. Tsuruoka, T. Niida, J. Antibiot. Ser. A 1966, 19, 288-292.
- [20] S. Inouye, T. Tsuruoka, Y. Koaze, T. Niida, *Tetrahedron* 1968, 24, 2125-2144.
- [21] N. Ishida, K. Kumagai, T. Niida, T. Tsuruoka, H. Yumoto J. Antibiot. Ser. A 1967, 20, 66-71.
- [22] H. Paulsen, in "Iminosugars as Glucosidase Inhibitors" A. E. Stütz, Ed., Wiley-VCH, Weinheim 1998, 1.

- [23] H. Paulsen, Angew. Chem. 1966, 78, 501-516; Angew. Chem. Int. Ed. 1966, 5, 495-511.
- [24] H. Paulsen, K. Todt, Adv. Carbohydr. Chem. 1968, 23, 115-232.
- [25] S. Moutel, M. Shipman, J. Chem. Soc., Perkin Trans 1 1999, 1403-1406.
- [26] T. Kajimoto, K. K.-C. Liu, R. L. Pederson, Z. Zhong, Y. Ichikawa, J. A. Porco, C.-H. Wong, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 6187-6196.
- [27] R. H. Furneaux, G. J. Gainsford, G. P. Lynch, S. C. Yorke, *Tetrahedron* 1993, 49, 9605-9612.
- [28] W. Koenigs, E. Knorr, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1901, 34, 957–981.
- [29] R. R. Schmidt, J. Michel, Angew. Chem. 1980, 92, 763-764; Angew. Chem. Int. Ed. 1980, 19, 731-732.
- [30] P. Brigl, Z. Physiol. Chem. 1922, 122, 245-262.
- [31] R. U. Lemieux, J. Howard, Methods Carbohydr. Chem. 1963, 2, 400-401.
- [32] B. Helferich, E. Schmitz-Hillebrecht, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1933, 66, 378 389.
- [33] W. Roth, W. Pigman, *Methods Carbohydr. Chem.* **1963**, *2*, 405 408.
- [34] G. Zemplén, E. Pacsu, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1929, 63, 1613-1618.
- [35] N. W. H. Cheetham, P. Sirimanne, *Carbohydr. Res.* **1981**, *96*, 126–128.
- [36] S. Koto, M. Hirooka, T. Tashiro, M. Sakashita, M. Hatachi, T. Kono, M. Shimizu, N. Yoshida, S. Kurasawa, N. Sakuma, S. Sawazaki, A. Takeuchi, N. Shoya, E. Nakamura, *Carbohydr. Res.* 2004, *339*, 2415–2424.
- [37] K. Toshima, K. Tatsuta, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1503-1531.
- [38] T.-C. Zheng, M. Burkart, D. E. Richardson, *Tetrahedron Lett.* 1999, 40, 603-606.
- [39] M. Hegner, P. Wagner, G. Semenza, Surface Science 1993, 291, 39-46.
- [40] P. Wagner, M. Hegner, H.-J. Güntherodt, G. Semenza, *Langmuir* 1995, *11*, 3867-3875.
- [41] W. J. Sanders, D. D. Manning, K. M. Koeller, L. L. Kiessling, *Tetrahedron* 1997, 53, 16391-16422.
- [42] S. David, Preparative Carbohydrate Chemistry, Dekker, New York 1997, 69-86.
- [43] S. Langston, B. Bermet, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* 1994, 77, 2341-2353.
- [44] A. Lubineau, J. Le Gallic, R. Lemoine, *Bioorg. Med. Chem.* 1994, 2, 1143-1151.
- [45] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930-933.
- [46] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1999, 550-554.

- [47] C.-H. Wong, M. Hendrix, D. D. Manning, C. Rosenbohm, W. A. Greenberg, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8319-8327.
- [48] U. Schöllkopf, A. Lorch, J. Paust, Chem. Ber. 1963, 96, 2275.
- [49] G. W. J. Fleet, P.W. Smith, R. J. Nash, L. E. Fellows, R. B. Parekh, T. W. Rademacher, *Chem. Lett.* **1986**, 1051-1054.
- [50] G. W. J. Fleet, L. E. Fellows, P.W. Smith, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 979-990.
- [51] H. Böshagen, F.-R. Heiker, A. M. Schüller, Carbohydr. Res. 1987, 164, 141-148.
- [52] M. Kiso, M. Kitagawa, H. Ishida, A. Hasegawa, J. Carbohydr. Chem. 1991, 10, 25-45.
- [53] E. Kappes, G. Legler, *Carbohydr. Chem.* **1989**, *8*, 371-378.
- [54] E. L. Davis, S. R. El Khoudary, E. O. Talbott, J. Davis, L. J. Regan, J. Urol. 2008, 179, 177-185.
- [55] J. Sairanen, T. L. J. Tammela, M. Leppilahti, M. Onali, T. Forsell, M. Ruutu, *Neurol.* & Urodyn. 2007, 26, 267-270.
- [56] H. Mack, J. V. Basabe, R. Brossmer, *Carbohydr. Res.* 1988, 175, 311-316.
- [57] D. B. Dess, J. C. Martin, J. Org. Chem. 1983, 48, 4155-4156.
- [58] R. E. Ireland, L. Liu, J. Org. Chem. 1993, 58, 2899.
- [59] A. J. Mancuso, S.-L. Huang, D. Swern, J. Org. Chem. 1978, 43, 2480-2482.
- [60] Y. Tsuda, M. Hanajima, N. Matsushira, Y. Okuno, K. Kanemitsu, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2344-2350.
- [61] S. David, A. Thieffry, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1979, 1568-1572.
- [62] A. R. Sawkar, W.-C-Cheng, E. Beutler, C.-H. Wong, W. E. Balch, J. W. Kelly, *PNAS* 2002, 99, 15428-15433.
- [63] K. I. Khanna, R. A. Mueller, R. M. Weier, M. A. Stealey, G. D. Searle & Co. (Skokie, IL), US 5216168, 1993; Chem. Abstr. 1993, 119, 250376.
- [64] N. Muschol, S. Storch, D. Ballhausen, C. Beesley, J.-C. Westermann, A. Gal, K. Ullrich, J. J. Hopwood, B. Winchester, T. Braulke, *Hum. Mut.* 2004, 23, 559-566.
- [65] A. Meyer, K. Kossow, A. Gal, C. Steglich, C. Mühlhausen, K. Ullrich, T. Braulke, N. Muschol, *Hum. Mut.* 2008, 29, 770-776.
- [66] F. M. Platt, R. H. Lachmann, Biochim. & Biophys. Acta, Mol. Cell Res. 2009, 1793, 737-745.
- [67] I. Bucior, S. Scheuring, A. Engel, M. M. Burger, J. Cell Biol. 2004, 165, 529-537.
- [68] A. M. Scheppokat, A. Gerber, A. Schroven, S. Meinke, S. Kopitzki, E. Beketow, J. Thimm, J. Thiem, *Eur. J. Cell Biol.* 2010, 89, 39-52.

- [69] S. Kopitzki, E. Beketow, J. Thimm, J. Thiem: Synthesis of Regioselectively Thioalkane-linked and Sulfated Glyco-Derivates and Investigation of Carbohydrate-Carbohydrate-Interactions by AFM, Poster 147, EUROCARB 14, Lübeck, 2007.
- [70] E. Beketow, Diplomarbeit, Hamburg **2004**, 28.
- [71] E. V. Tsiper, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 013204/1-013204/4.
- [72] C. Ray, J. R. Brown, B. B. Akhremitchev, J. Phys. Chem. 2007, 111, 1963-1974.
- [73] F. Kienberger, H. Gruber, P. Hinterdorfer, Applied Scannig Probe Methods II, Springer, New York, 2006, 143-146.
- [74] J. P. McNamara, A.-M. Muslim, H. Abdel-Aal, H. Wang, M. Mohr, I. H. Hillier, R. A. Bryce, *Chem. Phys. Lett.* 2004, 394, 429-436.
- [75] E. R. Hatcher, O. Guvench, A. D. MacKerell, J. Chem. Theory Comput. 2009, 5, 1315-1327.
- [76] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, H. E. Gaub, Science 1997, 276, 1109-1112.
- [77] <u>http://www.wavemetrics.com/</u>
- [78] M. T. Porter, A. L. Fluharty, H. Kihara, Science 1971, 172, 1263-1265.
- [79] M. Cantz, H. Kresse, *Eur. J. Biochem.* **1974**, *47*, 581-590.
- [80] S. R. Hanson, M. D. Best, C.-H. Wong, Angew. Chem. 2004, 116, 5858-5886; Angew.
   Chem. Int. Ed. 2004, 43, 5736-5763.
- [81] G. Uhlhorn-Dierks, T. Kolter, K Sandhoff, Angew. Chem. 1998, 110, 2591-2594;
   Angew. Chem. Int. Ed. 1998, 37, 2453-2455.
- [82] M. M. Bradford, Anal. Biochem. 1976, 72, 248-254.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

- bei allen Kollegen aus dem Arbeitskreis Thiem, auch ehemaligen, die während meines recht langen Aufenthaltes im AK bereits ausgeschieden sind, für angenehmes Arbeitsklima und sachliche Diskussionen. Besonderer Dank gilt dabei Dr. Julian Thimm, der jederzeit mit Rat und Tat zur Hilfe stand und die AFM-Messungen durchgeführt hat
- Lilia und Kirsten, ohne die es oft einfach nicht weiterging
- meiner Familie für Geduld und Aufmunterung
- zahlreichen Praktikanten aus OC-F- und IS-Praktika
- dem NMR-Service und Dr. Sinnwel f
  ür Abwicklung öfteren außergewönnlichen Anfragen
- Prof. T. Braulke aus Universitätskrankenhaus Eppendorf für angenehme Mitarbeit und Hilfestellungen