

**Synthese neuartiger Uridindiphospho-
N-acetylglycosaminyI-Derivate als Strukturanaloga
biogener Transferase-Donoren**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Daniel Lazarević
aus Hamburg

Hamburg 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Thiem
 2. Gutachter: Prof. Dr. H. Paulsen
- Tag der Disputation: 1. Juli 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2001 bis März 2005 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. J. Thiem am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 470 durchgeführt.

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

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	1
1.1. Glykosphingolipide und Ganglioside.....	2
1.1.1. Struktur und biologische Bedeutung der Glykosphingolipide.....	2
1.1.2. Transferasen des Glykosphingolipidstoffwechsels.....	7
1.1.3. Glykosphingolipid-Abbau und -Anreicherung.....	11
1.2. Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen.....	14
1.2.1. Photoaffinitätsmarkierung.....	15
1.2.2. Photoaffinitätsmarkierung von Glykosyltransferasen.....	19
1.3. Synthesen von Nukleosiddiphosphohexosen.....	22
1.3.1. Enzymatische Synthesen von Nukleosiddiphosphohexosen.....	23
1.3.2. Chemische Synthesen von Nukleosiddiphosphohexosen.....	24
1.4. Synthesen von Glykosylmonophosphaten.....	25
<u>2. Zielsetzung</u>	30
<u>3. Herstellung der α-Hexopyranosylmonophosphate</u>	32
3.1. Einleitung und Synthesekonzept.....	32
3.2. Synthese von Galactopyranosyl- und 2-Desoxygalactopyranosylphosphat.....	35
3.3. Herstellung der Hexopyranosaminy-1-phosphate.....	40
3.4. Charakterisierung von α -Hexopyranosylmonophosphaten.....	44
3.5. Synthese von HexNAc-1-Phosphat-Analoga.....	50
3.5.1. Selektive <i>N</i> -Acylierungen von Glucopyranosaminy- und Galactopyranosaminy-1-phosphat.....	50
3.5.2. Selektive <i>N</i> -Formylierung von Glucopyranosaminy- und Galactopyranosaminy-1-phosphat.....	53
3.5.3. Synthese von <i>N</i> -Trifluoracetamidogalactopyranosylphosphat....	56
3.6. Azid- und Diazirin-modifizierte HexNAc-1-Phosphat-Analoga.....	62
3.6.1. Synthese von (2-Azidoacetamido)galactopyranosaminy-1-phosphat.....	62
3.6.2. Synthese der 2-Azidohexopyranosaminy-1-phosphate.....	64
3.6.3. Synthese Diazirin-modifizierter GalNAc-1-Phosphat-Analoga....	66

<u>4. Synthesen von Uridindiphosphohexopyranosylaminen</u>	71
4.1. Morpholidat-Kupplungs-Reaktionen.....	72
4.2. Darstellung von UDP-Galactosamin.....	79
4.3. Charakterisierung von UDP-Hexosen.....	82
<u>5. Synthese phosphatierter 5'-Azidouridine</u>	86
<u>6. Zusammenfassung / Summary</u>	90
<u>7. Experimenteller Teil</u>	94
7.1. Allgemeine Methoden.....	94
7.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	98
7.3. Spezielle Arbeitsvorschriften.....	102
<u>8. Literatur</u>	168
<u>9. Gefahrenhinweise</u>	176

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetyl
Bn	Benzyl
Bu	<i>n</i> -Butyl
CAN	Cer(IV)-ammoniumnitrat
Cer	Ceramid
CMP	Cytidin-5'-yl-monophosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DE	Diethylether
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DTP	2-Diazo-1,1,1-trifluorpropionyl
EE	Ethylacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
equiv.	Äquivalent
Gal	D-Galactose
GalN	D -Galactosamin
GalN-1-P	D-Galactosaminyl-1-phosphat
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
GalNAc-1-P	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosaminylphosphat
GDP	Guanosinyl-5'-diphosphat
Glc	D-Glucose
GlcN	D -Glucosamin
GlcN-1-P	D-Glucosaminyl-1-phosphat
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin, NAG
GlcNAc-1-P	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosaminylphosphat
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie, SEC
GSL	Glykosphingolipid
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
<i>i</i> Pr	Isopropyl

ISC	Intersystem Crossing
Lac	Lactose
Me	Methyl
MIM	1-Methylimidazol
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
NDP	Nukleosiddiphosphat
NMP	Nukleosidmonophosphat
NTP	Nukleosidtriphosphat
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PE	Petrolether
PG	“Protecting group“, Schutzgruppe
Ph	Phenyl
<i>p</i> NP	<i>p</i> -Nitrophenyl
Pyr	Pyridin
RT	Raumtemperatur
SAP	Sphingolipid-Aktivator-Protein
SEC	“Size Exclusion Chromatography“, GPC
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
Tol	Toluol
UDP	Uridin-5'-yl-diphosphat
UMP	Uridin-5'-yl-monophosphat
UPPU	P ¹ ,P ² -Diuridin-5,5'-pyrophosphat (Uridindiphosphouridin)
UTP	Uridin-5'-yl-triphosphat

Die Abkürzungen sind auch in kombinierter Form vorkommend und setzen sich sinngemäß aus den hier gelisteten Einzelabkürzungen zusammen, wie z.B.

UDP-GlcN	Uridindiphosphoglucosamin
UDP-GalN	Uridindiphosphogalactosamin

1. Einleitung

Lange Zeit spielten die Kohlenhydrate, als größte Naturstoffklasse, eine eher untergeordnete Rolle in der Untersuchung metabolischer Prozesse. Ab Mitte dieses Jahrhunderts, bedingt durch die Strukturaufklärung der DNA durch J.D. Watson und F.H.C. Crick (1953), wurde daher verständlicherweise eher den Nucleinsäuren als Informationsspeicher des Lebens ein großer Erkenntnisbedarf zugesprochen. Fast schon überraschend scheint es daher aus heutiger Sicht, daß für die Kohlenhydrate und ihre Konjugate angesichts der Zahl möglicher glykosidischer Verknüpfungen, die nicht wie bei den Nucleinsäuren linear sondern exponentiell anwächst, nicht schon früher eine Rolle als Informationsträger der molekularen Kommunikation und anderer Funktionen angenommen wurde. In den letzten Jahrzehnten hat sich diese Erkenntnis durchgesetzt und das Wissen um die vielfältigen Aufgaben der Kohlenhydrate in der belebten Natur stark zugenommen. Außer den seit langen bekannten Funktionen der Kohlenhydrate als Energiespeicher, z.B. in der Stärke sowie im Glycogen, und Gerüstsubstanzen wie Cellulose und Chitin bei Pflanzen und Tieren, wurden Kohlenhydrate als Bestandteil vieler biogener Lipide und Proteine erkannt. In Form dieser Glykokonjugate erfüllen die Kohlenhydrate wichtige zum Teil noch unaufgeklärte Aufgaben in biologischen *in vivo*-Regulations- und Erkennungsprozessen. So ermöglichen die in der Zellmembran eingelagerten Glykoproteine und Glykolipide die Zell-Zell-Erkennung¹, beeinflussen auf diese Weise die Zelldifferenzierung² und schaffen die Voraussetzung für die adhesive Aggregation von Zellen³. Neben der körpereigenen Funktion im Rahmen der interzellulären Wechselwirkung werden die extrazellulären Oligosaccharidstrukturen von membrangebundenen Glykoproteinen- und lipiden auch durch hochspezifische Rezeptoren von Toxinen⁴, Bakterien⁵ und Viren⁶ erkannt und vermitteln so deren Eindringen durch die Zellmembran ins Zellinnere. Bekanntere Beispiele hierfür sind in der Domäne der Glykoproteine die Infektion der menschlichen T-Lymphozyten durch das HTLV-III-LAV (AIDS) -Virus über die spezifische Wechselwirkung der Oligosaccharidstruktur des CD4-Glykoproteins auf der T-Lymphocytenmembran mit dem als Kohlenhydratrezeptor wirkenden Virushüllenprotein GP 120⁷. Im Falle der Glykolipide treten hochspezifischen Bindungen des Cholera- und Tetanus-Toxins an membrangebundene Ganglioside menschlicher Nervenzellen auf^{8,9,10}, was zu dem

Schluß führte, daß Glykolipide eine bedeutende Rolle in der interzellulären Leitung von Nervenzellen spielen. Mit zunehmendem Verständnis für die Bedeutung und Funktion glykolipidischer Oligosaccharidstrukturen, steigt das Interesse an der Identifizierung neuer Vertreter dieser Naturstoffklasse und an der Erweiterung des Grundlagenwissens um deren biologische Funktion. Um dies zu untersuchen ist es nötig solche Verbindungen auf chemischem oder chemoenzymatischem Wege zu synthetisieren sowie Methoden für ihre Modifizierung und Markierung zu entwickeln, was letztlich Ziel dieser Arbeit ist.

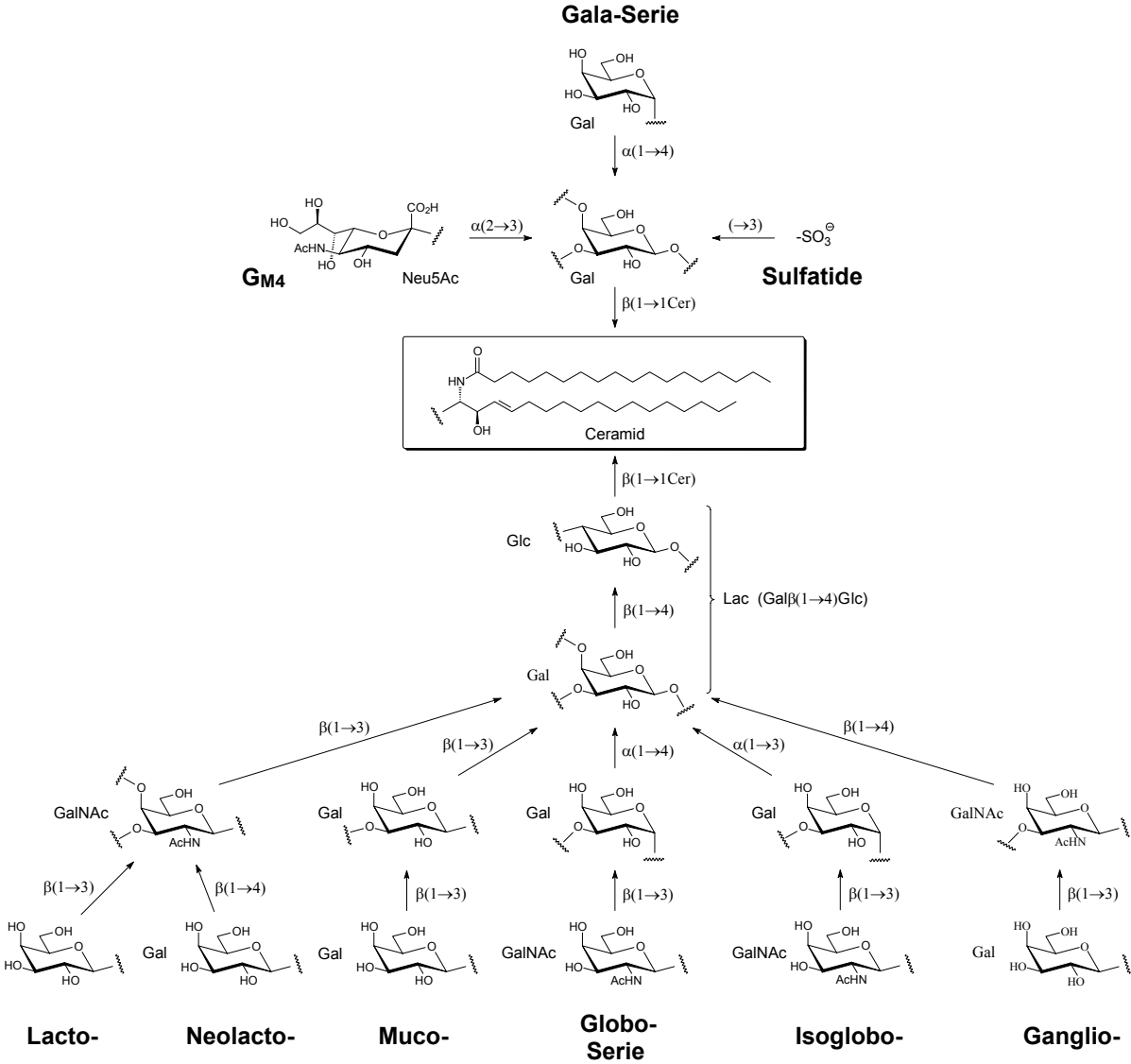
1.1. Glykosphingolipide und Ganglioside

Unter Glykolipiden, die neben den Glykoproteinen, Proteoglycanen und Lipopolysacchariden zu den Glykokonjugaten gehören, werden Lipide verstanden, die als hydrophilen molekularen Bestandteil glykosidisch gebundene Kohlenhydrate besitzen. Im Vergleich mit den ebenfalls zu den Glykokonjugaten zählenden Lipopolysacchariden Gram-negativer Bakterien handelt es sich um wesentlich kleinere Moleküle. Je Lipidmolekül sind meist höchstens ca. 10, in seltenen Fällen bis zu 30 Monosaccharid-Einheiten gebunden. Als lipophilen Kern enthalten die im Nervengewebe der Säugetiere auftretenden Glykolipide Ceramide und sind daher präziser durch die Bezeichnung 'Glykosphingolipide' (GSLs) charakterisiert. Man unterscheidet ferner die Cerebroside, die nur eine an Ceramid gebundene Monosaccharid-Einheit tragen (meist D-Glucose oder D-Galactose), die Sulfatide mit ihren sulfatveresterten Monosacchariden und die Ganglioside, die mit teilweise verzweigten Oligosaccharid-Ketten behaftet sind, üblicherweise bestehend aus D-Galactose, D-Glucose, L-Fucose, N-Acetyl-D-glucosamin, N-Acetyl-D-galactosamin und stets N-Acetyl-neuraminsäure (Sialinsäure).

1.1.1. Struktur und biologische Bedeutung der Glykosphingolipide

Glykosphingolipide (GSLs) sind amphiphile (sowohl hydrophile als auch lipophile) Komponenten der Plasmamembranen aller Wirbeltierzellen^{11,12}. Sie treten auch als

Membrankomponenten intrazellulärer Membranen sekretischer und endocytotischer Bioprozesse auf, wie etwa in den Golgi-, *trans*-Golgi-Netzwerk- (TGN-), endosomalen- und lysosomalen Membranen. Über ihr hydrophobes Ceramid-Strukturelement sind die GSLs auf den Plasmamembranaußenseiten verankert, so daß ihre hydrophilen Oligosaccharidreste in den extrazellulären Raum ragen.



Schema 1: Glykosidische Verknüpfungen und Nomenklatur verschiedener GSL-Serien. Ceramid, *N*-Acylsphingosin; Gal, *D*-Galactose; GalNAc, *N*-Acetyl-*D*-galactosamin; Glc, *D*-Glucose; GlcNAc, *N*-Acetyl-*D*-glucosamin; Neu5Ac, Sialinsäure

Bis heute sind mehr als 300 verschiedene GSL-Strukturen unterschiedlichster Größe und Komplexität bekannt, die gemäß Schema 1 in wenige Serien klassifiziert sind.

Allen gemeinsam ist das Auftreten des erwähnten lipidischen Ceramid-Restes als Membran-Ankergruppe, die über ihre primäre Hydroxygruppe, unmittelbar entweder mit D-Gal oder häufiger mit D-Glc β -glykosidisch verknüpft ist. Wesentliches Klassifizierungsmerkmal für die Unterteilung von GSLs ist das Auftreten diskreter glykosidischer Verknüpfungsmuster, die eine Zuordnung zur Lacto-, Neolacto-, Muco-, Glubo-, Isoglobo- und Ganglio-GSL-Serie erlauben, die sich untereinander neben einem gemeinsamen Lactosyl- $\beta(1\rightarrow1)$ ceramid-Gerüst in den beiden darauffolgenden Glykosylierungsfolgen zwischen D-Gal und D-GalNAc unterscheiden. Von diesen relativ häufigen GSL-Serien heben sich jene GSLs ab, die eine unmittelbar an Ceramid β -glykosidisch verknüpfte D-Gal-Einheit enthalten, die entweder sulfatiert (Sulfatide), sialyliert (Gangliosid G_{M4}) oder galactosyliert (Gala-Serie) vorkommen können.

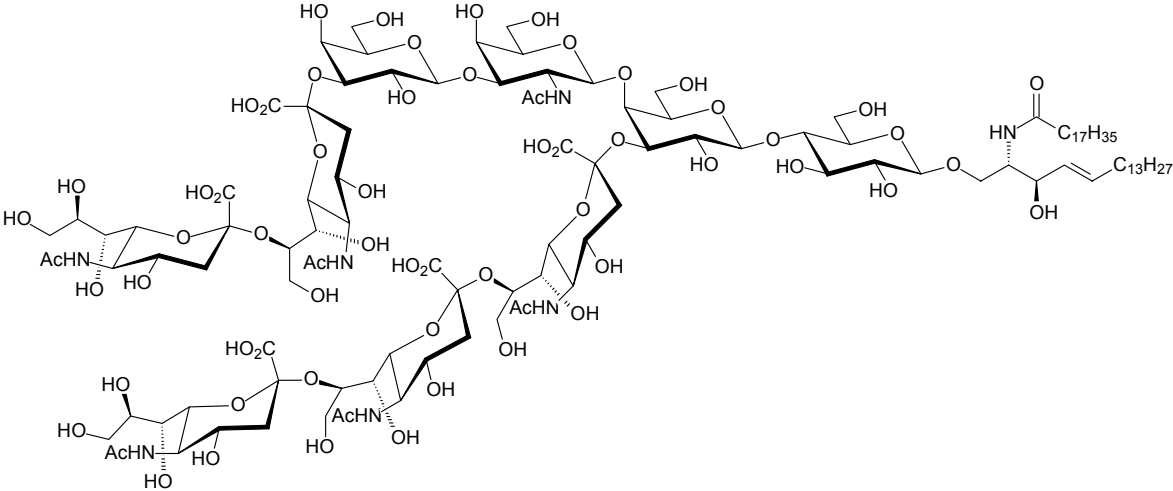
Ganglioside im besonderen sind eine Gruppe sialinsäurehaltiger GSLs mit hoher molekularer Vielfalt, die neben den bereits genannten häufig auftretenden Zucker-Einheiten auch seltenere Zuckerbausteine und andere Komponenten enthalten^{13,14}.

Ganglioside werden im Gehirn angereichert vorgefunden, vornehmlich in neuronalen Membranen und synaptischen Wachstumsknoten^{15,16}, aber auch weniger gehäuft in anderen Körperorganen wie z.B. der Milz. Schon länger ist bekannt, daß das Gangliosid-Kohlenhydratprofil von Zelloberflächen Zell- und Spezies-spezifisch ist und Veränderungen bei fötaler Entwicklung, Differenzierung, Organ-Regeneration, onkogener Transformation und Tumorentstehung erfährt¹⁷, was auf ihre Signifikanz bei der Zell-Zell-Wechselwirkung und Zelladhäsion schließen läßt^{13,18}.

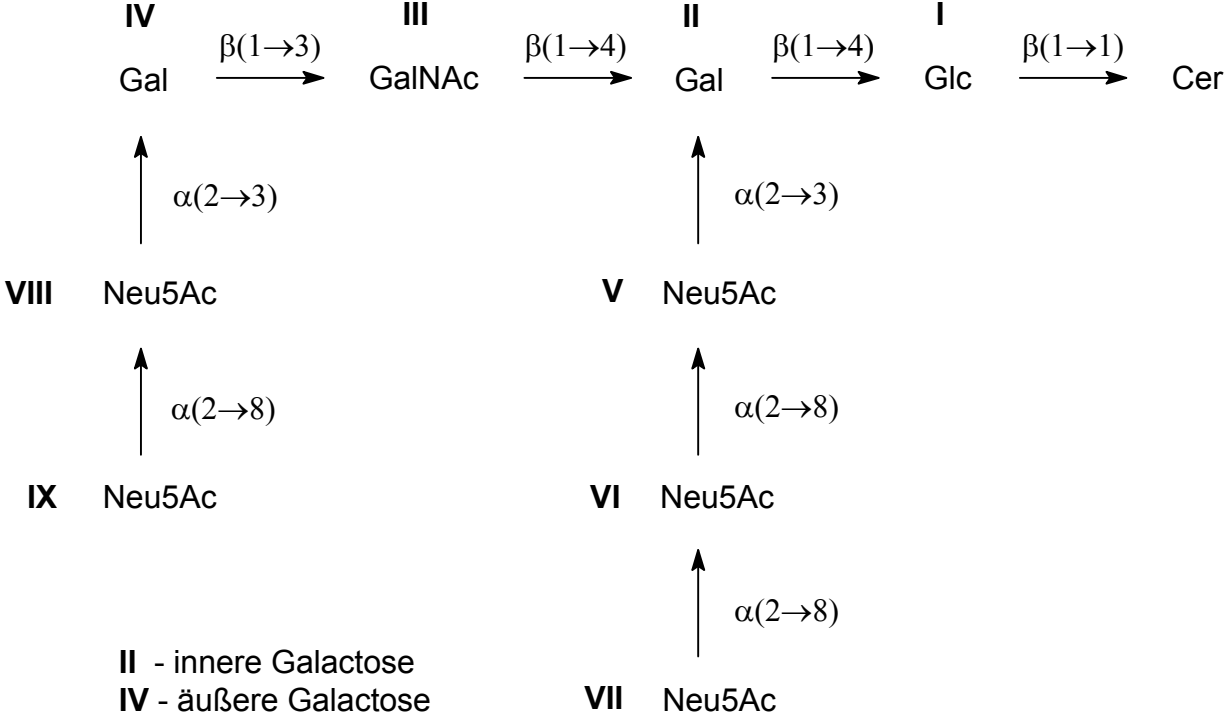
Die Oligosaccharidketten der Ganglioside sind Bindungsstellen für Lektine, spezifisch Kohlenhydrate erkennende Proteine, unter anderem bakterieller Toxine, Bindungsproteine von Viren und Antikörpern, die nach Bindung an den Kohlenhydrat-Rezeptoren der Membranoberflächen die Zellaktivität beeinflussen können^{14,19}. Daß viele Bakterien und Viren spezifisch bestimmte Gewebe infizieren, erklärt sich daraus, daß diese Gewebe jeweils ihr spezielles Repertoire an GSLs synthetisieren und an ihrer Oberfläche zur Schau stellen.

Die häufiger vorkommenden Haupt-Ganglioside menschlicher Nervenzellen, die ca. 0.1 % der Hirnsubstanz ausmachen, sind in Schema 2 wiedergegeben. Auffällig ist die Strukturverwandschaft der einzelnen Ganglioside untereinander, die sich in einem

wiederkehrenden Glykosylierungsmuster der Oligosaccharidkette ausdrückt. Das kompliziert gebaute Gangliosid G_{P1c} mit seinen selektiv verknüpften neun Zucker-Einheiten bildet dabei die Leitstruktur für die häufigen niedriger glykosylierten Ganglioside, was die Annahme einer sequenziellen Glykosylierung bei der Biogenese der Ganglioside erhärtet.



G_{P1c} : Neu5Ac $\alpha(2\rightarrow8)$ Neu5Ac $\alpha(2\rightarrow3)$ Gal $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc $\beta(1\rightarrow4)$ [Neu5Ac $\alpha(2\rightarrow8)$ Neu5Ac $\alpha(2\rightarrow8)$ Neu5Ac $\alpha(2\rightarrow3)$]Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc $\beta(1\rightarrow1)$ Cer



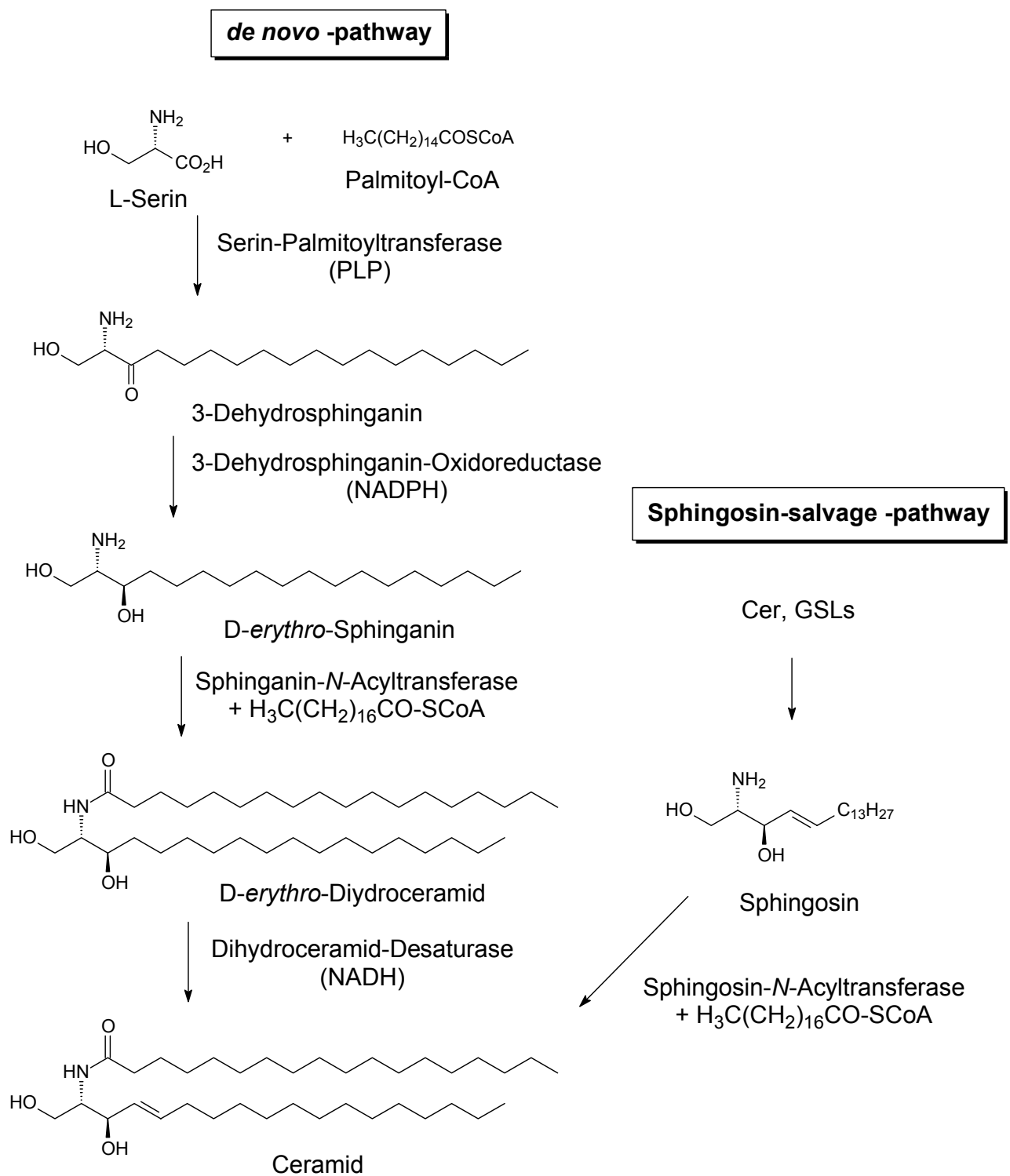
GlcCer, LacCer und die nachfolgend aufgeführten Ganglioside sind Teil der G_{P1c}-Struktur und enthalten neben dem hydrophoben Ceramid (Cer) zusätzlich die durch römische Ziffern gekennzeichneten Zucker:

GlcCer	I	G _{D2}	I - III, V, VI	G _{D1a}	I - V, VIII
LacCer	I, II	G _{T2}	I - III, V - VII	G _{T1b}	I - VI, VIII
G _{M3}	I, II, V	G _{A1}	I - IV	G _{Q1c}	I - VIII
G _{D3}	I, II, V, VI	G _{M1a}	I - V	G _{D1c}	I - IV, VIII, IX
G _{T3}	I, II, V - VII	G _{D1b}	I - VI	G _{T1a}	I - V, VIII, IX
G _{A2}	I - III	G _{T1c}	I - VII	G _{Q1b}	I - VI, VIII, IX
GM2	I - III, V	GM1b	I - IV, VIII	GP1c	I - IX

Schema 2 und Tabelle 1: Strukturen einiger Human-Ganglioside und ihre Strukturverwandschaft zum Gangliosid G_{P1c}. Die Terminologie für die aufgeführten Ganglioside ist die nach Svennerholm²⁰

1.1.2. Biogenese und Transferasen des Glykosphingolipid-Stoffwechsels

Obgleich die meisten GSLs in den zellulären Plasmamembranen konzentriert sind, findet ihre Biosynthese und ihr Abbau intrazellulär statt. Während die GSL-Biogenese an den Membranen des endoplasmatischen Reticulums (ER) beginnt und an den Golgi-Membranen fortgesetzt wird, findet ihr Abbau nach Endocytose in den lysosomalen Kompartimenten statt. Das gegenwärtige Wissen um die Lokalisierung der GSL-Biosynthese wurde im wesentlichen durch subzelluläre Fraktionierungsstudien und Zellkultur-Experimente ans Licht gebracht. Die Sphingolipid-Biosynthese kann entweder von Grund auf ausgehend von Serin (*de novo*-Ablauf), aus Sphingosin in den *de novo*-Prozess mündend oder durch Recycling nativer sowie partiell hydrolysierter GSLs erfolgen. Die einleitenden Schritte der Sphingolipid-Biosynthese nach dem *de novo*-Prozess führen zur Bildung von Dihydroceramid (DHCer) nach Schema 3, die durch Cytosol-seitig membrangebundene Enzyme des ER katalysiert wird^{21,22}. Erster Schritt ist die Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA zum 3-Dehydroshingonin, katalysiert durch Serin-Palmitoyltransferase^{23,24}.

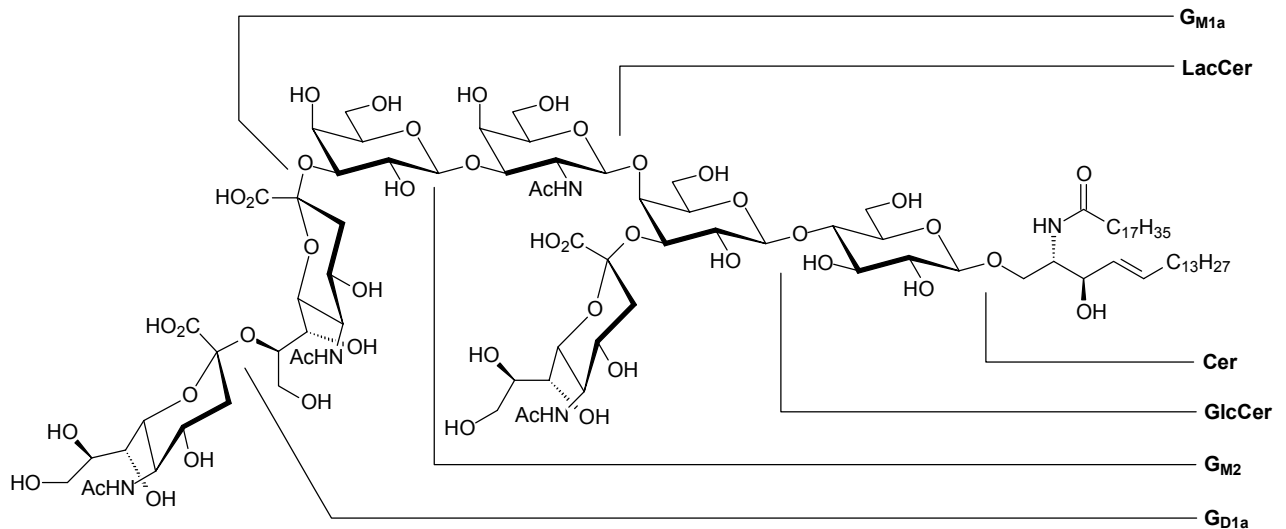


Schema 3: Schema der *de novo* und Sphingosine-salvage-Ceramid-Biosynthese. Alle enzymatischen Schritte sind auf der cytosolischen Seite des ER lokalisiert

3-Dehydrosphingarin wird sofort durch eine 3-Dehydrosphingarin-NADPH-Oxidoreductase zu D-*erythro*-Sphingarin reduziert²⁴. Die anschließende Acylierung der Aminogruppe des Sphingarins mittels Acyl-CoA liefert Dihydroceramid, das anstelle von Ceramid in einer Reihe hochspezialisierter makrophagen-artiger Zellen das hydrophobe GSL-Rückgrat ausmacht²⁶. Die abschließende Überführung von Dihydroceramid zum Ceramid durch Einführung einer *trans*-4,5-Doppelbindung scheint für die Zellen von signifikanter Bedeutung zu sein. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl Ceramid als auch dessen *N*-deacylierte Form (Sphingosin) an Signal-Transduktionsprozessen beteiligt sind, während ihre gesättigten Analoga Dihydroceramid und Sphingarin (Dihydrosphingosin) weitaus weniger effektiv sind oder solche Effekte vermissen lassen²⁷⁻²⁹. Wie zuerst von Ong und Brady³⁰ sowie von Stoffel und Bister³¹ vorgeschlagen, später von Merrill und Wang³² gezeigt und schließlich von Rother et al.³³ bestätigt wurde, findet die Einführung der *trans*-4,5-Doppelbindung durch Oxidation von Dihydroceramid und nicht auf der Stufe von Sphingarin statt. Demnach ist Sphingosin kein Intermediat der *de novo* -GSL-Biosynthese, sondern ein Abbauprodukt des Ceramids und führt wie zuvor erwähnt in einem alternativen Biosyntheseweg zu GSLs.

Der Befund, daß die meisten Ganglioside ihrerseits Vorstufen für höhermolekulare Ganglioside darstellen (vgl. dazu Schema 2 und 4), läßt wie eingangs bereits erwähnt auf eine schrittweise Glykosylierung durch geeignete Leloir-Transferasen schließen. Während für den Ort der frühen Glykosylierung von Cer zum GalCer die frühen Zysternen des Golgi-Apparates als gesichert gelten^{34-38,15}, gibt es widersprüchliche Vorschläge über die Galactosylierung von Cer zum GalCer im ER³⁹ und Golgi⁴⁰, sowie über den Transport von Ceramid vom ER zum Golgi-Apparat durch Vesikeln^{41,42} und/oder Transportproteine⁴³⁻⁴⁶. Die Galactosylierung von GlcCer unter Bildung von LacCer ist der nächste Schritt in der Gangliosid-Biosynthese und vollzieht sich nach Lannert *et al.* in den späten Golgi-Kompartimenten⁴⁷.

Die Übertragung nachfolgender Zucker auf LacCer unter Bildung verschiedener Trihexosyl-ceramide sowie die sequenzielle Addition weiterer Monosaccharide oder Sialinsäurereste an die wachsende Oligosaccharidkette wird gemäß Schema 5 durch membrangebundene Glykosyltransferasen katalysiert.

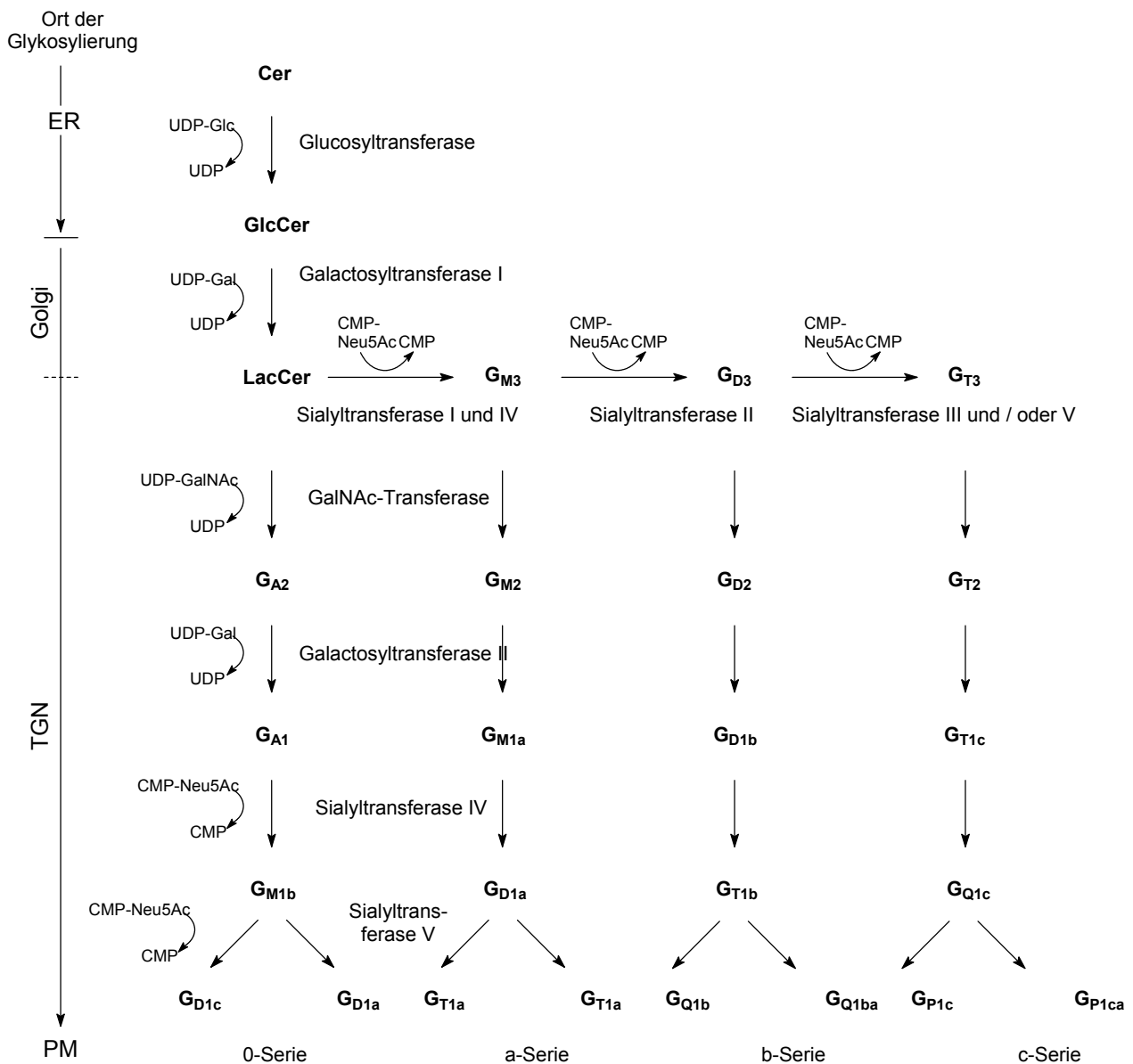


Schema 4: Anzeichen sequenzieller spezifischer Glykosylierung durch Identifizierung geringer glykosylierter Ganglioside und Gangliosidvorläufer im G_{T1a}

Diese Transferasen sind auf den Golgi-Apparat beschränkt, so daß die höheren GSLs nur dort biosynthetisiert werden⁵⁰⁻⁵⁴. All diese Befunde sprechen dafür, daß die sequenzielle Glykosylierung von Gangliosiden durch verschiedene Transferasen unter vektorieller Wanderung der reifenden Ganglioside vom ER über den Golgi-Apparat bis hin zur Plasmamembran vollzogen wird. Die anwachsenden Ganglioside durchwandern demnach einen Glykosylierungsgradienten im Verlauf ihrer Biosynthese. Ihr Transport erfolgt dabei durch vesikulären Fluß^{55,56}. Für Rattenleber-Golgi wurde demonstriert, daß die sequenzielle Glykosylierung analoger Precursoren, die sich nur in der Zahl an innerer Galactose (II, Schema 2) gebundener Neuraminsäure-Einheiten (0, 1, 2 oder 3) unterscheiden durch einen Satz bezüglich des Substrats schwach spezifischer Glykosyltransferasen katalysiert wird⁴⁸. Die Zahl der Sialinsäure-Einheiten die an der inneren Galactose der Oligosaccharidkette gebunden sind, bestimmt zu welcher Serie (asialo, a, b oder c) ein Gangliosid angehört. Beispielsweise katalysiert nur eine unspezifische GalNAc-Transferase die Reaktion von LacCer, G_{M3} , G_{D3} , und G_{T3} zu G_{A2} , G_{M2} , G_{D2} und G_{T2} ^{57,58}. Ähnliche Ergebnisse wurden für die nach Schema 5 benannte Sialyltransferase IV⁵⁷ und V⁵⁹ abgeleitet. Hingegen wird der erste Sialylierungsschritt an innerer Galactose durch die substratspezifischen Sialyltransferasen I und II katalysiert⁶⁰. Zahlreiche Sialyltransferasen verschiedener Species und Zelltypen

wurden daraufhin kloniert, analysiert und auf ihre Substratspezifität hin untersucht^{61,62}.

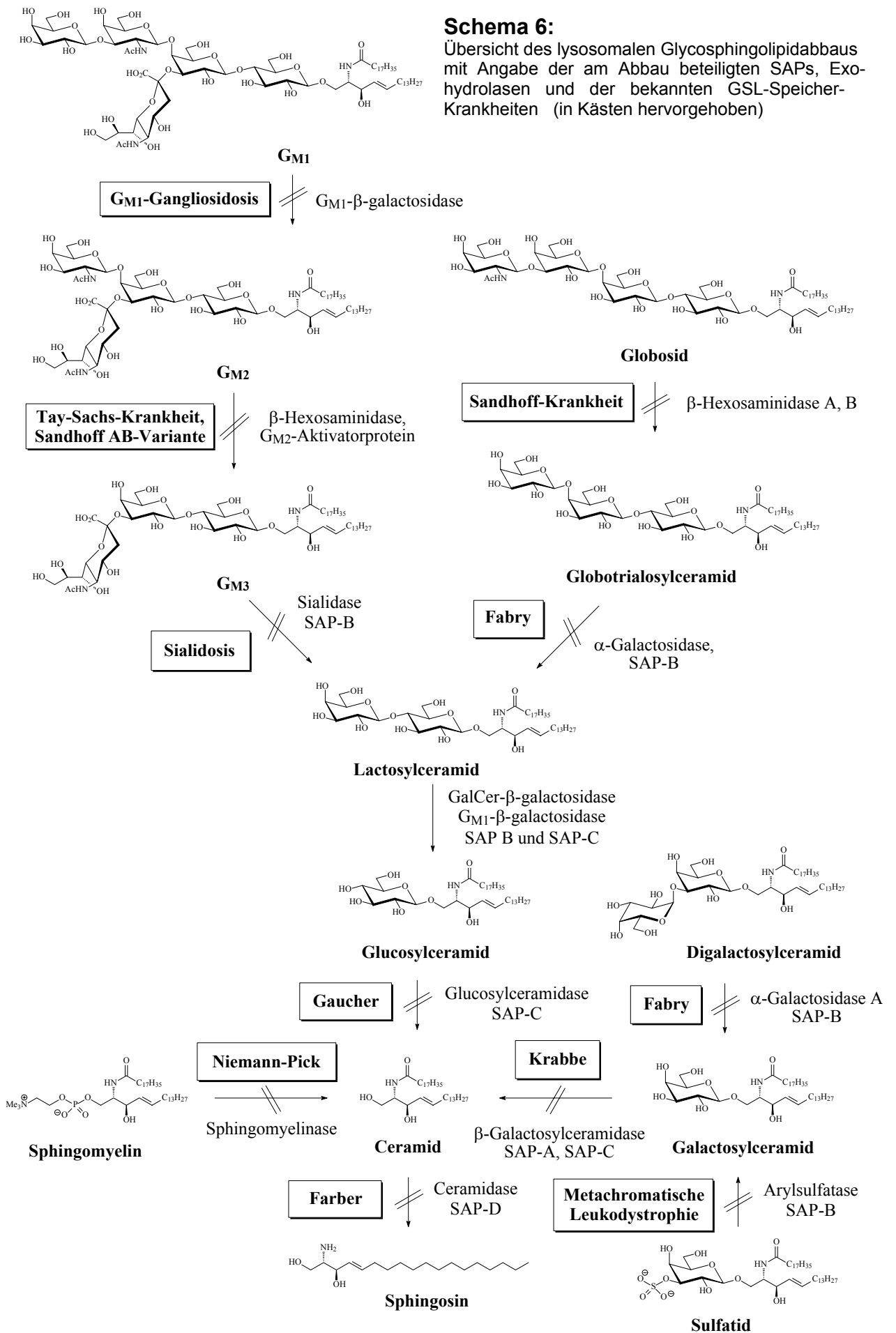
Die dabei *in vitro* beobachtete überlappende Substratspezifität verschiedener Sialyltransferase-Familien muß nicht notwendigerweise für die viel komplizierteren *in vivo* Verhältnisse relevant sein⁶².



Schema 5: Generelles Schema der Gangliosid-Biosynthese in Rattenleber-Golgi⁴⁸. Die Bildung von G_{D1a} aus G_{A1} via G_{M1b} wurde durch Hidari *et al.*⁴⁹ beschrieben. PM, Plasmamembran; TGN, trans-Golgi-Netzwerk; ER, endoplasmatisches Reticulum

1.1.3. Glykosphingolipid-Abbau und -Anreicherung

Der Abbau von GSLs vollzieht sich nach K. Sandhoff und T. Kolter⁶³ in den Lysosomen durch die schrittweise Aktion spezifischer Exohydrolasen beginnend vom hydrophilen Kohlenhydratende des GSL-Moleküls gemäß Schema 6. Mehr als zehn verschiedene Exohydrolasen sind am GSL-Abbau beteiligt. Das Fehlen bereits einer dieser GSL-abbauenden Hydrolasen führt zu einer unerwünschten Anreicherung des entsprechenden Lipidsubstrats in den lysosomalen Kompartimenten, was zu den sog. Sphingolipid-Speicher-Krankheiten („lipid storage diseases“) führt, die auf Gendefekte und damit einhergehend fehlende oder inaktive Hydrolasen zurückzuführen sind. Die abnorme Akkumulation der GSLs findet hauptsächlich in jenen Zelltypen und Organen statt in denen sie synthetisiert werden, obwohl Hydrolasen in allen Zellen mit Ausnahme der menschlichen Erythrozyten vorkommen. Demzufolge sind die unterschiedlichen Sphingolipid-Speicher-Krankheiten sowohl unter biochemischem als auch unter klinischem Gesichtspunkt in Hinblick auf ihre Symptomatik unterscheidbar⁶⁴. Im Gegensatz zu den membrangebundenen Glykosyltransferasen, die die GSL-Biosynthese katalysieren, sind die am GSL-Abbau beteiligten Exohydrolasen wasserlöslich, was mit weitreichenden Konsequenzen verbunden ist. Es konnte gezeigt werden, daß enzymatische Reaktionen, in denen sowohl Enzym als auch Substrat membrangebunden vorliegen, unabhängig vom Inkubationsvolumen sind. Dies ist ein Anzeichen dafür, daß die Reaktion hauptsächlich an der Oberfläche oder innerhalb individueller Membranen verläuft und nicht über die wässrige Phase⁶⁵. Es wird angenommen, daß die Glykosyltransferasen und ihre GSL-Substrate durch laterale Diffusion innerhalb der Membran aufeinandertreffen. In Kontrast dazu agieren wasserlösliche Exohydrolasen nur auf Membranoberflächen. Die Hydrolasen erkennen und spalten nur dann monosaccharidische Reste von Oligosaccharidketten, wenn diese weit genug aus der Membran in die wässrige Phase hinausragen⁶⁶. Dies trifft problemlos auf Ganglioside mit üblicherweise langen Oligosaccharidketten zu. Um membrangebundene GSLs mit kurzen Oligosaccharidketten (bis G_{M2}) abzubauen, bedürfen diese Enzyme der Hilfe kleiner Glykoprotein-Cofaktoren, den sogenannten Sphingolipid-Aktivator-Proteinen (SAPs- oder Saponine A bis D, sowie den G_{M2} -Aktivator im Speziellen)⁶⁷.



Der Grund für den Bedarf zweier Komponenten zum GSL-Abbau wird gegenwärtig darin gesehen, daß dadurch ein versehentlicher Abbau der Plasmamembran durch fehlgeleitete Hydrolasen unterdrückt wird. Sowohl die geringe Konzentration von SAPs auf der Membranoberfläche als auch der neutrale pH-Wert verhindern die Zellschädigung durch Hydrolasen, die ihre volle Aktivität erst bei niedrigen pH-Werten und hoher SAP-Konzentration entfalten. Seit der Entdeckung des Sulfatid-Aktivator-Proteins (SAP-B) 1964⁶⁸ wurden vier weitere für den hydrolytischen Abbau von GSL nötige SAPs beschrieben. Aus Sequenzdaten ist bekannt, daß nur zwei Gene für die Codierung der fünf bekannten SAPs verantwortlich sind⁶⁷. Eines dieser Gene codiert das G_{M2}-Aktivator-Protein und das zweite die SAP-Vorstufe (Prosaponin) für die vier homologen Proteine SAP-A, B, C und D. Das meiste des gegenwärtigen Erkenntnisstands über SAPs beruht auf Studien über Patienten, die unter den Sphingolipid-Speicher-Krankheiten leiden. So führt das Fehlen von SAP-C (Gaucher-Faktor) zu einer Variante der Gaucher-Krankheit, die durch eine Anreicherung von GlcCer über den normalen GlcCer-Spiegel hinaus charakterisiert ist^{69,70} (s. Schema 6). Die totale Defizienz des SAP-Precursors, der zu den SAPs A bis D führt, bedeutet eine folgenschwere Anreicherung von Cer, GlcCer, LacCer, des Gangliosids G_{M3} in der ganglio-Serie, sowie von GalCer, Sulfatiden, Digalactosylceramiden und von globo-Triaosylceramiden in den Zellen⁷⁰. Die Behandlung betroffener Zellen mit einem oder mehreren Aktivator-Proteinen verhindert die spezifische Anreicherung eines oder mehrerer GSLs und bestätigt die *in vivo*-Funktion dieser Moleküle. Während das SAP-Precursor-Protein in nanomolaren Konzentrationen verabreicht zu einer Aufhebung der Anreicherung der erwähnten GSLs führt⁷¹, stimuliert SAP-B erst bei höheren Konzentrationen und breiterer GSL-Spezifität⁷² den Abbau von angereichertem LacCer und G_{M3}, aber nicht von GlcCer und Cer⁷³. SAP-D hingegen stimuliert eindeutig nur den Ceramid-Abbau⁷³. SAP-C vermag direkt Glucosylceramid- β -glucosidase zu aktivieren⁷⁴, während das G_{M2}-Aktivator-Protein GSLs, wie das Gangliosid G_{M2} bindet und spezifisch mit β -Hexosaminidase A wechselwirkt⁷⁵, die eine GalNAc- oder GlcNAc-Hexose am nichtreduzierenden Kettenende entfernt. Die detaillierte Funktion der SAPs verbleibt derweil noch ungeklärt. Es wird diskutiert, daß einige als Sphingolipid-Bindungsproteine oder Liftasen unter Bildung eines wasserlöslichen GSL-Komplexes wirken, diesen aus der Membran heben und ihren Abbau durch Exohydrolasen ermöglichen⁶⁷.

1.2. Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen

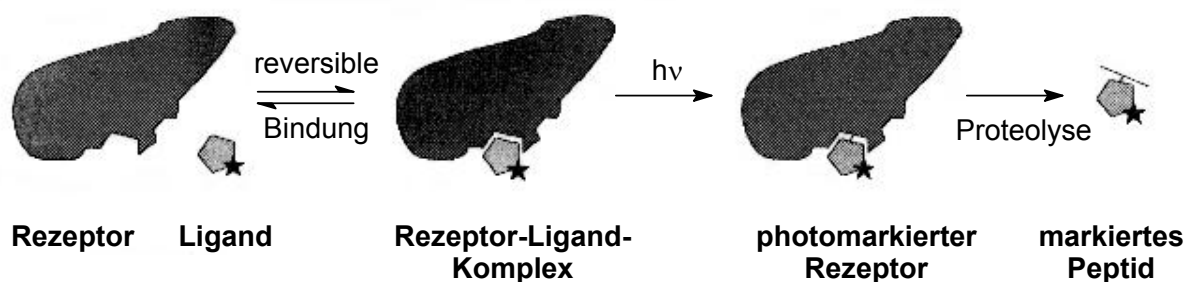
Die Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen ist und bleibt eine Herausforderung für Chemiker und Biologen. Auf der Grundlage der Strukturaufklärung von biologisch relevanten Rezeptoren gelangt man zu einem besseren Verständnis ihrer Funktion und ihres Wirkungsmechanismus in Bezug auf natürliche Substratliganden.

Eine Reihe von Techniken sind gegenwärtig etabliert um sich der Frage nach der Lokalisierung von aktiven Zentren und Bindungsstellen von Rezeptoren, allen voran Enzymen, zu nähern wenn nicht gar gänzlich zu beantworten. Diese Techniken, denen u.a. physikalische, chemische und biochemische Ansätze zugrundeliegen, beinhalten die Einkristall-Röntgenkristallographie, spektroskopische Analyse, die Proteinmodifizierung zur Bestimmung der an Bindungen beteiligten kritischen Aminosäuren (z.B. chemisches Crosslinking), Affinitätsmarkierung und Photoaffinitätsmarkierung. Jede dieser Methoden ist in Abhängigkeit vom jeweiligen Rezeptorsystem durch ihre Anwendbarkeit und Aussagekraft ihrer Ergebnisse limitiert. So liefert die Röntgenstrukturanalyse zwar ein nicht zu übertreffendes Ergebnis in Hinblick auf die räumliche Struktur eines Enzyme-Substrat-Komplexes, ist aber durch die z.T. sehr schwierige Isolierung und Kristallisation solcher Komplexe selten anwendbar, so daß die übrigen Techniken, darunter die Photoaffinitätsmarkierung, zur unumgänglichen Alternative werden.

1.2.1. Photoaffinitätsmarkierung

Es gibt zahlreiche Übersichtsartikel über die Photoaffinitätsmarkierung⁷⁶⁻⁸¹, deren in Anwendung befindliche photochemisch aktivierbare Reagenzien⁸², sowie von Bayley⁸³ eine Analyse von Photomarkierungsexperimenten. Es konnten durch Photoaffinitätsmarkierung die verschiedensten Rezeptoren, darunter Enzyme, Membranen⁸⁴, Proteine⁸⁵, neuronale Rezeptoren⁸⁶ und RNA- sowie DNA-Strukturen⁸⁷ erfolgreich markiert werden. Die Photoaffinitätsmarkierung wurde vor über drei Jahrzehnten durch Westheimer⁸⁸ *et al.* eingeführt und hat sich seitdem deutlich weiterentwickelt; das Grundprinzip ist allerdings unverändert geblieben.

Zur Photoaffinitätsmarkierung benötigt man ein durch Licht aktivierbares, jedoch chemisch inertes Analogon eines natürlichen Liganden bzw. Substrats, etwa für ein Enzym, welches markiert werden soll. Dies erfordert die Derivatisierung des natürlichen Substrats durch Einführung einer photolabilen Gruppe, welche die native Struktur des Substrats möglichst wenig verändern sollte. Anschließend werden das zu markierende Enzym und das photochemisch anregbar modifizierte Substrat inkubiert und bestrahlt. Dabei sollte die photolabile Gruppe im Substrat derart angeregt werden, daß sie ein hochreaktives Intermediat bildet, welches im Enzym-Substrat-Komplex eine bleibende kovalente Bindung zwischen Substrat und einer im aktiven Zentrum des Enzyms vorliegenden Aminosäuren ausbildet. Der anschließende hydrolytische Aufschluß des Enzyms (Proteolyse) würde dabei charakteristische mit dem Substrat verbundene und dadurch markierte Peptidfragmente oder Aminosäuren freisetzen, die nach ihrer Identifizierung zum aktiven Enzymzentrum zugeordnet werden könnten. Die relevanten Einzelschritte der Photoaffinitätsmarkierung sind schematisch nachfolgend zusammengefaßt.

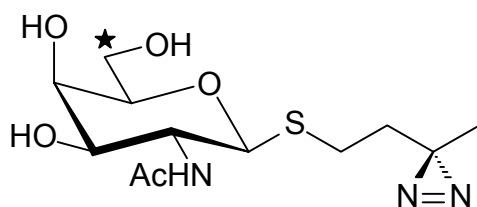


Schema 7: Relevante Einzelschritte eines Experimentes zur Photoaffinitätsmarkierung eines Rezeptors/Enzyms durch einen photolabilen Liganden/Enzymsubstrat

Der aus dem Bestrahlungsexperiment hervorgehende markierte Rezeptor läßt sich detektieren, wenn der Ligand vor der eigentlichen Photoaffinitätsmarkierung neben der Einführung einer photolabilen Gruppe noch zusätzlich markiert wurde. Dies wird üblicherweise durch die Einführung eines Radioisotops in den Liganden erzielt^{89,90}. Geeignet dafür sind prinzipiell die Kerne ^3H (T), ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S und ^{125}I . Die Wahl des Radioisotops hängt von der erforderlichen spezifischen Radioaktivität bzw. Nachweisempfindlichkeit sowie von der Verfügbarkeit einer speziell auf den Liganden angepaßten Markierungsmethode ab. Wegen der minimalen Störung der nativen

Ligandstruktur ist die Radiomarkierungsmethode gegenüber anderen Markierungstechniken, wie etwa der Fluoreszenzmarkierung, die durch Einführung relativ großer fluoreszenzaktiver Gruppen erfolgt, überlegen.

So lassen sich beispielsweise nach einem Standardverfahren Galactoside, nach Oxidation an C-6 mit Galactose-Oxidase und anschließender Reduktion mit NaBT₄, mit einem Tritiumatom an C-6 markieren. Sandhoff *et al.*⁹¹ gelang auf diese Weise die Darstellung des tritiummarkierten Thiogalactosids 3-Azi-1-[[[6-³H]-2-acetamido-2-desoxy-β-D-galactopyranosyl)thio]butan ([³H]-1-ATB-GalNAc, Schema 8) als Photoaffinitätsenzymsubstrat und Inhibitor für die humanen β-Hexosaminidasen A und B, zweier Exohydrolasen des menschlichen Gangliosidstoffwechsels.



Schema 8: Struktur des Diazirin-Hydrolase-Inhibitors [³H]-1-ATB-GalNAc; der Stern markiert die Position des Tritiumlabels

Beide Enzyme (β-HexA⁹¹ und β-HexB⁹²) konnten anschließend erfolgreich durch Photoaffinitätsmarkierung charakterisiert werden. Alternative Methoden zur Detektion des photoaffinitätsmarkierten Rezeptors/Enzyms beinhalten die spektroskopische Analyse^{93,94}, Fluoreszenzanalyse⁹⁵⁻⁹⁹,

Verfärbungsmethoden¹⁰⁰, partielle und totale Hydrolyse gefolgt von der Fragmentanalyse des Hydrolysats durch Massenspektroskopie und HPLC¹⁰¹.

Die Photoaffinitätsmarkierung ersetzt eine schwache Wechselwirkung zwischen zwei Komponenten durch eine stabile kovalente Bindung. Dieser Ansatz kann dazu genutzt werden um einen unbekanntem Rezeptor eines bestimmten Liganden zu identifizieren, wie es z.B. durch J.Casanova *et al.*^{102,103} zur Identifizierung des Thyroidhormon-Rezeptorproteins demonstriert wurde. In Fällen, in denen der Rezeptor bzw. das Enzym bereits bekannt sind und in reiner Form vorliegen, lassen sich die Bindungsstelle für den Liganden bzw. das Enzymsubstrat analysieren. Letzteres ist die Hauptanwendung der Photoaffinitätsmarkierung.

Die Hauptanstrengung in der Photoaffinitätsmarkierung liegt in der Synthese geeigneter photolabiler Reagenzien und ihre Einbindung in native Substrate, die ihre Wirkung als Photoaffinitätsliganden auf Rezeptoren und Enzyme entfalten können.

Eine ideales Substrat zur Photoaffinitätsmarkierung sollte folgende Kriterien erfüllen:

- Es sollte leicht zu synthetisieren sein.
- Es sollte im Dunkeln und unter den Bedingungen der Markierungsmethode chemisch inert sein.
- Das durch Bestrahlung abgeleitete Intermediat sollte eine hohe Reaktivität und kurze Lebensdauer besitzen.
- Nach Photolyse sollte keine intramolekulare Umlagerung stattfinden.
- Das modifizierte Substrat sollte durch den Rezeptor oder das Enzym erkannt werden und von diesem mit ausreichender Affinität gebunden werden. Aus diesem Grunde sollte die photolabile Gruppe keine sperrigen Substituenten enthalten um die Struktur des nativen Substrats möglichst wenig zu verändern.
- Die Analoga von Enzymsubstraten sollten durch die enzymatische Reaktion nicht gespalten werden.
- Die Aktivierung der Photoaffinitätsliganden sollte bei eingestrahelten Wellenlängen liegen, die Proteine unbeschädigt überstehen.
- Die reaktive Spezies sollte eine kovalente Bindung mit ausreichender Stärke bilden, welche nach der anschließenden chemischen Aufarbeitung des photoaffinitätsmarkierten Rezeptors erhalten bleibt.
- Die Photoreaktion und die kovalente Insertion sollten unabhängig von der chemischen Beschaffenheit der Bindungsstelle im Rezeptor sein.
- Eine geeignete Markierung (z.B. durch ein Fluoreszenzlabel oder Radioisotop) sollte an einer inerten Stelle des Moleküls vorhanden sein um die Detektierbarkeit des markierten Rezeptors zu gewährleisten. Dies ist nicht zwangsläufig notwendig, wenn anstelle der Markierung eine massenspektroskopische Analyse nach dem Bestrahlungsexperiment die Addukte eindeutig identifiziert.

Die Herstellung von Photoaffinitätsliganden beinhaltet letztlich die Einführung einer photolabilen Gruppierung in das native Substrat über geeignete Reagenzien, sogenannte Photoaffinitätssonden, von denen einige wenige kommerziell erhältlich. Am häufigsten finden solche Photoaffinitätssonden Verwendung, die photolytisch Stickstoff freisetzen und ein Carben oder Nitren als hochreaktive und kurzlebige Zwischenverbindung ausbilden. Dies beschränkt die möglichen Carben/Nitren-

Vorstufen auf die in Tabelle 2 zusammengefaßten Azide, Diazoverbindungen, Diazoniumsalze und Diazirine.

Verbindungs-			
klasse	Photoreaktion		reaktive Spezies
Azide	$\text{Ar}-\text{N}=\overset{\oplus}{\text{N}}=\overset{\ominus}{\text{N}} \xrightarrow[-\text{N}_2]{h\nu} \text{Ar}-\ddot{\text{N}}$		Nitrene (Singulett oder Triplett)
Diazo- verbindungen	$\begin{array}{c} \text{R}' \\ \\ \text{(Ar/R)}-\text{C}=\overset{\oplus}{\text{N}}=\overset{\ominus}{\text{N}} \end{array} \xrightarrow[-\text{N}_2]{h\nu} \begin{array}{c} \text{R}' \\ \\ \text{(Ar/R)}-\text{C} \end{array} \text{:}$		Carbene (Singulett oder Triplett)
Diazoniumsalze	$\text{Ar}-\overset{\oplus}{\text{N}}\equiv\text{N} \xrightarrow[-\text{N}_2]{h\nu} \overset{\oplus}{\text{Ar}}$		Carbeniumionen
Diazirine	$\begin{array}{c} \text{R}' \\ \\ \text{(Ar/R)}-\text{C}-\text{N} \\ \\ \text{N} \end{array} \xrightarrow{h\nu} \begin{array}{c} \text{R}' \\ \\ \text{(Ar/R)}-\text{C}=\overset{\oplus}{\text{N}}=\overset{\ominus}{\text{N}} \\ \\ \text{N} \end{array} \xrightarrow[-\text{N}_2]{h\nu} \begin{array}{c} \text{R}' \\ \\ \text{(Ar/R)}-\text{C} \end{array} \text{:}$		Carbene (Singulett oder Triplett)

Tabelle 2: Für die Photoaffinitätsmarkierung relevante photosensible Verbindungs-klassen die photolytisch unter N₂-Freisetzung zu reaktiven Intermediaten reagieren

Die aus den Carben- und Nitrenprecursoren photochemisch freigesetzten Carbene und Nitrene sind isoelektronische Spezies, die im Singulett(¹C,¹N)- oder Triplett(³C,³N)-Zustand auftreten und sich durch eine hohe Elektrophilie auszeichnen. Die Singulett-Spezies vermag sich an C–C-Doppelbindungen zu addieren, wird in C–H-Bindungen insertiert oder reagiert mit freien Elektronenpaaren von Heteroatomen, einschließlich denen des Lösungsmittels. Abhängig von ihrer Struktur unterliegen sie zudem unerwünschten Umlagerungsreaktionen, allem voran der Wolff-Umlagerung, die sich durch zusätzliche elektronenziehende Gruppen weitestgehend unterdrücken läßt. Die Triplett-Spezies entsteht aus einem elektronisch angeregten Zustand des Nitren- oder Carbenprecursors heraus und reagiert vorzugsweise durch radikalischen

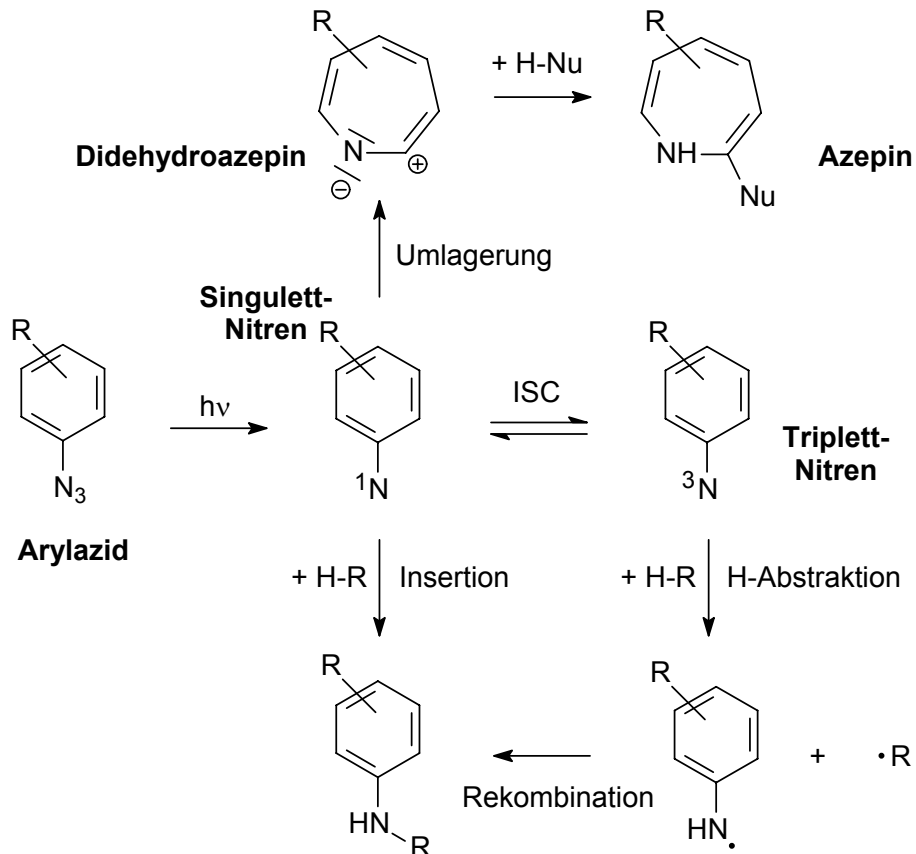
Angriff auf π - oder σ -Bindungselektronen. Nach Abstraktion eines Wasserstoffatoms vom Rezeptor, rekombinieren die daraus hervorgehenden Radikale unter Bildung einer kovalenten Bindung. Triplett-Spezies sind gewöhnlich inert gegenüber Wasser und lagern sich erst nach *Intersystem Crossing* um, reagieren aber mit Sauerstoff, der unter den experimentellen Bedingungen der Photoaffinitätsmarkierung eines Rezeptors ausgeschlossen werden muß.

1.2.2. Photoaffinitätsmarkierung von Glykosyltransferasen

Die bis in jüngste Zeit durch Sandhoff *et al.* zur Photoaffinitätsmarkierung von Glykosphingolipid-Rezeptoren, allen voran Transferasen gefolgt von Exohydrolasen u.a. Lektinen, synthetisierten teils radiomarkierten Glykosphingolipidanaloga sind überwiegend GSLs mit Azid- und Diazirinegruppen, seltener Verbindungen mit einer Diazogruppe als Carbenprecursor. Die häufigsten Nitrenvorstufen sind Arylazide, seltener Alkylnitrene, die zusätzlich in einer konkurrierenden Reaktion unter Wolff-Umlagerung Imine bilden können. Zur Photolyse von Arylaziden werden Wellenlängen um 250 nm, für Diazirine Wellenlängen um 260 – 280 nm genutzt. Für Azide wird gemäß Schema 9 angenommen, daß sowohl eine Insertion an einem Singulett-Nitren als auch eine intramolekulare Umlagerung zu der elektrophilen Didehydroazepin-Spezies zu einer kovalenten Bindung führen.

Zur Erhöhung der Insertionsselektivität bei Bindung an den Rezeptor läßt sich durch Einführung von elektronenziehenden Gruppen, üblicherweise über einen Nitro- oder Iodsubstituenten am Aromaten, die Didehydroazepin-Bildung reduzieren¹⁰⁴. Die zur GSL-Transferasemarkierung am häufigsten benutzten Carbenvorläufer sind Diazirine¹⁰⁵, insbesondere Trifluormethyldiazirine^{106,107}, die gegenüber dem unfluorierten Pendant eine vorteilhaft hohe chemische Stabilität besitzen. Eine Nebenreaktion der Carbenbildung bei Bestrahlung ist die Bildung der entsprechenden Diazoverbindung (s. Tabelle 3 und Schema 10), die bei fortlaufender Photolyse das entsprechende Carben freisetzt. Diese Nebenreaktion wird durch die Trifluormethylgruppe zusätzlich unterdrückt. Diazoverbindungen selbst fanden ebenfalls, wenngleich seltener, als Carbenprecursor in GSL-Rezeptor-Photoaffinitätsexperimenten Verwendung. Ihre Photolyse setzt bei Wellenlängen um 240

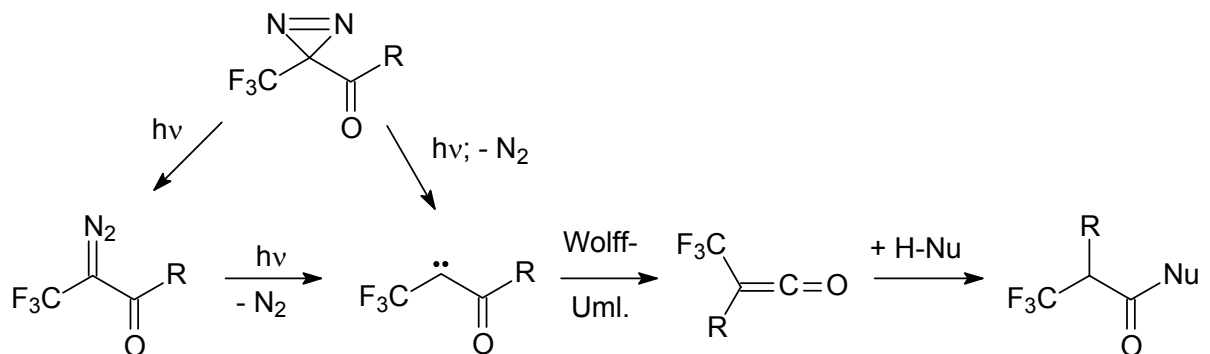
bis 280 nm ein. Eine unerwünschte Nebenreaktion ist gemäß Schema 10 eine Wolff-Umlagerung zu reaktiven Ketenen, die mit Nucleophilen und insbesondere mit dem Lösungsmittel reagieren können.



Schema 9: Mögliche Mechanismen der Kupplung von aus Aziden hervorgehenden Nitrenen an biologische Targets; (ISC = Intersystem Crossing)

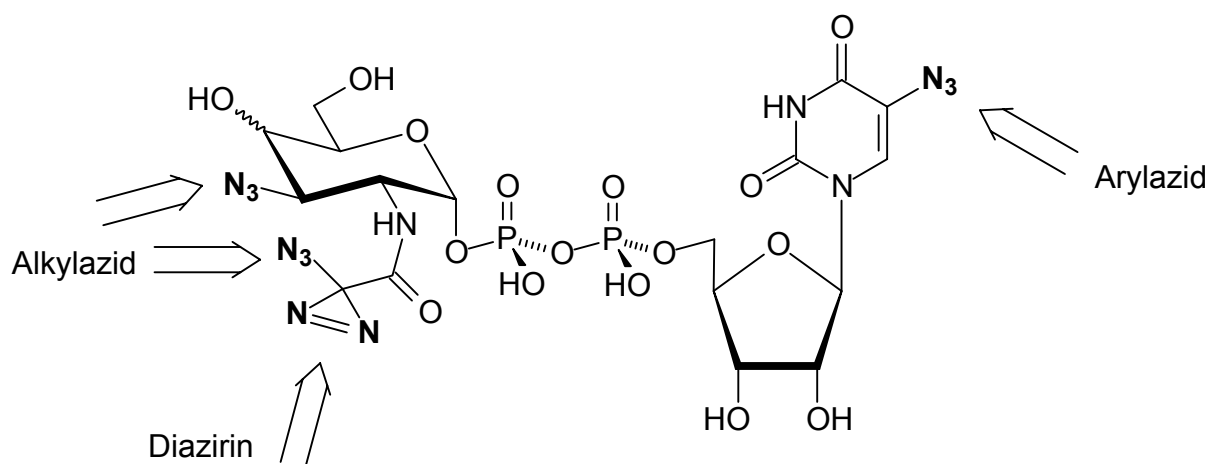
Auch hier dient in den meisten literaturbekannten Fällen eine Trifluormethylgruppe zur Unterdrückung dieser Nebenreaktion. So findet z.B. die Photoaffinitätssonde 2-Diazo-3,3,3-trifluorpropionsäure-*p*-nitrophenylester (s. Schema 10), die erstmals von Westheimer^{108,109} synthetisiert und von Khoranas Gruppe¹¹⁰ zunächst in Phospholipiden genutzt wurde, als Reagenz zur Einführung einer Diazofunktion in Aminogruppen von GSLs Verwendung¹¹¹. Bisweilen bekannt sind Transferase-Akzeptor-Analoga in denen die Photoaffinitätssonde jeweils am Kohlenhydrat- sowie am Ceramidgerüst gebunden ist. Dies erlaubt die Markierung des kohlenhydratbindenden Transferase-Epitops durch geeignete α -Diazocarbonyle¹¹¹, Azide¹¹²⁻¹¹⁷

und Diazirine^{117,118}. Hingegen ließen geeignete Transferase-Donor-Analoga zur Markierung der donorbindenden Enzymregion noch auf sich warten.



Schema 10: Wolff-Umlagerung als Nebenreaktion der Photoaffinitätsmarkierung von Diazirinen und Diazoverbindungen photolabiler Photoaffinitätssonden

Dies sollte durch Herstellung von Nucleosiddiphosphohexosen mit photolabilen Gruppen zugänglich sein. Praktische Ansätze dazu wären die Einführung einer Azidogruppe in die Uracilbase eines UDP-Zuckers oder eines der Acetamidogruppe analogen Strukturelements mit Diazirin- oder Diazofunktion in UDP-GalNAc- und UDP-GlcNAc-Analoga. Schließlich sollte auch ein UDP-Azidodesoxyzucker bzw. UDP-HexN-(2-azidoacetyl)-Derivat zur Photoaffinitätsmarkierung des Donorbindenden Transferase-Epitops potentiell verwendbar sein (s. Schema 11).



Schema 11: Potentielle Positionen photosensitiver Gruppen in UDP-Hexosaminen

1.3. Synthesen von Nucleosiddiphosphohexosen

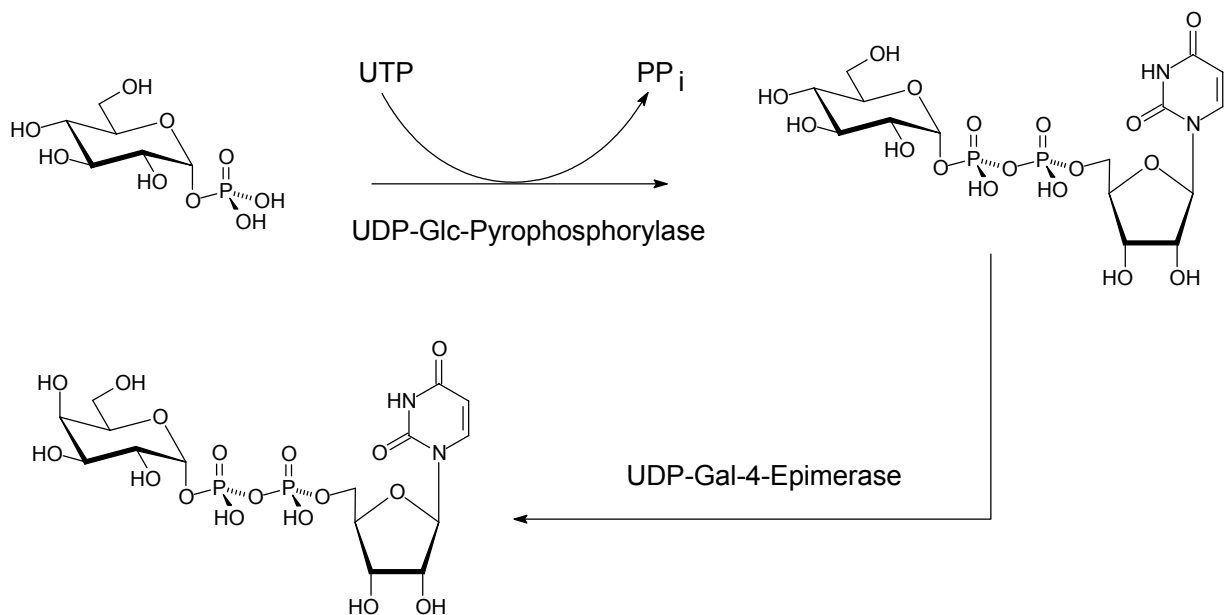
Phosphatierte Zucker wie die von D-Ribose und dessen 2-Desoxy-Derivats bilden in Form der Nucleinsäurebausteine die molekulare Grundlage von DNA und RNA. Ferner spielen Nucleotidstrukturen in Coenzymen wie ATP und NAD eine bedeutende Rolle, so daß der synthetische Zugang zu Phosphorsäureestern von Kohlenhydraten im Allgemeinen bis hin zu ausgewählten Nucleotidzuckern im Speziellen von nachhaltigem Interesse ist .

Wenngleich diverse Konzepte für die Synthese von Nucleosiddiphosphozuckern, die neben Cytidinmonophosphoneuraminsäure (CMP), die natürlichen Donoren der Leloir-Transferasen darstellen, bekannt sind, bleibt die Knüpfung von Nucleotid und Glykosylphosphat nach wie vor problematisch. Zum einen erschweren die geringe Reaktivität und Löslichkeit der Reaktanden, einhergehend mit langen Reaktionszeiten, wie auch sehr aufwendige Reinigungsschritte die Herstellung von Zuckernucleotiden. Neben der präparativen *in vitro*- Ausnutzung enzymatischer *in vivo*- Nucleotidzuckersynthesen sind darüber hinaus chemische Methoden anwendbar und etabliert.

1.3.1. Enzymatische Synthesen von Nucleosiddiphosphohexosen

Die präparative enzymatische Zuckernucleotid-Synthese, die bislang hauptsächlich zur Darstellung radioaktiver markierter Verbindungen¹¹⁹ genutzt wurde, findet auch in jüngster Zeit wieder zunehmendes Interesse. Aufgrund hoher Anschaffungskosten für benötigte Enzyme, Cofaktoren und Nucleosidtriphosphate wird bei den enzymatischen Synthesen mittlerweile eine cyclische Reaktionsführung mit Cofaktorregenerierung, Immobilisierung und Wiederverwendung der beteiligten Enzyme angestrebt¹²⁰. Während die enzymatischen Synthesen von GDP-Fucose¹²¹ und GDP-Mannose¹²² aufgrund der erforderlichen Isolierung von GDP-Fucose bzw. GDP-Mannose-Pyrophosphorylase sehr aufwendig und schwer reproduzierbar sind, sind die mit kommerziell erhältlicher UDP-Glucose-Pyrophosphorylase durchführbaren enzymatischen Synthesen von UDP-Glucose, UDP-Glucuronsäure¹²³ und UDP-N-Acetylglucosamin¹²⁴ im präparativem Maßstab möglich.

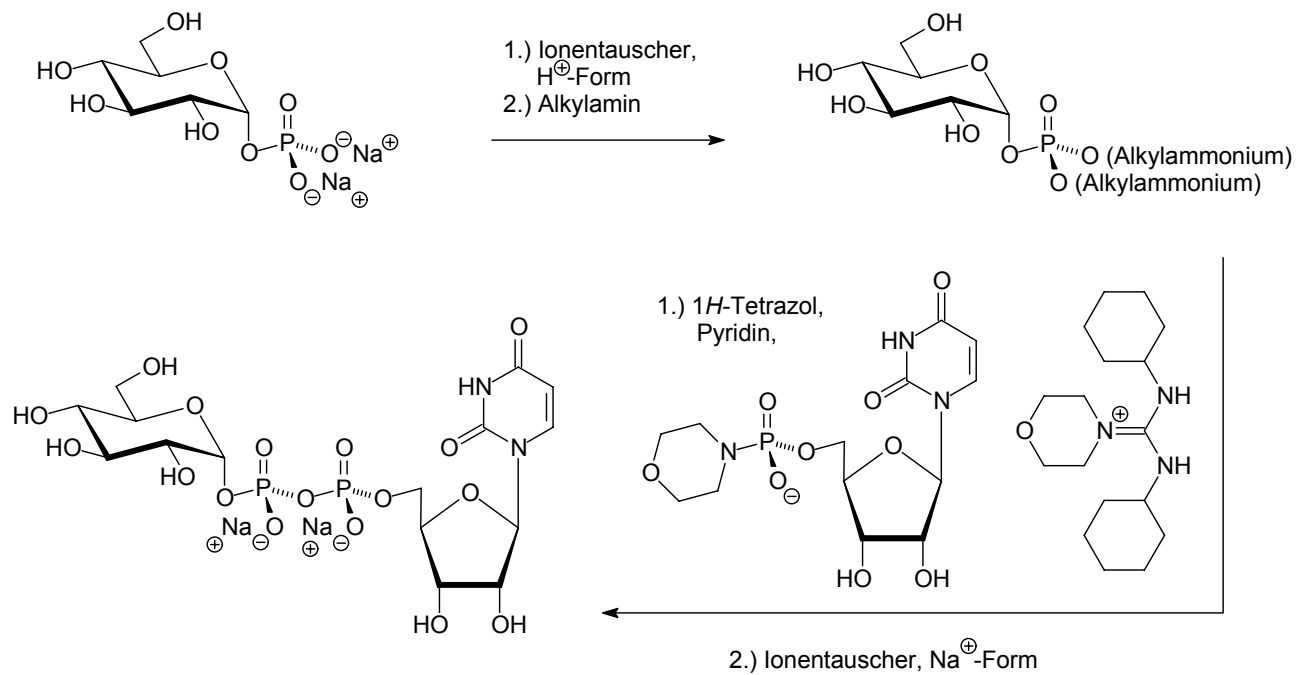
Mittels UDP-Galactose-4-Epimerase ist über UDP-Glucose auch der Zugang zu UDP-Galactose und UDP-*N*-Acetylgalactosamin¹²⁵ gegeben. Schließlich lassen sich auch spezielle Nukleotid-übertragende Transferasen verwenden um Nucleosiddiphosphozucker unterschiedlicher Hexosekonfiguration ineinander umzuwandeln¹²⁶.



Schema 12: Enzymatische Synthesen von Nucleosiddiphosphohexosen

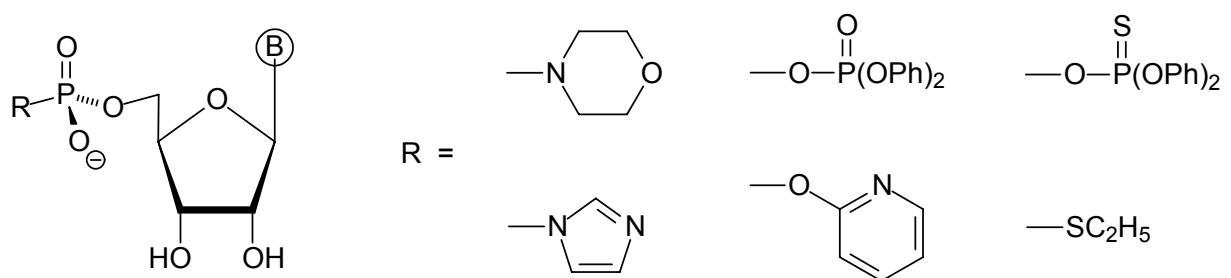
1.3.2. Chemische Synthesen von Nucleosiddiphosphohexosen

Die nach Khorana und Moffatt^{127,128} etablierte Methode zur Synthese von Nucleosiddiphosphozuckern erfolgt durch Umsetzung eines Glykosylphosphats mit einem aktivierten Nucleosid-5'-phosphat unter Säurekatalyse, üblicherweise 1*H*-Tetrazol in Pyridin nach Schema 13. Die Aktivierung des Nucleotids kann in Form geeigneter N-, S- und O-Nucleophile erzielt werden und ist durch Phosphorsäureamide (Morpholidat und Imidazolidat), Phosphorsäureanhydride (Diphenylphosphat und Dibutylphosphorthioat) oder Phosphorsäureester (Alkylsulfid und α -Pyridyl) beschrieben worden.



Schema 13: Kupplung von UMP-Morpholidat an ein Glykosylphosphat

Aufgrund der hohen thermischen und chemischen Stabilität des Morpholidats ist es in Form des *N,N'*-Dicyclohexylcarboxamidiniumsalzes von AMP, CMP, GMP und UMP mittlerweile kommerziell erhältlich, nicht zuletzt weil es in dieser Form in den gängigsten organischen Lösungsmitteln hinreichend gut löslich ist. Die Ausbeuten der Morpholidat-Kupplung liegen üblicherweise zwischen 25 und 35 %.



Schema 14: Nukleotidaktivierung als Phosphorsäureamid, -anhydrid und -ester

Eine Variation des Morpholidat-Verfahrens stellt die Verwendung eines zuckerseitig geschützten Glykosylphosphats¹²⁹ dar, was mit einer höheren Ausbeute der Kupplungsreaktion verbunden ist. Wegen der Ausbeuteverluste des im Säuren und Basischen sehr empfindlichen Zuckernukleotids bei der Entschützung werden

allerdings keine praktischen Vorteile erzielt. Ansätze mit umgekehrtem Aktivierungsmuster der Kupplungskomponenten, wie die Umsetzung eines Glykosylorthoesters¹³⁰ oder Glykosyliodids¹³¹ nach O. Hindsgaul *et al.* mit einem Nukleosiddiphosphat, scheinen durch die Umgehung der Synthese eines Glykosylphosphats zunächst attraktiv, lassen auf diesem Wege jedoch nur sehr geringe Ausbeuten von ca. 2 % an isoliertem Zuckernukleotid zu oder sind generell schwer reproduzierbar.

1.4. Synthesen von Glykosylmonophosphaten

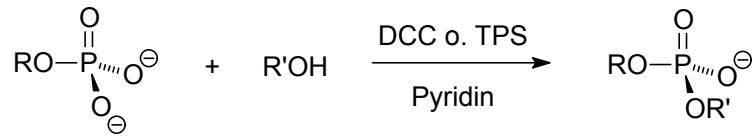
Es sind sowohl chemische als auch enzymatische Methoden, letztere unter Katalyse von Kinasen, etabliert. Bei den chemischen Methoden wird ferner unterschieden ob anomere oder diastereoselektive Zuckerphosphate erzielt werden und ob eine Aktivierung auf seiten des Phosphats oder des Monosaccharids vorliegt.

Ferner können Phosphate in Form von spezifischen Mono-, Di- oder Triestern synthetisiert werden. Die modernen Phosphatierungsmethoden bauen dabei auf den klassischen frühen Synthesen von Oligonukleotidbausteinen auf, allem voran der Phosphordiestermethode nach Khorana *et al.*¹³², gefolgt von der Phosphotriester-methode von Todd *et al.*¹³³ sowie Eckstein *et al.*^{134,135} (s. Schema 15).

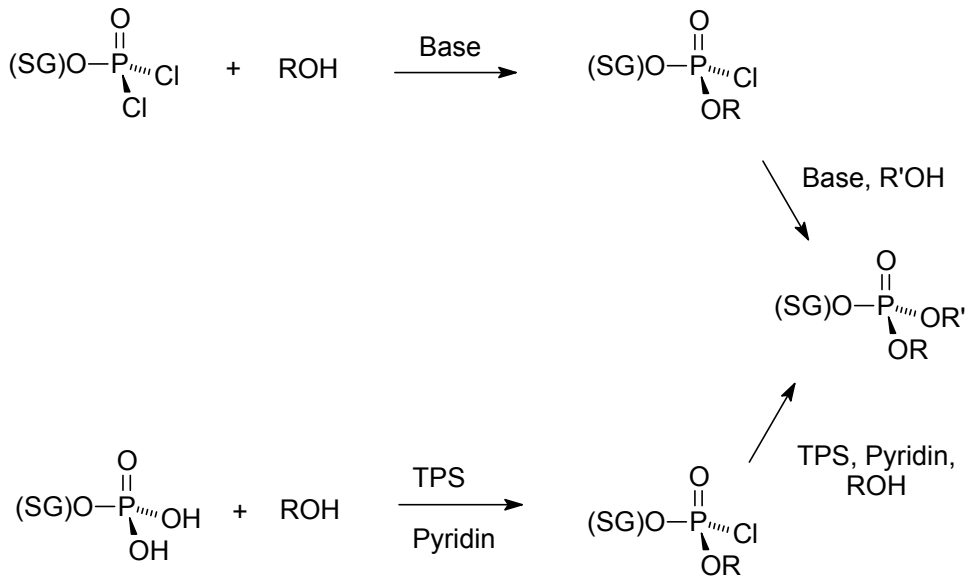
Während sich die Diestermethode eines Monophosphats mit anschließender Kupplungsreaktion bedient, findet in der Triestermethode ein partiell geschütztes und bifunktionelles Phosphorylierungsreagenz Verwendung, entweder in Form eines aktivierten Dichlorophosphats oder Dihydrogenphosphats, welches mit einer Benzyl-, Cyanoethyl-, oder 2,2,2-Trichlorethylgruppe geschützt ist. Benannt sind beide Methoden nach der Wertigkeit des aus ihnen hervorgehenden Phosphorsäureesters.

Eine Variante der Phosphotriestermethode stellt die Phosphitmethode¹³⁶ nach Letsinger *et al.* dar. Ausgehend von einem Dichlorophosphit wird ein Nukleosid phosphityliert und im Anschluss unter Oxidation die Phosphitgruppe in ein Phosphat überführt. Diese Art der Reaktionsführung schlägt die Brücke zu den jüngsten Phosphorylierungsmethoden, insbesondere der Phosphit-, und Phosphoramidit-Methode, die neben der H-Phosphonatmethodik die klassischen Ansätze speziell in der Zuckerphosphatsynthese verdrängt haben.

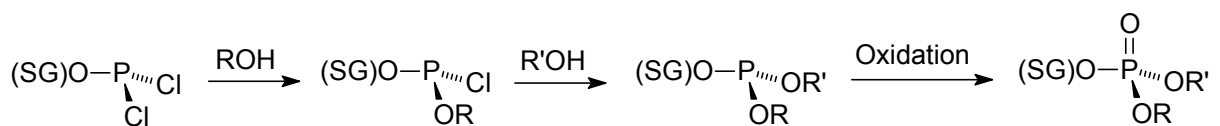
Phosphordiestermethode



Phosphortriestermethode



Letsinger-Variante bzw. Phosphitmethode

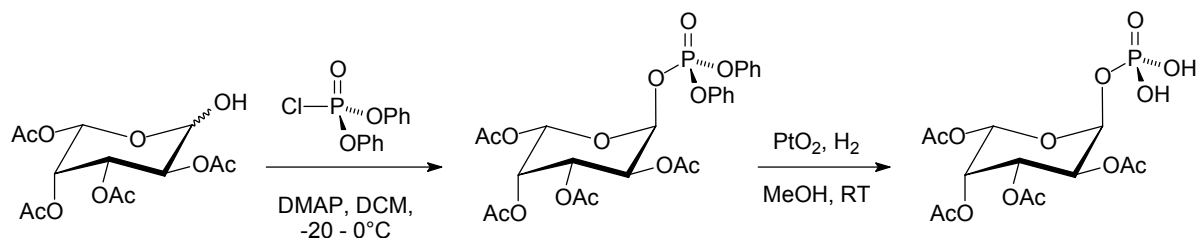


R, R' = Nukleoside, (SG) = Schutzgruppe

Schema 15: Phosphordiester-, -trierster- und Phosphit-Methoden

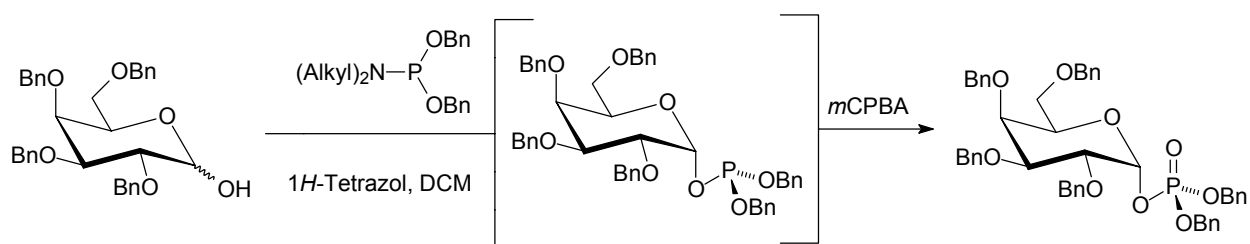
Zunächst unterscheidet man Verfahren bei denen ein bis auf die anomere Position geschützter Zucker einen Glykosylierungsakzeptor darstellt und mit einer aktivierten Phosphor-III- oder Phosphor-V-Verbindung umgesetzt wird. Letzteres wird

überwiegend mit einer Dialkyl- oder Diarylmonochlorophosphorsäure vollzogen, *tert*-Butyl¹³⁸-, Phenyl¹³⁹- und Dibenzylmonochlorophosphat¹⁴⁰ finden dabei die häufigste Verwendung, nicht zuletzt da letztere durch Übergangsmetallkatalyse eine hydrogenolytische Entschützung zum Glykosylmonophosphat zulassen (Schema 16).



Schema 16: Synthese eines Phosphorsäuretriesters mit Chlorodiphenylphosphat und dessen hydrogenolytische Entschützung zum Phosphorsäuremonoester

Im Falle der aktivierten Phosphor-III-Verbindungen findet jüngst die Phosphoramiditmethode nach Perich und Johns^{141,142} viel Aufmerksamkeit, eine Phosphit-Variante welche aufgrund der höheren Stabilität von Amiditen gegenüber Chlorphosphiten mit weniger Aufwand durchführbar ist. Anstelle eines Chlorids wird ein Amin nach Protonierung des Amidits zur Abgangsgruppe. Dabei werden als Amiditreagenzien u.a. Dibenzyl-*N,N*-diethyl- und Dibenzyl-*N,N*-diisopropylamidit¹⁴³ neben Chlor-2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramid^{144,145} eingesetzt.

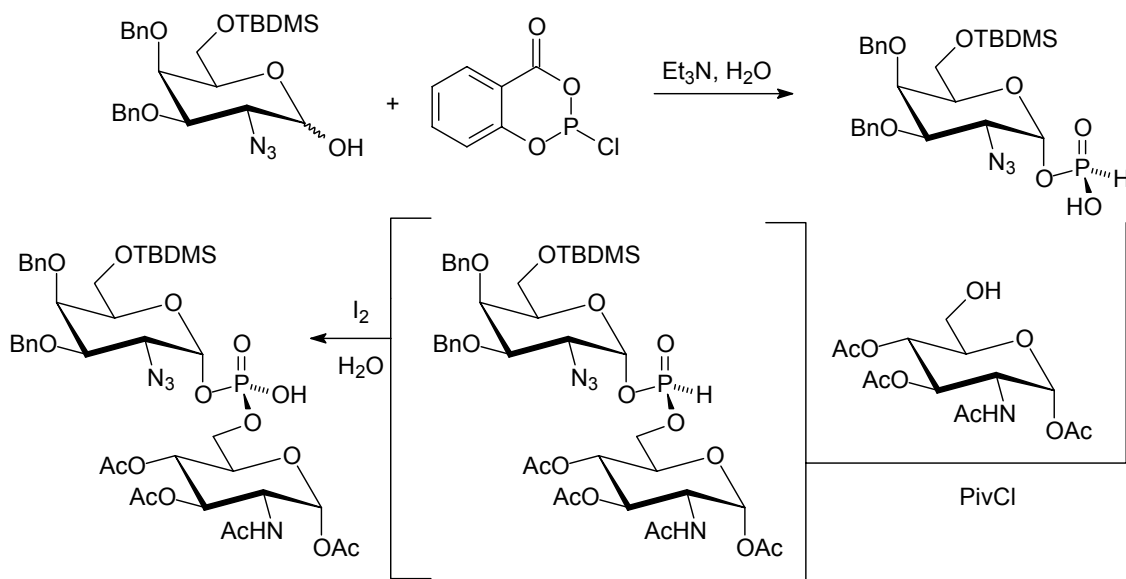


Schema 17: Phosphoramiditmethode

Die Oxidation des Phosphits zum Phosphat wird *in situ* im Sinne einer Eintopf-Reaktion mit *meta*-Chlorperbenzoesäure¹⁴⁶, *tert*-Butylhydroperoxid¹⁴⁴ oder Wasserstoffperoxid¹⁴⁷ sowie elementarem Iod¹⁴⁸ durchgeführt. Die besonders hervorzuhebende Effizienz dieser Reaktion liegt in der hohen α -Diastereoselektivität des Glykosylphosphitproduktes und der raschen Oxidation im Sinne einer Eintopf-

Reaktion. Üblicherweise kommt 1H-Tetrazol als katalytisch wirksame schwache NH-Säure zur Aktivierung des Amidits zum Einsatz. Bedingt durch die Explosionsgefährlichkeit des 1H-Tetrazols finden inzwischen Pyridiniumsalze, neben Imidazolium- und Benzimidazoliumtriflat sowie zahlreiche substituierte Imidazole als Katalysatoren Verwendung.

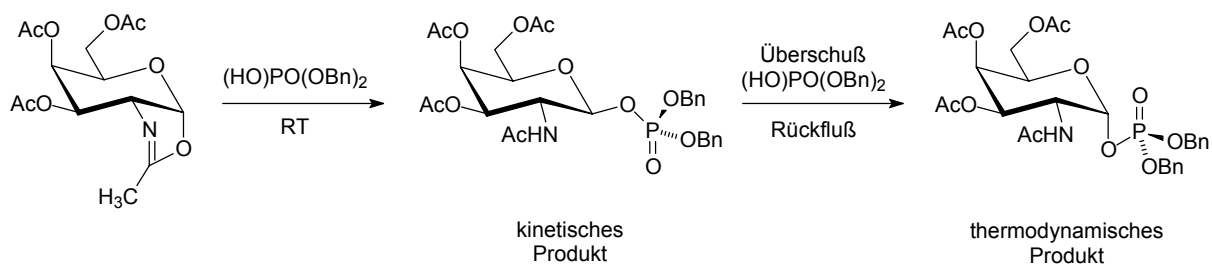
Eine weitere Methode zur Glykosylphosphatsynthese nach der Akzeptor-Variante ist die H-Phosphonatmethode nach van Boom *et al.*¹⁴⁹. Salicylchlorophosphit reagiert mit einem am anomeren Zentrum entschütztem Zucker zum Phosphit-Triester, der sich zum H-Phosphonatmonoester hydrolysieren lässt. Mit einem weiterem Monosaccharid wird ein H-Phosphonatriester erzeugt, welcher nach *in situ* Oxidation in einen Phosphorsäurediester mündet (s. Schema 18). Neben Glykosylakzeptoren lassen sich ferner sämtliche Donorstoffklassen, die aus der Oligosaccharidsynthese¹⁵⁰⁻¹⁵⁵ bekannt sind zur Herstellung von Glykosylphosphaten nutzen. Neben Thioglykosiden, Trichloracetamidaten, 1,2-Orthoestern und Oxazolinen finden überwiegend Glykosylbromide im Sinne einer Koenigs-Knorr-Reaktion Verwendung.



Schema 18: H-Phosphonatmethode

Dabei ist zu beachten das Glykosylphosphate ihrerseits Glykosylierungsdonoren darstellen und bei ihrer Herstellung daher milde und weitestgehend pH neutrale Reaktionsbedingungen erfordern. Die etablierteste Variante dieser Umsetzung

gebraucht Dibenzylphosphat¹⁵⁶ als Akzeptor neben Silber(I)-carbonat¹⁵⁷ oder Silber(I)-oxid¹⁵⁸ zur Aktivierung eines Bromids, darüber hinaus sind auch Phasentransfer-katalytische Verfahren literaturbekannt.¹⁵⁹



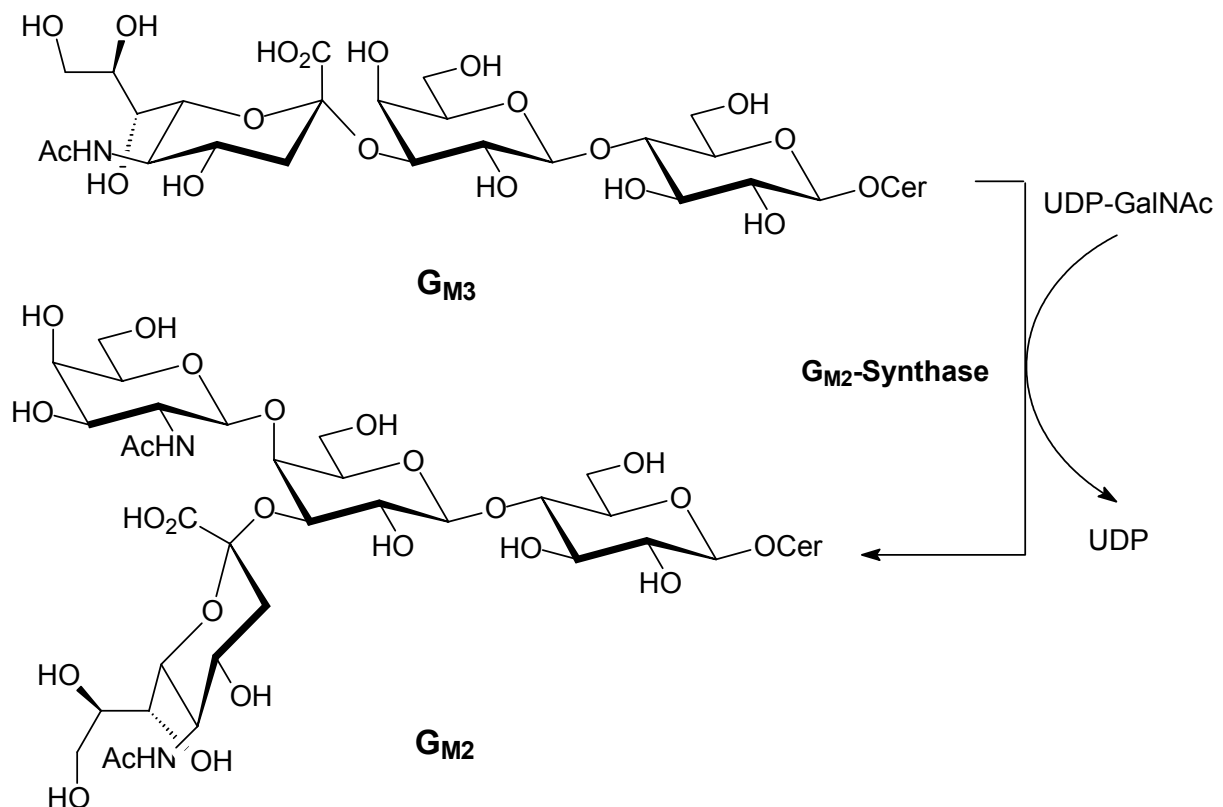
Schema 19: Diastereoselektive Reaktion eines Glykosyloxazolins zum Glykosylphosphat bei unterschiedlich kontrollierter Reaktionsführung

Die Bildung diastereoselektiver Glykosylphosphate, infolge von Nachbargruppen-effekten bei z.B. Esterschutzgruppen, sind auch bei dieser Variante der Phosphatierung realisiert und führen bei kinetischer Reaktionsführung überwiegend zu β -Phosphaten sowie bei thermodynamischem Verlauf infolge der Anomerisierung zu α -Phosphaten, was am Beispiel eines Oxazolins veranschaulicht (s. Schema 19) und in einem späteren Abschnitt dieser Arbeit praktisch genutzt wird.

Abschließend sei der Vollständigkeit halber die Methode von MacDonald *et al.*¹⁶⁰ erwähnt, die sich einer Umacetalisierung bei der Reaktion eines acetylgeschützten Monosaccharids mit reiner kristalliner *ortho*-Phosphorsäure bedient. Da diese Phosphatierung ein Anomerengemisch in einer Ausbeutegrößenordnung von ca. 15 - 20 % neben vielen Nebenprodukten liefert und daher mit einer aufwendigen Reinigung des Phosphats einhergeht, sowie nur am Beginn der Synthesekette praktikabel erscheint, hat diese Methode in der modernen Synthesepipeline zur Herstellung von anomerreinen Phosphaten nur noch eine geringe Bedeutung.

2. Zielsetzung

Die Ganglioside stellen eine wichtige Klasse von Glykosphingolipiden dar und sind dadurch charakterisiert, daß sie mindestens einen Sialinsäurebaustein in der an Ceramid gebundenen Oligosaccharidkette enthalten. Die Ganglioside mit einer Triglycosyl-*ganglio*-core-Struktur identifizieren sich durch eine an Lactosylceramid $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidisch verknüpfte GalNAc-Hexose als dritten Zuckerbaustein.¹⁶¹⁻¹⁶⁸ Diese tritt allerdings in Gangliosiden der *globo*^{161-163,167,169}- und *Forssman*-Gangliosid-Serie¹⁷⁰⁻¹⁷² als vierter und fünfter Zuckerbaustein auf.



Schema 20: G_{M2} -Synthase-katalysierte Glykosylierung von G_{M3} zu G_{M2}

Entsprechend wurden die darauf zurückzuführenden drei unterschiedlichen *N*-Acetylgalactosaminyl-Transferasen aus tierischen und humanen Geweben isoliert, welche die Übertragung von GalNAc aus UDP-GalNAc auf den jeweiligen Gangliosidprecursor dieser drei Serien katalysieren.

Einer von vielen Schwerpunkten der Glykolipidforschung besteht in der Strukturaufklärung von Transferasen, u.a. der G_{M2} -Synthase, eine der drei genannten *N*-Acetylgalactosaminyl-Transferasen. Die G_{M2} -Synthase überträgt GalNAc auf ihre nativen Gangliosid-Akzeptoren G_{D3} und G_{M3} (s. Schema 20) und stellt eine Schlüsseltransferase des humanen Glykosphingolipidstoffwechsels dar.

Zwecks Untersuchung derartiger membrangebundener *N*-Acetylgalactosaminyl-Transferasen, die sich einer röntgenkristallographischen Strukturuntersuchung bislang entziehen, sollen in dieser Arbeit geeignete Analoga von UDP-GalNAc synthetisiert werden, die eine geringfügige Modifikation der 2-Acetamido-Gruppierung der GalNAc-Hexose sowie am Uracilring des Uridinstrukturelements aufweisen.

Neben der Herstellung solcher UDP-GalNAc-Analoga mit einer um ein bis zwei C-Atome erweiterten bzw. verringerten Acetamidogruppe, sind Verbindungen mit elektrophilem halogeniertem Acetamido-Rest geplant, welche die kovalente Bindung und Charakterisierung nukleophiler Aminosäuren am GalNAc-bindendem Enzym ermöglichen.

Ferner ist es Ziel, photolabile Verbindungen mit einer Azidogruppe jeweils am Uracil- und am Hexosylring des GalNAc sowie an dessen Acetamidogruppe zu synthetisieren. Dieses Konzept soll weiterführend auf Diazirine übertragen und die Herstellung von Diazirin-modifizierten GalNAc- und UDP-GalNAc-Analoga realisiert werden. So hergestellten Azid- und Diazirin-Strukturanaloga von UDP-GalNAc sollen dabei weitestgehend der nativen Struktur des UDP-GalNAc Rechnung tragen und die Grundlage für eine Photoaffinitätsmarkierung von *N*-Acetylgalactosaminyl-Transferasen bilden.

Zusätzlich soll die Syntheseroute zu den genannten modifizierten GalNAc-Verbindungen in möglichst wenigen effizienten Syntheseschritten vollzogen werden, indem zunächst geeignete Schlüssel-Intermediate als breit funktionalisierbare Synthese-Bausteine herzustellen sind. Die Übertragbarkeit auf andere Monosaccharidkonfigurationen soll ferner durch die Synthese entsprechender UDP-GlcNAc-Strukturanaloga im Sinne eines „proof of concept“ aufzuzeigen sein.

3. Herstellung der α -Hexopyranosylmonophosphate

Dieses Kapitel beschreibt die Herstellung und weiterführende Funktionalisierung von α -Glykopyranosylphosphaten, die in Kapitel 4 zu Zuckernukleotiden des Uridins verknüpft werden.

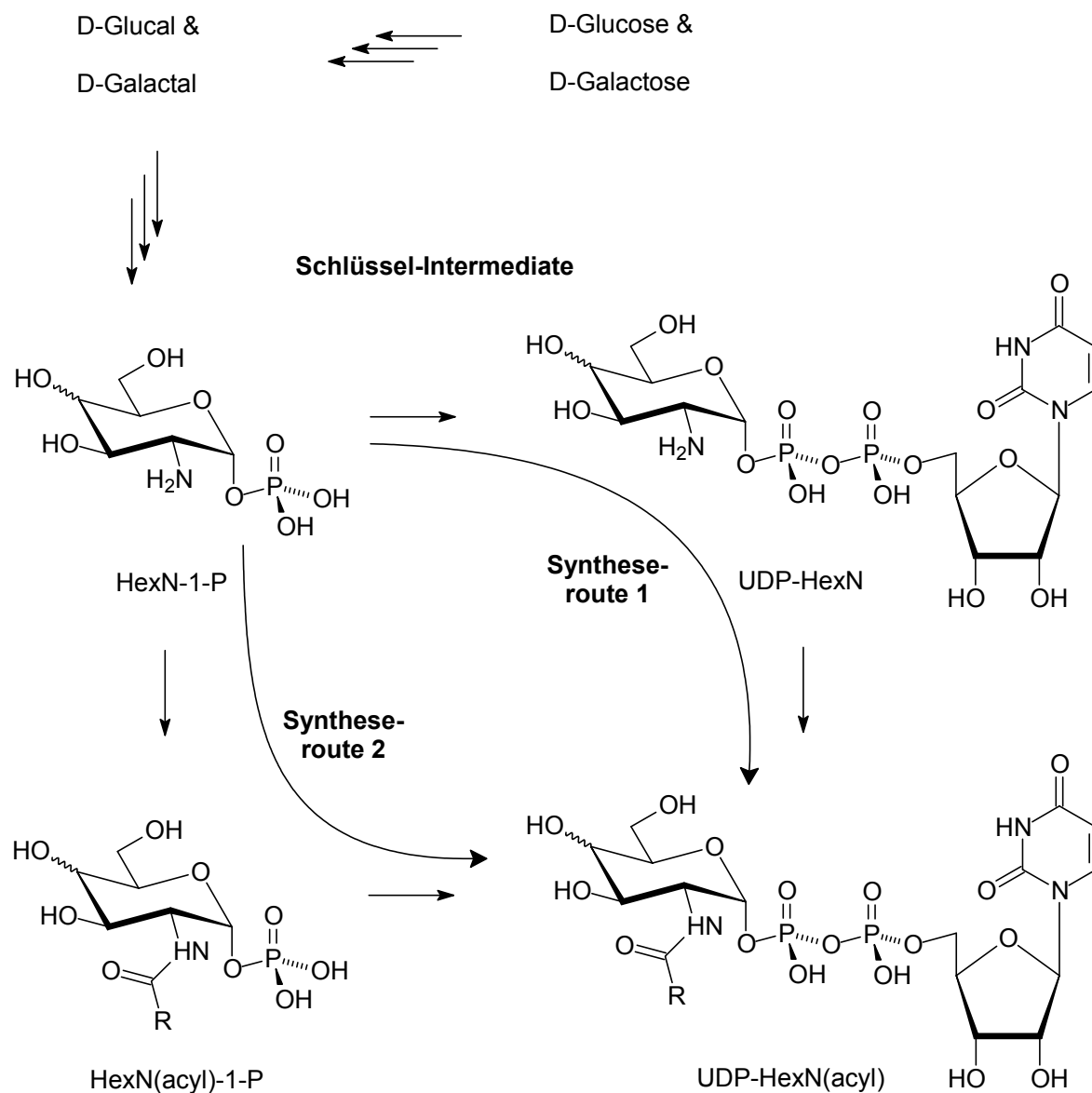
3.1. Einleitung und Synthesekonzept

Wie in den vorangegangenen Kapiteln geschildert, spielt GalNAc in Form des bioaktiven Leloir-Glykosylierungsdonors UDP-GalNAc eine wichtige Rolle in der Biosynthese von Glykokonjugaten und ihren Vorstufen.

Um die Synthese verschiedenartiger *N*-acylierter Galactosamine und Glucosamine, die sich zunächst nur in der Kettenlänge der Acylamidogruppe in der 2-Position unterscheiden, weitestmöglich effizient zu gestalten, erscheint es sinnvoll diese Verbindungen auf einen gemeinsamen Precursor zurückzuführen.

Dieser sollte sich idealerweise in guter Ausbeute und in wenigen Syntheseschritten sowie nach einem gut reproduzierbarem Syntheseprotokoll herstellen lassen und zusätzlich zur *N*-Acylierung weitere selektive Konversionsreaktionen an funktionellen Gruppen gestatten. Darüberhinaus sollten alle geplanten Derivatisierungen unter milden Reaktionsbedingungen am ungeschütztem Zucker, Zuckerphosphat oder Nukleotidzucker durchführbar sein. Dies hätte den Vorteil, daß nach Herstellung der geplanten Schlüssel-Intermediate, Schutzungs- und Entschützungs-schritte entfallen würden. Daraus ergibt sich zwangsläufig, daß Reaktionen an diesen entweder in Wasser, Pufferlösungen, Mischungen von Wasser und organischen Solventien stattzufinden hätten oder im Falle von Phosphaten und Nukleotiden geeignete Gegenionen einzuführen wären, welche die Löslichkeit in organischen polaren Lösungsmitteln befördern. Insgesamt vereinfacht sich die Reaktionsführung an ungeschützten Derivaten dadurch, daß in wässrigen Reaktionsmedien auf aufwendig getrocknete Lösungsmittel verzichtet werden kann und die Zahl an Syntheseschritten durch Verzicht auf Schutzgruppenchemie deutlich verringert wird. Dem gegenüber steht die Schwierigkeit, daß eine Trennung und Reinigung

hochpolarer Zielverbindungen im Vergleich zu geschützten Verbindungen in der Regel mit höherem Zeitaufwand und geringerer Trennschärfe der dafür benötigten Chromatographiematerialien verbunden ist.



Schema 21: Alternative Synthesewege zu *N*-acylierten UDP-Hexopyranosaminen

Potentielle Kandidaten, die als Schlüssel-Intermediat zur weiteren Funktionalisierung der 2-Position geeignet erscheinen, sind gemäß Schema 21 neben den Phosphorsäuremonoestern von Galactosamin (GalN-1-P) und Glucosamin (GlcN-1-P) ferner deren Nukleotidanaloga Uridindiphosphogalactosamin (UDP-GalN) und Uridindiphosphoglucosamin (UDP-GlcN).

Da diese Verbindungen allesamt eine freie Aminogruppe in der 2-Position des Hexopyranosylrings besitzen, die zudem die höchste Nucleophilie neben allen übrigen Aminofunktionen und Phosphatgruppen aufweist, sollte eine Acylierungsreaktion überwiegend in dieser Position stattfinden. An das dafür nötige Acylierungsreagenz wäre lediglich die Bedingung geknüpft, daß es möglichst von moderater Reaktivität ist und damit einhergehend hochselektiv und ausschließlich mit der Aminogruppe der Aminosuckerkomponente reagiert. Dies schließt im Vorfeld Anhydride oder Säurehalogenide aus, zumal sie im wässrigen Medien sauer reagieren und während der Reaktion oder im Rahmen der Aufarbeitung eine Spaltung der Phosphatgruppen bewirken können. Es sollen daher vorrangig Ester mittlerer Reaktivität wie die von *N*-Hydroxysuccinimid¹⁷³, *para*-Nitrophenol¹⁷⁴ und anderer halogener Phenole¹⁷⁴ zum Einsatz kommen, wie sie z.T. aus der Peptidchemie bekannt sind. Weiterführend erlauben Hexopyranosylaminderivate in einer metallkatalysierten Diazotransfer-Reaktion die Konversion der Aminogruppe zur Azidogruppe und eröffnen eine Maskierung der Aminofunktion, so wie auch den Zugang zu photolabilen Enzymsubstratanaloga für Photoaffinitätsmarkierungsexperimente. Inwiefern Aminosuckerphosphate u.a. mit der Diazotransfer-Reaktion^{175,176} kompatibel sind wird daher auch Gegenstand dieser Arbeit sein.

Nach Schema 21 stehen generell zwei Syntheserouten über die genannten Aminoglykopyranosylphosphat-Intermediate zu den Acylamidohexopyranosyl-nucleotiden zur Auswahl. Nach Syntheseroute 1 ausgehend von GalN-1-P und GlcN-1-P hätte zunächst entweder eine chemische Kupplung oder ein enzymatischer Schritt zur Herstellung des entsprechenden Aminosuckernucleotids zu erfolgen, gefolgt von einem abschliessenden Funktionalisierungsschritt an der Aminogruppe.

Dem gegenüber steht die umgekehrte Reaktionsfolge nach Syntheseroute 2, wonach zuerst die monosaccharidischen Phosphate GalN-1-P und GlcN-1-P selektiv zu *N*-acylieren wären um die daraus hervorgehenden Acylamidozuckerphosphate zu den korrespondierenden Nucleotiden zu verknüpfen.

Zunächst erscheint Syntheseroute 1 attraktiver, zumal der für das gesamte Syntheseprotokoll kritischste Nucleotidverknüpfungsschritt nur einmal auszuführen wäre. Jedoch sind bislang weder chemische Morpholidatkupplungen an Aminosuckerphosphaten literaturbekannt, noch sind UDP-GalN und UDP-GlcN natürliche Substrate für nucleotidgenerierende Pyrophosphorylasen, die zudem für

galacto-Zucker nicht kommerziell erhältlich sind. Die geringere Stabilität von Zuckernukleotiden gegenüber einfachen Zuckerphosphaten kommt in einer selektiven *N*-Acylierungsreaktion als weitere Schwierigkeit hinzu und macht diesen abschliessenden Reaktionsschritt ungewiß. Gleiches kann für andere typische Aminreaktionen, wie etwa dem genannten Diazotransfer angenommen werden, der an Aminohexopyranosylphosphaten aussichtsreicher erscheint als an UDP-Aminohexosen, bedingt durch ihre geringere Löslichkeit und Stabilität.

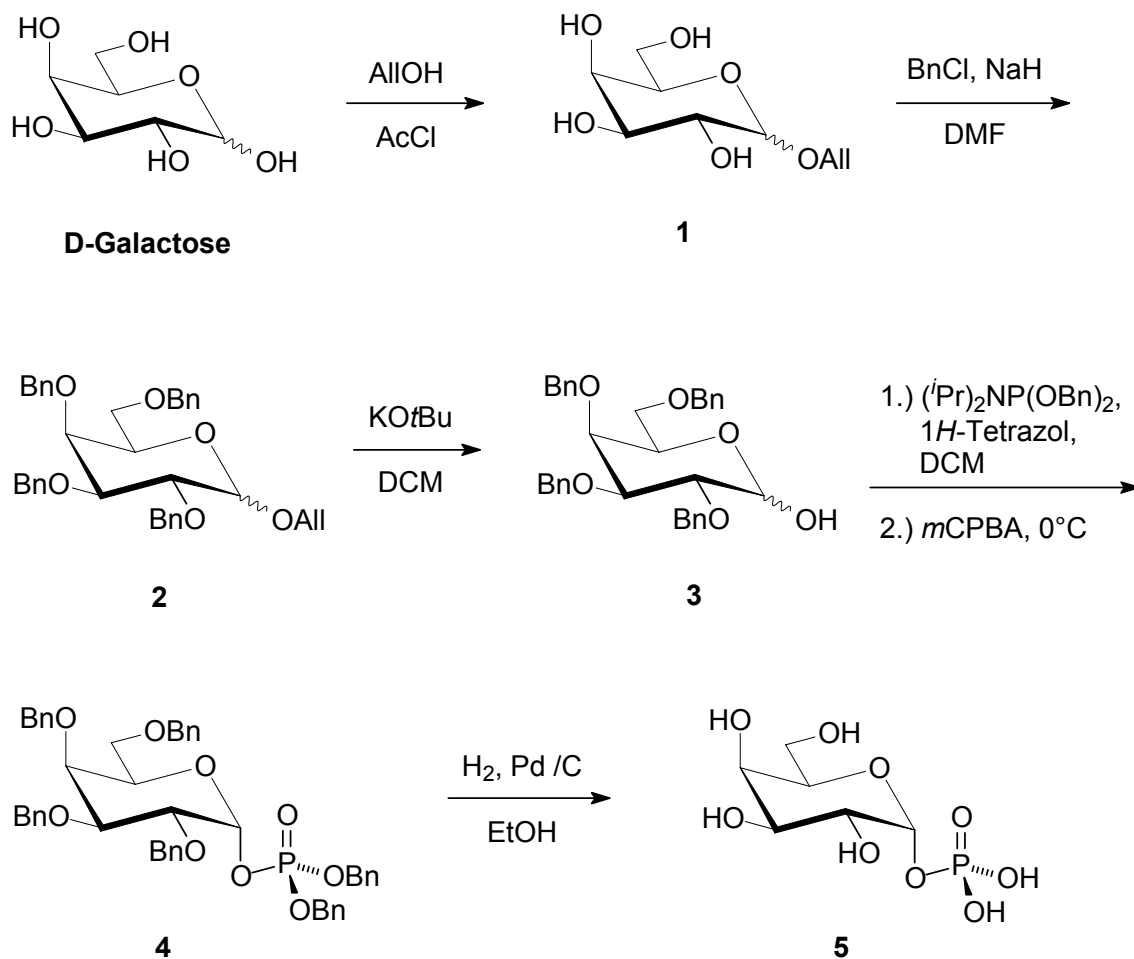
Syntheseroute 2 erscheint in beiden konsekutiven Syntheseschritten erfolgsversprechender, zumal eine Morpholidat-Kupplung an Acetamidozuckerphosphaten bekanntermaßen durchführbar ist. Zu erwähnen sei jedoch, daß nach Syntheseroute 2 für jedes UDP-Zielnukleotid eine gemessen an Reaktionsdauer, Reaktionsführung und Produktaufarbeitung aufwendige Morpholidat-Kupplung durchzuführen ist und gegenüber Syntheseroute 1 diesen zusätzlichen Kupplungsschritt je Zielverbindung erforderlich macht.

Im Rahmen dieser Arbeit werden beide Syntheserouten auf ihre Praktikabilität und experimentelle Durchführbarkeit hin untersucht.

3.2. Synthese von Galactopyranosyl- und 2-Desoxy-galactopyranosylphosphat

Zunächst wurden die anomenreinen α -Phosphate der D-Galactose und 2-Desoxy-D-galactose unter Anwendung bekannter Verfahren der Zuckerschutzgruppenchemie und Thioglykosylierungsmethodik hergestellt. Die beiden bereits bekannten Galactopyranosylphosphate **5** und **13** (s. Schema 22 u. 23) sollen wie später in Kapitel 4 beschrieben wird in einer Morpholidat-Kupplungs-Reaktion zu den entsprechenden UDP-Referenznukleotiden umgesetzt werden. Innerhalb der Verbindungsreihe UDP-2-desoxy-Gal, UDP-Gal, UDP-GalN, UDP-GalNAc und verschiedener *N*-acylierter UDP-GalN-Derivate soll ein möglicher Einfluß des Substituenten in der 2-Position auf die Morpholidat-Kupplung untersucht werden, und weiterführend sind Optimierungen der Morpholidatkupplungs-Reaktion von Interesse. Ausgehend von D-Galactose wurde zunächst die anomere Position in Gegenwart einer kleinen Menge an Acetylchlorid in 68 % Ausbeute allyliert und dann die übrigen vier Hydroxygruppen des rohen anomeren Allylgalactosids **1** in praktisch quantitativer

Ausbeute perbenzyliert. Nach Entfernung der Allylgruppe, welche zur temporären Schützung der anomeren Position eingeführt wurde, mit Kalium-*tert.*-butoxid, wurde nach der Akzeptorvariante von Perich und Johns^{141,142} unter Verwendung von Dibenzyldiisopropylphosphoramidit die freie anomere Position von **3** in sauer katalysierter Reaktion zum Phosphit umgesetzt, das sogleich mit *m*CPBA zum Phosphat **4** oxidiert wurde.

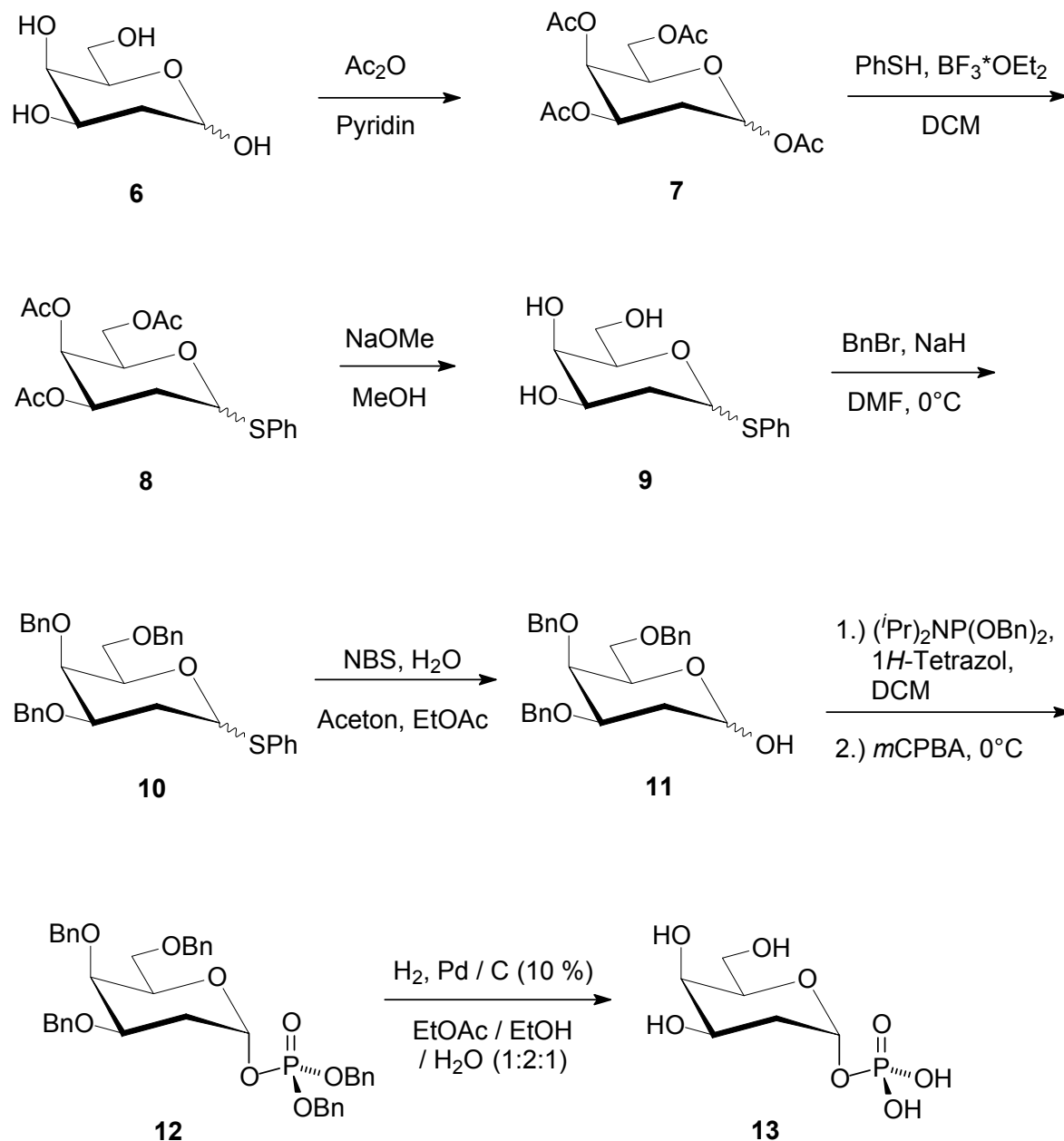


Schema 22: Synthese des α -Galactopyranosylphosphats **5**

Das so in 63 % Ausbeute anomerenrein erhaltene benzylgeschützte α -Phosphat **4** wurde abschliessend hydrogenolytisch mit Palladium auf Aktivkohle in 72 % Ausbeute durch Entfernen aller sechs Benzylgruppen vollständig entschützt.

Das breitbandenkoppelte ^{31}P -NMR des Galactopyranosylphosphats **5** weist mit einem Signal bei $\delta = 0.27$ ppm eine für monofunktionalisierte Phosphorsäureester typische chemischen Verschiebung im Bereich von ≈ -3 bis 5 ppm auf.

Im Vergleich zur Synthese herkömmlicher Glykopyranosylphosphate, ist die diastereoselektive Herstellung von 2-Deoxy-glykopyranosylphosphaten um nachfolgende Syntheseaspekte erschwert.



Schema 23: Herstellung des 2-Deoxy- α -galactopyranosylphosphats **13**

Zum einen ist dies bedingt durch die Abwesenheit einer Nachbargruppe zur anomeren Position und den damit einhergehenden fehlenden Einfluß auf den sterischen Verlauf einer Phosphatierung eines 2-Deoxy-Donors nach einem der

bereits geschilderten Donorverfahren. Zum anderen erweisen sich 2-Desoxyglykopyranosylphosphate als wesentlich hydrolyseempfindlicher verglichen mit entsprechenden Phosphaten nicht 2-desoxygenerter Zucker. Das Fehlen der elektronegativen 2-Hydroxygruppe führt zur zusätzlichen Stabilisierung eines intermediären Oxocarbenium-Ions und fördert die Spaltung der Phosphatgruppe am anomeren Zentrum bei ausreichender Aktivierung unter Hydrolysebedingungen.¹⁷⁷

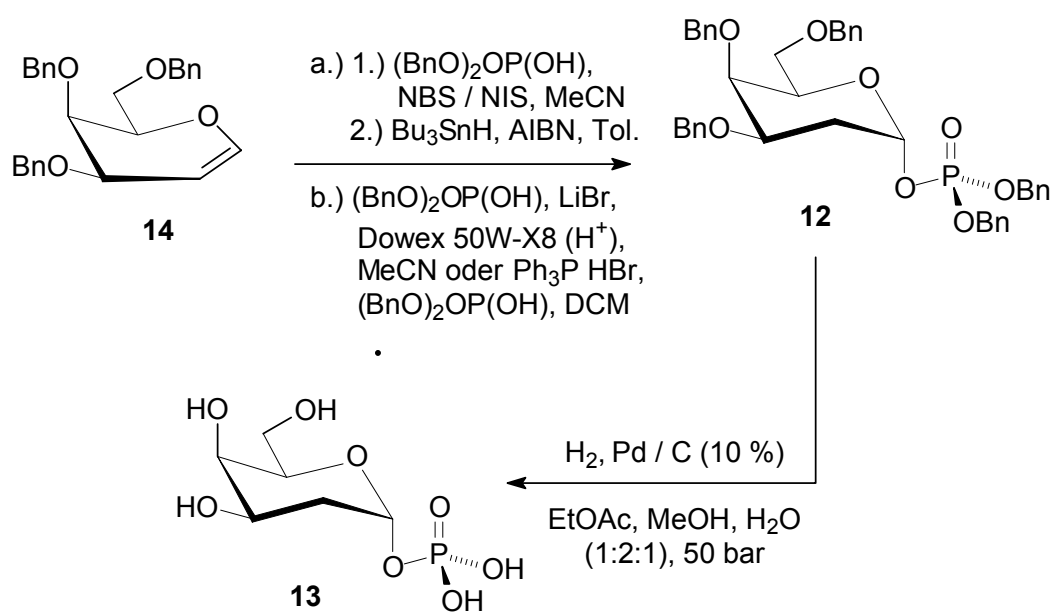
Zumindest die erste Problematik lässt sich umgehen, wenn für die Phosphatierung wie im Falle des Syntheseweges für das Galactopyranosylphosphat **5** (s. Schema 22) das gleiche Akzeptorverfahren zur Anwendung kommt. Die Phosphatierung zum 2-Deoxy-galactopyranosylphosphat wurde demzufolge wie folgt beschrieben ebenfalls nach der bewährten Phosphoramiditmethode durchgeführt.

Die bis auf die anomere Position benzylierte Galactose **11** wurde durch Phenylthioglykosylierung des Peracetats **7**, gefolgt von der Zemplén-Entschützung des Phenylsulfids **8** zu **9** und anschließender Benzylgruppen-Schützung zu **10** sowie darauffolgender Glykosylierung mit Wasser unter NBS-Aktivierung, hergestellt. Diese fünf Syntheseschritte gelangen jeweils in guter bis sehr guter Ausbeute zwischen 87 und 98 %. Analog der Phosphatierung des Galactoseakzeptors **3** gelang auch bei dessen 2-Desoxy-Pendant **11** die Umsetzung mit Dibenzylidiisopropylphosphoramidit mit anschließender *in situ* Oxidation zum geschütztem 2-Desoxy- α -galactopyranosylphosphat **12** in 52 % Ausbeute. Die Komplettentschützung zum polaren Phosphat **13** durch hydrogenolytische Debenzylierung ließ sich in vergleichbarer Ausbeute von 65 % erzielen. Die Zuordnung der Anomerie erfolgte über die vicinale Kopplungs-konstante $^3J_{1,2ax} = 3.6$ Hz, neben der sehr kleinen nicht auflösbaren $^3J_{1,2eq}$ -Kopplung und die durch das paramagnetische P-Atom unterlegte Kopplung $^3J_{1,P} = 7.3$ Hz.

Alternativ ließe sich das Phosphat **13** in weniger Syntheseschritten nach einem Donor-Verfahren mit Dibenzylphosphat als Phosphatierungsreagenz ausgehend von Tribenzylgalactal **14** gemäß Schema 24 herstellen. Die stereoselektive Synthese von 2-Desoxy- α -glykopyranosiden wie -glykopyranosylphosphaten lässt sich mittels einer durch ein Elektrophil vermittelten Addition eines Akzeptors an die Doppelbindung eines Glycals, gefolgt von der reduktiven Entfernung des Substituenten an der Position 2 realisieren.¹⁷⁸

Nach Ferrier erfolgt mit Lewis-Säuren die allylische Umlagerung unter Bildung von 2,3-ungesättigten Glykosiden als die dabei häufigste Nebenreaktion¹⁷⁹, die sich auch zu Synthesezwecken als Hauptreaktion nutzen lässt.

Die gebräuchlichste Variante dieser Reaktion bedient sich einer α -Haloalkoxylierung mit entweder *N*-Brom- (NBS)¹⁸⁰ oder *N*-Iodsuccinimid (NIS)¹⁸¹ mit anschließender reduktiver Dehalogenierung des intermediären *trans*-ständigen 2-Haloglykosids mit wahlweise Tributylzinnhydrid gemäß Schema 24 oder Nickelborid.¹⁸²

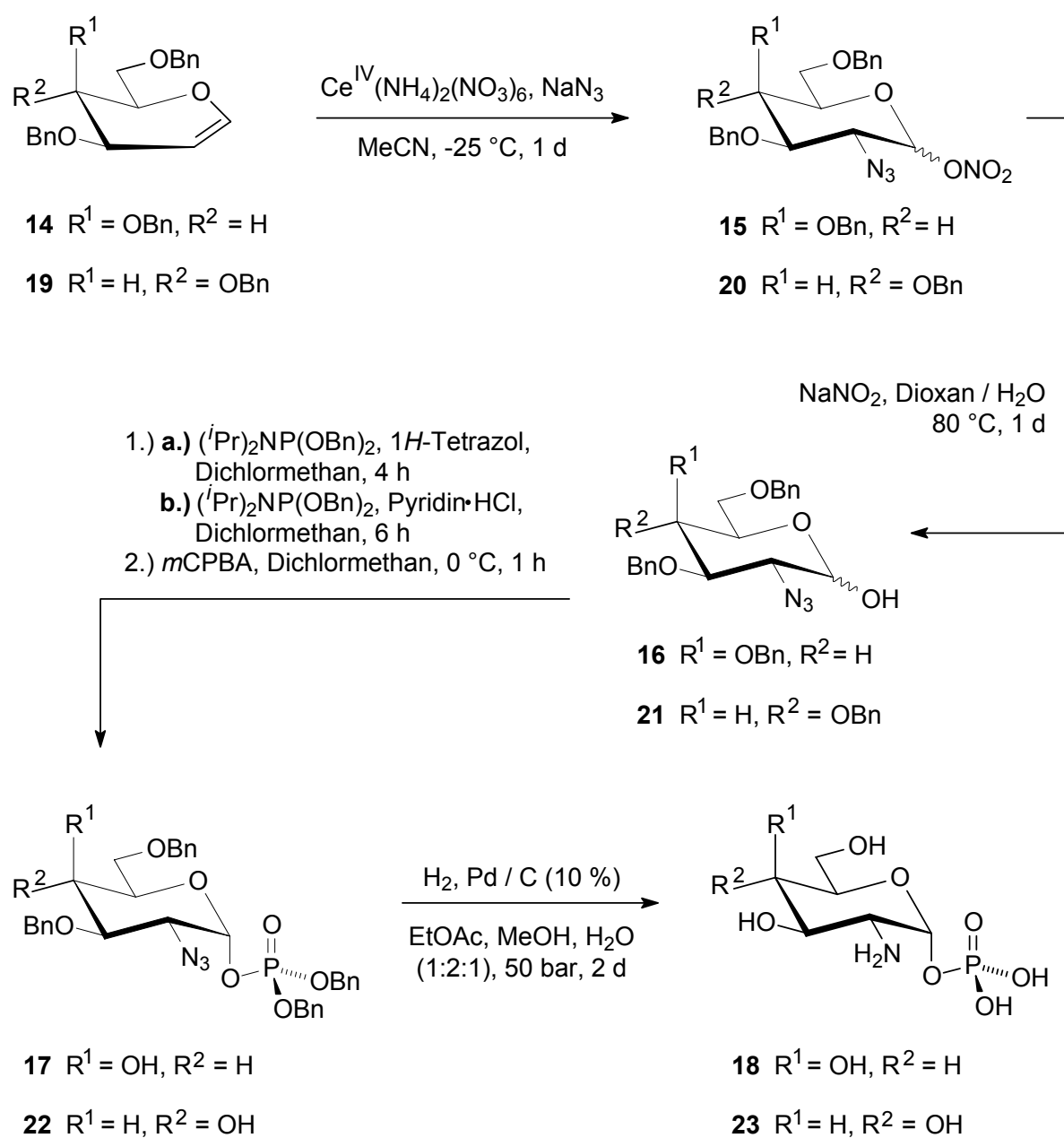


Schema 24: Alternativer Syntheseweg zum 2-Deoxy- α -galactosylphosphat **13**

Darüberhinaus sind nach Schema 24 auch Methoden der direkten Umsetzung von Glycalen mit Akzeptoren bekannt, bei der Sulfonsäure-Ionentauscher¹⁸³ in Gegenwart von Lithiumbromid 2-Desoxy- α -glykopyranoside geben sowie die Methode eines durch Triphenylphosphinhydrobromid^{184,185} vermittelten und höchst α -selektiven *cis*-Additions-Verfahren an glycalische Doppelbindungen.

3.3. Herstellung der Hexopyranosaminy-1-phosphate

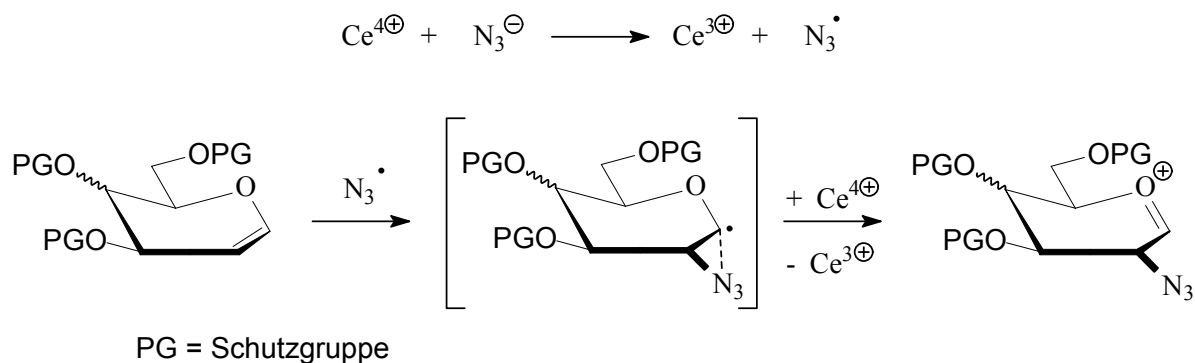
Die Synthese von D-Galactopyranosaminy-1-phosphat (**18**) und D-Glucopyranosaminy-1-phosphat (**23**) begann ausgehend vom perbenzyliertem D-Galactal **14** sowie D-Glucal **19** und folgte dem Syntheseweg via Azidonitratierung, der ursprünglich von Lemieux *et al.* erstmals auf estergeschützte Glycale^{186,187} angewandt und von R.R. Schmidt *et al.* auf perbenzylierte Glycale erweitert wurde¹⁸⁸.



Schema 25: Synthese der Hexopyranosaminy-1-phosphate **18** und **23**

Die Azidogruppe wurde im Verlauf der Azidonitratisierung nach Schema 25 erwartungsgemäß regioselektiv und vorzugsweise in äquatorialer Orientierung in die 2-Position eingeführt.

Die Azidonitratisierung verläuft nach einem radikalischen Mechanismus^{189,190} durch Addition eines zuvor oxidativ aus einem Azidion gebildetem Azidradikals auf die Glycaldoppelbindung mit anschließender Oxidation zum 2-Azido-oxocarbenium-Ion, an welches sich vorzugsweise ein Nitration addiert. Da das Lösungsmittel Acetonitril als weiteres Nukleophil zugegen ist, kommt es in geringem Umfang ebenfalls zur Bildung von Imidaten als Nebenprodukte.



Schema 26: Mechanismus der oxidativ initiierten radikalischen Azidonitratisierung

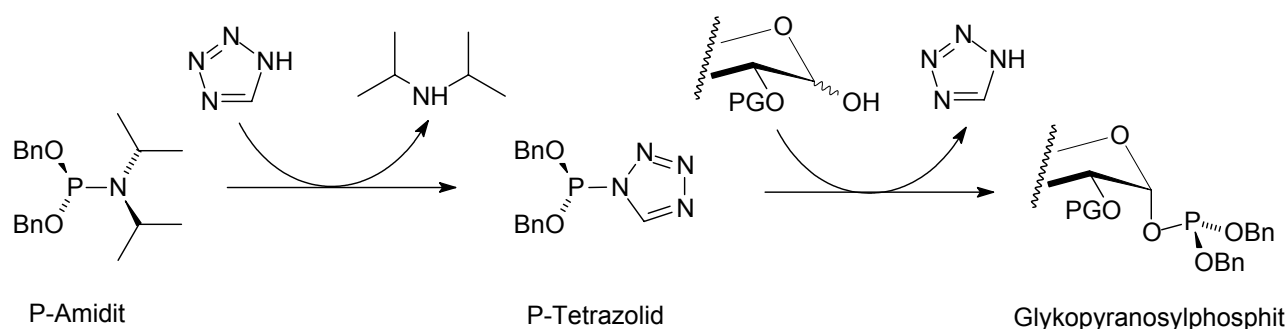
Einhergehend mit den früheren Arbeiten wurden sowohl ausgehend von der *gluco*- als auch der *galacto*-konfigurierten Ausgangsverbindung mit etwas weniger als ca. 2 % die *manno*- bzw. *talo*-konfigurierten Produkten erhalten.

Die beiden 2-Azidoglykopyranosylnitrate **15** und **20**, die als Hauptprodukte dieser Reaktion in Ausbeuten von 61 % bzw. 45 % hervorgingen, wurden einer reduktiven Hydrolyse unterworfen und führten zur Bildung der benzylgeschützten 2-Azidopyranosen **16** und **21** nach Behandlung mit Natriumnitrit in heissem, wässrigem Dioxan. Dabei handelt es sich um eine Synproportionierungsreaktion, in deren Folge ein Nitrition mit dem anomergebundenem Nitrat braunes sichtlich austretendes NO₂-Gas bildet und die anomere Position freisetzt. Um die bei dieser Reaktion typischerweise moderate Ausbeute zu optimieren, erwies es sich als unumgänglich unter starkem Rühren und oberhalb 80 °C das nitrose Gas auszutreiben, so daß **15** und **20** mit 54 % und 58 % Ausbeute erhalten werden konnten. Nicht umgesetztes

Material ließ sich nach chromatographischer Reinigung zurückgewinnen und einer erneuten Nitratspaltung unterwerfen.

Im nächsten Syntheseschritt wurde die Phosphatgruppe eingeführt. Die benzylierten 2-Azidogalactosen **16** und **21** wurden unter Verwendung von Dibenzyl-*N,N'*-diisopropylphosphoramidit nach der bereits zuvor bewährten Phosphoramidit-Methode an der anomeren Position phosphoryliert. In Gegenwart von 1*H*-Tetrazol wurde zunächst der Phosphit-Triester erzeugt, der *in situ* mit 3-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA) als Oxidationsmittel zum Phosphat-Triester reagierte und ausschliesslich die anomererenreinen α -Phosphate **17** und **22** in hinreichend guten Ausbeuten von 62 % und 58 % über beide Synthesestufen in einer Ein-topf-Reaktion ergab. Eine Bildung der entsprechenden β -Phosphate wurde nicht beobachtet.

Dem 1*H*-Tetrazol als schwache NH-Säure mit einem pKa-Wert von 4.9 wird wie bereits im einleitendem Teil dieser Arbeit kurz angedeutet bei der Aktivierung des Phosphors eine gewichtige Rolle zugesprochen. So wird diskutiert, daß das Phosphoramiditreagenz wie in Schema 27 zusammengefasst nach Austritt des Amins (hier Diisopropylamin) ein Tetrazolid bildet indem es den Aminstickstoff zuvor protoniert, wodurch der nukleophile Angriff einer Hydroxygruppe auf den elektrophilen Phosphor erleichtert stattfinden soll.



Schema 27: Mechanismus der Phosphoramidit-Methode unter 1*H*-Tetrazol-Katalyse

Die Herstellung phosphatseitig dibenzylgeschützter Phosphate nach der Phosphoramiditmethode zeigt hinsichtlich Ausbeute und Reaktionsführung deutliche Vorteile gegenüber der noch häufig angewendeten Glykosylphosphat-Darstellung aus dem entsprechenden Glykosylbromid mit Dibenzylphosphat als direktes Phosphatierungsreagenz. Dies trifft auch auf andere Donormethoden zu.

Vorhergehende Versuche das perbenzylierte 2-Azido- α -galactopyranosylphosphat **17** über ein aus **16** erzeugtes Trichloracetimidat, gefolgt von der Phosphorylierung mit Dibenzylphosphat, anomenrein zu synthetisieren, misslangen unter verschiedensten Bedingungen. Es bildete sich ausschließlich ein α -Trichloracetimidat, welches im nachfolgendem Phosphorylierungsschritt zum reinen β -Phosphat führte.

Neben dem für diese Methode klassischem 1*H*-Tetrazol-Katalysator wurde zudem Pyridiniumhydrochlorid als vergleichbar schwache Säure und 1*H*-Tetrazol-Ersatz mit einem pKa-Wert von 5.23 untersucht. Dies ist insofern von Interesse, als 1*H*-Tetrazol jüngst nicht mehr in reiner Form sondern nur noch als Lösung kommerziell erhältlich ist. Problematisch ist dies insbesondere wenn das Syntheseprotokoll ein anderes Lösungsmittel oder eine abweichende Verdünnung an 1*H*-Tetrazol erfordert.

Die Ausbeuten der demzufolge durch Pyridiniumhydrochlorid-Katalyse erzeugten Phosphate **17** und **20** lagen mit 51 bzw. 50 % ca. 10 % niedriger als die entsprechenden durch 1*H*-Tetrazol-Katalyse hergestellten Verbindungen, so daß diese Variation in der Reaktionsführung eine ernstzunehmende Alternative darstellt.

Den abschliessenden Schritt stellt die Entschützung zu den Hexopyranosaminyl-1-phosphaten **18** und **23** dar. Die vollständige Entfernung aller drei Benzylether und beider Phosphorsäurebenzylestergruppen sowie die Reduktion der Azido- zur Aminofunktion gelang in einem einzigen Reaktionsschritt unter katalytischer Hydrierung mit Palladium-Aktivkohle bei hohem Wasserstoffdruck in einem Stahlautoklaven. Diese Komplettentschützung stellte sich als kritischster Schritt der unter Schema 25 abgebildeten Synthesesequenz in Hinblick auf die Ausbeute und die Vollständigkeit der Entschützung heraus. Da zunächst die Azidogruppe in eine Aminofunktion überführt wird und selbige den Palladiumkatalysator partiell inhibiert, führte dies zu einer erschwerten bis aussetzenden Debenzylierung im weiteren Verlauf der Reaktion. Sowohl Verunreinigungen im Ausgangsmaterial wie auch die variierende Qualität verschiedener Palladium-Aktivkohle-Chargen hatten einen signifikanten, z.T. inhibierenden Einfluß auf die Hydrierung, und äußerten sich durch längere Reaktionszeiten und verminderte Ausbeuten. Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich durch die langsame sequenzielle Debenzylierung, die zuerst an den

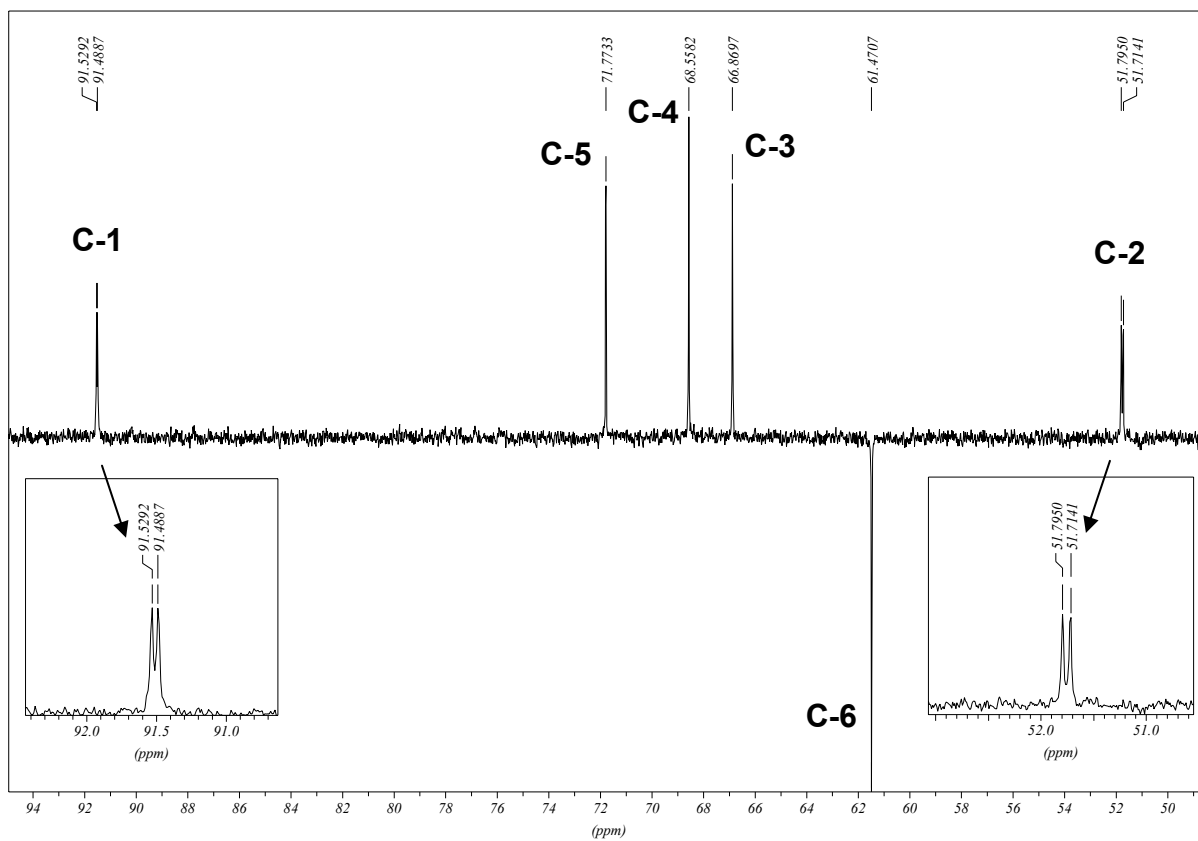
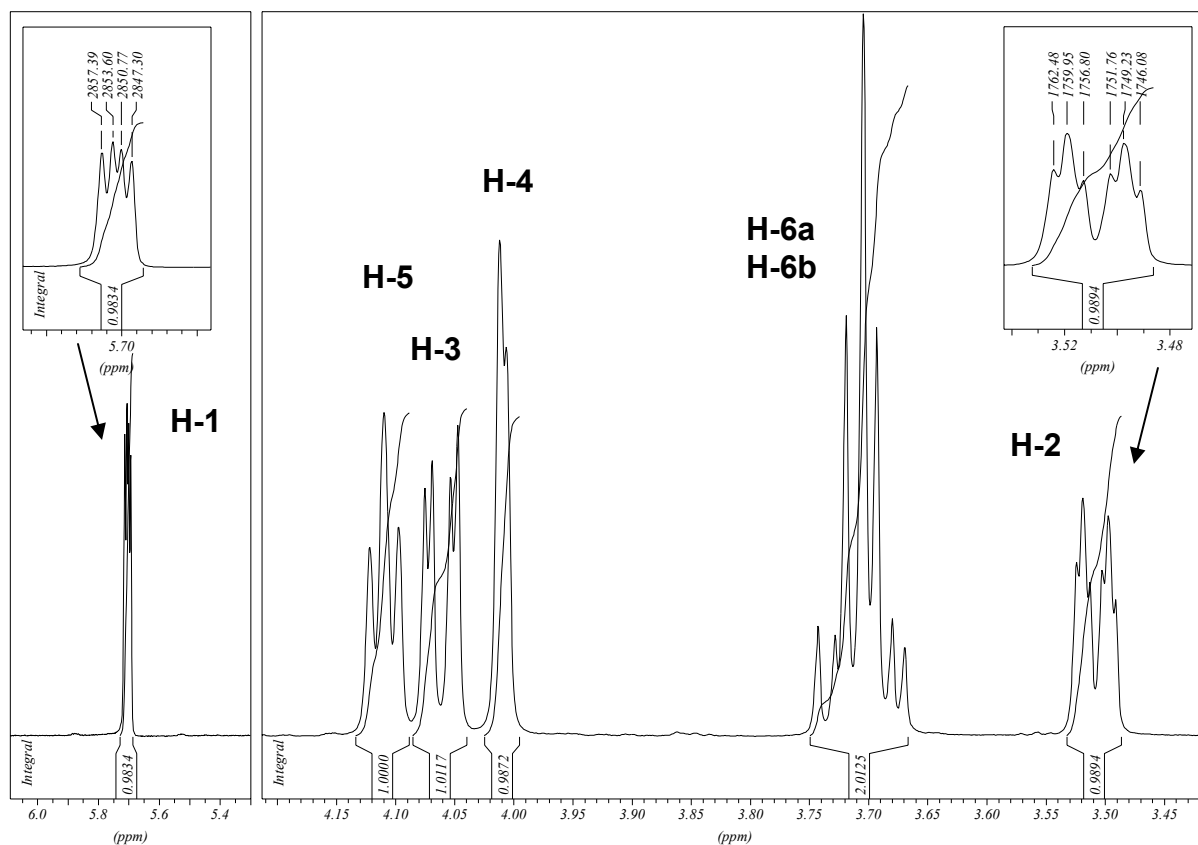
Benzylestern der Phosphatgruppe eintritt, was zur Bildung eines Phosphorsäure-aminoesters in Form eines inneren Salzes führt. Dies bedurfte eines Lösungsmittelgemisches, welches sowohl die unpolaren benzylgeschützten Phosphate **17** und **22** sowie die hochpolaren Produkte **18** und **23** in Form ihrer Betaine in Lösung hält.

Unter Berücksichtigung des hohen Polaritätsunterschieds der Komplette- und entschützten Phosphate sowie der übrigen erwähnten Schwierigkeiten wurde die optimierte Hydrogenolyse unter einem Wasserstoffdruck von 50 bar mit einem deutlichem Überschuß an Palladium-Aktivkohle-Reagenz in einer homogenen Lösungsmittelmischphase aus Ethylacetat / Methanol / Wasser im Verhältnis 1:2:1 im Zeitraum von zwei bis drei Tagen durchgeführt. Dies lieferte die ungeschützten Aminophosphate **18** und **23** in mit 71 % bzw. 67 % weitestgehend reproduzierbarer Ausbeute, ohne daß Nebenprodukte oder partiell debenzyliertes Material auftrat¹³⁷.

Da die Reaktion noch im 2 g Maßstab unter Erhalt von über 400 mg Produkt realisierbar ist, stellt dies eine wesentliche Verbesserung gegenüber anderen Methoden dar. Kommerziell ist Galactosamin-1-phosphat (**18**) nur in Kleinstmengen (5-20 mg) erhältlich und wird unter Verwendung aufwendig zu isolierender Galactokinasen aus speziellen lactoseverstoffwechselnden Hefen hergestellt^{191,192}.

3.4. Charakterisierung von α -Hexopyranosylmonophosphaten

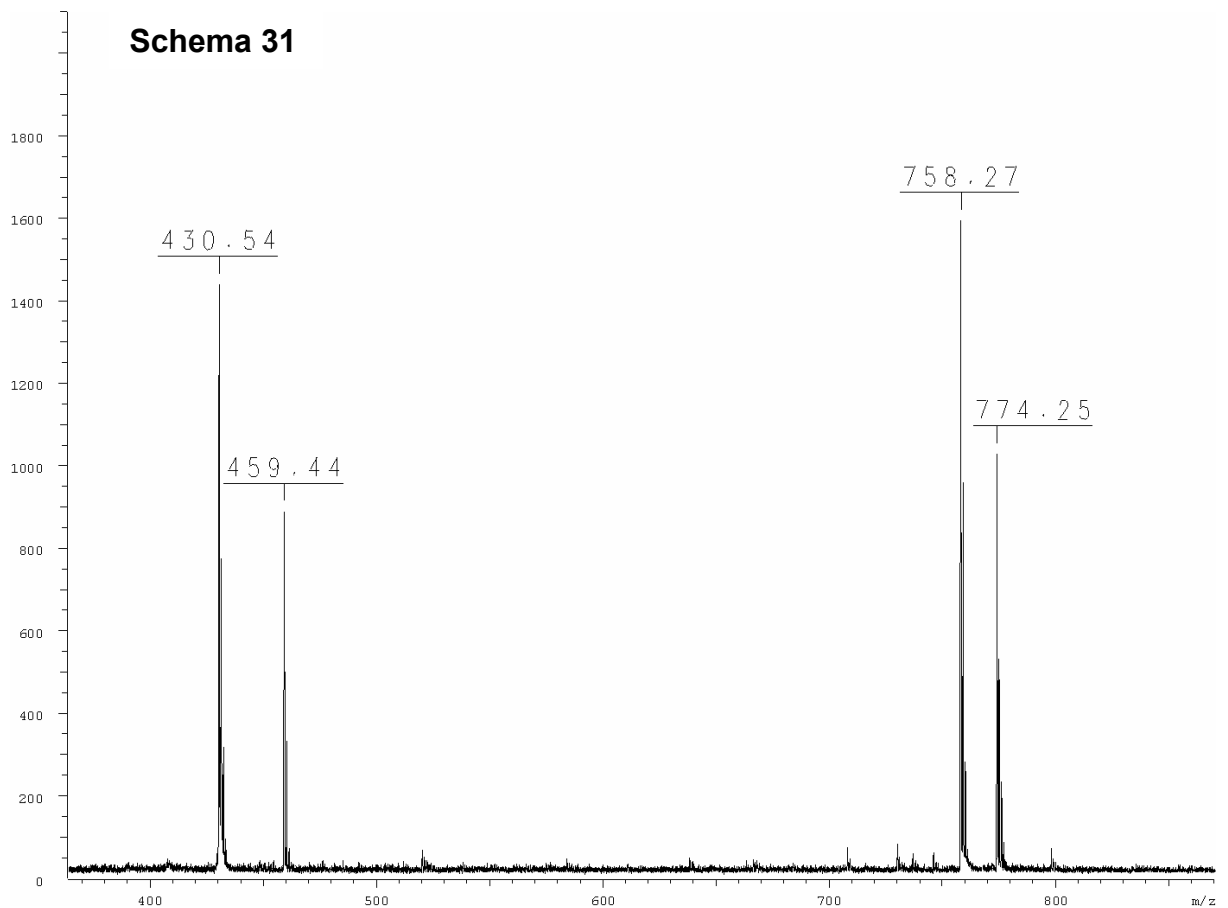
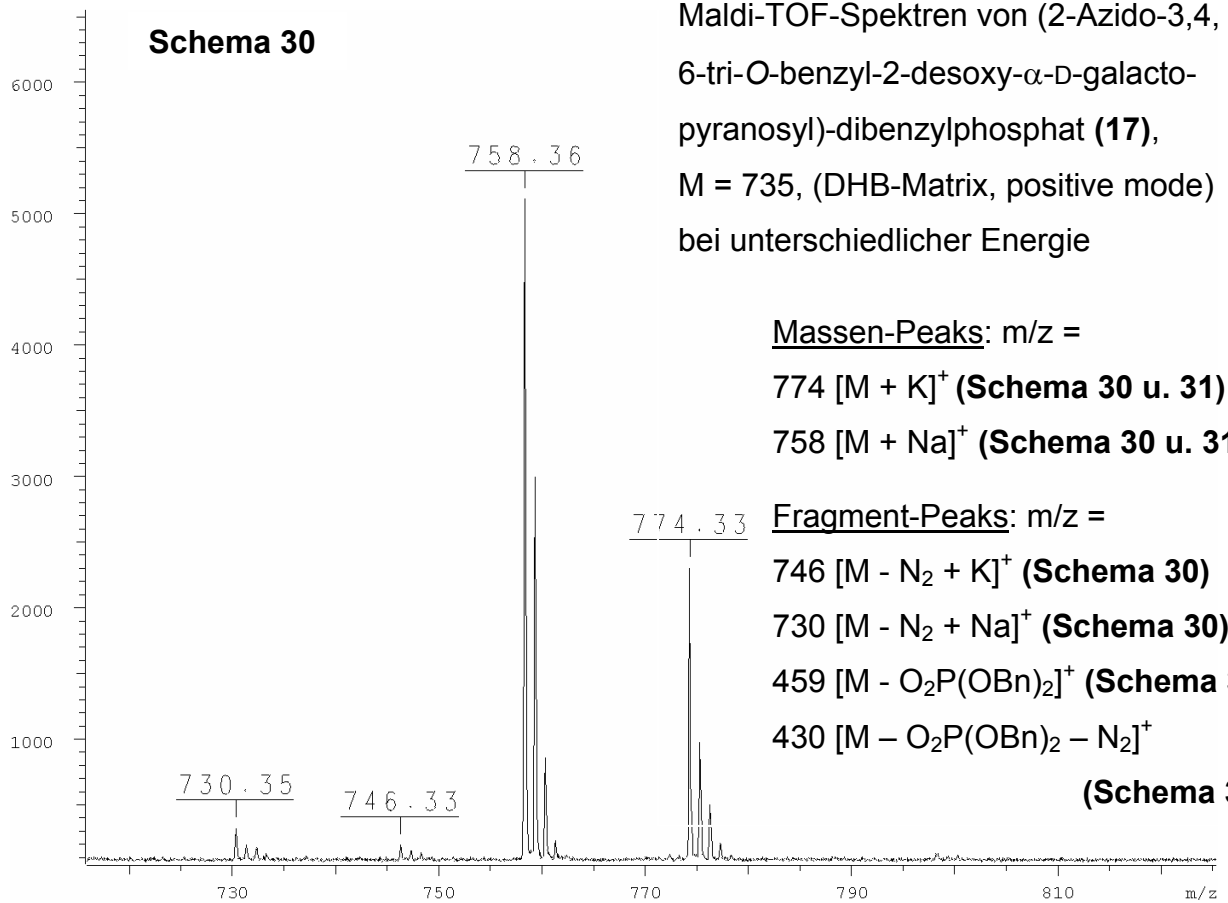
Die so hergestellten Phosphate können eindeutig durch ^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -Hetero-NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Zudem entnimmt man dem ^1H -NMR-Spektrum die Anomerie der Phosphatgruppe in den ge- und entschützten Phosphaten. Nach der Karplus-Kurve ergibt sich für α -Phosphate bei einem idealisierten Diederwinkel von 60° , bzw. *cis-trans*-Orientierung der vicinalen H-1- und H-2-Atome, eine Kopplungs-konstante von ca. $^3J_{1,2} \approx 3.0 - 3.5$ Hz. β -Phosphate hingegen mit einem Diederwinkel von nahezu 180° und *trans-trans*-orientierten vicinalen H-1- zu H-2-Atomen geben eine Kopplungsgrößenordnung von $^3J_{1,2} \approx 7 - 8.5$ Hz. Während *talo*- und *manno*-konfigurierte Zucker für beide Anomere einen ähnlichen Diederwinkel von ca. 60° besitzen, was ein breitbandenkoppeltes ^{13}C -gated-NMR-Spektrum erfordert, ist für die hier hergestellten *gluco*- und *galacto*-



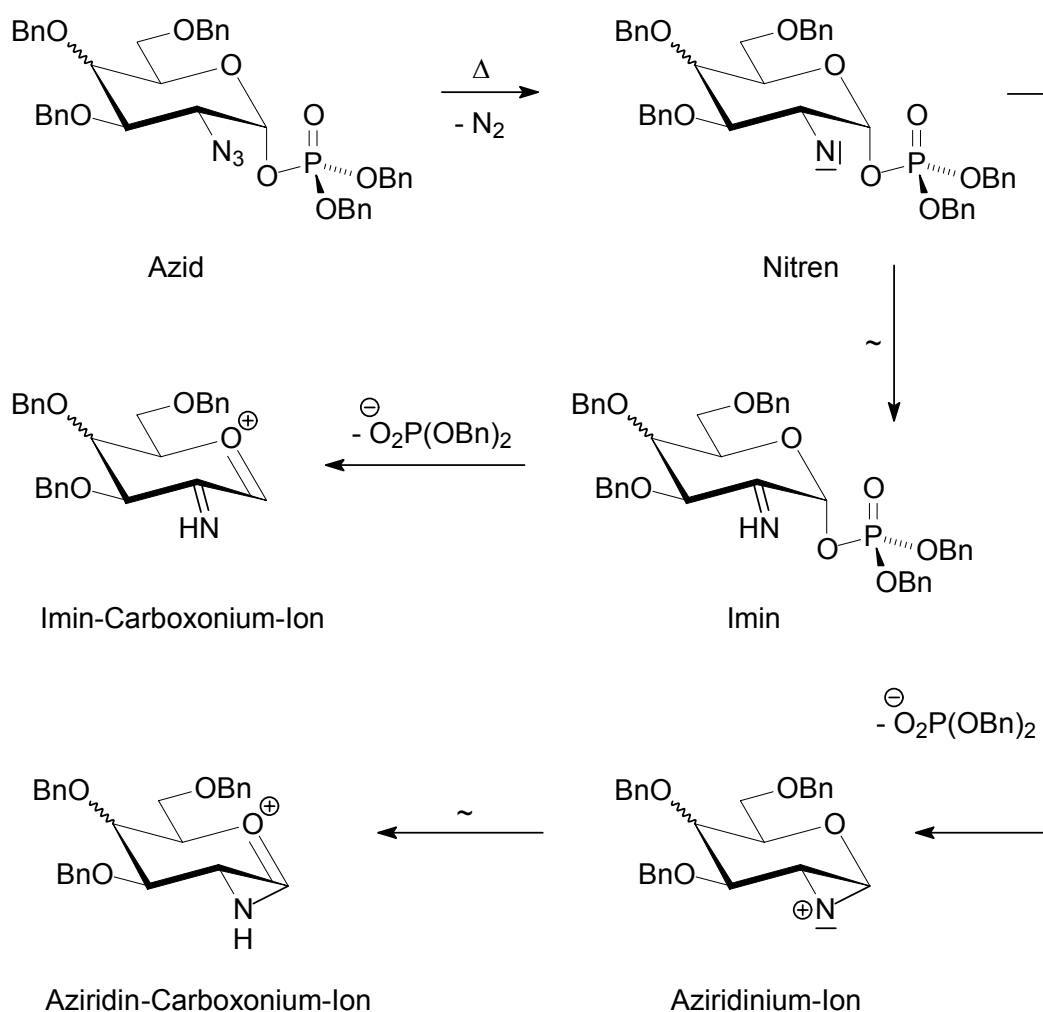
Schema 28 und 29: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von 2-Amino-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**18**) in D₂O (¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz)

Zuckerphosphate die Zuordnung anhand des ^1H -Spektrums eindeutig. So erweisen sich sämtliche Phosphate **5, 13, 17, 18, 22** und **23** mit den Kopplungskonstanten $^3J_{1,2}$ zwischen 3.2 und 3.6 Hz als anomereneine α -Phosphate und liegen damit als korrekte Diastereomere vor, um aus ihnen Leloir-Transferasedonor-Analoga mit biogener Struktur herstellen zu können.

Für die ungeschützten Phosphate kam es infolge dynamischer Effekte zu einer ausgeprägten Linienverbreiterung so daß nicht alle Kopplungskonstanten genau bestimmbar sind. Im ^1H -Spektrum macht sich eine zusätzliche Aufspaltung des anomeren Protons zu einem dd-Signal bemerkbar, die durch eine vicinale 3J -Kopplung zum paramagnetischen ^{31}P -Atom der Phosphatgruppe verursacht wird und in der Größenordnung um $^3J_{1,P} \approx 6.6 - 7.4$ Hz bestimmt wurde. In seltenen Fällen ist bei gut aufgelösten Spektren eine Aufspaltung des H-2 zu einem ddd-System in Form eines dt-Systems durch „long-range“-Kopplung des H-2 mit dem Phosphoratom mit einer gerade noch bestimmbaren Kopplungskonstante von $^4J_{2,P} = 2.5$ Hz detektierbar. Aus dem gleichen Grund finden sich im breitbandenkoppeltem ^{13}C - sowie ^{13}C -Pendant-Spektrum Dublett-Aufspaltungen für das C-1- und C-2-Atom, mit einer geminalen Kopplungskonstante von $^2J_{\text{C-1,P}} \approx 4.6 - 5.9$ Hz sowie einer vicinalen Kopplungskonstante von $^3J_{\text{C-2,P}} \approx 7.4 - 8.1$ Hz für die synthetisierten α -Phosphate. Im Fall der benzylgeschützten Phosphate **17** und **22** ist die Methylengruppe der phosphatseitigen Benzylesterschutzgruppen zusätzlich zum Dublett mit $^2J_{\text{CH}_2,P} \approx 6.1$ Hz aufgespalten. Die beschriebenen zusätzlichen Kopplungen im ^1H - und ^{13}C -Spektrum stellen den experimentellen Nachweis der anomer gebundenen Phosphatgruppe dar, was in Schema 28 und 29 am Beispiel des α -D-Galactopyranosaminyolphosphats **18** anhand der ^1H - und ^{13}C -Spektren veranschaulicht ist. Zusätzlich zur ^1H - und ^{13}C -Spektroskopie bietet sich die ^{31}P -Spektroskopie an, die in ihrer breitbandenkoppelten Variante für die genannten Verbindungen ein für Glykopyranosylmonophosphate typisches Singulett bei einer chemischen Verschiebung zwischen $\delta = -0.26$ bis 2.88 ppm bezogen auf *o*-Phosphorsäure ($\delta = 0$ ppm) lieferte. Entsprechend wird später in Kapitel 4 die erfolgreiche Nukleotidverknüpfung durch Diskriminierung der chemischen Verschiebungen von Mono- und Diphosphaten nachgewiesen.



Die Auswertung der MALDI-TOF-Spektren der komplettgeschützten Phosphate **17** und **22**, den einzigen Verbindungen mit detektierbaren Massen oberhalb 400 m/z, bestätigt zusätzlich das Vorhandensein von Dibenzylphosphatgruppen in beiden Molekülen, und lieferte darüber hinaus unerwartete Erkenntnisse. Neben den erwarteten Molekülmassenpeaks der Kationassoziate $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ konnten bei unterschiedlich induzierter Energie der Messungen noch weitere Spezies beobachtet werden, die sich auf spezifische Zerfallsprozesse zurückführen lassen.



Schema 32: MALDI-TOF identifizierte Fragmentierung der Glykopyranosylazide **17** und **22**

Zum einen ergab die Analyse, daß sich durch Spaltung einer Dibenzylphosphatgruppe Massenpeaks mit $[M - O_2P(OBn)_2]^+$ identifizieren lassen. Dies dürfte mit der Labilität der Anomer-gebundenen Phosphatgruppenbindung und der Stabilität des

aus deren Spaltung hervorgehenden Dibenzylphosphats und des Carboxoniumions einhergehen. Zum anderen lassen die übrigen in Schema 30 und 31 illustrierten Massenpeaks darauf schliessen, daß sich infolge der Eliminierung von Stickstoff die kationassoziierten Molekülspezies $[M - N_2 + K]^+$ und $[M - N_2 + Na]^+$ gebildet haben. Dies entspricht der für die Photoaffinitätsmarkierung relevanten Nitren-Zwischenstufe, welche bedingt durch ihre Kurzlebigkeit in das entsprechende Imin umgelagert ist und wahrscheinlich in dieser Form im MALDI-TOF-Experiment nachgewiesen wurde.

Wesentlich interessanter ist jedoch die Beobachtung von Massenspezies des Typs $[M - O_2P(OBn)_2 - N_2]^+$, für deren Auftreten zwei kompetitive Zerfallsmechanismen zur Diskussion stehen. Nach Schema 32 ist zum einen denkbar, daß sich aus dem Imin-Metallion-Assoziat durch Spaltung einer Dibenzylphosphatgruppe ein Imin-Carboxonium-Ion erzeugt, was durch die Ausbildung einer konjugierten Doppelbindung begünstigt wird. Alternativ lässt sich deuten, daß der Umlagerungsschritt und die Phosphatspaltung in umgekehrter Folge ablaufen, indem der Nitren-Stickstoff selbst die Phosphatgruppenspaltung unter verbrückender Bindung zu einem Aziridinium-Ion bewirkt und schließlich nach Hydridwanderung aus der anomeren Position zum mesomeriestabilisiertem Azirin-Carboxonium-Ion umlagert.

Welcher von beiden Zerfallswegen zur $[M - O_2P(OBn)_2 - N_2]^+$ -Molekülspezies führt oder ob beide Mechanismen miteinander konkurrieren lässt sich schlussendlich nicht aus dem MALDI-TOF-Experiment ableiten.

Zumindest aus Sicht der Photoaffinitätsmarkierung ist letzterer interessant, zumal dieser Mechanismus auf eine durch ein Nitren motivierte Kovalenzbindung hindeuten würde, wenngleich diese intramolekular stattgefunden hätte, was allerdings im Kontext einer nicht-dynamischen Umgebung wie dem umhüllenden Kristallinat einer DHB-Matrix nicht anders zu erwarten wäre.

3.5. Synthese von HexNAc-1-Phosphat-Analoga

Chemoenzymatische Arbeiten von R.F. Sala *et al.*¹⁹³ belegen jüngst, daß in der UDP-HexNAc-Serie die trifluoracetylierte Verbindung UDP-*N*-Trifluoracetylglucosamin erfolgreich durch einen isolierten UDP-GlcNAc-Transferase-Rohextrakt auf ein peptidisches Akzeptorsubstrat übertragen wird. Dagegen erwies sich das entsprechende nicht acylierte UDP-Glucosamin als nicht transferierbar, was u.a. mit seinem Vorliegen in Form eines Ammonium-Ions bei physiologischen pH-Werten begründet wird. Dies deutet darauf hin, daß das Vorhandensein einer Acylamidogruppe in der 2-Position von NDP-Zuckern zumindest kritisch und als erforderliches Erkennungsmerkmal einzustufen ist um durch eine HexNAc-Transferase erkannt und in Form eines modifizierten Acylamidozuckers auf native Akzeptoren übertragen zu werden.

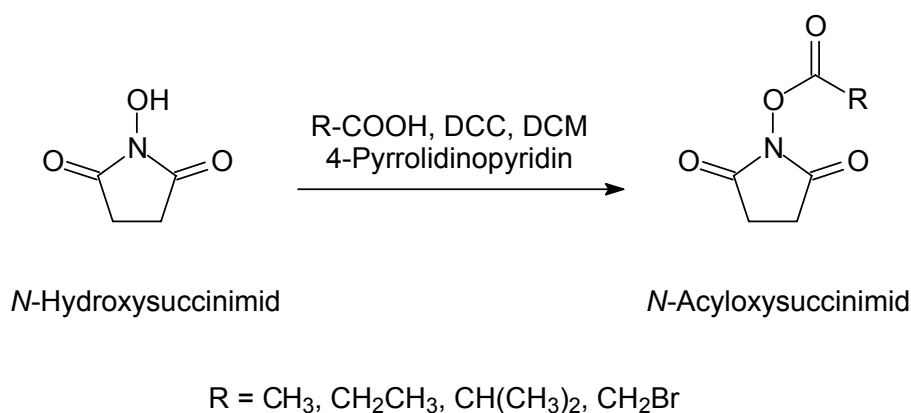
Um UDP-GalNAc-Transferasen in Hinblick auf diese Eigenschaft untersuchen zu können sowie den Zugang zu neuartigen Oligosacchariden mit potentiell bioaktiven Eigenschaften zu eröffnen, wurden im folgenden neben *N*-Acetamido- α -galactopyranosylsylphosphat als Referenzverbindung *N*-Acylamido- α -glykopyranosylphosphate mit *N*-Propionyl-, *N*-Butyryl-, *N*-Isobutyryl-, *N*-(2-Bromacetyl)-, *N*-Formyl- und *N*-(Trifluoracetyl)-Modifizierung synthetisiert und weiterführend in Kapitel 4 chemoenzymatisch und synthetisch in die entsprechenden UDP-Nukleotidzucker-verbindungen überführt.

3.5.1. Selektive *N*-Acylierungen von Glucopyranosaminyl- (18) und Galactopyranosaminyl-1-phosphat (23)

Zunächst wurden die in der selektiven *N*-Acylierung von **18** und **23** eingesetzten *N*-Hydroxysuccinimid-Ester mittlerer Reaktivität nach Schema 33 hergestellt.

Durch Reaktion von Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Isobuttersäure und 2-Bromessigsäure mit *N*-Hydroxysuccinimid nach der Standard DCC-Veresterungsmethode lassen sich die entsprechenden *N*-Acet-, *N*-Propionyl-, *N*-Butyr-, *N*-Isobutyryl-

und *N*-(2-Bromacet)-oxysuccinimid-Ester in guten Ausbeuten zwischen 82 und 91 % nach wahlweise chromatographischer Reinigung oder Kristallisation gewinnen.

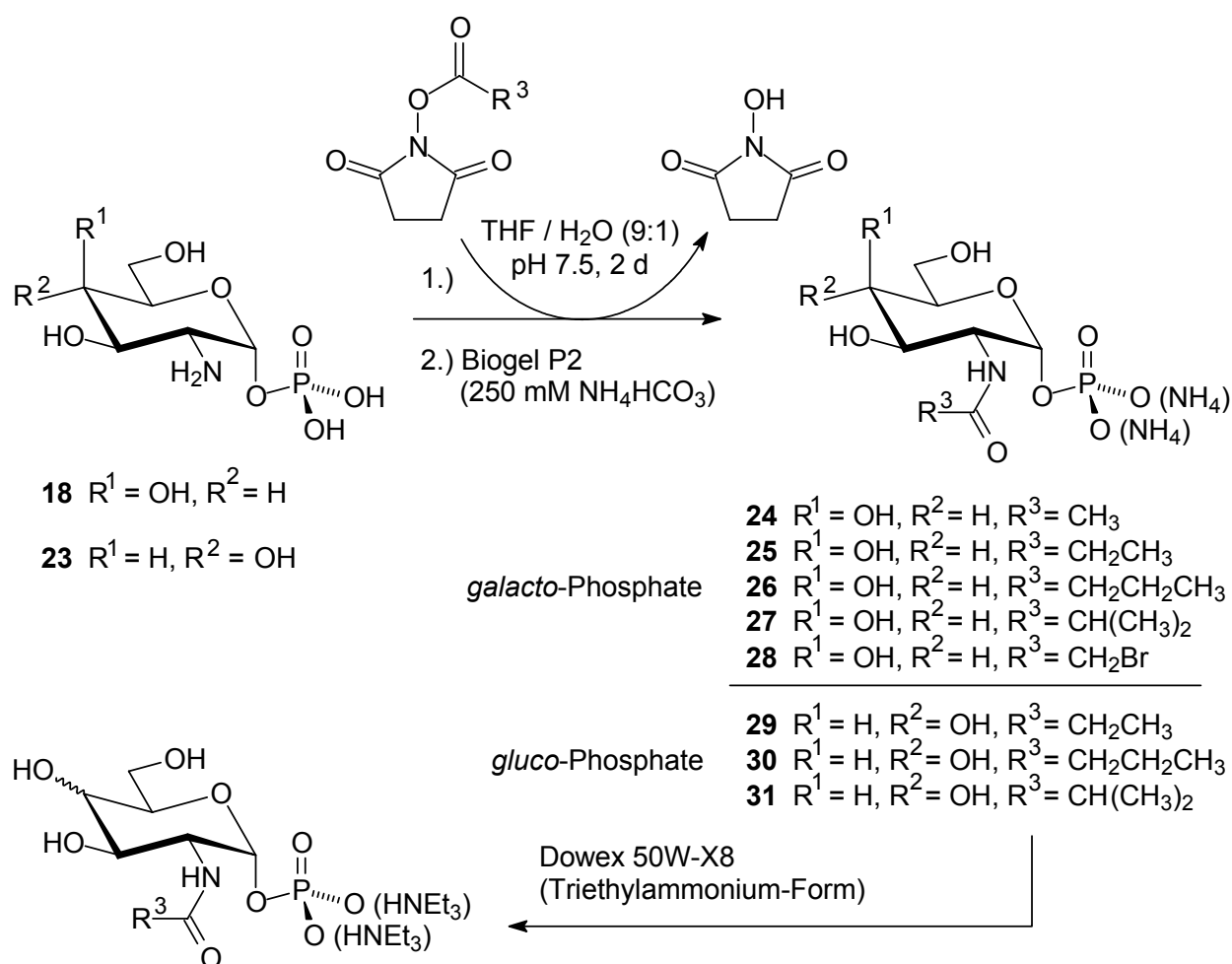


Schema 33: Herstellung der *N*-Hydroxysuccinimid-Ester nach der DCC-Methode

Eingangs wurden der *N*-Acetoxy- und *N*-Propionyl-oxysuccinimid-Ester durch Reaktion von Acetyl- und Propionylchlorid mit *N*-Hydroxysuccinimid in Gegenwart von Triethylamin hergestellt. Diese Veresterung misslang im Falle des *N*-(2-Bromacet)oxysuccinimid-Esters infolge nukleophiler Substitution des Broms durch Triethylamin, so daß im generellen und insbesondere bei elektrophilen Reaktanden die DCC-Kupplungsmethode nach Schema 33 vorzuziehen ist.

Die nachfolgende selektive *N*-Acylierung der Aminophosphate **18** und **23** nach Schema 34 gelang nach Anlösen des polaren Phosphats in wenig Wasser und anschließendem Verdünnen mit THF und der Zugabe des entsprechenden *N*-Acyloxysuccinimid-Esterreagenzes. Als ausbeutekritisch erwies es sich, daß der pH-Wert ca. alle 8 Stunden auf 7.0 – 7.5 nachzustimmen war. Üblicherweise war die Reaktion nach ein bis zwei Tagen ohne weiteres Fortschreiten beendet und lieferte in der *galacto*-Reihe die *N*-Acylamido- α -galactopyranosylphosphate **24** bis **28** und *N*-Acylamido- α -glucopyranosylphosphate **29** bis **31** der *gluco*-Reihe in guten Ausbeuten im Mittel um 85 % nach Größenausschlußchromatographie in Form ihrer Ammoniumsalze, wobei sich die nicht umgesetzten Aminophosphate zurückgewinnen ließen. Durch wahlweise Gefriertrocknung in Gegenwart von 2 Äquivalenten Triethylamin oder durch Elution an einer mit Triethylammoniumchlorid konditionierten Ionenaustauschersäule konnten die so hergestellten α -Phosphate **24** bis

31 in die für eine Nukleotidkupplungs-Reaktion verwendbaren und in organischen Solventien hinreichend gut löslichen Triethylammoniumsalze umgewandelt werden.



Schema 34: Selektive *N*-acylierende Umesterung zu den α -Phosphaten **24** bis **31**

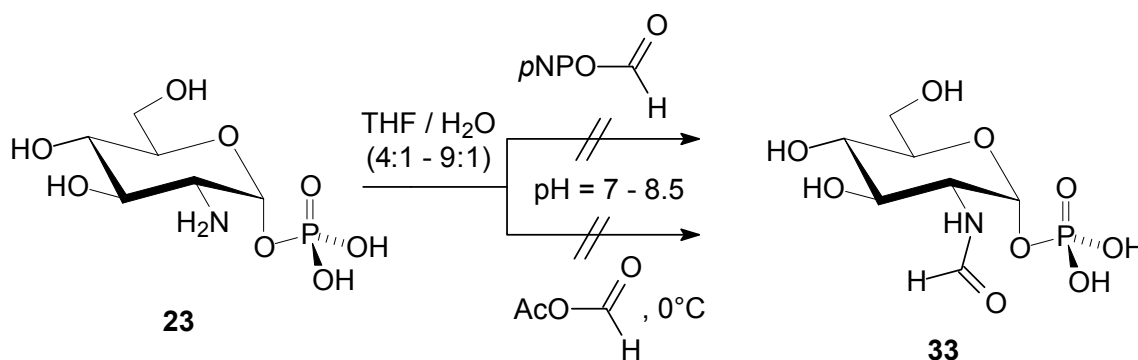
Die selektive *N*-Acylierungs-Methode über *N*-Hydroxysuccinimid-Ester erwies sich als beeindruckend effektiv. Weder wurden unter den sehr milden partiell wässrigen Reaktionsbedingungen dieser Methode die Spaltung von Phosphatgruppen, noch Nebenprodukte, die aus einer *O*-Acylierung der ungeschützten 3-, 4- und 5-Positionen hervorgehen könnten beobachtet. Die bekanntermaßen in wässrigen Medien hydrolyseempfindliche anomergebundene Phosphatgruppe in direkter Nachbarschaft zur 2-Aminogruppe zeigte keinen störenden Einfluß auf den Verlauf der Umesterung. Generell lässt sich daher schließen, daß die aus der Peptidchemie auf Aminoglykoside übertragene *N*-Hydroxysuccinimid-Umesterung auch mit

ungeschützten Aminoglykopyranosylphosphaten kompatibel ist und sehr gute *N*-Selektivität einhergehend mit guten Ausbeuten bietet.

Die α -Phosphate **24** bis **31** beider Konfigurationen zeigten gegenüber den Aminophosphaten **18** und **23** neue ^1H - und ^{13}C -Signale der zusätzlichen Acylamidogruppen und bei $\delta = 0.35$ und 2.9 ppm das Singulett des Phosphorsäuremonoesters im breitbandenkoppeltem ^{31}P -NMR-Spektrum. Darüberhinaus beobachtet man eine lokal auf das H-2 beschränkte relative chemische Tieffeldverschiebung von im Mittel 0.9 bis 1.15 ppm im ^1H -NMR-Spektrum sowie eine am C-2 auftretende mittlere Hochfeldverschiebung von $1.3 - 1.4$ ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum.

3.5.2. Selektive *N*-Formylierung von Glucopyranosaminyl- (**18**) und Galactopyranosaminyl-1-phosphat (**23**)

Die Formylierung einer Aminogruppe wird üblicherweise durch Reaktion desamins mit Ameisensäure und Essigsäureanhydrid erzielt¹⁹⁴. Darüberhinaus sind Methoden unter Verwendung von DCC mit Ameisensäure^{195,196} sowie 3-Methylbutanoylchlorid oder 2,2-Dimethylpropanoylchlorid mit Ameisensäure¹⁹⁷ zur Einführung einer Formylamido-Funktionalität genutzt worden.



Schema 35: *N*-Formylierungsversuche mit *p*-Nitrophenyl- und Acetylformiat

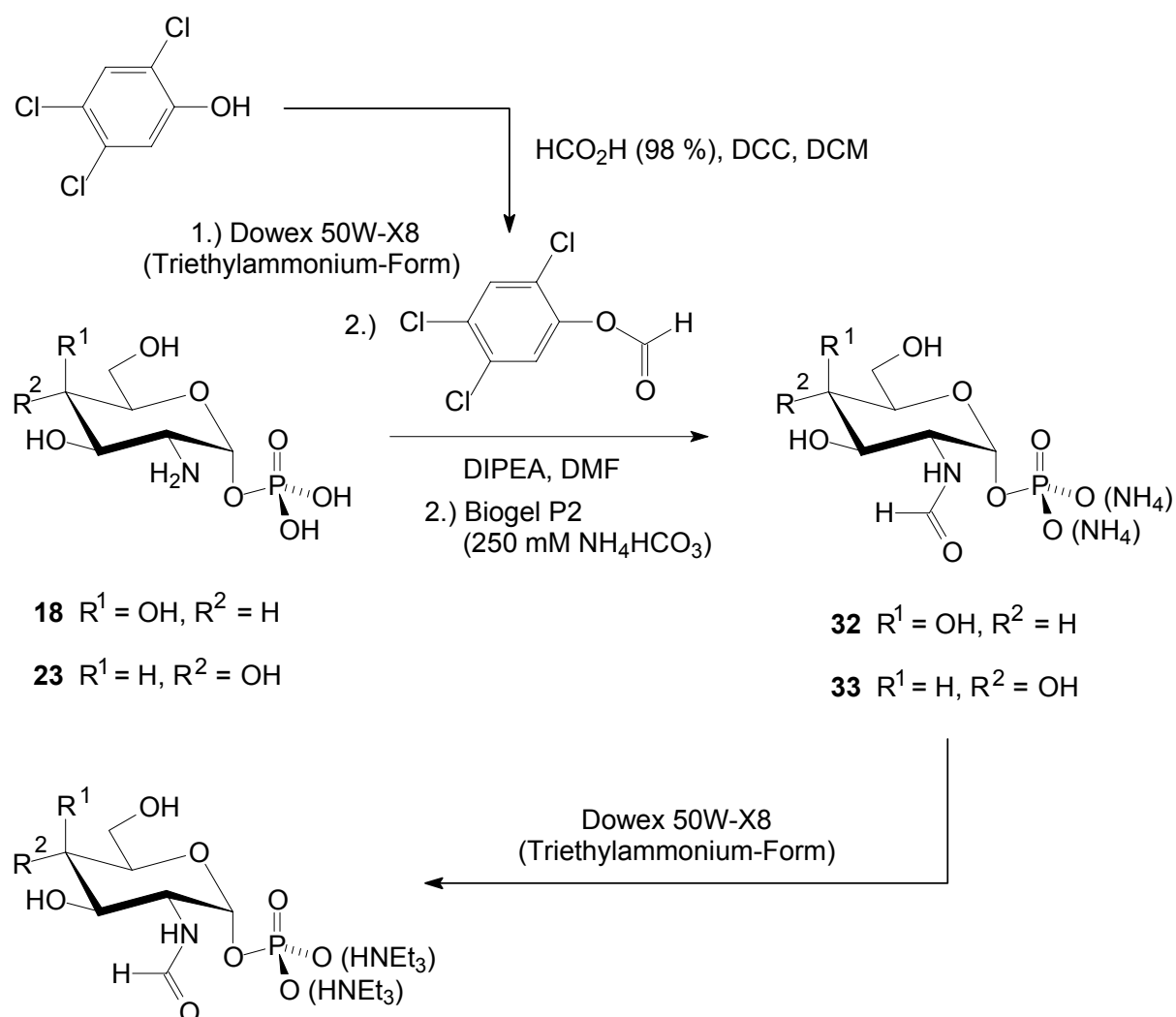
Aufgrund der hohen Reaktivität und Acidität der in diesen Methoden eingesetzten Reagenzien ist eine Eignung für ungeschützte Aminosuckerphosphate praktisch ausgeschlossen, da eine selektive Diskriminierung zwischen der Aminofunktion und den übrigen Hydroxygruppen nicht zu erwarten sowie eine saure Hydrolyse der Phosphatgruppe unter den erwähnten Reaktionsbedingungen mehr als wahrscheinlich ist. Daher wurde neben dem gemischten Anhydrid der Ameisen- und Essigsäure, die Eignung von *p*-Nitrophenylformiat¹⁹⁸ als kommerziell erhältliches Formylierungsreagenz mit verminderter Reaktivität zur selektiven *N*-Formylierung von D-Glucopyranosaminylphosphat **23** untersucht. Nach Schema 35 wurden dabei die Reaktionsbedingungen der bewährten *N*-Acylierungs-Methode über *N*-Hydroxysuccinimid-Ester hinsichtlich des Lösungsmittels und pH-Wertes weitgehend beibehalten. Das gemischte Anhydrid, welches sowohl die Hydroxygruppen neben der Aminofunktion formylierte und auch acetylierte, erwies sich selbst bis zum Gefrierpunkt als zu reaktiv. Dagegen zeigte *p*-Nitrophenylformiat bis zu einem pH-Wert von 8.5 keine Reaktion, obgleich das Aminophosphat **23** unter diesen Bedingungen in Form des unprotonierten freienamins vorliegt.

Nach J. Martinez und J. Laur¹⁷⁴ gelang im Rahmen der Untersuchung von Formylierungsreagenzien die Herstellung von *N*-formylierten Aminosäure-Estern und Formylpeptiden mit 2,4,5-Trichlorphenylformiat unter sehr milden Reaktionsbedingungen. Das durch DCC-Kupplung aus 2,4,5-Trichlorphenol mit Ameisensäure in nach Umkristallisation 44 % Ausbeute hergestellte 2,4,5-Trichlorphenylformiat wurde nach Schema 36 jeweils zusammen mit den beiden α -Hexosaminylphosphaten **18** und **23** einer selektiven *N*-Formylierung unterworfen.

Dabei gelang die Synthese der beiden *N*-Formylamido- α -glykopyranosylphosphate **32** und **33** abweichend von den Bedingungen der *N*-Hydroxysuccinimid-Ester-Methode in DMF-Lösung in Gegenwart von Diisopropylethylamin (DIPEA) in vergleichbaren Ausbeuten von 81 % bzw. 78 % nach Größenauschlusschromatographischer Aufarbeitung und abschließender Überführung in die Triethylammoniumsalze mittels konditionierter Ionenaustauschchromatographie.

Um die Aminophosphate **18** und **23** in eine DMF-lösliche Form zu bringen, sind diese vor der Formylierungs-Reaktion in einem zusätzlichen Schritt ebenfalls in Triethylammoniumsalze überführt worden.

Dies erwies sich als unumgänglich, da es nicht gelang das 2,4,5-Trichlorphenylformiat im Lösungsmittelgemisch THF / Wasser zur Lösung zu bringen.



Schema 36: Selektive N-Formylierung der Hexopyranosaminylphosphate **18** und **23**

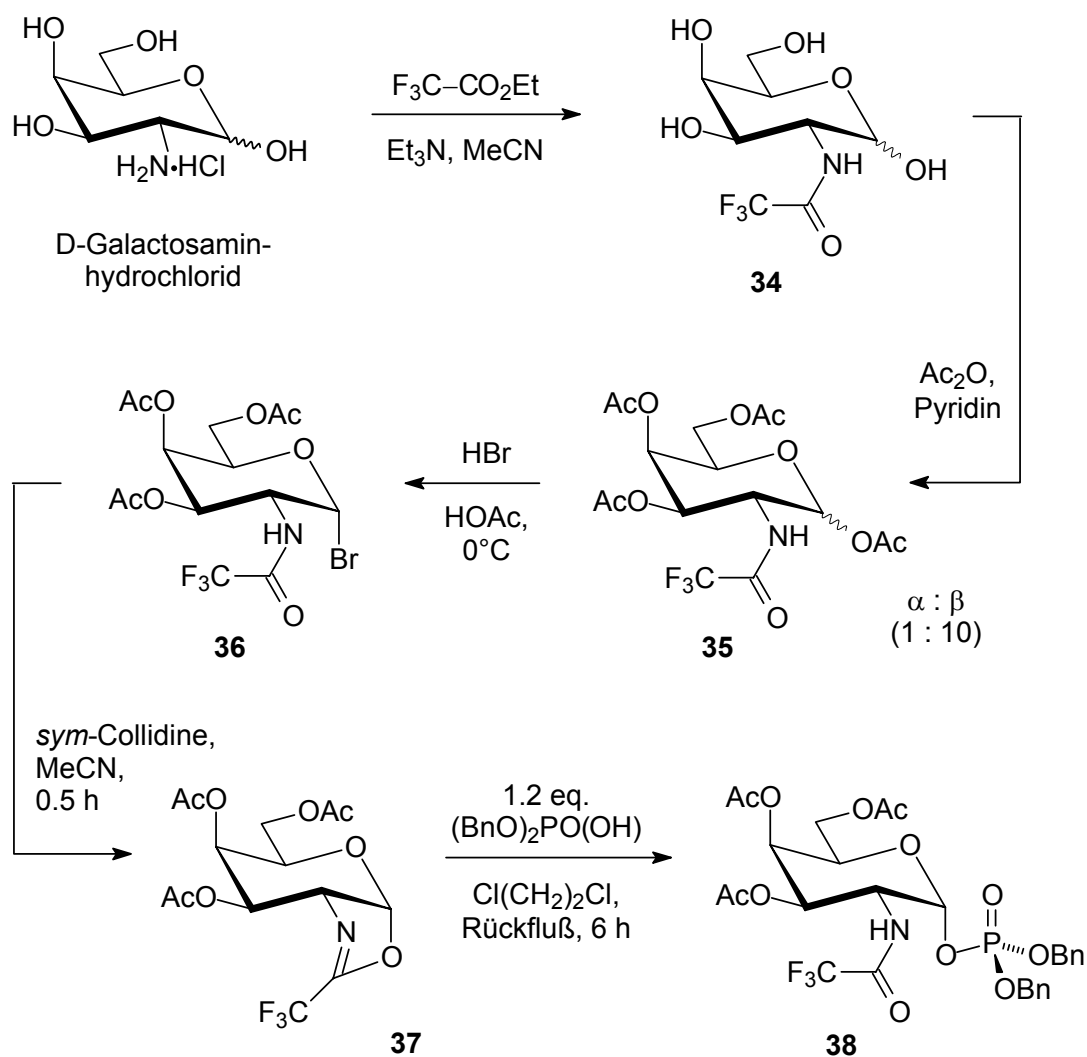
Die carbonylische Formylamidogruppe erkennt man im ^{13}C -Pendant-NMR-Spektrum an dem Auftreten eines bei 168 ppm detektierbaren quarternären Singulets, während sich im ^1H -NMR-Spektrum infolge rascher Deuterierung in D_2O bis auf die für 2-Acylamidogruppen genannten relativen Verschiebungen kein direkter Hinweis findet.

3.5.3. Synthese von *N*-Trifluoracetamido- α -galactopyranosylphosphat (40)

Wie einleitend zu diesem Kapitel erwähnt, gelangen R.F. Sala *et al.*¹⁹³ 1997 durch die Synthese von *N*-Trifluoracetamido- α -glucopyranosaminyolphosphat und weiterführend zu dessen Leloir-Transferasedonor-Analogon in Form des entsprechenden UDP-Nukleotidzuckers (UDP-GlcNAc-F₃) die Übertragung des trifluorierten Monosaccharidbausteins auf Proteine. Demnach ließ sich UDP-GlcNAc-F₃ als Donorsubstrat für die 'core 2'-GlcNAc-Transferase, die an der Biosynthese O-verbrückter Glykoproteine beteiligt ist, und für die GlcNAc-Transferase V, einem Schlüsselenzym welches das Verzweigungsmuster komplexer Asn-gebundener Oligosaccharide auf Zell-Oberflächen kontrolliert, erfolgreich einsetzen¹⁹³.

R.F. Sala *et al.* beschreiben die Synthese des *N*-Trifluoracetamido- α -glucopyranosaminyolphosphats im Phosphatierungsschritt zum einen nach der MacDonalds-Variante mit *o*-Phosphorsäure aus einer anomer acetylierten Zuckervorstufe in 27 % Ausbeute. Außerdem berichten sie über die Umsetzung einer an der anomeren Position entschützten Glucovorstufe durch Phosphatierung mit Diphenylphosphochloridat als Phosphorylierungsreagenz. Wie bereits erwähnt besteht ein Nachteil der MacDonalds-Phosphatierung generell in sehr geringen Ausbeuten und einem hohen Aufarbeitungsaufwand beim Isolieren des phosphatierten Produktes. Dem gegenüber ist die Akzeptorvariante mit Diphenylphosphochloridat im Vergleich zur alternativ anwendbaren Phosphoramidit-Methode zumindest im Phosphatierungsschritt preiswerter. Dieser Vorteil wird jedoch durch die Erfordernis von Platin(IV)-oxid als Hydrogenierungskatalysator zur Entfernung der Phenylesterschutzgruppen kompensiert. Zudem bedarf die Entschützung eines hohen Wasserstoffdrucks, d.h. der Notwendigkeit einer Autoklavierung. Die Bildung von Cyclohexylphosphorsäureestern als Nebenprodukte durch konkurrierende Phenyl-ringhydrierung ist ein weiterer Nachteil dieser Methode und macht u.U. einen weiteren Reinigungsschritt erforderlich. Unter Umgehung der aufgeführten Nachteile wurde das α -Phosphat von *N*-Trifluoracetamidogalactopyranosamin ausgehend von Galactosamin und unter Anwendung der preiswertesten Donor-Phosphatierung mit Dibenzylphosphat als Phosphorylierungsreagenz in möglichst wenigen Synthese- und Reinigungsschritten nach Schema 37 anomenenrein synthetisiert.

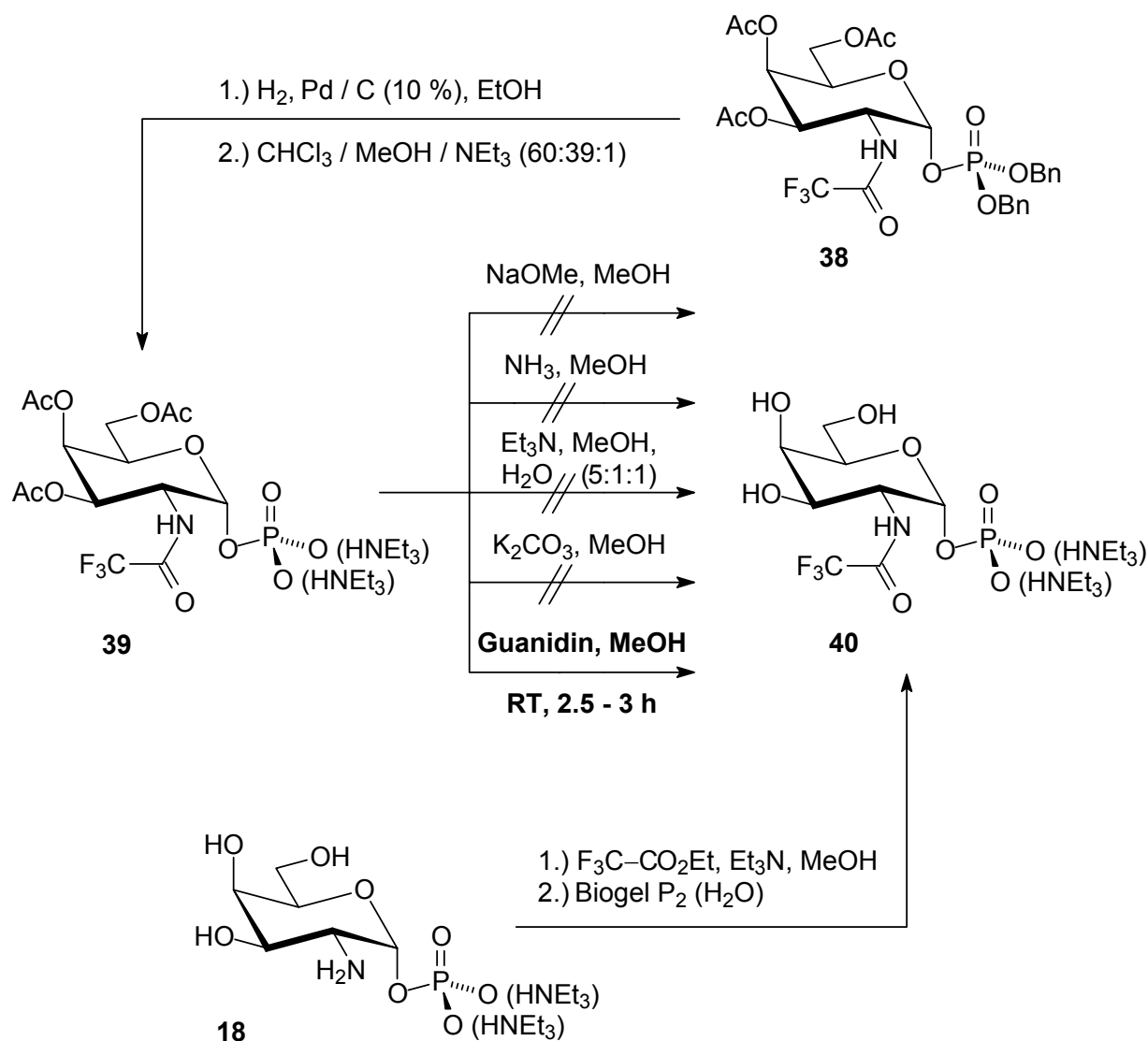
Dazu wurde das Hydrochlorid von D-Galactosamin nach M. Shiozaki *et al.*¹⁹⁹ unter sehr milden Bedingungen mit dem hoch elektrophilem Ethyltrifluoracetat in einer Acetonitril-Suspension in Gegenwart von Triethylamin selektiv an der Aminofunktion trifluoracetyliert. Diese Methode stellt eine wesentliche Vereinfachung in der Reaktionsführung gegenüber der *N*-Trifluoracetylierung von J. Bertho *et al.*²⁰⁰ durch Reaktion mit Trifluoressigsäureanhydrid bei 0°C im schwerer entfernbarem DMF dar.



Schema 37: Synthese des acetyl- und benzylestergeschützten Trifluoracetamido- α -galactopyranosylphosphats **38** über das Oxazolin **37**

Ohne reinigende Aufarbeitung von **34** wurden nach Entfernen des Acetonitrils mit Essigsäureanhydrid in Pyridin die übrigen vier Hydroxygruppen acetyliert und das Acetat **35** im Anomerenverhältnis $\alpha : \beta \approx 1 : 10$ in über beide Schritte quantitativer

Ausbeute gewonnen. Die nachfolgende Umsetzung zum α -Bromid **36** erfolgte unter altbewährten Standard-Bedingungen mit Bromwasserstoff-gesättigtem Eisessig bei 0°C ²⁰¹. Das Bromid **36** stellt für gewöhnlich einen Phosphorylierungs-Donor für die nachfolgende Einführung einer Phosphatgruppe dar.



Schema 38: Entschützung zum Trifluoracetamido- α -galactopyranosylphosphat **40** und alternativer Reaktionsweg durch selektive *N*-Trifluoracetylierung von **18**

Um eine Isolierung dieses empfindlichen Bromids mittels chromatographischer Reinigung oder Kristallisation zu umgehen wurde es ohne Aufarbeitung und in rohem Zustand durch kurze Behandlung mit der sperrigen Base *sym*-Collidin in Acetonitril in die trifluorierte Oxazolin-Verbindung **37** in 37 % Ausbeute überführt.

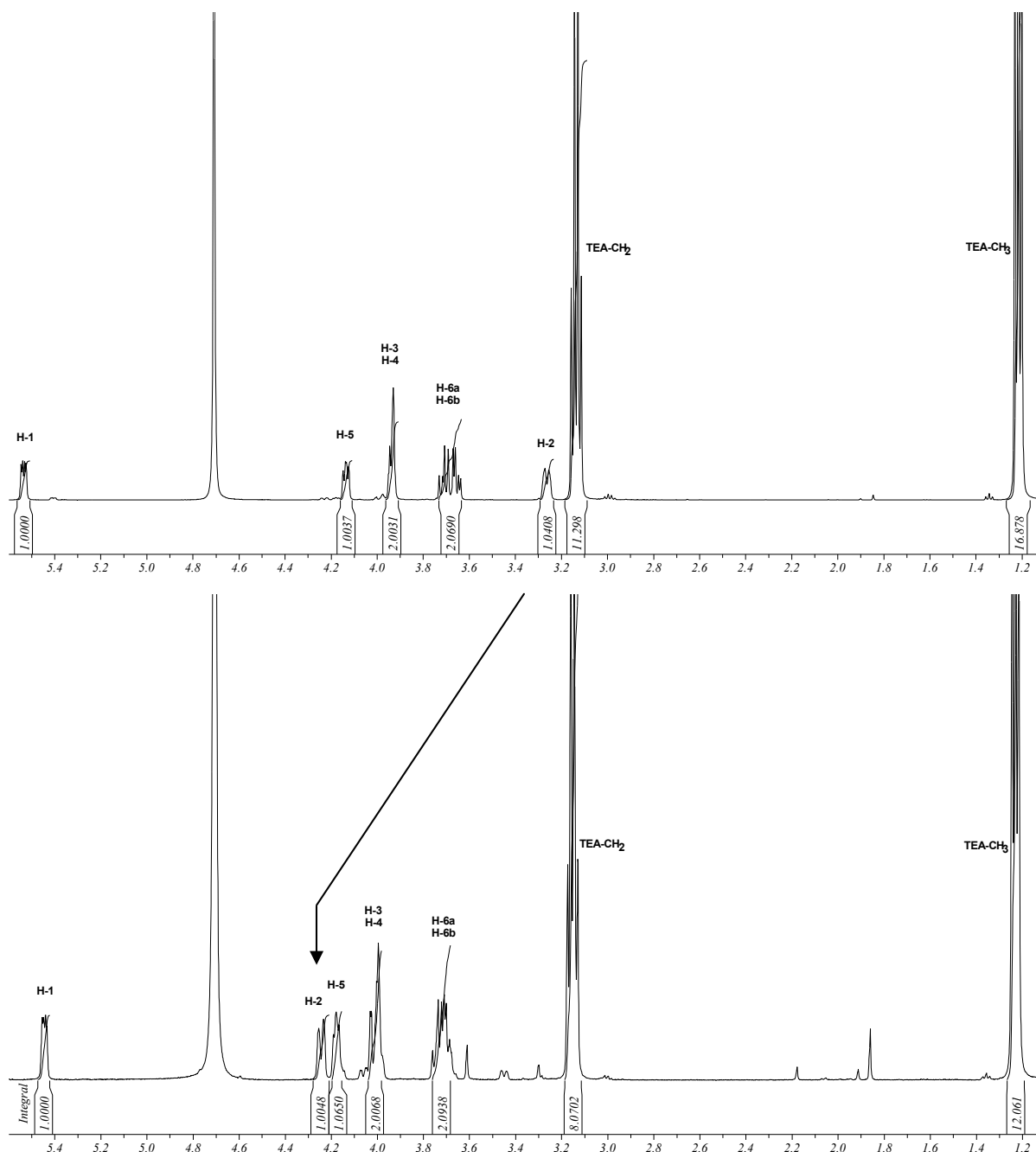
An dem gereinigten Oxazolin **37** wurde mit einem Überschuß von 1.2 Äquivalenten Dibenzylphosphat das anomenreine α -Phosphat **38** in 54 % Ausbeute unter Rückflußbedingungen in Ethylendichlorid-Lösung hergestellt. Zunächst bildete sich aus dem Oxazolin erwartungsgemäß das β -Phosphat, welches unter den gegebenen Bedingungen einer thermodynamisch kontrollierten Reaktionsführung zum α -Phosphat **38** isomerisierte. Zu diesem Zweck wurde ein 20 %-iger Dibenzylphosphatüberschuß eingesetzt und anstelle von Dichlormethan das mit 100°C deutlich höher siedende Ethylendichlorid verwendet um die Isomerisierung vom kinetischen β -Phosphat zum thermodynamisch favorisierten α -Phosphat zu bewirken. Nach 6 Stunden ließ sich kein Oxazolin mehr detektieren und neben den 54 % anomenreinem α -Phosphat ließ sich kein β -Phosphat beobachten.

Die Entschützung von **38** erfolgte zunächst an den Benzylestern der Phosphatgruppe durch Palladium-katalysierte Hydrogenolyse bei Normaldruck in 64 % Ausbeute nach Elution an einem Gemisch von 1 %-igem Triethylamin in methanolischem Chloroform. Dabei wurde direkt das Triethylammoniumsalz von **39** erhalten. Die abschließende Entschützung durch Deacetylierung an den Positionen 3, 4 und 6 gestaltete sich unerwarteterweise problematisch, zumal die Standard-Verfahren nach Zemplén, sowie die methanolischen Lösungen von Ammoniak, Triethylamin und von Metallcarbonat-Suspensionen versagten und es zu einer vorzeitigen Phosphatgruppen- sowie auch Trifluoracetylgruppen-Spaltung in **39** kam.

Einzig die Deacetylierung nach J. Poisson²⁰² mit methanolischer Guanidin-Lösung gelang in 88 % Ausbeute, wobei spätestens nach drei Stunden optimierter Reaktionsdauer durch Neutralisation mit salzsaurer Lösung abubrechen war um eine zu weit fortschreitende Phosphatgruppenspaltung zu verhindern. Die Neutralisierung erwies sich als zwingend erforderlich, da es andernfalls im Rahmen der Aufarbeitung zu einer kompletten Entfernung der im basischen labilen Trifluoracetylgruppe kommt.

Nach Abschluß dieses Syntheseweges gelang überraschenderweise die direkte Trifluoracetylierung des Aminogalactopyranosylphosphats **18** in Form des Triethylammoniumsalzes mit Ethyltrifluoacetat in hervorragender 97 %-iger Ausbeute. Dies entkräftet den in Schema 37 und 38 dargelegten Syntheseweg über ein Oxazolin als

Phosphorylierungsdonor, für den sich die Diastereoselektivität des Phosphatierungsschritts steuern lässt, keineswegs. Es ist zu berücksichtigen, daß sich auf diese Weise in kurzer Zeit und mit nur insgesamt drei Reinigungsschritten α -GalNAc-1-P und daraus weiterführend UDP-GalNAc effizienter herstellen lassen als über die MacDonalds-Phosphatierung oder ein beliebiges anderes Akzeptor-Verfahren.



Schema 39 und 40: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrenvergleich der Triethylammoniumsalze von GalN-1-P (**18**) und dem Trifluoroacetamido- α -phosphat **40** ($^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, D_2O)

So ist die Route über das Oxazolin im Falle von α -GalNAc-1-P der in Kapitel 3.5.1. unter Schema 34 vorgestellten *N*-Acylierungs-Methode mittels eines *N*-Acetoxy-succinimid-Esters in Hinblick auf die Zahl an Syntheseschritten und den Zeitaufwand überlegen. Die *N*-Hydroxysuccinimid-Ester-Methode rechtfertigt sich lediglich für die Synthese von unnatürlichen Acylamidozuckerphosphaten und das nach dieser Methode als Referenzderivat synthetisierte α -GalNAc-1-P **24**.

Die Charakterisierung des trifluorierten α -GalNAc-Phosphats **40** sowie der übrigen trifluorierten und teils phosphatierten Vorstufen **35** bis **39** erfolgte zum einen durch Heteroatom-NMR-Spektroskopie. Beim ^{31}P -NMR, ergab sich je ein Singulett zwischen $\delta = -3$ und -1 ppm für die drei anomeren α -phosphatierten Verbindungen und im breitbandenkoppelten ^{19}F -NMR-Spektrum für das Oxazolin **37** zeigte sich ein Singulett bei $\delta = -71.5$ ppm und für die übrigen trifluorierten Derivate ein Singulett um $\delta = -75$ bis -76 ppm lieferte. Da beide Hetero-NMR-Spektroskopie-Methoden keine Informationen über die Konnektivität der Phosphat- bzw. Trifluoracetylgruppe zum Monosaccharid lieferten, wurde dafür das ^1H -NMR-Spektrum herangezogen.

Neben der bereits erwähnten zusätzlichen Dublett-Aufspaltungen des anomeren Protons zum dd-System mit Kopplungskonstanten $^3J_{1,\text{P}} = 7.1$ Hz und 7.3 Hz für **39** und **40** zeigt ferner die Gegenüberstellung der in D_2O aufgenommenen Spektren der Triethylammoniumsalze des Aminophosphats **18** und dessen *N*-trifluoracetyliertem Analogon **40** (Schema 39 und 40) eine lediglich auf das H-2 beschränkte sehr ausgeprägte Tieffeldverschiebung von einer ganzen ppm-Einheit, die sich auf die stark abschirmende Wirkung der drei Fluoratome zurückführen lässt. Die entsprechende Tieffeldverschiebung im ^{13}C -NMR von 51.7 ppm auf 52.7 ppm für das C-2-Atom fällt hingegen relativ moderat aus.

Das MALDI-TOF-Spektrum des dibenzylestergeschützten Phosphats **38** lieferte lediglich die Massenpeaks 700 $[\text{M} + \text{K}]^+$ und 684 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Dagegen wurden im Vergleich zu den geschützten Azidophosphaten **17** und **22** keine $[\text{M} - (\text{BnO})_2\text{PO}_2]^+$ Kationenspezies oder andere Zerfallsprodukte detektiert.

Die in Schema 39 und 40 abgebildeten ^1H -NMR-Spektren lieferten zudem den Anlaß zur Untersuchung einer bislang in der Literatur unerwähnt gebliebenen Beobachtung

über die Verteilung der Ammonium-Gegenionen. So wurde festgestellt, daß lediglich die Amino- α -phosphate **18** und **23** tatsächlich in Form von Bis(triethylammonium)-Salzen isolierbar sind, während sämtliche *N*-Acylamidophosphat-Verbindungen, wie am Beispiel des ^1H -NMR-Spektrums des *N*-trifluoracetylierten Derivats **40** in Schema 41 ersichtlich, ein Verhältnis von Phosphat-Ion zu Triethylammonium-Ionen von näherungsweise 1 : 1.3 bis 1 : 1.5 feststellbar ist. Literaturangaben die Mono- und Bis- (mono- oder trialkylammonium)-Gegenionen implizieren sind demzufolge mangels kritischer Untersuchung dieser Verbindungen inkorrekt und führen im Falle hochalkylierter und massereicher Gegenionen zu verfälschten Einwaagen und Ausbeuten. Aus diesem Grund sind die in dieser Arbeit bis auf zwei Ausnahmen (**39** und **40**) synthetisierten Glykopyranosyl- α -phosphate wie auch später in Kapitel 4 die entsprechenden Nucleotidzucker entweder in Form der freien Säure oder ihrer Ammoniumsalze charakterisiert worden, um den durch die unbestimmte Gegenion-Verteilung eingeschleppten statistischen Fehler weitmöglich gering zu halten.

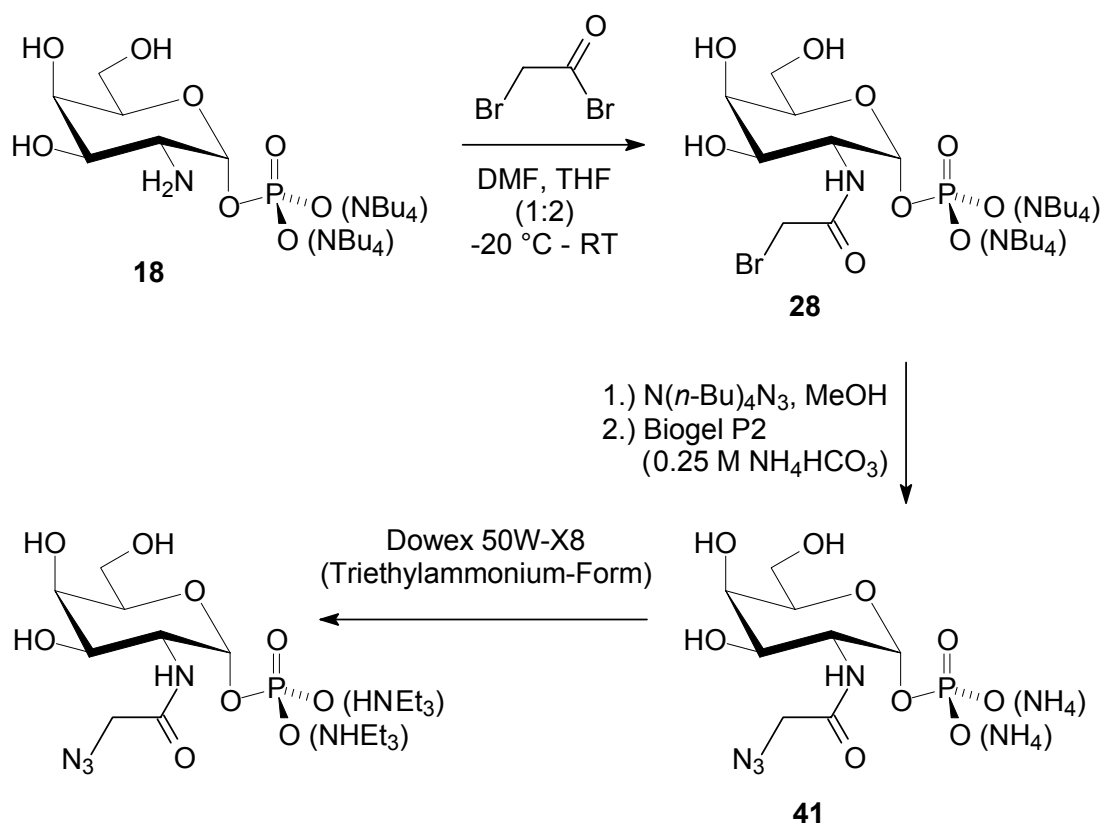
3.6. Azid- und Diazirin-modifizierte HexNAc-1-Phosphat-Analoga

Aufbauend auf den Methoden und Erkenntnissen des vorhergehenden Kapitels wird an dieser Stelle die Synthese von *N*-Acetamido- α -galactopyranosaminylphosphat-Analoga mit photosensitiven Substituenten beschrieben, die Nitrene oder Carbene unter photolytischen Bedingungen freisetzen können.

3.6.1. Synthese von (2-Azidoacetamido)- α -galactopyranosaminylphosphat (41)

Nach Bertozzi *et al.*^{203,204} ist ausgehend vom Hydrochlorid des D-Mannosamins ein Syntheseweg zu Azido-Derivaten des *N*-Acetylmannosamins beschrieben, in dessen Verlauf zunächst die Aminogruppe mit Iodessigsäureanhydrid iodacetyliert wird und anschließend die sehr knappe und effiziente Synthesesequenz durch eine nukleophile Substitution des Iods mit Natriumazid ihren Abschluß findet. Mit dem wesentlich preiswerterem Anhydrid der Chloressigsäure gelang jedoch der

abschließende Substitutionsschritt unter Einführung der Azidogruppe nicht, so daß nach wie vor die Notwendigkeit des sehr teuren Iodessigsäureanhydrids die Effizienz schmälert. Während ein reaktiv dazwischenliegendes Bromessigsäureanhydrid nicht kommerziell erhältlich und folglich nicht untersucht werden konnte, ist die potentielle Verwendbarkeit des sehr preiswerten 2-Bromacetyl bromid, mit zwei sehr unterschiedlich elektrophilen C-Atomen, durch Bertozzi *et al.* offenbar übersehen worden. Hier soll versucht werden diesen Ansatz auf das Galactopyranosaminyl-1-phosphat **18** zu übertragen.



Schema 41: Syntheseweg zum Azido-Analogen **41** von α -GalNAc-1-P

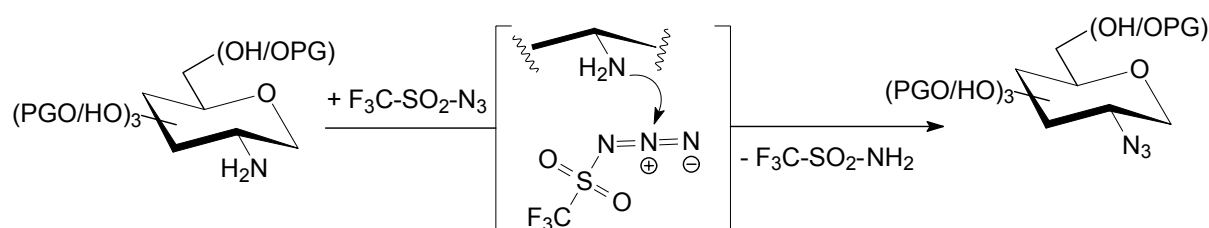
Dabei gelang gemäß Reaktionsschema 41 die Synthese des entsprechenden *N*-bromacetylierten α -Phosphats **28**, welches zuvor in Kapitel 3.5.1 nach der *N*-Hydroxysuccinimid-Ester-Methode mit 82 % Ausbeute erhalten wurde, in 45 % Ausbeute. Die Reaktionsführung dieses selektiven *N*-Acetylierungsschritts wurde dahingehend optimiert, daß durch einen geringfügigen Unterschuß von 0.8 Äquivalenten an α -Bromacetyl bromid bei -20 °C die konkurrierende *O*-Bromacetylierung größtenteils zurückgedrängt werden konnte.

Da ein wässriges Medium angesichts der Reaktivität des Bromreagenzes nicht zulässig ist und zu seiner Hydrolyse sowie der der Phosphatgruppe führt, wurde das Aminophosphat **18** in Form des organisch löslichen Bis(tetrabutylammonium)-Salzes dieser Reaktion unterworfen und erwies sich in dieser Form als sehr geeignet.

Da die Azid-Substitution des entsprechenden iodierten Derivats bekanntermaßen gut und an der chlorierten Verbindung nicht funktionierte, wurde für das 2-Brom-acetylierte α -Phosphat **28** anstelle von Natriumazid das in Methanol lösliche und infolgedessen besser nukleophile Tetrabutylammoniumazid verwendet und lieferte das Azido-Analogon **41** von α -GalNAc-1-P in einer guten Ausbeute von 63 %, gefolgt von der Reinigung und Konversion dieser Verbindung zum Triethylammonium-Salz.

3.6.2. Synthese der 2-Azidohexopyranosaminyolphosphate **42** und **43**

In der Reihe der Azido-Analoga wurden zusätzlich die 2-Desoxy-2-azido-Derivate des α -Glucopyranosyl- und α -Galactopyranosylphosphats hergestellt. Zwar könnten sich diese aus entsprechend *manno*- und *talo*-konfigurierten und an der 2-Position mit einer Abgangsgruppe versehenen Vorstufen durch Substitution mit Natriumazid erzeugen, dies hätte jedoch ein Abweichen der ursprünglich eingeschlagenen Syntheseroute 2 nach Schema 21 über die bereits beschriebenen Schlüssel-Intermediate **18** und **23** zur Folge, deren Verwendung in dieser Hinsicht ebenfalls untersucht wurde.

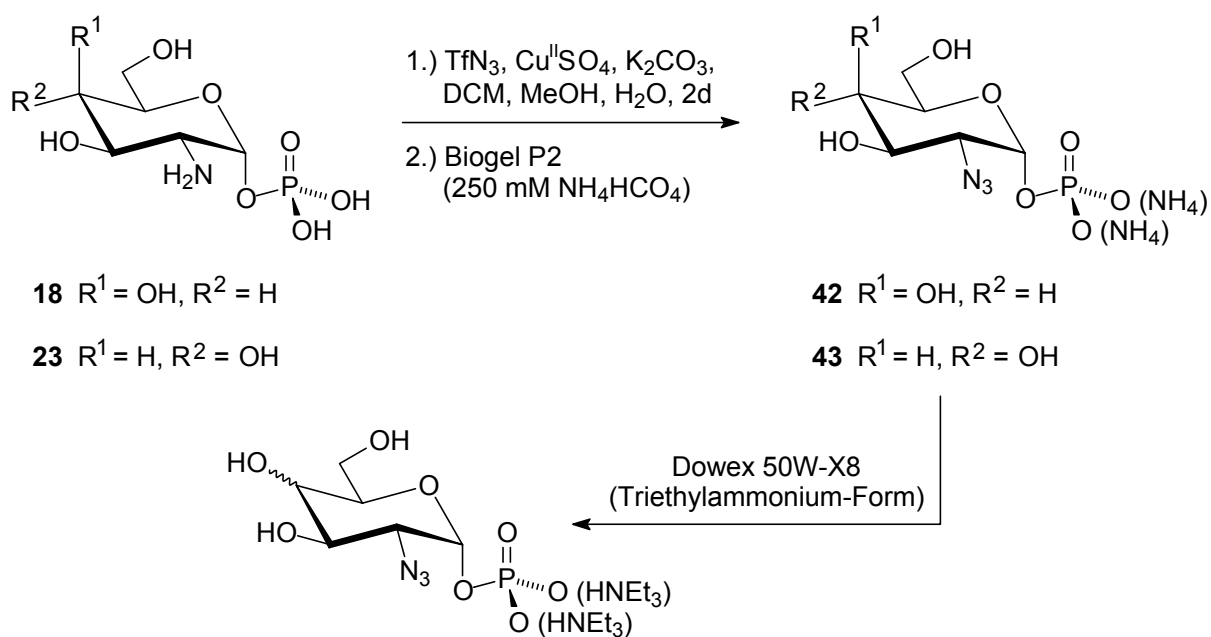


Schema 42: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der Diazotransfer-Reaktion

Nach Vasella *et al.*¹⁷⁵ und Wong *et al.*¹⁷⁶ gelingt in Aminozuckern die Überführung einer Aminogruppe in eine Azidogruppe unter Retention und damit unter Erhalt der ursprünglichen Zuckerkonfiguration in einer durch Metal(II)-Ionen katalysierten

Diazotransfer-Reaktion mit Trifluormethansulfonylazid (Triflylazid) als Azid-Donor-Reagenz unter basischen Reaktionsbedingungen.

Letztere sind erforderlich um die Aminofunktion als freies Amin vorliegen zu haben. Wenngleich die Arbeiten von Vasella und Wong sowie Folgearbeiten keinen Hinweis auf den mechanistischen Verlauf der Diazotransfer-Reaktion liefern, lässt sich zumindest auf der Grundlage der experimentellen Befunde der nach Schema 42 vorgeschlagene Reaktionsmechanismus diskutieren. Danach greift die freie Aminofunktion des Aminozuckers den mittleren Stickstoff am Triflylazid nukleophil an, und nach Freisetzung von Triflylamin wird die neue Azidogruppe generiert. Dieser Mechanismus steht zumindest mit den elektronischen Begebenheiten der Azidogruppe im Triflylazid und der Beobachtung des retentiven Reaktionsverlaufs unter Konfigurationserhalt des erzeugten Azidozuckers im Einklang.



Schema 43: Diazotransfer an anomer phosphatierten Hexopyranosylaminen

Die Amino- α -hexopyranosylphosphate **18** und **23** wurden in einer Suspension von wässrigem und methanolischem Dichlormethan in Gegenwart von Kupfer(II)-sulfat, Kaliumcarbonat und frisch hergestelltem Triflylazid zur Reaktion gebracht. Dabei wurden **18** und **23** in Form ihrer freien Säuren eingesetzt, da sie in organisch löslicher Form ihrer Bis(triethylammonium)- oder Bis-(tetrabutylammonium)-Salze aufgrund der dadurch zusätzlich in die Reaktion eingebrachten Aminogruppen

möglicherweise nicht verwendbar sind. Dennoch gelang aus der Suspension heraus die Herstellung der entsprechenden 2-Desoxy-2-azido-Derivate **42** und **43** in erstaunlich guten Ausbeuten von 59 % bzw. 63 %. Dies stellt den ersten Literaturbeschriebenen Diazotransfer an vollständig ungeschützten Aminoglykopyranosylphosphaten dar. Abschließend wurden **42** und **43** in die für eine Morpholidat-Kupplung kompatible Triethylammonium-Form überführt.

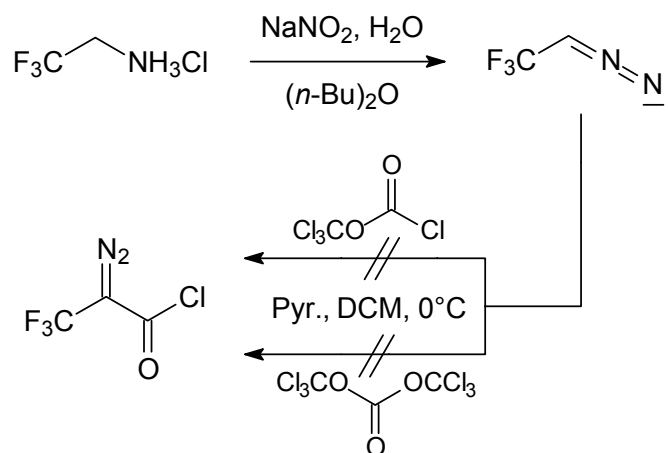
Das Anwesenheit einer Azidogruppe in den Verbindungen **41** bis **43** wurde durch den IR- spektroskopischen Befund einer Absorptionsbande um $\nu \approx 2087 \text{ cm}^{-1}$ bestätigt. Im ^{13}C -NMR-Spektrum zeigen die synthetisierten Azidophosphate **42** und **43** neben den bereits erläuterten Merkmalen einer α -anomer gebundenen Phosphatgruppe ($^3J_{1,P} = 7.6$ und 7.9 Hz ; ^{31}P -NMR: $\delta \approx -0.25 \text{ ppm}$), zusätzlich eine mittlere chemische Tieffeldverschiebung um 10 ppm für das an die Azidogruppe gebundene C-2-Atom verglichen mit dem in den analogen Amino-Vorstufen **18** und **23** (siehe in diesem Zusammenhang Schema 56 und 57 in Kap. 4.3).

3.6.3. Synthese diazirinmodifizierter GalNAc-1-Phosphat-Analoga

Um die Möglichkeit der Photoaffinitätsmarkierung von UDP-GalNAc-Transferasen zu eröffnen sind Syntheseveruche zur Herstellung eines geeigneten auf Diazo- und Diazirinverbindungen basierenden Photoaffinitäts-Labels in Form eines Essigsäure- und Propionsäure-Esters unternommen worden. Dieser sollte nach der bereits vielfach ausgeführten Methode der selektiven *N*-Acylierung in das 2-Amino- α -galactopyranosylphosphat **18** als Struktur analogon des für die Erkennung durch Transferasen erforderlichen 2-Acetamido-Strukturelements eingeführt werden und so zu einem photosensitivem α -GalNAc-1-Phosphat-Mimetikum führen.

Zunächst wurde versucht ein Photoaffinitäts-Label auf der Grundlage eines kurzkettigen mit einer Diazogruppe bestückten Esters über die Herstellung einer entsprechenden Säurechlorid-Vorstufe zu synthetisieren. Nach Westheimer gelingt die Herstellung von 2-Diazo-3,3,3-trifluorpropionsäurechlorid nach Diazotierung von

2,2,2-Trifluorethan und anschließender C-C-verknüpfender Umsetzung mit Phosgen¹⁰⁹.

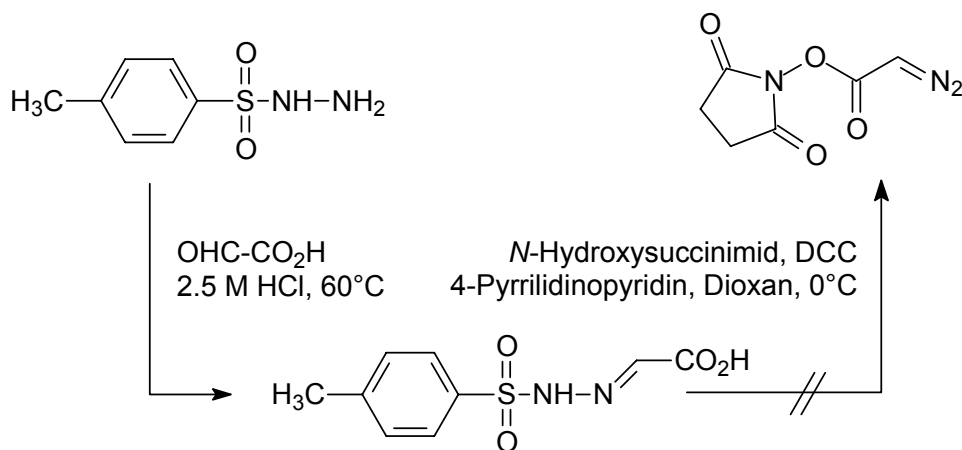


Schema 44: Versuche zur Darstellung von 2-Diazo-3,3,3-trifluorpropionsäurechlorid

Die Herstellung von 2-Diazo-trifluorethan gelang nach Reaktion des Hydrochlorids von Trifluorethan mit Natriumnitrit in salzsaurer Lösung von Dibutylether. Das gasförmige wie potentiell explosive gelbe Gas ließ sich nach Destillation aus dieser Lösung durch Kondensation in einer Kühlfalle bei -79°C isolieren und sogar erstmals in einer schnellen Messung durch ^{19}F -NMR-Spektroskopie charakterisieren (^{19}F -NMR, 470 MHz, C_6D_6 : $\delta = -55.8$ ppm, dublett, $^3J_{\text{F,H}} = 4.6$ Hz).

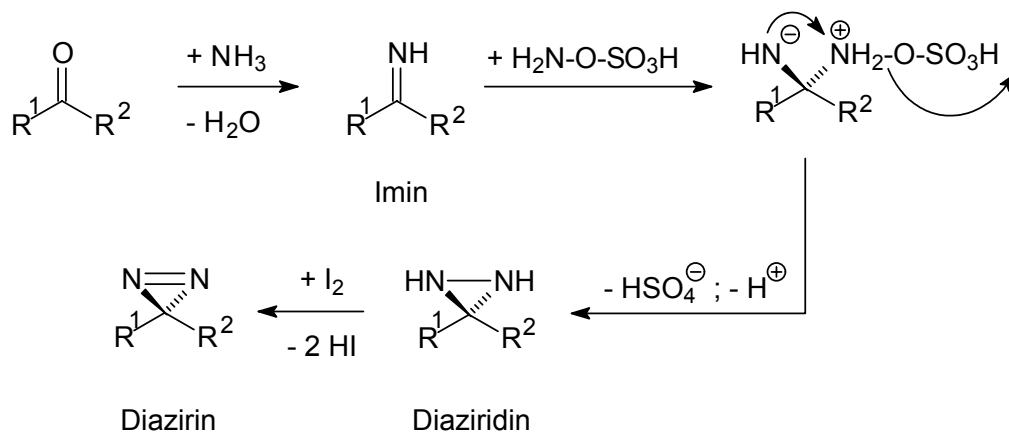
Die anschließenden nach Schema 44 abgebildeten Versuche das 2-Diazo-3,3,3-trifluorpropionsäurechlorid anstelle von Phosgen mit jeweils Diphosgen (Trichlormethylchloroformiat) und Triphosgen (Bis(trichlormethyl)-carbonat)²⁰⁵ herzustellen misslangen. Offenbar weisen die verwendeten Phosgen-Ersatzreagenzien eine zu geringe Reaktivität auf. Es ließ sich zudem nicht feststellen, ob sie Phosgen in einem konkurrierenden Zerfallsprozeß freisetzen.

Versuche zur Synthese von Diazo-*N*-hydroxysuccinimidestern durch kontrollierten Zerfall eines *p*-Toluolsulfonylhydrazons unter DCC-Kupplungsbedingungen nach E.J. Corey²⁰⁶ und H.O. House *et al.*²⁰⁷ gemäß Schema 45 mißlang ebenfalls. Nach erfolgreicher Kondensation von *p*-Toluolsulfonylhydrazin mit Glyoxalsäure zum entsprechendem *p*-Toluolsulfonylhydrazon²⁰⁸ wurden im nachfolgenden DCC vermittelten Veresterungsschritt nur Zersetzungsprodukte erhalten.



Schema 45: Versuch der Diazo-*N*-hydroxysuccinimidestersynthese über Hydrazone

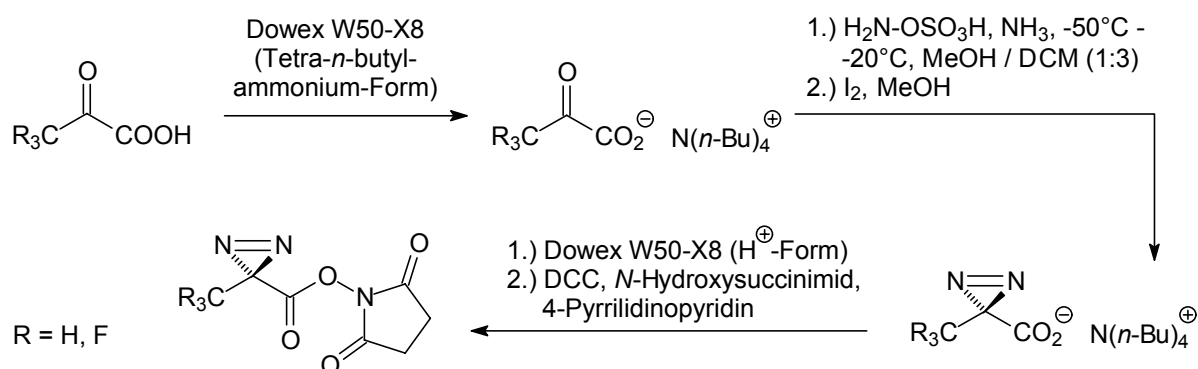
Dagegen erwies sich die Synthese eines Diazirin-Photoaffinitäts-Labels als erfolgreich. Diaziridine und aus ihnen durch Iod oder Silberoxid mild oxidativ gewinnbare Diazirine lassen sich für Laborzwecke gemäß Schema 46 aus Ketonen über Imine und nachfolgende Umsetzung mit Hydroxylamin-*O*-sulfonsäure unter Cyclisierung zum Diaziridin erzeugen²⁰⁹.



Schema 46: Labormaßstabs-Synthese von Diaziridinen mit Hydroxylamin-*O*-sulfonsäure in flüssigem Ammoniak und Oxidation zu Diazirinen

Diesem Reaktionsweg folgend wurde Brenztraubensäure (2-Oxopropionsäure) gemäß Syntheschema 47 nach Elution an einer konditionierten Ionenaustauschersäule in das entsprechende Tetrabutylammonium-Pyruvat überführt und in

einer mit Methanol und Dichlormethan verdünnten Lösung von flüssigem Ammoniak zwischen - 50 °C und - 20 °C mit Hydroxylamin-O-sulfonsäure zunächst zum Diaziridin umgesetzt und anschließend nach Oxidation mit methanolischer Iod-Lösung zum Diazirin oxidiert. Das so hergestellte Propanoat mit der Diazirinfunktion in der 2-Position wurde einer DCC-Kupplung mit *N*-Hydroxysuccinimid als Alkoholkomponente unterworfen und lieferte den entsprechenden Diazirin-modifizierten Ester in 33 % Ausbeute.

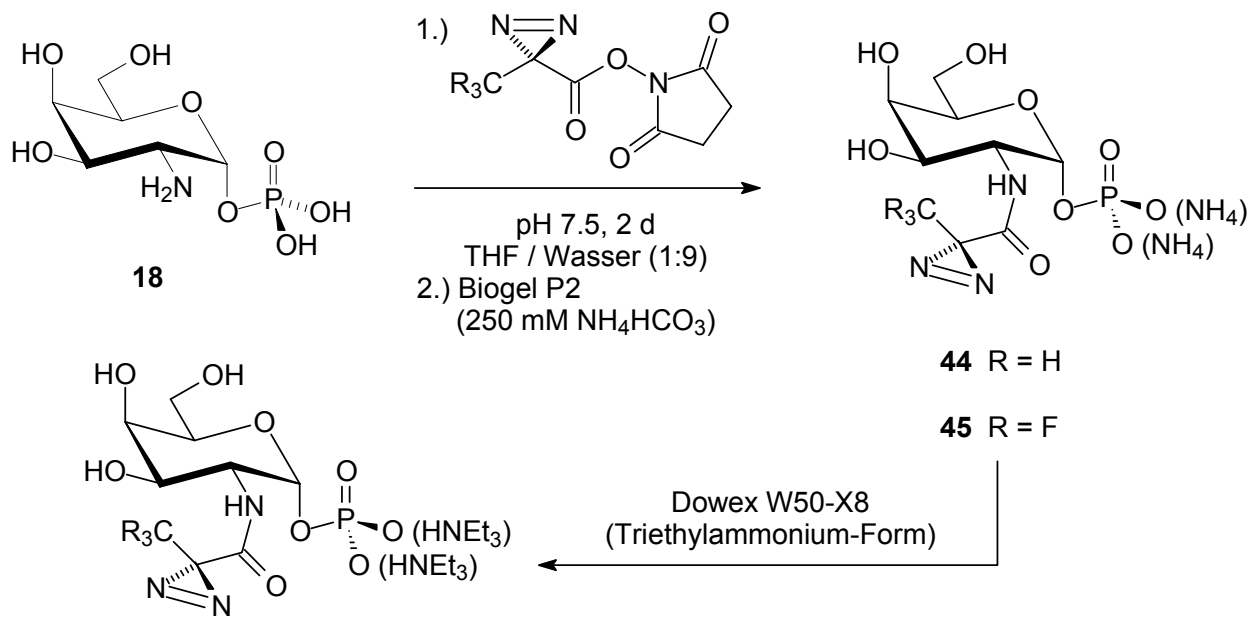


Schema 47: Herstellung der Diazirin-modifizierten *N*-Propionyloxysuccinimid-Ester

Da anstelle einer trifluorierten Brenztraubensäure lediglich deren Ethylester (Ethyl-3,3,3-trifluorpyruvat) kommerziell erhältlich ist, wurde dieser mit 1 M schwefelsaurer Lösung gespalten und mit der nach Extraktion anfallenden wässrigen Lösung des 3,3,3-Trifluorpyruvats ohne weitere Reinigung nach Gefriertrocknung das gleiche Syntheseprotokoll wie im Falle der nicht-fluorierten Verbindung angewandt.

Der daraus hervorgegangene *N*-(2-Azi-3,3,3-trifluorpropionyl)-oxysuccinimid-Ester wurde in 28 % Ausbeute isoliert

Die bewährte Anwendung der selektiven *N*-Acylierungsmethode mittels *N*-Hydroxysuccinimid-Estern auf α -Galactopyranosaminyolphosphat (**18**) mit den beiden Diazirinfunktionalisierten *N*-Hydroxysuccinimid-Estern lieferte nach Schema 48 die beiden photosensitiven GalNAc-1-P-Analoga **44** und **45** in Ausbeuten von 78 und 81 %.



Schema 48: Selektive *N*-Propionylierung zu photoaffinen α -Galactopyranosaminphosphaten

Sowohl die beiden Hydroxysuccinimid-Ester als auch die mit ihnen hergestellten Diazirin- α -galactosylphosphate **44** und **45** in Form ihrer Ammonium- und Triethylammonium-Salze zeigten gegenüber normalem Tageslicht eine hohe Beständigkeit ohne Spuren von photolytischer Zersetzung und ließen sich neben NMR-spektroskopischen Methoden durch ihre UV-Absorptionsmaxima bei 362 nm für **44** und 360 nm für **45** charakterisieren, die nach Brunner *et al.*^{106,107} typischerweise um 360 nm vorzufinden sind.

4. Synthesen von Uridindiphosphohexopyranosylaminen

Die molekulare Erkennung in Organismen wird bekanntermaßen durch Bindungsprozesse vermittelt, an denen komplexe Kohlenhydratstrukturen auf Zell-Oberflächen beteiligt sind²¹⁰⁻²¹⁴. Verbindungen, welche durch Modulation oder Inhibition auf diese Bindungsprozesse einwirken, können sich als potentielle Kandidaten für Wirkstoffe zahlreicher Erkrankungen herausstellen. Demzufolge haben Strategien für die Synthese derartiger Oligosaccharide in den vergangenen Jahren zunehmendes Interesse und Aufmerksamkeit erfahren. Dazu zählen Synthesen unnatürlicher Kohlenhydratstrukturen als potentiell effektivere Agentien, welche im Sinne eines Mimetikums ihre natürlich vorkommenden Analoga nachahmen^{150-153,215-218}.

Neben rein naßchemischen Syntheseansätzen durch lineare oder konvergente Glykosylierungsschritte, ist die Verwendung von Transferasen mit Hexopyranosylnukleotiden als aktivierte Kohlenhydrat-Donoren eine alternative und vielversprechende Methodik^{173,219}. Der Hauptvorteil dieses Ansatzes ist, daß Transferase-Enzyme eine hohe Stereo- und Regioselektivität hinsichtlich der Lenkung des Kohlenhydrat-Donors auf eine spezifische Position eines erkannten Akzeptors zeigen. Dies eliminiert zudem den Bedarf an zahlreichen Schützungs- und Entschützungs-schritten, die bei nicht-enzymatischen Synthesen erforderlich sind. Dennoch sei nicht verschwiegen, daß der Syntheseansatz über Glykosyl-Transferasen darunter leidet, daß diese Enzyme recht labil und sehr spezifisch sind. Für gewöhnlich ist die Verwendung von Kohlenhydrat-Donoren ausgeschlossen, welche strukturell signifikant von ihren natürlich vorkommenden Pendanten abweichen. Dies macht insgesamt die enzymatische Synthese unnatürlicher Oligosaccharide zu einer schwierigen und herausfordernden Aufgabe. In jedem Falle erlaubt darüberhinaus die Synthese artifizierlicher Kohlenhydrat-Donoren auf der Grundlage von Hexopyranosylnukleotiden die Untersuchung von Glykosyl-Transferasen und die Charakterisierung ihrer donorbindenden Epitope.

Dieses Kapitel beschreibt im folgenden die chemoenzymatische und naßchemische Herstellung von Uridindiphosphogalactosamin (UDP-GalN) und die Morpholidat-Kupplungs-Reaktionen mit den in Kapitel 3 synthetisierten unnatürlichen α -Glykopiranosylphosphaten zu unterschiedlich funktionalisierten Analoga des

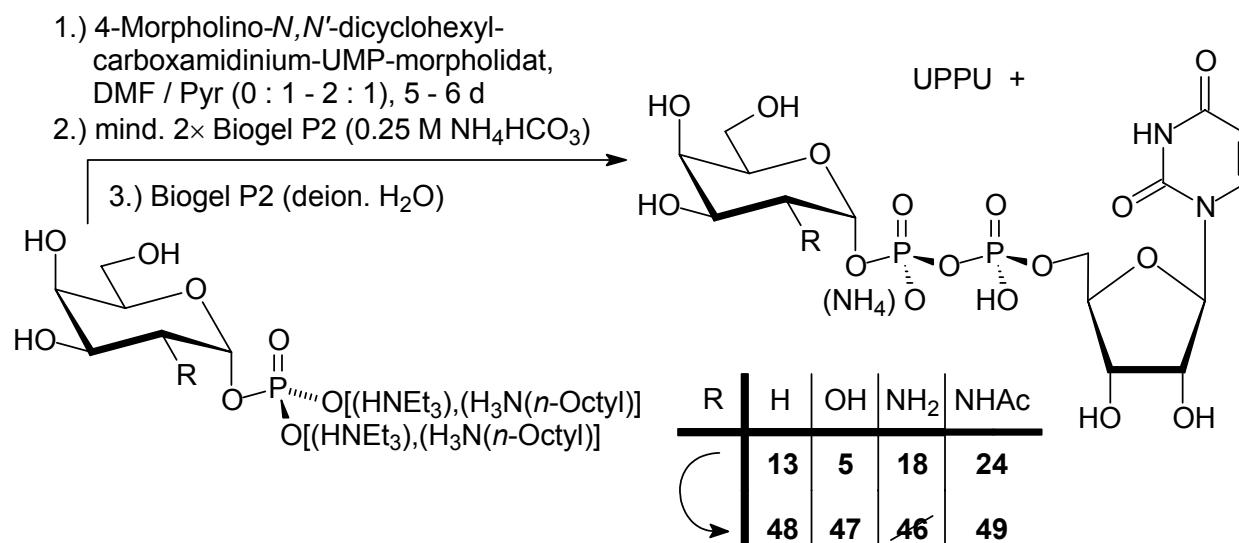
Uridindiphospho-*N*-acetylglucosamins (UDP-GlcNAc) und Uridindiphospho-*N*-acetylgalactosamins (UDP-GalNAc).

4.1. Morpholidat-Kupplungs-Reaktionen

Zunächst wurde untersucht, ob sich die nach Khorana und Moffatt^{127,128} mittlerweile weit verbreitete und als eigenständige Methode etablierte Kupplung eines Phosphomorpholidats mit einem Phosphat unter verschiedenen Aspekten, darunter der Wahl des Lösungsmittels, der Notwendigkeit eines Katalysators und der Beschaffenheit des Gegen-Ions im einzusetzenden Phosphat optimieren lässt. Auffällig ist dabei, daß sich in der Gesamtheit der Literatur, welche sich dieser Methode bedient ein verfestigtes Syntheseprotokoll durchgesetzt hat, welches z.T. durchgehend absolutes Pyridin als Lösungsmittel neben sehr viel 1*H*-Tetrazol als Katalysator und Phosphate in Form von Mono- und Tri-*n*-octylammonium-Salzen verwendet. Dieses ist unter den oben genannten Aspekten zu hinterfragen.

Bereits in der Vorbereitung zur Morpholidat-Kupplung zeigte sich, daß Pyridin allein als Lösungsmittel keineswegs ideal ist. Während sich das Glykopyranosylphosphat in Form eines üblicherweise Mono- oder Trialkylammonium-Salzes noch gerade gut in Pyridin lösen lässt, sind die Lösungseigenschaften des Pyridins für das UMP-Morpholidat-Reagenz (4-Morpholino-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinium-UMP-morpholidat) eher schwach bis mäßig. Dennoch lässt sich auf Pyridin nicht verzichten, da es im Vorfeld zur Kupplungsreaktion mindestens dreimal erforderlich ist das Glykopyranosylphosphat zusammen mit dem Kupplungsreagenz zu destillieren, zumal letzteres lediglich als kristallwasserhaltiges Salz (1.5 Äquivalente H₂O je Äquivalent Morpholidat-Reagenz) isolierbar und kommerziell erhältlich ist. Das mehrfache Destillieren mit Pyridin erfüllt den Zweck die z.T. beträchtliche Kristallwassermenge zu entfernen, da die Morpholidat-Kupplung strikte Schlenk-Bedingungen erfordert. Zwischen den einzelnen Destillations-Schritten fällt dabei sehr deutlich auf, daß sich die Löslichkeit des Glykopyranosylphosphats mit jedem Destillationsschritt verbessert. Es liegt daher nahe zu vermuten, daß es mit der Zeit zu einem Austausch des Glykopyranosylphosphat-Gegenions durch ein

Pyridiniumion kommt, welches durch Assoziation mit der Phosphatgruppe dessen Solvation vermittelt. Danach sollte die Morpholidat-Kupplung weitestgehend unabhängig von der Beschaffenheit des Gegen-Ions verlaufen, falls letztlich alle Phosphate in Form ihrer Pyridiniumsalze solvatisiert werden. Dies soll durch die Verwendung eines Phosphats mit Triethylammonium-, neben *n*-Octylammonium-Gegenionen im Vergleich untersucht werden. Dennoch ist eine zusätzliche Verbesserung der Löslichkeit durch ein geeignetes Zweitsolvens wünschenswert. DMF scheint dabei die erste Wahl, zumal es mit Pyridin und Wasser in jedem Verhältniß mischbar und darüber hinaus das für nukleophile Substitutionsreaktionen geeignetste aprotische Lösungsmittel ist. Vorversuche zeigten, daß die Lösungsmittleigenschaften von DMF sowohl für das Glykosylphosphat wie für das UMP-Morpholidat-Reagenz hervorragend sind. Es wurde daher ferner geprüft, ob sich durch die Verwendung einer Mischung von DMF und Pyridin die Morpholidat-Kupplung insgesamt verbessern lässt. Eine besondere Auffälligkeit publizierter Morpholidat-Kupplungen ist die z.T. große Menge an verwendetem 1*H*-Tetrazol, die sich typischerweise in einer Größenordnung zwischen 2.5 – 5 Äquivalenten bewegt. V. Wittmann und C.-H. Wong berichten in diesem Zusammenhang von der Beobachtung eines während der Morpholidat-Kupplung auftretenden Tetrazolid-Intermediats mittels MALDI-TOF-Untersuchung des Reaktions-Mediums²²⁰. Die im Vorkapitel im Rahmen der Herstellung von Glykopyranosylphosphaten nach der Phosphoramidit-Methode bewährte Verwendung von Pyridiniumhydrochlorid anstelle von 1*H*-Tetrazol zeigte, daß ein Verzicht auf 1*H*-Tetrazol unter Verwendung eines preiswerteren und leichter verfügbaren Ammoniumsalzes nicht von Nachteil sein muß. Für das Morpholidat-Kupplungs-Reagenz in Form eines Phosphorsäureamids sind ähnliche Verhältnisse verglichen mit denen in einem Phosphorigsäureamidit zu erwarten, da es sich in beiden Reagenzien um eine Phosphor-Aktivierung mittels einer N-P-Bindung handelt (Bindungsenergien - P-N: 288 – 330 kJ/mol, dazu im Vergleich P-O: ~ 540 kJ/mol). Ein Vergleich des pKa-Wertes von 1*H*-Tetrazol (pKa = 4.9) mit den pKa-Werten des Triethylammonium- (pKa = 10.75) und *n*-Octylammoniumions (pKa = 10.64) deutet zunächst daraufhin, daß die mit dem Phosphat in die Reaktion eingebrachten Gegen-Ionen praktisch keine NH-Aciditäten mit sich bringen. Dennoch sollen Untersuchungen der Morpholidat-Kupplung ohne den Einsatz von 1*H*-Tetrazol schlußendlich die Frage nach dessen Notwendigkeit oder irgendeines zusätzlichen Katalysebedarfs in dieser Reaktion beantworten.



α -Phosphat	Gegen-Ion	Lösungs- mittel	1 <i>H</i> - Tetrazol	Aus- beute	Produkt
2-Desoxy- Gal-1-P (13)	[HN(Et) ₃] ⁺	Pyridin	5 Äquiv.	32 %	48
2-Desoxy- Gal-1-P (13)	[HN(Et) ₃] ⁺	Pyridin	-	31 %	48
Gal-1-P (5)	[HN(Et) ₃] ⁺	Pyridin	3.5 Äquiv.	32 %	47
Gal-1-P (5)	[H ₃ N(<i>n</i> -octyl)] ⁺	Pyridin	3.5 Äquiv.	30 %	47
GalNAc-1-P (24)	[HN(Et) ₃] ⁺	Pyridin	-	32 %	49
GalNAc-1-P (24)	[HN(Et) ₃] ⁺	DMF/Pyr (1:1)	-	33 %	49
GalNAc-1-P (24)	[HN(Et) ₃] ⁺	DMF/Pyr (2:1)	-	35 %	49
GalN-1-P (18)	[HN(Et) ₃] ⁺	DMF/Pyr (2:1)	-	-	46
GalN-1-P (18)	[H ₃ N(<i>n</i> -octyl)] ⁺	Pyridin	3.5 Äquiv.	-	46
GalN-1-P (18)	[H ₃ N(<i>n</i> -octyl)] ⁺	Pyr, 8 d	3.5 Äquiv.	-	46
GalN-1-P (18)	[H ₃ N(<i>n</i> -octyl)] ⁺	Pyr, 40°C	3.5 Äquiv.	-	46
GalN-1-P (18)	[H ₃ N(<i>n</i> -octyl)] ⁺	Pyr, 40°C	5 Äquiv.	-	46

Schema 49 und Tabelle 3: Untersuchungen zur Reaktionsoptimierung der Morpholidat-Kupplungs-Reaktion durch Herstellung einiger UDP-Hexosen unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen (Reaktionszeit: ~ 5 Tage, relative Menge UMP-Morpholidat-Reagenz: ~ 1.7 Äquivalente bezogen auf das α -Phosphat)

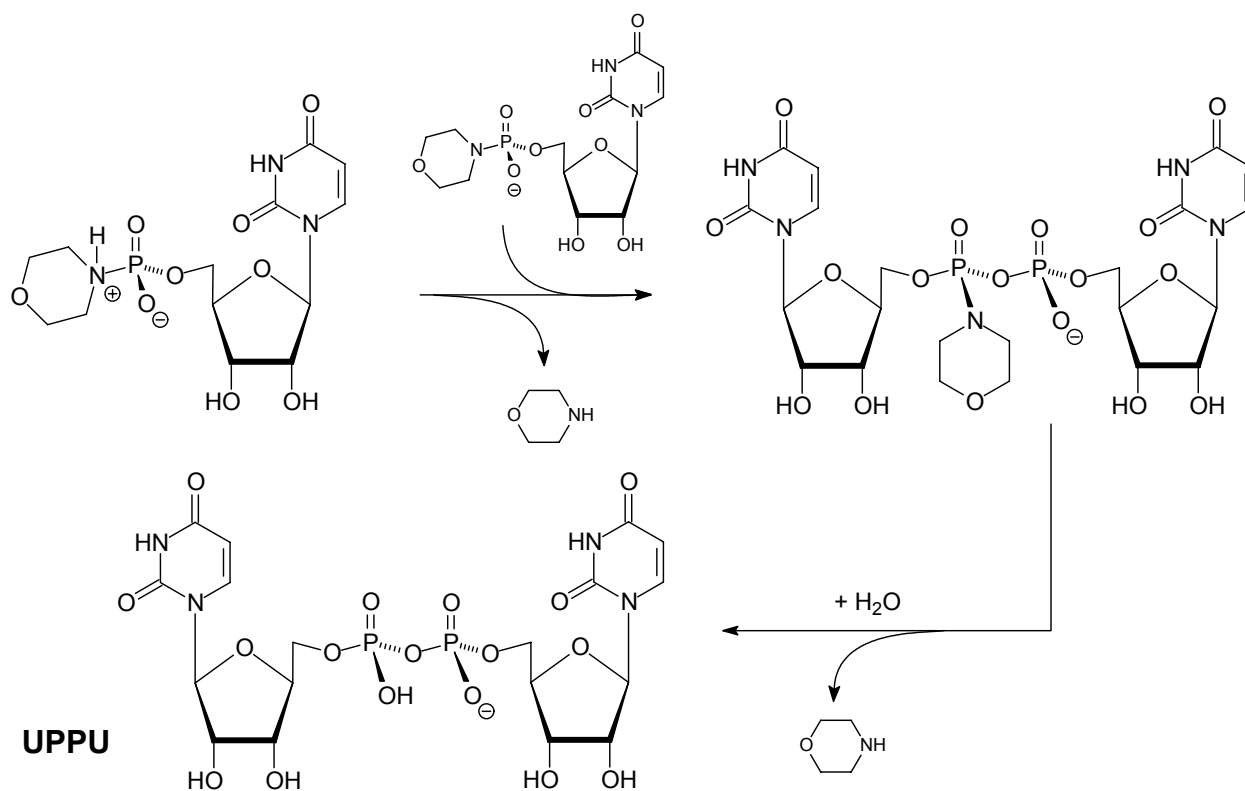
Zu diesem Zweck wurden die α -Phosphate der 2-Desoxygalactose **13**, der Galactose **5**, des *N*-Acetamidogalactopyranosamins **24** und des Galactopyranosamins **18** nach Tabelle 3 in Form von Triethylammonium- und *n*-Octylammonium-Salzen gemäß Reaktions-schema 49 einer UMP-Morpholidat-Kupplungs-Reaktion unterworfen.

Das auffälligste Ergebniss ist, daß in der Reihe der α -Galactopyranosylphosphate lediglich das Galactopyranosaminy-1-phosphat **18** für eine Morpholidat-Kupplungs-Reaktion unter den verschiedensten Reaktionsbedingungen, unabhängig vom Lösungsmittelsystem und 1*H*-Tetrazolkatalyse selbst bei erhöhter Temperatur und über einer Woche Reaktionszeit, nicht kompatibel ist. Dies könnte generell an der unter den basischen Bedingungen der Reaktion freien Aminofunktion liegen. Denkbar wäre dies auch wegen der höheren Nukleophilie der Aminogruppe gegenüber der Phosphatgruppe oder durch die Nähe der *cis*-vicinalen Orientierung beider funktionellen Gruppen und einer daraus resultierenden elektronischen Störung oder infolge intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen. Abschließend läßt sich dies bisher nicht beantworten. Interessant wäre in diesem Zusammenhang wäre die Untersuchungen an Galactopyranosaminy-1-phosphaten mit einer Aminogruppe an den Positionen 3, 4 oder 6 um weitere Rückschlüsse zu ziehen.

Während sich 2-Desoxygalactopyranosylphosphat (**13**), Galactopyranosylphosphat (**5**) und GalNAc-Phosphat (**24**) prinzipiell zu ihren UDP-Nukleotidhexosen in dieser Reaktion unter verschiedenen Bedingungen problemlos verknüpfen ließen, läßt sich in Hinblick auf das Gegen-Ion beim Übergang von Triethylammonium zu *n*-Octylammonium kein signifikanter Unterschied ausmachen, was die eingangs geäußerte Annahme, daß die Phosphate im Reaktionsmedium praktisch als Pyridiniumion-assoziierte Salze gelöst vorliegen zumindest nicht entkräftet.

Ernüchternd fallen auch die Ergebnisse bei der Beurteilung zum Cosolvens DMF aus, mit dem eine erhoffte signifikante Ausbeutesteigerung ausbleibt, wenngleich die Ausbeuten im Mittel um wenige Prozentpunkte höher ausfallen als bei der Verwendung von reinem Pyridin als Lösungsmittel. Der Einfluß des DMF scheint trotz sichtlich verbesserter Löslichkeit der Reaktanden zwar nachweisbar aber nicht sehr groß zu sein.

Überraschend hingegen ist die Beobachtung, daß eine zusätzliche Katalyse durch die Gegenwart von 1*H*-Tetrazol als NH-Säurekatalysator in der Morpholidat-Kupplung offenbar nicht erforderlich ist. Nach einer Reaktionsdauer von 5 Tagen wurde unabhängig von der eingesetzten Menge an 1*H*-Tetrazol eine vergleichbare Ausbeute an 2-Desoxy-UDP-galactose **48** erreicht. 1*H*-Tetrazol katalysiert die Reaktion und hat Einfluß auf die erzielte Ausbeute. Die Reaktion kommt innerhalb von 5 Tagen zum Erliegen, weil offenbar andere kationische Spezies vergleichsweise NH-acid wirken und eine zusätzliche Katalyse unnötig machen. Dies wurde bereits in der mit Pyridiniumhydrochlorid vermittelten Phosphorylierung nach der Phosphoramidit-Methode in Kapitel 3.2 nachgewiesen. Angesichts des nicht festgestellten Vor-



Schema 50: Intermolekulare Morpholidat-Kupplung zum Nebenprodukt UPPU

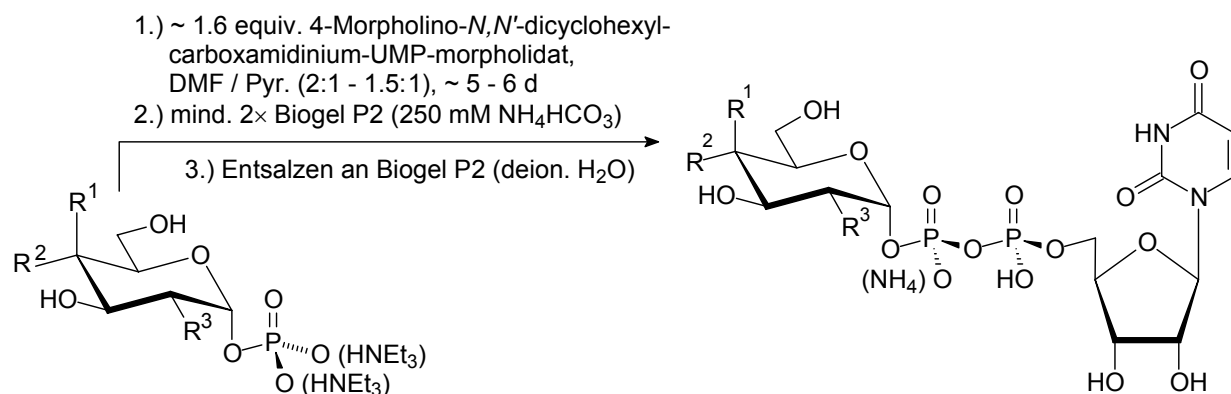
teils von 1*H*-Tetrazol verbunden mit der nötigen zusätzlichen Vortrennung mittels Gelpermeationschromatographie und der mittlerweile eingeschränkten kommerziellen Verfügbarkeit, wurden alle nachfolgenden Morpholidat-Kupplungen erfolgreich ohne 1*H*-Tetrazol durchgeführt.

Erwähnenswert ist darüberhinaus die Beobachtung eines bei allen gemißlungenen Morpholidat-Kupplungs-Reaktionen auftretenden Nebenprodukts, welches gemäß Schema 50 durch Eigensubstitution einer protonierten UMP-Morpholidat-Spezies mit einem weiteren Morpholidat-Ion nach anschließender Hydrolyse im Rahmen der wässrigen Aufarbeitung gebildet wird und sich in einer Ausbeutengrößenordnung von ca. 20 – 25 % isolieren ließ. Im Falle der mißglückten Versuche der Herstellung von UDP-Galactosamin (**46**) aus Galactopyranosaminyll-1-phosphat (**18**) nach dieser Methode wurde UPPU als einziges Produkt erhalten und trat unter sämtlichen geschilderten Reaktionsbedingungen und in allen nachfolgenden UMP-Morpholidat-Kupplungen als unvermeidbares Nebenprodukt auf. Die Hauptschwierigkeit der Morpholidat-Kupplung in ihrer Gesamtheit lag daher weniger im Syntheseprotokoll als vielmehr in der Trennung des UPPU von den jeweiligen UDP-Hexosen. Dies erfordert z.T. mehrmalige Größenausschlußchromatographiegänge und neben ungefähr eine Woche Reaktionszeit ca. zwei Wochen aufwendige Reinigungsschritte je hergestellter UDP-Hexose.

In diesem Zusammenhang erscheint es daher eher ungewöhnlich, daß das Auftreten symmetrischer Nukleosiddiphosphonukleoside und der mit ihnen verbundenen Aufarbeitungsschwierigkeiten in dieser Reaktion weitestgehend unerwähnt bleibt. C.-H. Wong und V. Wittman beschreiben für die Umsetzung der Phosphate von D-Mannose und D-Galactose in Form ihrer Trioctylammoniumsalze mit den für die Herstellung ihrer natürlichen Transferase-Donoren nötigen Nukleosidmonophosphormorpholidaten unter 1*H*-Tetrazol-Katalyse Ausbeuten von 76 % bezogen auf GDP-Mannose und 91 % bezüglich UDP-Galactose²²⁰. Im Kontext der geschilderten Beobachtungen zur Morpholidat-Kupplungs-Reaktion sind derartige Ausbeutegrößenordnungen beeindruckend. Allerdings sind sie schwierig nachvollziehbar, wenn man die Bildung der entsprechenden GPPG und UPPU hinzurechnet und einen quantitativen Umsatz des Kupplungsreagenzes annehmen würde. Selbst beträchtliche vom Nukleotidzucker ungetrennte Mengen an 1*H*-Tetrazol und Nukleosiddiphosphonukleosiden können in Standard-¹H- und ¹³C-Spektren undetektiert bzw. durch nur einen Ribose-Signalsatz in den typischerweise breiten Ribose-Signalsätzen (siehe Kap. 4.3.) der Produkte unentdeckt bleiben.

Die Morpholidat-Kupplungs-Reaktionen der zuvor synthetisierten *gluco*- und *galacto*- α -Phosphate **25** bis **33** und **40** bis **45** in Form ihrer Triethylammonium-Salze erfolgte

gemäß Schema 51 unter den optimierten Bedingungen in einem Lösungsmittelgemisch von trockenem DMF und absolutem Pyridin im Verhältnis zwischen ~ 2 : 1 und 1.5 : 1 bei Raumtemperatur und ohne zusätzliche Verwendung von 1*H*-Tetrazol in Gegenwart von ca. 1.6 – 1.7 Äquivalenten UMP-Morpholidat-Kupplungsreagenz.



25 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CH₂CH₃

26 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CH₂CH₂CH₃

27 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CH(CH₃)₂

28 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CH₂Br

32 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH-CHO

40 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CF₃

41 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CH₂N₃

42 R¹ = OH, R² = H, R³ = N₃

44 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CN₂CH₃

45 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CN₂CF₃

galacto-
Verbindungen

50 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CH₂CH₃

51 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CH₂CH₂CH₃

52 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CH(CH₃)₂

53 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CH₂Br

54 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH-CHO

55 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CF₃

56 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CH₂N₃

57 R¹ = OH, R² = H, R³ = N₃

58 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CN₂CH₃

59 R¹ = OH, R² = H, R³ = NH(CO)CN₂CF₃

29 R¹ = H, R² = OH, R³ = NH(CO)CH₂CH₃

30 R¹ = H, R² = OH, R³ = NH(CO)CH₂CH₂CH₃

31 R¹ = H, R² = OH, R³ = NH(CO)CH(CH₃)₂

33 R¹ = H, R² = OH, R³ = NH-CHO

43 R¹ = H, R² = OH, R³ = N₃

gluco-
Verbindungen

60 R¹ = H, R² = OH, R³ = NH(CO)CH₂CH₃

61 R¹ = H, R² = OH, R³ = NH(CO)CH₂CH₂CH₃

62 R¹ = H, R² = OH, R³ = NH(CO)CH(CH₃)₂

63 R¹ = H, R² = OH, R³ = NH-CHO

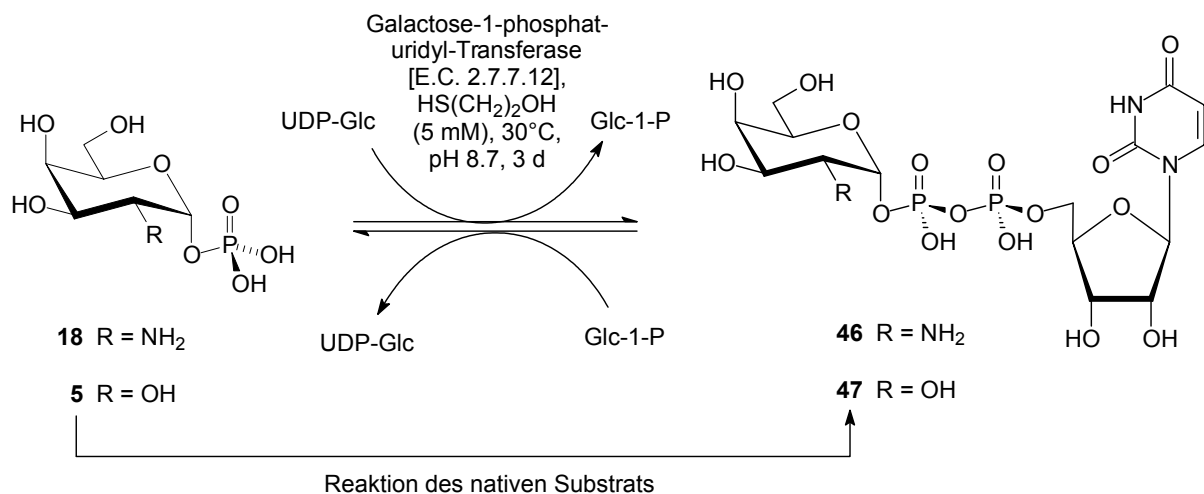
64 R¹ = H, R² = OH, R³ = N₃

Schema 51 und Tabelle 4: Morpholidat-Kupplungen der α-Phosphate **25-33** und **40-45** mit Pyr / DMF als Solvens und ohne 1*H*-Tetrazol

Nach spätestens 7 Tagen wurde die mittels HPLC an einer Hypercarb-Säule aus porösem graphitisierten Kohlenstoff verfolgte Reaktion abgebrochen und nach mehrfachem Ausführen einer Größenausschluß-chromatographischen Reinigung an Biogel P2 gefolgt von einer abschließenden Entsalzungschromatographie an Sephadex G10 die entsprechenden UDP-Galactosamin-Derivate **50** bis **59** in Ausbeuten zwischen 21 % und 32 % und UDP-Glucosamin-Verbindungen **60** bis **64** in vergleichbaren Ausbeuten zwischen 25 % und 33 % in Form der Ammonium-Salze gewonnen und wie im übernächsten Kapitel zusammengefasst charakterisiert.

4.2. Darstellung von UDP-Galactosamin (46)

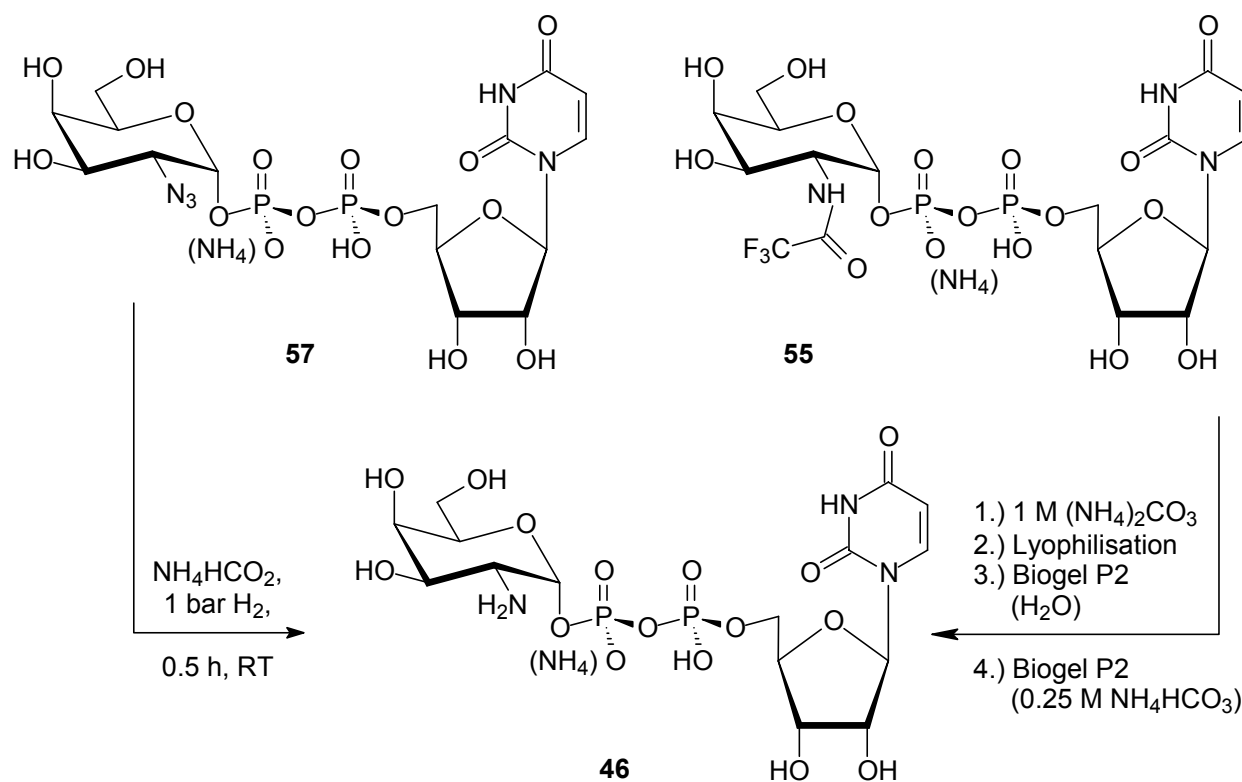
Da sich die Herstellung von UDP-Galactosamin mittels der Morpholidatkupplungs-Methode als nicht durchführbar erwies, wurde zunächst ein enzymatischer Herstellungsansatz gewählt. Whitesides *et al.* konnten bereits 1992 zeigen, daß unter Verwendung von Galactose-1-phosphat-uridyl-Transferase (E.C. 2.7.7.12) die Umsetzung von Galactosaminyl-1-phosphat (**18**) zum entsprechendem UDP-Galactosamin (**46**) gelingt. In ihrer biogenen Reaktion katalysiert Galactose-1-phosphat-uridyl-Transferase den Transfer von Uridinmonophosphat (UMP) aus UDP-Glucose (UDP-Glc) auf das natürliche Substrat Galactopyranosyl-1-phosphat (**5**) unter gleichzeitiger Freisetzung von Glucopyranosyl-1-phosphat neben UDP-Galactose (**47**).



Schema 52: Transferasekatalysierte enzymatische Synthese von UDP-GalN (**46**)

Das nach Whitesides *et al.*²²¹ berichtete Syntheseprotokoll ließ sich im Gramm-Maßstab nicht reproduzieren. Daher wurde im Parallel-Ansatz und unter vereinfachten Reaktionsbedingungen gemäß Schema 52 die Überführung von Galactosaminyl-1-phosphat (**18**) zum UDP-Galactosamin (**46**) in 12 % Ausbeute erzielt. Dabei ließ sich die enzymatische Reaktion dahingehend optimieren, daß GalN-1-P (**18**) in einem Zeitraum von drei Tagen bei 30 °C und bei pH 8.7 gepufferter Lösung von 5mM 2-Mercaptoethanol, welches Transferase-Reaktionen zusätzlich beschleunigt²²², inkubiert wurde. Bei 37 °C hingegen sank die Ausbeute stark ab und es wurde hauptsächlich das zu transferierende UMP als Nebenprodukt freigesetzt.

Im Gegensatz zu den durch Whitesides *et al.* berichteten Ergebnissen, zeigte sich dieser enzymatische Ansatz sehr resistent gegenüber upscaling-Versuchen. Die Reaktion versagte im Gramm-Maßstab und wurde daher zum Erhalt einer größeren Menge des Produktes **46** in Größenordnungen von 10 – 70 mg des Ausgangsmaterials **18** durchgeführt. Die so erzielte Ausbeute von 12 % wurde in diesem Sinne ausgehend von insgesamt 450 mg Galactosaminyl-1-phosphat (**18**) in vierzig parallelen Inkubationsansätzen von je 0.5 ml Volumen erreicht. Die relative Reaktionsrate mit Galactopyranosaminyl-1-phosphat (**18**) beträgt etwa 5 % der mit Galactopyranosyl-1-phosphat (**5**) durchgeführten Reaktion, was auch mit einem um 30-fach höherem K_m -Wert einhergeht. Die Bildung von **46** im Vergleich zu **47** ist danach gleichgewichtsbedingt nicht begünstigt²²³.

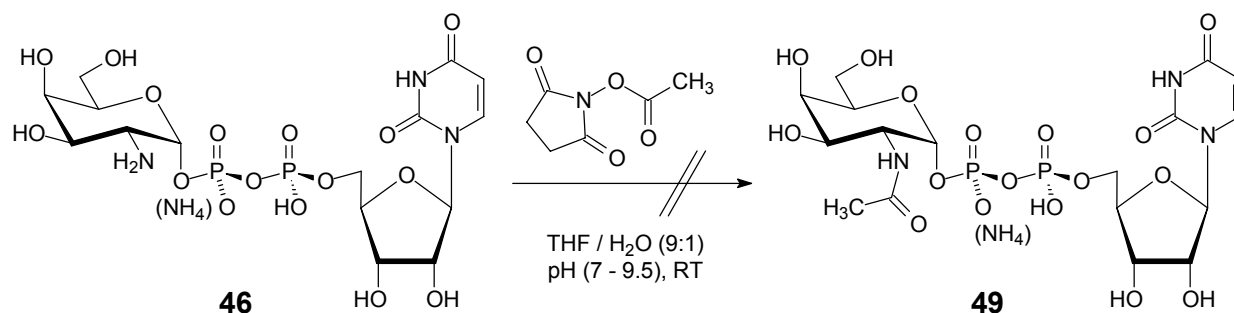


Schema 53: Chemische Synthesen von UDP-GalN (**46**) aus **55** und **57**

Die erzielte geringe Ausbeute an **46** ist für eine Transferase-katalysierte Reaktion gerade noch akzeptabel und beträgt in etwa ein Drittel der zuvor in den Morpholidat-Kupplungen erzielten Ausbeuten. Für weitere Derivatisierungen von **46** ist die enzymatisch gewonnene Menge jedoch zu gering.

Versuche, unter Umgehung nicht kommerziell erhältlicher Pyrophosphorylasen, aus α -GalNAc-1-phosphat (**24**) auf diesem Wege UDP-GalNAc (**50**) darzustellen waren hingegen nicht erfolgreich, da **24** als Substrat durch das Enzym unerkant blieb.

Bedingt durch die Schwierigkeiten beim „up-scaling“ der enzymatischen Synthese von UDP-GalN (**46**) und der bescheidenen Ausbeute nach dieser Methode, wurden Wege zur naßchemischen Synthese von **46** untersucht (Schema 53). Dies gelang schließlich unter milden transhydrogenolytischen Bedingungen aus dem 2-Azido-Analogon **57** mit Ammoniumformiat als Hydrierungsreagenz neben Wasserstoff unter Normaldruck in 77 % Ausbeute, wohingegen die klassische Wasserstoffdruckhydrierung in Gegenwart von Pd / C nur zur Zersetzung von **46** führte. Als wesentlich besserer und reproduzierbarer Zugang zu **46** erwies sich die Entschützung des UDP-2-Trifluor-acetamido-Derivats **55** durch milde De-trifluoracetylierung, indem **55** in 1 M wässriger Ammoniumcarbonat-Lösung bis zum Feststoff gefriergetrocknet und in praktisch quantitativer Ausbeute unter Freisetzung der Aminogruppe in **46** mündete.

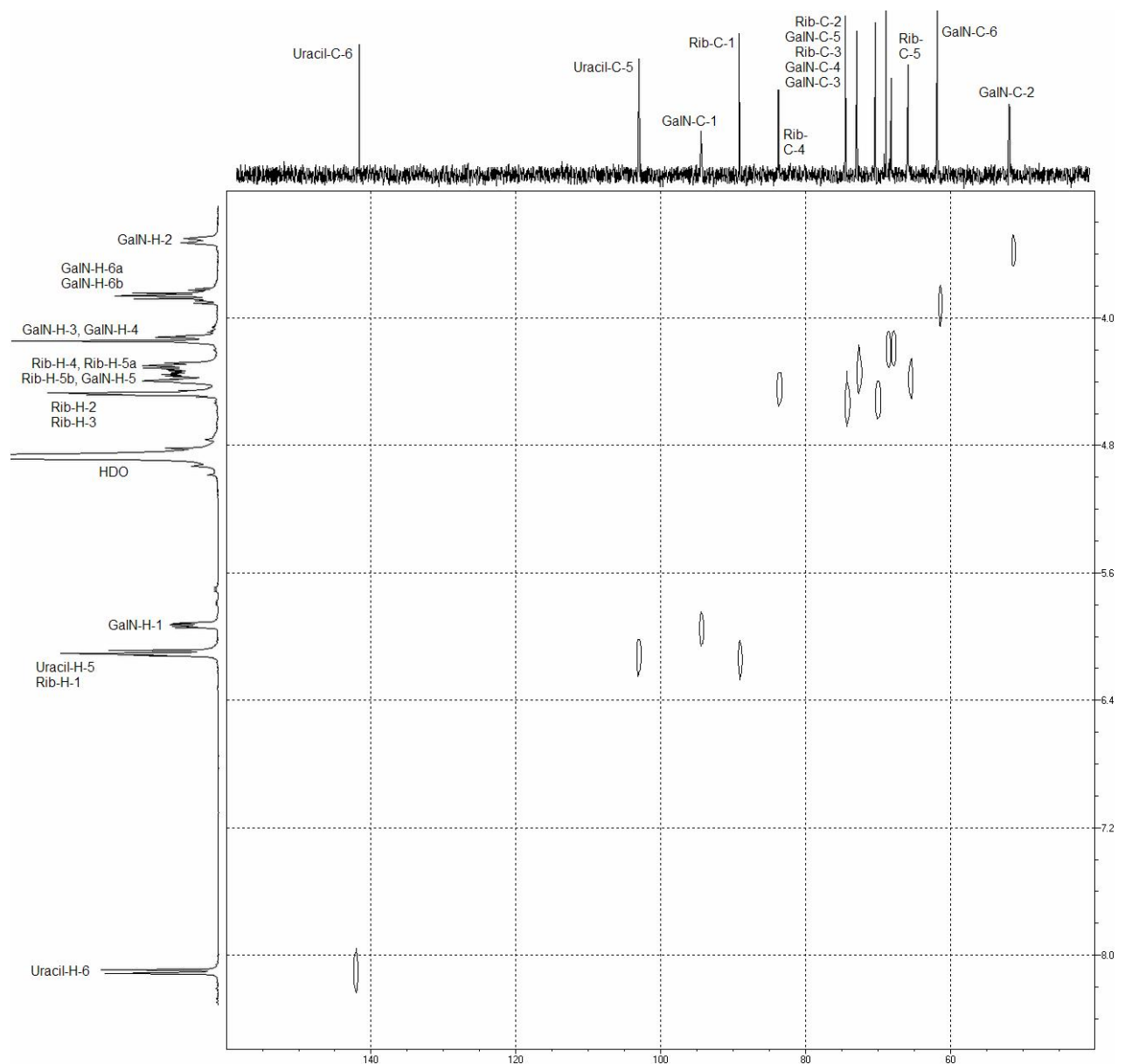


Schema 54: Versuch der selektiven *N*-Acetylierung von **46** mit *N*-Acetoxysuccinimid

Der Versuch die selektive *N*-Acylierung der in Kapitel 3.4.1. entwickelten und erfolgreich an Aminoglykopyranosylphosphaten angewandten *N*-Hydroxysuccinimid-Ester-Methode auf UDP-GalN zu übertragen scheiterte aus unerfindlichen Gründen und blieb am Beispiel der versuchten *N*-Acetylierung von UDP-GalN (**46**) nach UDP-GalNAc (**49**) (Schema 54) selbst nach Tagen unter deutlich basischeren Bedingungen ohne Ergebnis. Die nach Schema 21 vorgeschlagene Syntheseroute 1, mit UDP-GalN (**46**) als Schlüssel-Intermediat zu höher funktionalisierten UDP-GalNAc-Analoga, erweist sich damit als nicht gangbar, während sich Syntheseroute 2 über α -GlcN-1-P (**23**) und α -GalN-1-P (**18**) als realisierbarer Syntheseweg herausstellte.

4.3. Charakterisierung von UDP-Hexosen

Die Charakterisierung der nach Kapitel 4.1 und 4.2 hergestellten UDP-Zucker erfolgte hauptsächlich durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie durch Protonenbreitband-entkoppelte Hetero-NMR-Auswertung, darunter die ^{31}P spektroskopische Untersuchung neben ggf. ^{19}F -NMR-Spektroskopie für die fluorierten UDP-Derivate **55** und **59**, die jeweils ein Singulett bei $\delta = -75.8$ ppm und -72.3 ppm (470 MHz, D_2O) geben.

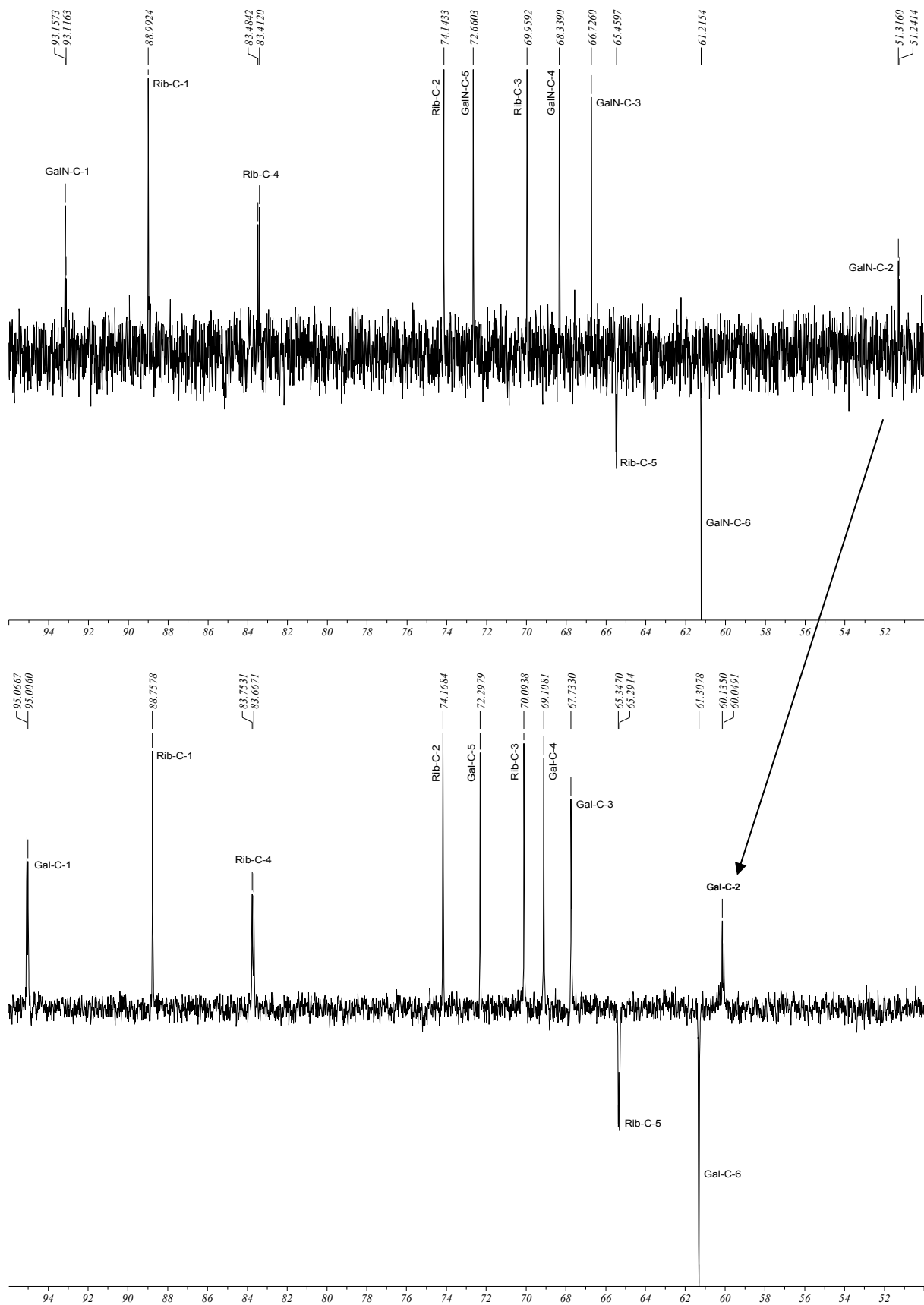


Schema 55: ^1H - / ^{13}C -Korrelationsspektrum des enzymatisch gewonnenen UDP-Galactosamins (**46**) in D_2O (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz)

Gegenüber den geschützten Glykopyranosylmonophosphaten **5**, **13**, **18**, **23** bis **33** und **40** bis **45**, die im ^{31}P -NMR-Spektrum (200 MHz, D_2O) jeweils ein Singulett zwischen $\sim - 0.25$ und 2.65 ppm aufweisen, wurden für die UDP-Hexosyl-Verbindungen **46** bis **64** je zwei Singuletts bei chemischen Verschiebungen zwischen $- 9.9$ bis $- 10.7$ ppm und $- 11.6$ bis $- 12.3$ ppm ermittelt, die jeweils den beiden Phosphoratomen der Diphosphatgruppe zwischen Uridin und dem Hexosylzucker zuzuordnen sind und ein typisches Spektroskopie-Merkmal für NDP-Zucker darstellen.

Die ^1H - und ^{13}C - NMR-Spektren liefern je einen Signalsatz für den Pyranosylring des Hexosaminyl-analogen Zuckers mit sieben Protonen und sechs C-Atomen und für den Ribofuranosylring mit sechs Protonen und fünf C-Atomen. Daraus bestätigt sich die Anomerenreinheit bei nicht beobachteter Signalsatz-Verdoppelung der jeweiligen Verbindung. Zudem wird die α -Anomeritet bedingt durch eine Kopplungskonstante $^3J_{1,2}$ zwischen 3.1 Hz und 3.6 Hz im Pyranosylzucker-System aller Verbindungen belegt. Diese ist zusätzlich mit einer durch vicinale Kopplung zum Phosphor-Atom verursachten Kopplungskonstante von $^3J_{1,P}$ zwischen 6.9 Hz und 7.3 Hz in Form eines dd-Systems unterlegt und beweist die Konnektivität zur Phosphatgruppe.

Die Zuordnung der einzelnen ^1H - und ^{13}C -Signale lässt sich wie am Beispiel des UDP-GalN (**46**), in Schema 55 abgebildet, durch Korrelation aller dreizehn ^1H - / ^{13}C -Signalpaare bestimmen. Während eine Bestimmung der Kopplungskonstanten des Pyranosylrings möglich ist, lassen sich für den Riboseteil bedingt durch die für geladenene Moleküle in D_2O stark ausgeprägte Linienverbreiterung keine Feinstrukturen auflösen und folglich bleiben Kopplungskonstanten der Ribose-Protonen bis auf die des anomeren Protons unbestimmt. Generell zeigt sich, daß die Lage der Uracil- und Ribose-Signale im ^1H - und ^{13}C -Spektrum in praktisch allen Verbindungen gleich bleibt, während Abschirmungseffekte spezifischer Gruppen und Substituenten am Pyranosylzuckerring, allen voran der 2-, neben der 3- und der anomeren Position diese Signale signifikant verschieben.



Schema 56 und 57: Gegenüberstellung der ^{13}C -Pendant-Spektrenausschnitte von UDP-GalN (**46**) (oben) und UDP-2-Azido- α -Gal (**57**) (unten), in welchen die Ribose- und Galactosesignale abgebildet sind

So zeigt der ^{13}C -Pendant-Spektrenvergleich von UDP-GalN (**46**) mit dessen 2-Azido-Analogon UDP-2-Azido- α -Gal (**57**) in der Gegenüberstellung von Schema 56 und 57 eine lokale Tieffeldverschiebung von ca. 9 ppm für das C-2-Dubletts beim Übergang einer Aminogruppe zur Azidogruppe, wie sie schon in den entsprechenden Phosphat-Vorstufen **18** und **42** sowie **23** und **43** gefunden wurde. Demgegenüber fallen die entsprechenden Tieffeldverschiebungen von 1.4 ppm am C-1 und 0.7 ppm am C-3 eher moderat aus, so daß die chemische Verschiebung des pyranosidischen C-2 im ^{13}C -Spektrum einen Substituenten-Indikator für die jeweils an der 2-Position modifizierten UDP-GlcNAc- und UDP-GalNAc-Analoga darstellt.

Wie bereits für die Zuckermonophosphate berichtet findet man im ^{13}C -Pendant-Spektrum Dublett-Aufspaltungen der C-1- und C-2-Signale mit den Kopplungskonstanten $^2J_{1,P}$ zwischen 5.6 Hz und 6.5 Hz sowie $^3J_{2,P}$ zwischen 8.4 Hz und 9.2 Hz. Zusätzlich zeigen alle synthetisierten UDP-Hexosen darüber hinaus Dublett-Aufspaltungen an den C-4' und C-5'-Signalen des über die 5'-Position an das Diphosphat gebundenen Ribofuranosylrings. Diese durch Kopplung zum Uridinseitigem Phosphat verursachten Aufspaltungen sind durch die Kopplungskonstanten $^3J_{4',P}$ zwischen 8.7 Hz und 9.1 Hz sowie $^2J_{5',P}$ zwischen 5.3 Hz und 5.6 Hz charakterisiert. Das Auftreten aller vier Dublett-Aufspaltungen, die ebenfalls anhand der ^{13}C -Pendant-Spektren in Schema 55 und 56 ersichtlich sind, an den C-1, C-2, C4' und C-5'-Atomen weist eine Konnektivität zwischen der Diphosphatgruppe und beiden Zuckermolekülen nach und ist damit der Nachweis einer erfolgreichen Morpholidat-Kupplung bzw. transferasekatalysierten Zuckernukleotid-Verknüpfung.

Versuche der Massen- und Fragmentidentifizierung mittels MALDI-TOF-Spektrometrie verliefen hingegen selbst im „negative mode“ bei unterschiedlicher Präparationstechnik ergebnislos. Bislang gelang es nicht, durch Auswahl eines geeigneten Gegenions und der geeigneten Matrixpräparation aus den doppelt negativ geladenen UDP-Hexosen eine im Kontext des MALDI-TOF-Experiments hinreichend flüchtige kationische Zuckernukleotid-Spezies nachzuweisen.

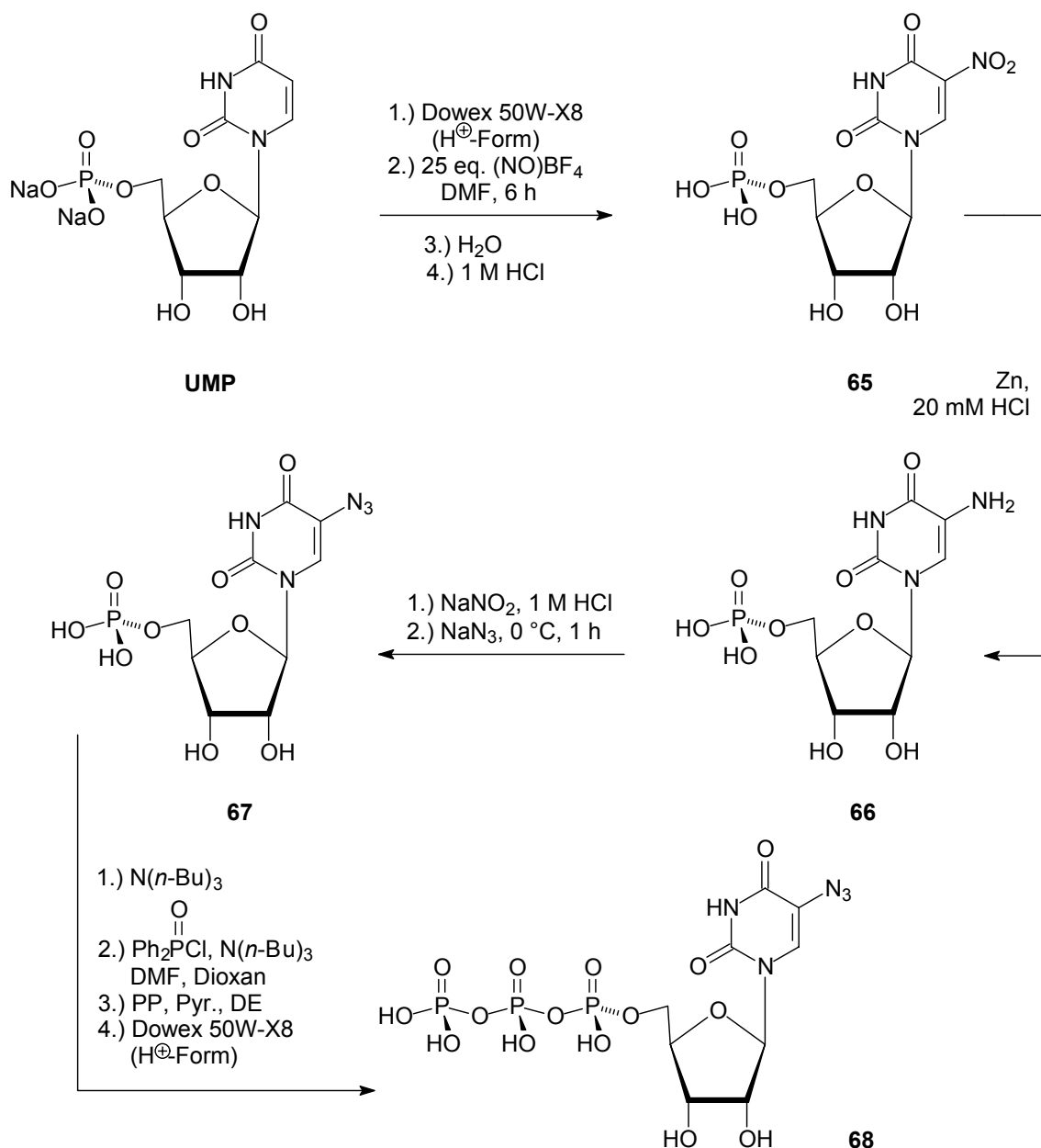
5. Synthese phosphatierter 5'-Azidouridine

Zur Herstellung von Arylaziden sind generell zwei Methoden bekannt. Die eine ist die nukleophile Substitution eines Brom-, Chloratoms oder einer Nitrogruppe am Aromaten. Die andere Methode ist die Reaktion eines Azidions mit einem diazotierten primären aromatischen Amin²²⁴. Die erste Methode nach Czarnecki *et al.*²²⁵ eignet sich zur Herstellung von 8'-Azidoguanosin- und 8'-Azidoadenosin-Verbindungen aus der entsprechenden 8'-Bromnukleosid-Vorstufe. Versuche diese Methode auf Uridin-Derivate, ausgehend von 5'-Nitrouridin²²⁶ und 5'-Bromuridin²²⁷, anzuwenden scheitern an der anschließenden Cyclisierung des gebildeten Azids zur 2'-Oxo-8'-azapurin-Verbindung. Es wurde daher ein Syntheseweg über die Diazotierung eines 5'-Nitrouridins gewählt. Die Synthese unter Einführung einer Azidogruppe in die 5'-Position der Uracilbase von 2-Desoxyuridin ist nach Evans und Haley²²⁸ beschrieben und beginnt ausgehend von der freien Säure des Desoxyuridins mit der Nitrierung der 5'-Position, gefolgt von der Reduktion der Nitrogruppe zur Aminogruppe sowie deren Diazotierung und anschließender Verkochung zum 5'-Azidodesoxyuridin mit Natriumazid.

Für die Nitrierung von Uridin-Nukleosiden sind bisweilen Methoden bekannt, die nach Schützung der (2-Desoxy)- Ribose-Hydroxygruppen Salpetersäure mit Schwefelsäure²²⁹ und Nitroniumtetrafluoroborat²³⁰ am ungeschütztem Nukleosid als Nitrierungsmittel verwenden. Der Nachteil beider Methoden liegt neben einer geringen Ausbeute (28 % - 42 %) und dem Auftreten von Nebenprodukten durch Spaltung der glykosidischen Bindung zum Uracil außerdem in der Notwendigkeit, die freien Hydroxygruppen der Ribose zu schützen um die parallel eintretende O-Nitrierung an der 2- und 3-Position zu verhindern. Evans und Haley verwenden erstmals Nitrosyltetrafluoroborat, welches im Überschuß eingesetzt zunächst eine Nitrosogruppe einführt und selbige darauf rasch zur Nitrogruppe oxidiert (~ 10 Min.) bevor eine O-Nitrierung einsetzt.

Unter Anwendung dieses Syntheseprotokolls nach Schema 58 wurde UMP nach Konversion des kommerziell erhältlichen Natriumsalzes in die freie Säure durch Behandeln mit 25 Äquivalenten Nitrosyltetrafluoroborat in DMF nach wenigen Stunden in die entsprechend nitrierte Verbindung **65** in 72 % Ausbeute überführt.

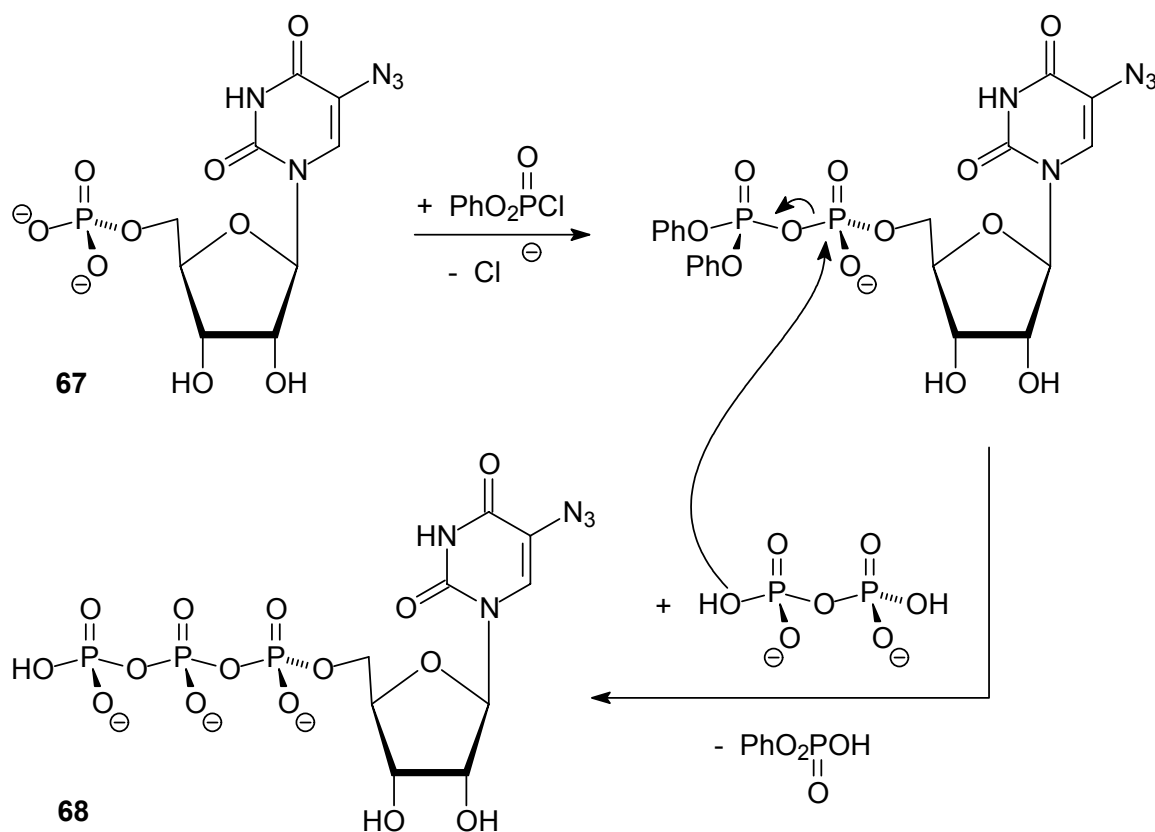
Die Detektion des sehr schnellen Reaktionsfortschritts erfolgte mittels UV-Spektroskopie auf der Grundlage der Extinktionskoeffizienten und Absorptionsmaxima der nach Evans und Haley beschriebenen 2-desoxy-analogen Verbindungen.



Schema 58: Syntheseweg vom UMP zu 5'-Azidouridiny-5-triphosphat (**68**)

Für die Nitrierungsreaktion wurde daher eine vollständige Verschiebung des Absorptionsmaximums von UMP mit $\lambda = 289$ nm zum 5'-Nitro-UMP (**65**) mit $\lambda = 306$ nm (zum Vergleich 2-Desoxy-5'-nitro-UMP: $\lambda = 302$ nm)²³⁰ beobachtet. Die

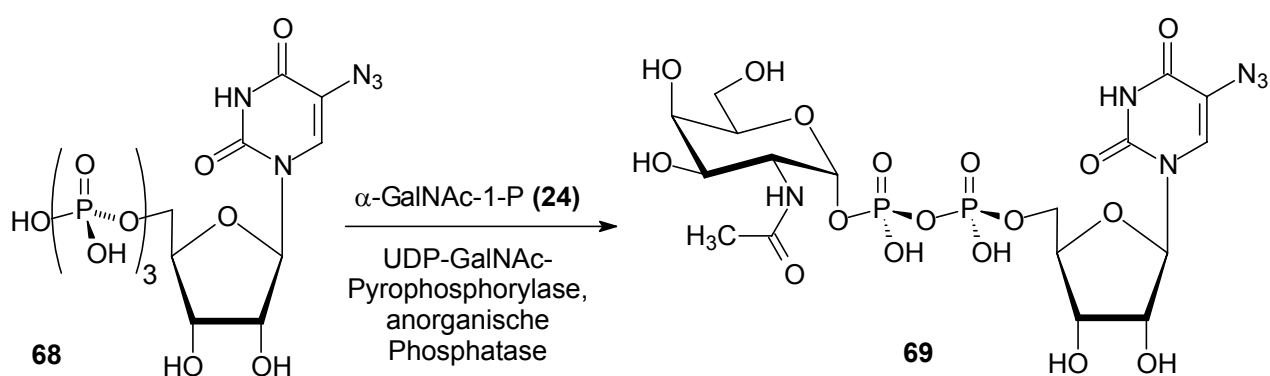
anschließende Reduktion der Nitrogruppe unter Erhalt der 5'-Aminoverbindung **66** mit Zinkstaub in salzsaurer Lösung erfolgte bis zur Detektion eines Absorptionsmaximums bei $\lambda = 290 \text{ nm}$ (2-Desoxy-5'-amino-UMP: $\lambda = 290 \text{ nm}$)²³¹ in 28 % Ausbeute nach Ionenaustauschchromatographie zur freien Säure unter gleichzeitiger Reinigung der Verbindung, da sich nur die freie Säure für die nachfolgende Diazotierung eignete. Dies war zugleich der kritischste Schritt des gesamten Syntheseprotokolls worin auch die sehr geringe Ausbeute begründet liegt. Die anschließende Diazotierung mit salzsaurer Natriumnitritlösung, gefolgt von der Azidierung mit Natriumazidlösung lieferte nach einer Stunde das 5'-Azido-UMP-Derivat **67** in 62 % Ausbeute nach Biogel-Reinigung und Gefriertrocknung.



Schema 59: Mechanismus der Diphenylchlorophosphat-Kupplung nach Michelson

Der abschließende Kupplungsschritt von **67** zum Triphosphat **68** wurde nach der Diphenylchlorophosphat-Kupplungs-Methode nach Michelson²³² durchgeführt.

Der alternative Weg mittels einer Carbonyldiimidazol-Kupplung nach Weckbecker und Keppler²³³ wurde nicht verfolgt. Zunächst wurde das Monophosphat **67** zum Tri-*n*-butylammoniumsalz in eine organisch lösliche Form überführt und in einer Lösung von Dioxan und DMF mit Diphenylphosphochloridat gemäß Reaktionsschema 59 zum diphenylgeschütztem Diphosphoanhydrid umgesetzt. Die anschließende nukleophile Substitution der diphenylgeschützten Phosphatgruppe durch Pyrophosphat in Form des Bis(tri-*n*-butylammonium)-salzes unter Schlenk-Bedingungen in Pyridin führte zu 5'-Azidonucleosidtriphosphat **68** in 31 % Ausbeute nach Reinigungs- und Ionenaustauschschritten unter Konversion von **68** in die freie Säure.



Schema 60: Pyrophosphorylase-katalysierter potentieller chemoenzymatischer Zugang zum photoaffinem UDP-GalNAc-Derivat **69**

Das 5'-Azidouridiny-5-triphosphat (**68**) stellt ein potentiell geeignetes Substrat-Analogon zur Photoaffinitätsmarkierung von UDP-GalNAc-Pyrophosphorylase dar. Alternativ erlaubt das bei positivem Ausgang aus dieser Reaktion nach Schema 60 hervorgehende 5''-Azido-UDP-GalNAc (**69**) neben den Diazirinphosphaten **44** und **45** die photoaffinitätsmarkierende Untersuchung von UDP-GalNAc-Transferase-Enzymen in Bestrahlungsexperimenten.

6. Zusammenfassung

N-Acetylgalactosaminyl-Transferasen sind unter Verwendung ihres biogenen Leloir-Glykosylierungs-Donors UDP-*N*-Acetamidogalactose (UDP-GalNAc) am sequentiellen Aufbau von Glykokonjugaten, darunter Sphingolipiden und Gangliosiden beteiligt. Letztere regulieren den essentiellen Lipidstoffwechsel menschlicher Nervenzellen und zahlreiche lysosomale Glykosphingolipid-Speicherkrankheiten, die sich auf eine Defizienz beim Abbau vereinzelter Ganglioside zurückführen lassen, sind bekannt, sowie die daran beteiligten Hydrolasen, die mittlerweile gut charakterisiert sind. Demgegenüber sind die am Gangliosid-Aufbau beteiligten membrangebundenen GalNAc-Transferasen strukturell weniger gut untersucht da sie sich bewährten Methoden wie der Röntgenkristallographie bislang entziehen und alternative Untersuchungsmethoden auf der Grundlage von Enzym-Substrat-Wechselwirkungs-Studien und Affinitätsmarkierungen erfordern. Die Darstellung neuer, zu diesem Zweck verwendbarer Struktur-Analoga des UDP-GalNAc sind in dieser Arbeit beschrieben.

Im ersten Teil wurden ausgehend von Benzylether-geschützten Glycalen die beiden α -Phosphate des Glucosamin- und des Galactosamins unter Einführung der verkappten Aminogruppe in Form des Azids und nach Anwendung des Phosphoramidit-Verfahrens synthetisiert. Diese erwiesen sich als hervorragend funktionalisierbare Bausteine und erlaubten im ungeschütztem Zustand durch Reaktion mit entsprechenden Estern des *N*-Hydroxysuccinimids die Herstellung von *N*-Acylamidohexopyranosylphosphaten. Unter Anwendung dieser selektiven Acylierungs-Methodik gelang in Ausbeuten um 80 bis 90 % die Herstellung der entsprechenden *N*-Propionylamido-, *N*-Butyramido und *N*-Isobutyramido-hexopyranosylphosphate sowohl in der *gluco*- als auch in der *galacto*-Reihe sowie zusätzlich die des *N*-Acetamido- und *N*-Bromacetamido-hexopyranosylphosphate in der *galacto*-Reihe. Diese Methode wurde auf andere Ester mittlerer Reaktivität übertragen und führte so neben *N*-Formamidoglykopyranosylphosphaten beider Konfigurationen ferner zu den *N*-(2-Azidoacet)amido- und *N*-Trifluoracetamido-galactopyranosylphosphaten unter Zuhilfenahme von halogeniertem Phenylformiat, 2-Bromacetyl-bromid und Ethyltrifluoracetat als hochselektive *N*-Acylierungs-

reagenzien, wobei in in letzterem Falle ein effizienter Syntheseweg über Oxazoline als stereochemisch kontrollierbare Phosphorylierungs-donoren erarbeitet wurde.

Der in dieser Arbeit erstmals an Aminoglykopyranosylphosphaten ausgeführte Diazotransfer zu Azidophosphaten in über 60 % Ausbeute erwies sich an beiden Schlüssel-Bausteinen als gangbar und eröffnet neben der Synthese zweier Diazirin-modifizierter Struktur-Analoga des *N*-Acetylgalactosamin den Zugang zu Enzymsubstrat-Analoga für Photoaffinitätsmarkierungsexperimente.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden sämtliche höher funktionalisierten Glykopyranosylphosphate unter Anwendung des Phosphomorpholidat-Kupplungsverfahren zu den entsprechenden UDP-GlcNAc- und UDP-GalNAc -Strukturanaloga in Ausbeuten zwischen 25 % und 35 % umgesetzt. Die allen synthetisierten Phosphaten zugrundeliegenden Aminophosphat-Bausteine hingegen erwiesen sich gegenüber der Morpholidat-Kupplungsmethode als inkompatibel.

Versuche zur Herstellung des nach der Morpholidat-Methode nicht synthetisierbaren UDP-Galactosamins erlaubten schließlich die Optimierung des Transferase-enzymatischen Synthesewegs, womit allerdings nur 12 % Ausbeute erzielt werden konnten. Darüberhinaus konnte die Verbindung sowohl aus einem Azido-UDP-Galactose-Derivat als auch über das *N*-trifluoracetylierte UDP-Galactosamin in guten bis sehr guten Ausbeuten erhalten werden. UDP-Galactosamin erwies sich jedoch als nicht vergleichbar funktionalisierbar wie die Aminophosphat-Bausteine, die ihrer Rolle als Schlüssel-Intermediate zu höher funktionalisierten Hexopyranosylphosphaten und weiterführend zu den entsprechenden UDP-Hexosen gerecht wurden.

Im dritten und letzten Teil dieser Arbeit wurde in der Reihe der Photoaffinitäts-Enzymsubstrat-Analoga neben den zuckerseitig Azid- und Diazirin-modifizierten UDP-Hexosaminen ein enzymatisch oder zu Kupplungszwecken verwendbares photosensitives 5'-Azido-UTP-Derivat erreicht. Ausgehend von UMP wurde in einem 11-stufigem Syntheseweg durch Nitrierung, Diazotierung und anschließender Substitution das Azid hergestellt.

6. Summary

By use of their naturally occurring Leloir glycosylation donor substrate UDP-*N*-acetamido galactose (UDP-GalNAc) *N*-acetylgalactosamine transferases take part in the stepwise glycosylation towards glycoconjugates. Among these are sphingolipids and gangliosides, which regulate the essential lipid metabolism in human nervous system cells. Many glycosphingolipid storage diseases, based on the deficient degradation of specific gangliosides are known, including the many well characterized hydrolases taking part in this process. Their counter parts, the ganglioside generating membrane bound transferases are so far less well investigated since they are rarely applicable to common methods like x-ray crystallography and therefore require alternative investigative techniques based on enzyme-substrate interaction studies and affinity labelling. New structure analogues of UDP-GalNAc which can be employed for this purpose are described within this work.

In the first part of this work the syntheses of the α -Phosphates of glucosamine and galactosamine (**18** and **23**) starting from benzyl protected glycals are described. By introduction of the amino group via an azide and subsequent use of the phosphoramidite method those phosphates were obtained. They proved to be versatile building blocks for further derivatisation in their unprotected state and could be reacted to *N*-acylamidohexosyl phosphates with appropriate ester compounds derived from *N*-hydroxysuccinimide. By use of this selective acylating method the preparation of the corresponding *N*-propionylamido-, *N*-butyramido und *N*-isobutyramido-hexosylphosphates in both the *gluco* and *galacto* series and additionally *N*-acetamido- und *N*-bromoacetamido-hexosylphosphates in the *galacto* series were achieved in yields ranging from 80 to 90 %. This method was applied to other esters with moderate reactivity and led next to *N*-formamidoglycosyl phosphates for both configuration to the formation of *N*-(2-azidoacet)amido- and *N*-trifluoro-acetamidogalactosyl phosphates via the halogenated phenylformiate, 2-bromoacetyl bromide and ethyl trifluoroacetate as highly selective acylating reagents.

In the latter case an efficient synthetic pathway via oxazolines as stereochemically controllable phosphorylating donors was additionally established.

With both amino phosphate key intermediates an azido transfer reaction was successfully applied for the first time within this work in yields exceeding 60 %. Further the synthesis of two structural analogues of *N*-acetylgalactosamine displaying a diazirine moiety was established. Thus, a the pathway towards enzyme substrate analogues for photoaffinity labelling studies was opened.

In the second part of this work all of the derivatized glycosyl phosphates were converted to the corresponding UDP-GlcNAc and UDP-GalNAc structural analogues in yields ranging from 25 % to 35 % utilizing the phosphomorpholidate coupling procedure. Both the amino phosphate building blocks from which all other synthesized phosphates were derived proved to be incompatible towards the morpholidate coupling method.

Attempts to synthesize UDP-galactosamine which failed to react under morpholidate coupling conditions finally led to an improved enzymatic pathway with 12 % yield employing a transferase. Further the desired compound could be obtained in good to excellent yield either via an azido-UDP-galactose derivative or via a *N*-trifluoroacetylated UDP-galactosamine upon deprotection. UDP-galactosamine, on the other hand, proved not to be a versatile component for various conversions in contrast to the amino phosphate building blocks. This justifies their role as key intermediates enroute to higher functionalized hexosyl phosphates and further towards their corresponding UDP-hexoses.

In the third and final part of this work in the series of enzyme substrate analogues for photoaffinity labelling in addition to the UDP-hexosamines displaying a sugarside azido or diazirine moiety a photosensitive 5'-azido-UTP compound was synthesized starting from UMP by ways of nitration, diazotation and subsequent azide substitution. This compound could be further potentially processed enzymatically or by a coupling method.

7. Experimenteller Teil

7.1. Allgemeine Methoden

Analytische und präparative Chromatographie

Alle Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelfolien (DC-Alufolien, Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck) verfolgt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Absorption und / oder durch Besprühen mit 20%iger ethanolischer Schwefelsäure und anschließender Wärmebehandlung oder durch Besprühen mit einer 10 %igen Molybdätophosphorsäure-Lösung und anschließendem Erhitzen. Glykosylbromide im speziellen wurden durch Behandlung mit essigsaurer 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung (1 : 1) gefolgt von 1 %iger Fluoresceinlösung in Ethanol / Wasser (1 : 1) und anschließender Wärmebehandlung detektiert.

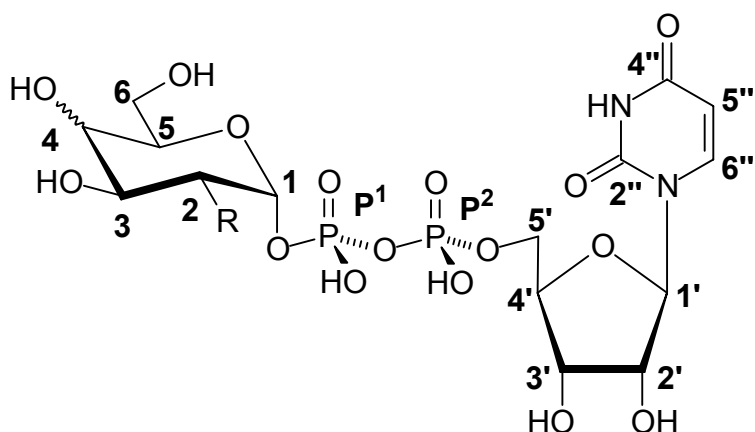
Die Kieselgelchromatographie wurde nach dem Flashverfahren bei einem Überdruck von 0.3-0.6 bar mit Kieselgel 60 (230-400 mesh, Korngröße 40-63 µm) der Hersteller Merck oder ICN mit den jeweils angegebenen destillierten organischen Solventmischungen durchgeführt. Gelpermeationschromatographie (GPC, auch Größenausschluß- oder Size Exclusion Chromatography, SEC) erfolgte an Biogel[®] P-2 (Bio-Rad, fine, 45-90 µm) mit Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (250 mM) oder deionisiertem Wasser an einer 2cm x 160 cm oder 3 cm x 130 cm Säule. Die Zuordnung der einzelnen Fraktionen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie an Kieselgelfolie (DC-Alufolien, Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck) mit hauptsächlich 2-Propanol / 2 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung (2 : 1) oder konz. Ammoniak / 2-Propanol / Wasser / Toluol (15 : 50 : 25 : 10). Für Ionenaustausch-chromatographische Trennungen wurde DEAE-Sephacel[®] (Pharmacia, 2 × 30 cm) unter Anwendung eines Gradienten von 30 mM nach 400 mM wässriger Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung verwendet. Detektionen durch analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden an einem LaChrom[®]-HPLC-System mit einer Druckgradientenpumpe vom Typ L-7000 und substanzspezifisch mittels eines UV-

Diodenarray-Detektors UV-(L-7455) oder Brechungsindex-Detektor RI-(L-7490) der Firma Merck durchgeführt.

Zur Reaktionsverfolgung und Analytik der Phosphatierungen und Zuckernukleotid-Kupplungsreaktionen wurden neben analytischen Merck LiChrosorb[®] NH₂-Säulen (4 x 250 mm, 5 µm, 1 ml/min) auch Merck LiChrosorb[®] RP-18-Säulen (4 x 250 mm, 5 µm, 1 ml/min) sowie Thermo Hypersil Hypercarb[®] Säulen mit porösem graphitischem Kohlenstoff als Füllmaterial (3 x 250 mm, 5 µm, 0.32 ml/min) verwendet.

Spektroskopie und Spektrometrie

Die Messung der NMR-Spektren erfolgte an einem Bruker Spektrometer AMX-400 (¹H: 400.13 MHz, ¹³C: 100.61 MHz) bzw. einem Bruker Spektrometer DRX-500 (¹H: 500.13 MHz, ¹³C: 125.83 MHz) bei 300 K im Automationsbetrieb. Wenn erforderlich, wurden für die Zuordnung der Signale ¹H¹H-COSY-, ¹H¹³C-COSY, TOCSY-, sowie HMQC- und HMBC-Experimente durchgeführt. Als interner Standard wurden Tetramethylsilan bzw. o-Phosphorsäure verwendet, oder es wurde auf das charakteristische Lösungsmittelsignal von CHCl₃ in CDCl₃ (7.26 ppm), d₃-MeOH in d₄-MeOH (3.31 ppm), d₅-DMSO in d₆-DMSO (2.50 ppm), d₆-Aceton (2.05 ppm) oder HDO in D₂O (4.79 ppm) kalibriert. Die Spektren wurden nach Erster Ordnung ausgewertet, die Konnektivitäten der Kohlenstoffatome wurde durch DEPT- oder PENDANT-Experimente ermittelt. Zur Kennzeichnung der Multiplizitäten der Signale finden folgende Abkürzungen Anwendung: s (Singulett), bs (breites Singulett), d (Dublett), dd (doppeltes Dublett), ddd (Dublett eines doppelten Dubletts), bd (breites Dublett), dt (doppeltes Triplet), q (Quartett), dq (doppeltes Quartett), t (Triplet), vt (virtuelles Triplet), m (Multiplet durch Signalüberlagerung mehrerer nichtäquivalenter Protonen). Die Zuordnung der Signale der Ribofuranose und des Uracilrings neben denen einer über zwei Phosphatgruppen verbrückten Hexopyranose erfolgte nach folgendem Nummerierungsschema der C-Atome und der mit ihnen assoziierten Protonen.



^{31}P - und ^{19}F -Spektren wurden ausschließlich am DRX-500 (^{31}P : 202.5 MHz, ^{19}F : 470.6 MHz) gemessen und waren wie die ^{13}C -Spektren Protonenbreitband-entkoppelt. Feinstruktur und Signalaufspaltung in ^{13}C -Spektren sind daher durch ^1J - bis ^4J -Kopplung zu Phosphor- und Fluoratomen verursacht.

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisierung - Time Of Flight (MALDI-TOF)-Massenspektren wurden mit einem Bruker Biflex[®] III (N_2 -Laser, 337 nm, extern kalibriert) in einer DHB-Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure) gemessen. Fast Atom Bombardment (FAB)-MS wurde mit einem VG-Microtech Analytical 70-250S mit *m*-Nitrobenzylalkohol als Matrix und Elektrospray-Ionisation (ESI)-MS mit einem Mariner Biospectrometer durchgeführt.

Analytik

Die Bestimmung der Drehwerte erfolgte mit einem Perkin-Elmer-Polarimeter 341 (Natrium-D-Linie, 589 nm, 1 dm Küvettenlänge) bei 20 °C. Drehwerte wurden nur von anomererenreinen Verbindungen gemessen.

Ein Shimadzu-Spektralphotometer UV-160-A mit Polyethylenküvetten (Länge 1 cm) wurde für spektrometrische Messungen verwendet. Infrarot-Spektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer ATI Mattson Genesis Series FT-IR gemessen. Die Elementaranalysen wurden von der Abteilung Zentrale Elementanalytik des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg ausgeführt.

Reaktionsführung

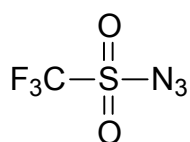
Die in Reaktionen verwendeten Lösungsmittel wurden stets frisch destilliert oder wenn nötig nach gängigen Labormethoden absolutiert. Wurden Reaktionen unter einer Argonatmosphäre nach der Schlenck-Technik durchgeführt, geschah dies in einer unter Vakuum gründlich ausgeheizten Apparatur. Druckhydrierungen wurden in einem Berghof-Hochdruckautoklaven mit Stahlummantelung und Tefloneinsatz des Typs HR-100 durchgeführt. Enzymatische Reaktionen wurden in einem Eppendorf Thermomixer comfort in Eppendorf Einweggefäßen zu 0.5, 1.5 oder 2.0 ml durchgeführt. Die Pufferlösungen für enzymatische Ansätze und Laufmittel für die Gelpermeationschromatographie wurden mit deionisiertem Wasser (Seralpur Pro 90C oder Millipore Milli-Q) angesetzt. Bei den Pufferlösungen für enzymatische Reaktionen wurde 0.02 % Natriumazid zugesetzt, um eine Kontamination durch Mikroorganismen zu vermeiden. Die Bestimmung und Einstellung von pH-Werten erfolgte nach Kalibrierung an Pufferlösungen (pH = 7.00 und pH = 4.00) mit einem Toledo MP220-pH-Meter oder WTW pH521-pH-Meter. Wässrige Lösungen wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und an einer Lyovac GT2 (Leybold-Heraeus) oder einer Alpha 1-4 LD (Christ) im Hochvakuum gefriergetrocknet.

Verwendete Enzyme

- Galactose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase (EC 2.7.7.12), Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Galactoseoxidase aus *Dactylium dendroides*, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Katalase aus *Aspergillus niger*, Sigma, Deisenhofen, Deutschland

7.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften

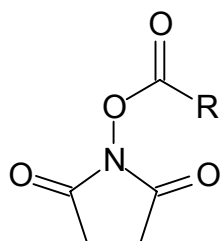
AAV 1: Präparation einer Triflylazid-Lösung in Dichlormethan²³⁴



Natriumazid (960 mg, 14.8 mmol) wird in deionisiertem Wasser (2.7 ml) gelöst und nach Zugabe von Dichlormethan (2 ml) auf ca. 2°C abgekühlt. Unter starkem Rühren wird Trifluormethansulfonsäureanhydrid (0.49 ml) in einem Zeitraum von 5 Minuten zugetropft.

Die zweiphasige Mischung wird 2 weitere Stunden bei Raumtemperatur so stark gerührt, daß eine Durchmischung beider Phasen stattfindet. Anschließend wird die organische Phase abgetrennt, die wässrige Phase wird zweimal mit je 2 ml Dichlormethan extrahiert, und dann sämtliche organischen Phasen vereint, sowie abschliessend einmal mit 2 ml einer gesättigten Natriumcarbonatlösung gewaschen. Nach Abtrennung der wässrigen Phase kann die erhaltene Lösung von Triflylazid in ca. 8 ml Dichlormethan ohne weitere Reinigungsschritte in einer metallkatalysierten Diazotransfer-Reaktion genutzt werden. Eine Aufbewahrung und Lagerung dieser Lösung erwies sich als nicht möglich. Sie wird dafür stets unmittelbar vor der Verwendung frisch hergestellt.

AAV 2: Herstellung O-acylierter N-Hydroxysuccinimide nach der DCC-Methode



Eine Lösung von *N*-Hydroxysuccinimid (1.0 equiv.), einer Carbonsäure (freie Säure, 1.1 equiv.), *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, zwischen 1.1 und 1.7 equiv. je nach Reaktivität der Carbonsäure) und einer katalytischen Menge 4-Pyrrolidinopyridin (ca. 0.01 equiv.) wird in trockenem Dichlormethan bis zur vollständigen und z.T. stark exothermen Umsetzung gerührt. Die

sich bildende Suspension wird vom ausgefallenen *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff filtriert, das Lösungsmittel vollständig entfernt, der Rückstand an Kieselgel (Petrolether / Ethylacetat 2:1 bis 1:1) gereinigt und gegebenenfalls aus dem selbem Lösungsmittelgemisch kristallisiert.

AAV 3: Selektive *N*-Acylierung von 2-Desoxy-2-aminozuckerphosphaten

D-Galactosamin-1-phosphat bzw. D-Glucosamin-1-phosphat (26 mg, 0.1 mmol) werden in deionisiertem Wasser (0.5 ml) gelöst und mit einer Lösung eines nach AAV 2 hergestellten *N*-Acyloxysuccinimids (0.15 mmol) in einem Gemisch aus THF / Wasser (4 : 1 – 9 : 1) versetzt.

Der pH-Wert dieser Mischung wird mit einer 400 mM wässrigen Kaliumhydroxidlösung auf 7.0 eingestellt. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und gegebenenfalls weiteres *N*-Acyloxysuccinimid (0.1 mmol) in einem Gemisch aus THF / Wasser (5 : 1 – 10 : 1) versetzt und anschliessend die pH-Einstellung auf 7.0 bis 7.5 durchgeführt. Nach beendeter Reaktion bzw. wenn kein weiteres Fortschreiten der Reaktion beobachtbar ist, wird die Reaktionsmischung ohne Vorreinigung auf Biogel P2 mit zunächst 250 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung, gefolgt von deionisiertem Wasser als Laufmittel eluiert. Nach Gefriertrocknung der das Produkt enthaltenden Fraktionen wird das Acylamidohexopyranosylphosphat in Ausbeuten von üblicherweise 80% - 90 % in Form eines farblosen und hygroskopischen Feststoffpulvers erhalten. Das Acylamidohexopyranosylphosphat wird als Ammoniumsalz gewonnen.

AAV 4: Morpholidatkupplung von Hexopyranosylphosphaten (mit 1*H*-Tetrazol)

Das aus AAV 3 hervorgegangene Hexopyranosyl-1-phosphat (0.18 mmol) wird in deionisiertem Wasser (1 ml) gelöst und durch eine Säule (1 cm x 5.5 cm) aus Kationentauscher Dowex 50W-X8 (Triethylammoniumform) geführt. Nach Gefriertrocknung wird das so quantitativ gewonnene Triethylammoniumsalz des Glykopyranosylphosphats in Form eines farblosen Pulvers zusammen mit Uridin-5'-monophosphomorpholidat (4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinium-Salz, ca. 1.6 – 1.7 equiv., 0.29 – 0.3 mmol) in absolutem Pyridin (10 ml) suspendiert und ohne äußere Wärmezufuhr bis zur Trockne im Vakuum eingeengt. Der darauffolgende Druckausgleich zum Normaldruck wird dabei mit trockenem Argon ausgeführt. Die Zugabe von absolutem Pyridin und die darauffolgende Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum ohne äußere Wärmezufuhr wird drei weitere Male wiederholt. Dabei ist zu beobachten, daß nach jedem Einengungsschritt mehr vom Hexopyranosylphosphat wie auch vom Monophosphomorpholidatreagenz in Pyridin in Lösung geht. Nachdem auf diese Weise insgesamt 40 ml Pyridin zwecks

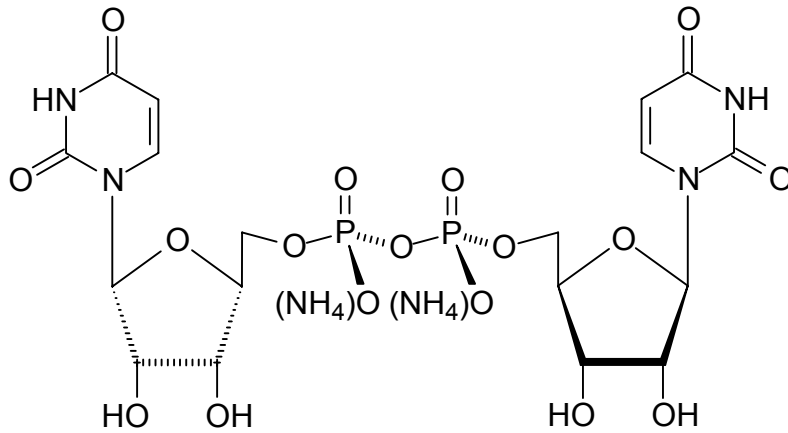
Trocknung der Reaktanden abgezogen sind, wird der mittlerweile sirupöse Rückstand ein letztes Mal in 3 ml absolutem Pyridin aufgelöst und 1*H*-Tetrazol (2.5 equiv., 0.45 mmol) zugegeben. Die resultierende trübe Lösung wird 5 – 7 Tage bei Raumtemperatur und unter Argon-Atmosphäre verschlossen gerührt. Das Lösungsmittel wird ohne Erwärmung im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser (5 ml) aufgenommen, filtriert und an Biogel P2 zunächst mit 250 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung eluiert und abschließend ein weiteres mal mit deionisiertem Wasser als Eluens entsalzt. Es wird die Uridindiphosphohexose in Form des Ammoniumsalzes als farbloses hygroskopisches Pulver isoliert.

AAV 5: Morpholidatkupplung von Hexosylphosphaten (ohne 1*H*-Tetrazol)

Das Glykopyranosyl-1-phosphat (0.18 mmol) wird in deionisiertem Wasser (1 ml) aufgenommen und nach Elution auf einer mit Triethylammoniumchlorid konditionierten Dowex 50W-X8 Ionentauschersäule (1 cm x 5.5 cm) als Triethylammoniumsalz nach Gefrier-trocknung gewonnen. Zusammen mit (4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarbox-amidinium)uridin-5'-monophosphomorpholidat (1.6 – 1.7 equiv., 0.29 – 0.3 mmol) wird es insgesamt vier mal zunächst in absolutem Pyridin (4 x 10 ml) suspendiert, und dann das Lösungsmittel im Vakuum bei Raumtemperatur abgezogen und anschließend der Druckausgleich mit Argonschutzgas vorgenommen. Der sirupartige Rückstand wird in einem Gemisch aus absolutem Pyridin und absolutem Dimethylformamid (~ 1 : 1.5 – 1 : 2) gut bis vollständig gelöst und ca. 5 Tage bei Raumtemperatur und unter Argon-Atmosphäre gerührt. Die Reaktionslösung wird im Verlauf der Aufarbeitung mit dem 10-fachen Volumen deionisiertem Wasser verdünnt, eingefroren und lyophilisiert. Der rohe Rückstand wird in 5 ml Wasser gelöst und nacheinander mit zunächst 250 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung sowie mit reinem Wasser an Biogel P2 gereinigt und entsalzt. Erhalten wird das Ammoniumsalz des Nucleosiddiphosphozuckers als hygroskopisches und farbloses Pulver.

Hauptnebenprodukt der Uridinmonophosphomorpholidat-Kupplungsreaktion:

P¹,P²-Diuridin-5,5'-pyrophosphat (Uridindiphosphouridin, UPPU)

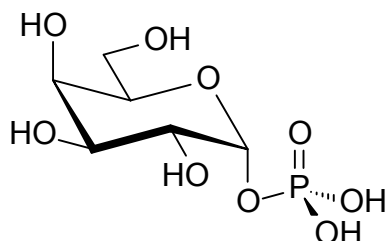


C₁₈H₃₀N₆O₁₇P₂ (664.41 g/mol)

¹H-NMR (400.14 MHz, D₂O): δ = 7.92 (d, 1H, H-6'); 5.91 (d, 1H, H-1); 5.84 (d, 1H, H-5'); 4.24 (dd, 1H, H-2); 4.22 (dd, 1H, H-3); 4.18 (bs≈m, 1H, H-4); 4.03 (m, 1H, H-5a); 3.98 (m, 1H, H-5b) ppm.

6.3 Spezielle Arbeitsvorschriften

α -D-Galactopyranosylphosphat (**5**)^{153,154}



1.15 g (1.44 mmol) Dibenzyl-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)phosphat (**4**, M = 800.89) werden in 30 ml eines homogenen Gemisches aus Wasser, Methanol und Ethylacetat (1 : 2 : 1) gelöst, wobei zunächst das Wasser, dann Methanol, gefolgt von Ethylacetat zugegeben werden. Nach Zugabe einer katalytischen Menge Palladium auf Aktivkohle (Pd / C, 10-%ig) wird die leicht getrübbte Suspension in Gegenwart von 50 bar Wasserstoffatmosphäre in einem Stahlautoklaven 2 Tage bei Raumtemperatur stark gerührt. Anschliessende wird über Celite filtriert und das suspendierte Palladium / Aktivkohle-Reagenz entfernt, dann die organischen Lösungsmittel Vakuum abgezogen und die verbliebene wässrige Lösung gefriergetrocknet. Das rohe entschützte Phosphat wird an Biogel P2 mit deionisiertem Wasser als Eluens gereinigt. Es werden 268 mg (72 %) des Galactopyranosylphosphats **5** als farbloser, schaumiger Feststoff in Form des freien Phosphorsäuremonoesters gewonnen.

$C_6H_{13}O_9P$ (260.14 g/mol)

Ausbeute: 268 mg (72 %), freie Säure, farbloser Feststoff

$[\alpha]_D^{20}$: - 72.5° (c = 1.0, Wasser)

1H -NMR (500.13 MHz, D_2O): δ = 5.56 (dd, 1H, H-1); 4.11 (m, 1H, H-5); 3.96 (dd, 1H, H-4); 3.86 (dd, 1H, H-3); 3.74 (m, 1H, H-2); 3.66 (m, 2H, H-6a und H-6b) ppm.

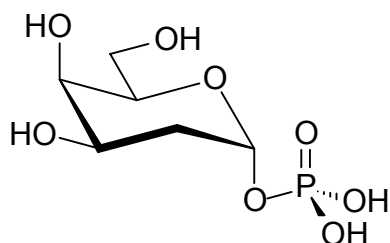
$^3J_{1,P}$ = 7.1; $J_{1,2}$ = 2.9; $J_{2,3}$ = 10.3; $J_{3,4}$ = 3.3; $J_{4,5}$ < 2; $J_{5,6a}$ = 5.9; $J_{5,6b}$ = 6.3; $J_{6a,6b}$ = 12.1 Hz

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, D_2O): $\delta = 95.8$ (d, C-1); 72.0 (C-5); 69.4 (C-4); 69.1 (C-3); 64.8 (d, C-2); 61.1 (C-6) ppm.

$^2\text{J}_{\text{C-1,P}} = 5.3$; $^3\text{J}_{\text{C-2,P}} = 8.1$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.5 MHz, D_2O): $\delta = 0.27$ ppm.

2-Desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**13**)¹⁵⁵



145 mg (0.21 mmol) Dibenzyl-(2-deoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-phosphat (**12**, $M = 694.76$ g/mol) werden in 10 ml Lösungsmittelgemisch (Wasser / Methanol / Ethylacetat, 1 : 2 : 1) gelöst, wobei zunächst das Wasser, dann Methanol, gefolgt von Ethylacetat zugegeben werden. Nach Versetzen mit einer katalytischen Menge Palladium auf Aktivkohle (Pd / C, 10-%ig) wird die Suspension bei Raumtemperatur und 50 bar Wasserstoffatmosphäre über Nacht autoklaviert. Durch anschließende Filtration an Celite wird das suspendierte Palladium / Aktivkohle-Reagenz entfernt, dann Ethylacetat und weitestgehend Methanol im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird einmal lyophilisiert und das rohe entschützte Phosphat an Biogel P2 mit deionisiertem Wasser als Eluens gereinigt. Es werden 33 mg (65 %) des 2-Desoxygalactopyranosylphosphats **13** als farbloser, schaumartiger Feststoff in Form des freien Phosphorsäuremonoesters gewonnen.

$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_8\text{P}$ (244.14 g/mol)

Ausbeute: 33 mg (65 %), freie Säure, farbloser Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: + 17.5° (c = 1.0, D_2O)

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 5.47 (m, 1H, H-1); 3.98 (ddd, 1H, H-3); 3.92 (dd, 1H, H-4); 3.84 (ddd≈dt, 1H, H-5); 3.67 (m, 2H, H-6a und H-6b); 2.14 (ddd, 1H, H-2_{ax}); 2.08 (ddd, 1H, H-2_{eq}) ppm.

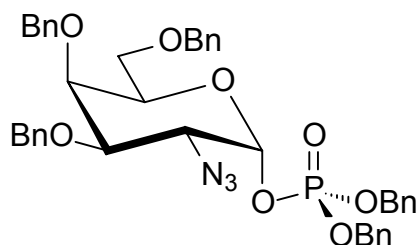
³J_{1,P} = 7.3; J_{1,2ax} = 3.6; J_{1,2eq} < 2; ²J_{2ax,2eq} = 13.7; J_{2ax,3} = 11.7; J_{2eq,3} = 5.6; J_{3,4} = 3.1; J_{4,5} < 2; J_{5,6a} = 5.1; J_{5,6b} = 6.1; J_{6a,6b} = 10.7 Hz.

¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 92.3 (d, C-1); 71.5 (C-5); 68.6 (C-4); 66.2 (C-3); 61.9 (C-6); 32.1 (d, C-2) ppm.

²J_{C-1,P} = 5.7; ³J_{C-2,P} = 8.3 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, Aceton-d₆): δ = - 0.21 ppm.

Dibenzyl-(2-azido-2-desoxy-3,4,6-tri-O-benzyl-α-D-galactopyranosyl)phosphat (17)



Methode 1 (mit 1H-Tetrazol als Phosphorylierungskatalysator):

368 mg (5.25 mmol) 1H-Tetrazol werden in einem zuvor ausgeheizten Kolben und unter Argonschutzgas in 3 ml absolutem Dichlormethan aufgenommen. Zu dieser Suspension werden 0.87 ml (894 mg, 2.59 mmol) Dibenzyl-N,N-diisopropylphosphoramidit zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der suspendierte Feststoff geht binnen dieser Zeit in Lösung. Zu dieser Lösung gibt man zügig eine Lösung von 513 mg (1.08 mmol) 2-Azido-3,4,6-tri-O-benzyl-2-desoxy-α/β-D-galactopyranose (**16**)^{186,187} (M = 475,54 g/mol) in 3 ml absolutem Dichlormethan

und rührt 5 Stunden bei Raumtemperatur und Schutzgasatmosphäre. Die so hergestellte hellgelbe Reaktionslösung wird anschließend auf 0°C abgekühlt und portionsweise mit 740 mg (3 mmol) 3-Chlorperbenzoesäure (~70 %ig, neben ~20 % 3-Chlorbenzoesäure und ~10 % Wasser) versetzt. Es wird eine weitere Stunde bei Raumtemperatur an der Luft gerührt und anschließend bei einer Badtemperatur von 30°C bis zur Trockne im Vakuum eingengt. Es verbleiben 2.57 g eines farblosen mit Öl durchsetzten Feststoffes, der an Kieselgel (Petrolether / Essigester, 7:2) gereinigt wird. Es werden 493 mg (62 %) der ausschließlich α -anomeren Titelverbindung **17** in Form eines farblosen Sirups isoliert. Ein entsprechendes β -Galactopyranosylphosphat wird nicht gefunden.

Methode 2 (mit Pyridiniumhydrochlorid als Phosphorylierungskatalysator):

Anstelle von 1*H*-Tetrazol werden 540 mg (4.67 mmol) Pyridiniumhydrochlorid in 5 ml absolutem Dichlormethan suspendiert. Es wird im folgenden wie nach Methode 1 verfahren, wobei 0.77 ml (795 mg, 2.3 mmol) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit mit 456 mg (0.96 mmol) 2-Azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- α/β -D-galactopyranose (**16**) sowie mit 658 mg (2.67 mmol) 3-Chlorperbenzoesäure (~70 %ig, neben ~20 % 3-Chlorbenzoesäure und ~10 % Wasser) zur Reaktion gebracht werden. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel werden 360 mg (51 %) des rein α -anomeren Produktes **17** gewonnen. Wie zuvor nach Methode 1 verbleibt ein entsprechendes β -Galactopyranosylphosphat undetektiert.

$C_{41}H_{42}O_8N_3P$ (735.77 g/mol)

Ausbeute: 493 mg (62 %) nach Methode 1, farbloser Sirup

360 mg (51 %) nach Methode 2, farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20}$: + 76° (c = 1.0, Chloroform)

Maldi-TOF (DHB, positive mode): m/z = 774 $[M + K]^+$, 758 $[M + Na]^+$, 746 $[M - N_2 + K]^+$, 730 $[M - N_2 + Na]^+$, 684 $[M - C_7H_7 + K]^+$, 668 $[M - C_7H_7 + Na]^+$.

IR (KBr): 2114 (ν - N_3) cm^{-1} .

¹H-NMR (400.13 MHz, Aceton-d₆): δ = 7.20 (m, 25H, 5 × Ph); 5.75 (dd, 1H, H-1); 4.99, 4.95 (2 × d, 4H, 2 × POCH₂Ph); 4.80, 4.77, 4.62, 4.47, 4.36, 4.29 (6 × d, 6H, 3 × OCH₂Ph); 4.18 (dd, 1H, H-4); 4.11 (dt, 1H, H-5); 3.99 (m, 2H, H-2 und H-3); 3.54 (dd, 1H, H-6a); 3.39 (dd, 1H, H-6b) ppm.

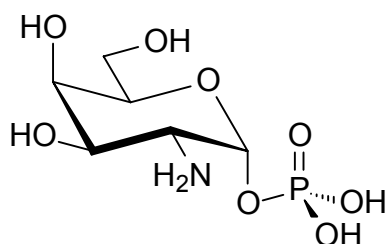
³J_{1,P} = 6.1; J_{1,2} = 3.1; J_{2,3} = 10.7; J_{3,4} = 3.1; J_{4,5} < 2; J_{5,6a} = 6.6; J_{5,6b} = 6.1; J_{6a,6b} = 9.4; ³J_{CH₂,P} = 7.6 Hz.

¹³C-NMR (100.61 MHz, Aceton-d₆): δ = 129.7, 2×129.6, 129.5, 129.4, 2×129.2, 2×129.1, 129.0, 128.8 128.7 (*tert.* C_{Ph}); 98.0 (d, C-1); 78.4 (C-3); 76.0 (OCH₂Ph); 74.6 (C-4); 74.3 (OCH₂Ph); 73.0 (C-5); 72.8 (OCH₂Ph); 70.3 (d, POCH₂Ph); 70.0 (d, POCH₂Ph); 69.9 (C-6); 61.2 (d, C-2) ppm.

²J_{C-1,P} = 6.1; ³J_{C-2,P} = 8.1; ²J_{CH₂,P} = 5.6 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, Aceton-d₆): δ = - 1.05 ppm.

2-Amino-2-desoxy-α-D-galactopyranosylphosphat (18)



470 mg (0.64 mmol) Dibenzyl-(2-azido-3,4,6-tri-O-benzyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)phosphat (**17**) werden in 20 ml Lösungsmittelgemisch (Wasser / Methanol / Ethylacetat, 1 : 2 : 1) gelöst, wobei zunächst das Wasser, dann Methanol gefolgt vom Ethylacetat zugegeben werden. Es wird unter Argonschutzgas mit 790 mg Palladium auf Aktivkohle (Pd/C, 10 %ig) versetzt und die vereinte Suspension in einem Autoklaven bei Raumtemperatur und 50 bar Wasserstoffatmosphäre mindestens 2 Tage gerührt. Zur Aufarbeitung wird das suspendierten

Palladium/Aktivkohle-Reagenz durch Filtration über Celite entfernt, die organischen Lösungsmittel des Filtrats im Vakuum abgezogen und die verbliebene hellgrüne Lösung an Biogel P2 mit deionisiertem Wasser als Eluens gereinigt. Es werden 117 mg (71 %) des α -D-Galactopyranosaminy-1-phosphats (**18**) als farbloser, schaumiger Feststoff in Form des freien Phosphorsäuremonoesters erhalten.

$C_6H_{14}O_8NP$ (259.15 g/mol)

Ausbeute: 116.7 mg (71 %), freie Säure, farbloser Feststoff

$[\alpha]_D^{20}$: + 108° (c = 1.0, Wasser)

1H -NMR (500.13 MHz, D_2O): δ = 5.38 (dd, 1H, H-1); 3.88 (ddd \approx t, 1H, H-5); 3.80 (dd, 1H, H-3); 3.72 (dd \approx d, 1H, H-4); 3.47 (dd, 1H, H-6a); 3.42 (dd, 1H, H-6b); 3.20 (dd, 1H, H-2) ppm.

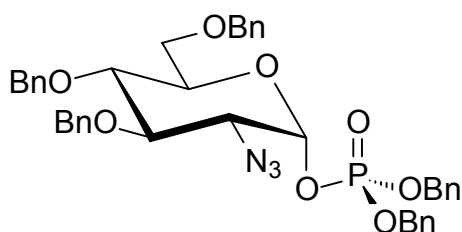
$^3J_{1,P}$ = 6.9; $J_{1,2}$ = 3.2; $^4J_{2,P}$ = 2.5 Hz; $J_{2,3}$ = 10.7; $J_{3,4}$ = 3.2; $J_{4,5}$ < 2; $J_{5,6a}$ = 6.9; $J_{5,6b}$ = 5.1; $J_{6a,6b}$ = 12.0 Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 91.5 (d, C-1); 71.8 (C-5); 68.6 (C-4); 66.8 (C-3); 61.4 (C-6); 51.7 (d, C-2) ppm.

$^2J_{C-1,P}$ = 4.6; $^3J_{C-2,P}$ = 7.4 Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): δ = 2.66 ppm.

Dibenzyl-(2-azido-2-desoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-glucopyranosyl)phosphat (**22**)



Methode 1 (mit 1H-Tetrazol als Phosphorylierungskatalysator):

307 mg (4.38 mmol) 1H-Tetrazol werden unter Schlenkbedingungen in 3 ml absolutem Dichlormethan suspendiert, gefolgt von der Zugabe von 0.73 ml (745 mg, 2.59 mmol) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit innerhalb von 10 Minuten und unter Rühren bei Raumtemperatur. Das suspendierte 1H-Tetrazol geht in dieser Zeit in Lösung, zu welcher zügig eine Lösung von 427 mg (0.9 mmol) 2-Azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- α/β -D-glucopyranose (**21**) ($M = 475.54$ g/mol) in 3 ml absolutem Dichlormethan gegeben wird. Es wird weitere 4 Stunden bei Raumtemperatur und Argonatmosphäre gerührt. Die so hergestellte hellgelbe Reaktionslösung wird anschließend auf 0°C abgekühlt und portionsweise mit 617 mg (2.5 mmol) 3-Chlorperbenzoesäure (~70 %ig, neben ~20 % 3-Chlorbenzoesäure und ~10 % Wasser) versetzt. Nach einer weiteren Stunde Rühren bei Raumtemperatur, wird bei einer Badtemperatur von 30°C bis zur Trockne im Vakuum eingengt. Es verbleiben 2.11 g eines farblosen öligen Pulvers, das an Kieselgel (Petrolether / Essigester, 3:1) gereinigt wird. Es werden 382 mg (58 %) der reinen α -anomeren Titelverbindung **22** in Form eines farblosen bis hellgelben Sirups isoliert. Ein entsprechendes β -Glucopyranosylphosphat bleibt unbeobachtet.

Methode 2 (mit Pyridiniumhydrochlorid als Phosphorylierungskatalysator):

Anstelle von 1H-Tetrazol werden 616 mg (5.32 mmol) Pyridiniumhydrochlorid in 4 ml absolutem Dichlormethan suspendiert. Das übrige Syntheseprotokoll entspricht dem nach Methode 1, wobei 0.88 ml (906 mg, 2.6 mmol) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit mit 520 mg (1.09 mmol) 2-Azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- α/β -D-glucopyranose (**21**) sowie mit 750 mg (3 mmol) 3-Chlorperbenzoesäure (~70 %ig, neben ~20 % 3-Chlorbenzoesäure und ~10 % Wasser) zur Reaktion gebracht werden. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel werden 399 mg (50 %) des α -anomeren Glucopyranosylphosphats **22** gewonnen. Wie zuvor nach Methode 1 läßt sich kein entsprechendes β -Glucopyranosylphosphat isolieren.

$C_{41}H_{42}O_8N_3P$ (735.77 g/mol)

Ausbeute: 382 mg (58 %) nach Methode 1, farbloser bis hellgelber Sirup

399 mg (50 %) nach Methode 2, farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20}$: - 42.5° ($c = 1.0$, Chloroform)

Maldi-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 774 [M + K]^+$, $758 [M + Na]^+$, $746 [M - N_2 + K]^+$, $730 [M - N_2 + Na]^+$, $684 [M - C_7H_7 + K]^+$, $668 [M - C_7H_7 + Na]^+$.

IR (KBr): $2114 (\nu-N_3) \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 7.19$ (m, 25H, $5 \times \text{Ph}$); 5.73 (dd, 1H, H-1); $4.98, 4.95$ ($2 \times \text{d}$, 4H, $2 \times \text{POCH}_2\text{Ph}$); $4.78, 4.76, 4.62, 4.46, 4.35, 4.28$ ($6 \times \text{d}$, 6H, $3 \times \text{OCH}_2\text{Ph}$); 3.86 (ddd \approx dt, 1H, H-5); 3.84 (dd, 2H, H-3); 3.74 (dd, 1H, H-2); 3.71 (dd, 1H, H-4); 3.67 (dd, 1H, H-6a); 3.54 (dd, 1H, H-6b) ppm.

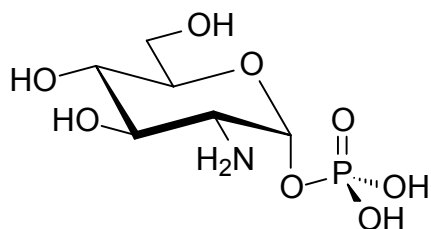
$^3J_{1,P} = 6.1$; $J_{1,2} = 3.3$; $J_{2,3} = 10.7$; $J_{3,4} = 10.1$; $J_{4,5} = 9.8$; $J_{5,6a} = 4.3$; $J_{5,6b} = 2.7$; $J_{6a,6b} = 13.1$;
 $^3J_{\text{CH}_2,P} = 7.6$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 129.3, 2 \times 129.2, 129.1, 2 \times 128.8, 128.7, 2 \times 128.4, 128.2, 2 \times 128.0, 127.8$ (*tert.* C_{Ph}); 97.8 (d, C-1); 81.7 (C-3); 76.5 (OCH_2Ph); 75.8 (C-4); 74.8 (OCH_2Ph); 74.0 (C-5); 73.4 (OCH_2Ph); 70.6 (d, POCH_2Ph); 70.2 (d, POCH_2Ph); 69.2 (C-6); 65.1 (d, C-2) ppm.

$^2J_{\text{C-1,P}} = 6.1$; $^3J_{\text{C-2,P}} = 8.3$; $^2J_{\text{CH}_2,P} = 5.6$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.5 MHz, Aceton- d_6): $\delta = -0.87$ ppm.

2-Amino-2-desoxy- α -D-glucopyranosylphosphat (23)



379 mg (0.52 mmol) Dibenzyl-(2-azido-3,4,6-tri-O-benzyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl)phosphat (**22**) werden in 25 ml Lösungsmittelgemisch (Wasser /

Methanol / Ethylacetat, 4 : 7 : 4) gelöst, wobei zunächst das Wasser, dann Methanol gefolgt vom Ethylacetat zugegeben werden. Es werden unter Argonschutzgas zügig 650 mg Palladium auf Aktivkohle (Pd/C, 10 %ig) zugegeben und die vereinte Suspension in einem Autoklaven bei Raumtemperatur und 65 bar Wasserstoffatmosphäre 3 Tage stark gerührt. Zur Aufarbeitung wird das suspendierten Palladium/Aktivkohle-Reagenz durch Filtration über Celite entfernt, die organischen Lösungsmittel des Filtrats im Vakuum abgezogen und die verbliebene grüngraue trübe Lösung an Biogel P2 mit deionisiertem Wasser als Eluens gereinigt. Es werden 89 mg (67 %) des α -D-Glucopyranosaminyl-1-phosphats (**23**) als farbloser und voluminöser Schaum in Form des freien Phosphorsäuremonoesters erhalten.

$C_6H_{14}O_8NP$ (259.15 g/mol)

Ausbeute: 89 mg (67 %), freie Säure, farbloser schaumiger Feststoff

$[\alpha]_D^{20}$: - 36.5° (c = 1.0, Wasser)

1H -NMR (500.13 MHz, D_2O): δ = 5.36 (dd, 1H, H-1); 3.66 (dd, 1H, H-3); 3.63 (ddd \approx t, 1H, H-5); 3.61 (dd, 1H, H-6a); 3.55 (dd, 1H, H-6b); 3.25 (dd, 1H, H-4); 2.94 (dd, 1H, H-2) ppm.

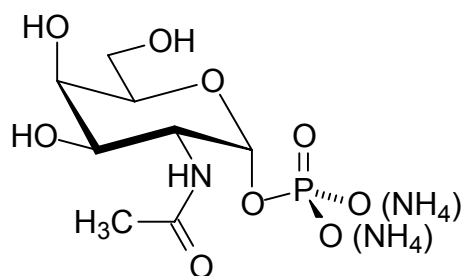
$^3J_{1,P}$ = 7.1; $J_{1,2}$ = 3.2; $^4J_{2,P}$ = 2.5 Hz; $J_{2,3}$ = 10.6; $J_{3,4}$ = 9.7; $J_{4,5}$ = 9.7; $J_{5,6a}$ = 4.1; $J_{5,6b}$ = 2.7; $J_{6a,6b}$ = 12.7 Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 91.3 (d, C-1); 72.8 (C-5); 70.1 (C-3); 69.8 (C-4); 60.7 (C-6); 55.6 (d, C-2) ppm.

$^2J_{C-1,P}$ = 5.7; $^3J_{C-2,P}$ = 7.8 Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): δ = 2.70 ppm.

2-Acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**24**)



Nach AAV 3 werden 259 mg (1.0 mmol) 2-Amino-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**18**) mit 400 mg (2.55 mmol) *N*-Acetoxysuccinimid ($M = 157.13$ g/mol) zur Reaktion gebracht. Es werden nach Gefriertrocknung 306 mg (91 %) der Titelverbindung **24** in Form des Ammoniumsalzes und als farbloser aufgeschäumter Feststoff erhalten.

$C_8H_{22}O_9N_3P$ (335.25 g/mol)

Ausbeute: 306 mg (91 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff

$[\alpha]_D^{20}$: + 74.5° ($c = 1.0$, Wasser)

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): $\delta = 5.41$ (dd, 1H, H-1); 4.16 (m, 1H, H-2); 4.10 (dt, 1H, H-5); 3.98 (dd, 1H, H-4); 3.90 (dd, 1H, H-3); 3.79 (m, 2H, H-6a und H6b); 1.87 (s, 3H, CH_3) ppm.

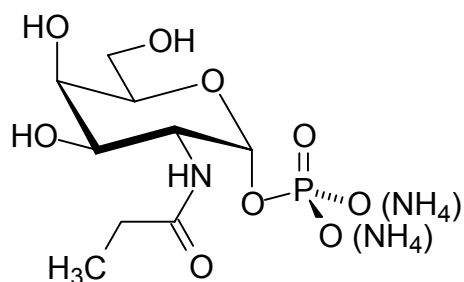
$^3J_{1,P} = 7.4$; $J_{1,2} = 3.3$; $J_{2,3} = 10.9$; $J_{3,4} = 3.1$; $J_{4,5} < 2$; $J_{5,6a} = 6.4$; $J_{5,6b} = 6.1$; $J_{6a,6b} = 11.7$ Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): $\delta = 178.2$ (CO); 94.0 (d, C-1); 72.0 (C-5); 68.9 (C-4); 67.8 (C-3); 61.8 (C-6); 50.3 (d, C-2); 22.1 (CH_3) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 5.9$; $^3J_{C-2,P} = 7.7$ Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): $\delta = 0.37$ ppm.

2-Desoxy-2-propionylamido- α -D-galactopyranosylphosphat (**25**)



Nach AAV 3 werden 88 mg (0.34 mmol) 2-Amino-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**18**) mit der korrespondierenden Menge *N*-Propionylloxysuccinimid zur Reaktion gebracht. Es werden 96 mg (90 %) der Titelverbindung **25** als farbloser amorpher Feststoff nach Gefriertrocknung erhalten.

$C_9H_{24}O_9N_3P$ (349.28 g/mol)

Ausbeute: 96 mg (90 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroscopischer Feststoff

$[\alpha]_D^{20}$: + 98° (c = 1.0, Wasser)

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): δ = 5.12 (dd, 1H, H-1); 3.88 (m, 1H, H-2); 3.83 (dt, 1H, H-5); 3.71 (dd, 1H, H-4); 3.63 (dd, 1H, H-3); 3.43 (m, 2H, H-6a und H6b); 1.99 (q, 2H, CH_2); 0.79 (t, 3H, CH_3) ppm.

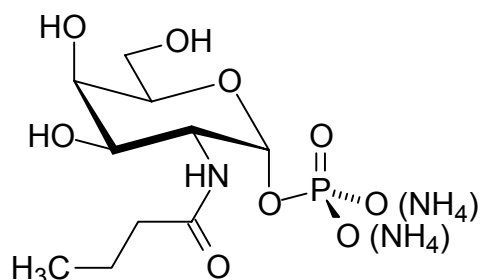
$^3J_{1,P}$ = 7.4; $J_{1,2}$ = 3.3; $J_{2,3}$ = 10.9; $J_{3,4}$ = 3.1; $J_{4,5}$ < 2; $J_{5,6a}$ = 6.4; $J_{5,6b}$ = 6.1; $J_{6a,6b}$ = 11.7 Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 178.2 (CO); 94.0 (d, C-1); 72.0 (C-5); 68.9 (C-4); 67.8 (C-3); 61.8 (C-6); 50.3 (d, C-2); 29.5 (CH_2); 9.8 (CH_3) ppm.

$^2J_{C-1,P}$ = 5.9; $^3J_{C-2,P}$ = 7.7 Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): δ = 0.35 ppm.

2-Butyramido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**26**)



Gemäß AAV 3 werden 81 mg (0.31 mmol) 2-Amino-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**18**) mit der entsprechenden Menge *N*-Butyroxysuccinimid zur Reaktion gebracht. Es werden 86 mg (84 %) der Titelverbindung **26** als farbloses hygroskopisches Pulver nach dem Lyophilisieren gewonnen.

$C_{10}H_{26}O_9N_3P$ (363.3 g/mol)

Ausbeute: 86 mg (84 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff

$[\alpha]_D^{20}$: + 79° (c = 1.0, Wasser)

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): δ = 5.35 (dd, 1H, H-1); 4.12 (m, 1H, H-2); 4.12 (dt, 1H, H-5); 3.94 (dd, 1H, H-4); 3.86 (dd, 1H, H-3); 3.67 (m, 2H, H-6a und H6b); 2.23 (t, 2H, CH_2); 1.55 (m, 2H, CH_2); 0.86 (t, 3H, CH_3) ppm.

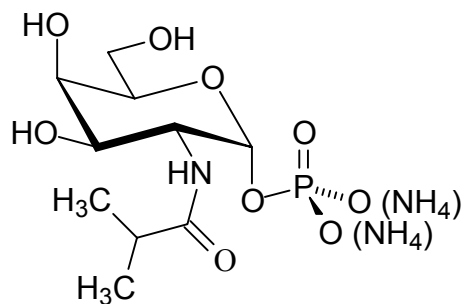
$^3J_{1,P}$ = 7.4; $J_{1,2}$ = 3.6; $J_{2,3}$ = 10.6; $J_{3,4}$ = 3.3; $J_{4,5}$ < 2; $J_{5,6a}$ = 5.3; $J_{5,6b}$ = 4.7; $J_{6a,6b}$ = 12.7 Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 178.3 (CO); 93.8 (d, C-1); 71.8 (C-5); 69.1 (C-4); 66.2 (C-3); 61.7 (C-6); 50.3 (d, C-2); 38.1 (CH_2); 19.3 (CH_2); 13.2 (CH_3) ppm.

$^2J_{C-1,P}$ = 5.9; $^3J_{C-2,P}$ = 7.8 Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): δ = 2.63 ppm.

2-Desoxy-2-isobutyramido- α -D-galactopyranosylphosphat (27)



Nach AAV 3 werden 80 mg (0.31 mmol) 2-Amino-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**18**) mit der entsprechenden Menge *N*-Isobutyroxysuccinimid umgesetzt. Nach Gefriertrocknung werden 88 mg (86 %) der Titelverbindung **27** als amorpher farbloser und hygroskopischer Feststoff isoliert.

$C_{10}H_{26}O_9N_3P$ (363.3 g/mol)

Ausbeute: 88 mg (86 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff

$[\alpha]_D^{20}$: + 73° (c = 1.0, Wasser)

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): δ = 5.30 (dd, 1H, H-1); 3.82 (m, 1H, H-2); 3.77 (dt, 1H, H-5); 3.68 (dd, 1H, H-4); 3.59 (dd, 1H, H-3); 3.36 (m, 2H, H-6a und H6b); 1.87 (m, 1H, CH_2); 0.82 (d, 6H, $2 \times CH_3$) ppm.

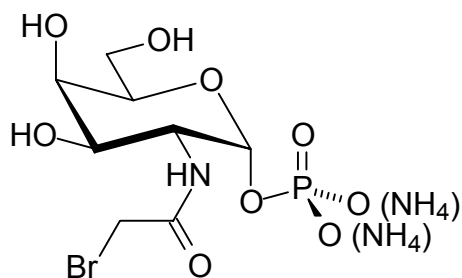
$^3J_{1,P}$ = 6.8; $J_{1,2}$ = 3.4; $J_{2,3}$ = 10.7; $J_{3,4}$ = 3.2; $J_{4,5}$ < 2; $J_{5,6a}$ = 6.9; $J_{5,6b}$ = 6.1; $J_{6a,6b}$ = 12.0 Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 178.1 (CO); 93.8 (d, C-1); 72.0 (C-5); 68.4 (C-4); 68.0 (C-3); 61.7 (C-6); 50.4 (d, C-2); 28.7 (CH); 12.7 (CH_3) ppm.

$^2J_{C-1,P}$ = 5.7; $^3J_{C-2,P}$ = 7.8 Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): δ = 2.58 ppm.

2-(2-Bromacetamido)-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**28**)



Methode 1:

Unter Anwendung der AAV 3 werden 103 mg (0.40 mmol) 2-Amino-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**18**) mit einer ausreichenden Menge *N*-(2-Bromacetoxy)-succinimid zur Umsetzung gebracht. Isoliert werden nach dem Lyophilisieren 124 mg (82 %) des Ammoniumsalzes der Titelverbindung **28** in Form eines farbloser und hygroskopischen, sowie voluminösen Pulvers.

Methode 2:

82 mg (0.32 mmol) der freien Säure von 2-Amino-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**18**) werden an einer Ionentauschersäule Dowex 50W-X8 (Tetrabutylammoniumform) in das entsprechende Tetrabutylammoniumsalz überführt und mit 4 ml eines Gemisches Dimethylformamid / Tetrahydrofuran (1:2) zur Lösung gebracht. Bei -20°C werden 22.5 μl (0.8 equiv., 0.26 mmol) α -Bromacetyl bromid langsam zugetropft, zunächst zwei weitere Stunden bei dieser Temperatur und dann über Nacht unter Erwärmung auf Raumtemperatur weitergerührt. Es wird mit 25 ml Wasser verdünnt und einmal mit 10 ml Dichlormethan gewaschen. Die wässrige Phase wird durch Gefriertrocknung eingeeengt und der Rückstand an Biogel P2 mit 250 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung als Eluens gereinigt. Es werden 63 mg (45 %) der Titelverbindung **28** als farbloses hygroskopischen Pulvers gewonnen.

$\text{C}_8\text{H}_{21}\text{O}_9\text{N}_3\text{Br}$ (414.2 g/mol)

Ausbeute: 124 mg (82 %) nach Methode 1.

63 mg (45 %) nach Methode 2.

Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer und hoch voluminöser Feststoff.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $+62^{\circ}$ ($c = 1.0$, Wasser)

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 5.47 (dd, 1H, H-1); 4.25 (m, 1H, H-2); 4.12 (dt, 1H, H-5); 4.01 (dd, 1H, H-4); 3.97 (dd, 1H, H-3); 3.73 (m, 2H, H-6a und H6b); 2.60 (m, 2H, CH₂) ppm.

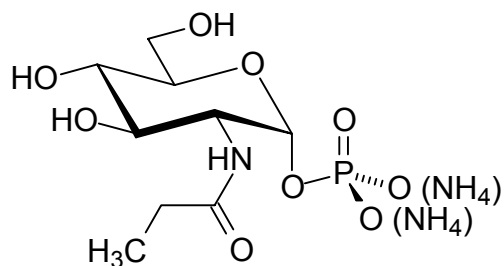
³J_{1,P} = 7.6; J_{1,2} = 3.6; J_{2,3} = 10.9; J_{3,4} = 3.3; J_{4,5} < 2; J_{5,6a} = 6.4; J_{5,6b} = 6.1; J_{6a,6b} = 11.7 Hz.

¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 171.5 (CO); 94.0 (d, C-1); 72.2 (C-5); 68.8 (C-4); 67.6 (C-3); 61.6 (C-6); 50.4 (d, C-2); 38.1 (CH₂); 19.3 (CH₂); 13.2 (CH₃) ppm.

²J_{C-1,P} = 5.7; ³J_{C-2,P} = 8.1 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = 2.88 ppm.

2-Desoxy-2-propionylamido-α-D-glucopyranosylphosphat (**29**)



Nach AAV 3 werden 75 mg (0.29 mmol) 2-Amino-2-desoxy-α-D-glucopyranosylphosphat (**23**) mit der korrespondierenden Menge *N*-Propionyloxysuccinimid zur Reaktion gebracht. Es werden 80 mg (79 %) der Titelverbindung **29** als farbloser amorpher Feststoff nach Gefriertrocknung erhalten.

C₉H₂₄O₉N₃P (349.28 g/mol)

Ausbeute: 80 mg (79 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff

[α]_D²⁰: + 35° (c = 1.0, Wasser)

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 5.55 (dd, 1H, H-1); 4.02 (m, 1H, H-2); 3.97 (m, 1H, H-5); 3.90 (m, 2H, H-6a und H-6b); 3.83 (dd, 1H, H-3); 3.57 (dd, 1H, H-4); 2.51 (q, 2H, CH₂); 1.28 (t, 3H, CH₃) ppm.

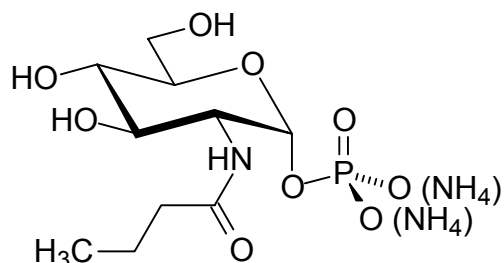
³J_{1,P} = 7.1; J_{1,2} = 3.3; J_{2,3} = 10.3; J_{3,4} = 9.7; J_{4,5} = 9.6; J_{5,6a} = 4.3; J_{5,6b} = 2.7; J_{6a,6b} = 12.9 Hz.

¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 178.9 (CO); 94.7 (d, C-1); 73.2 (C-5); 71.1 (C-3); 69.8 (C-4); 60.7 (C-6); 53.7 (d, C-2); 29.6 (CH₂); 9.9 (CH₃) ppm.

²J_{C-1,P} = 5.7; ³J_{C-2,P} = 8.1 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = 0.27 ppm.

2-Butyramido-2-desoxy-α-D-glucopyranosylphosphat (**30**)



Gemäß AAV 3 werden 73 mg (0.28 mmol) 2-Amino-2-desoxy-α-D-glucopyranosylphosphat (**23**) mit der entsprechenden Menge *N*-Butyroxysuccinimid zur Reaktion gebracht. Es werden 88 mg (86 %) der Titelverbindung **30** als farbloses hygroskopisches Pulver nach dem Lyophilisieren gewonnen.

C₁₀H₂₆O₉N₃P (363.3 g/mol)

Ausbeute: 88 mg (86 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff

[α]_D²⁰: + 44° (c = 1.0, Wasser)

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 5.52 (dd, 1H, H-1); 4.01 (m, 1H, H-2); 3.96 (m, 1H, H-5); 3.88 (m, 2H, H-6a und H-6b); 3.83 (dd, 1H, H-3); 3.59 (dd, 1H, H-4); 3.40 (t, 2H, CH₂); 1.70 (m, 2H, CH₂); 1.01 (t, 3H, CH₃) ppm.

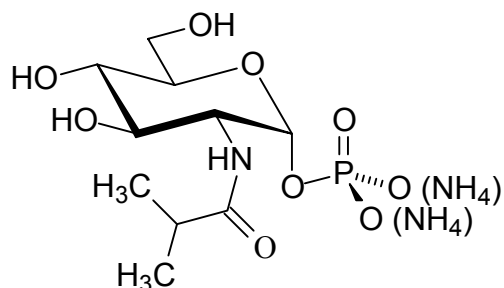
³J_{1,P} = 7.1; J_{1,2} = 3.3; J_{2,3} = 10.3; J_{3,4} = 9.7; J_{4,5} = 9.6; J_{5,6a} = 4.1; J_{5,6b} = 2.7; J_{6a,6b} = 12.9 Hz.

¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 178.1 (CO); 94.6 (d, C-1); 73.1 (C-5); 71.0 (C-3); 69.7 (C-4); 60.5 (C-6); 53.7 (d, C-2); 37.8 (CH₂); 19.3 (CH₂); 13.2 (CH₃) ppm.

²J_{C-1,P} = 6.1; ³J_{C-2,P} = 8.1 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = 1.86 ppm.

2-Desoxy-2-isobutyramido-α-D-glucofuranosylphosphat (31)



Nach AAV 3 werden 72 mg (0.28 mmol) 2-Amino-2-desoxy-α-D-galactopyranosylphosphat (**23**) mit der entsprechenden Menge *N*-Isobutyroxysuccinimid umgesetzt. Nach Gefriertrocknung werden 85 mg (84 %) der Titelverbindung als amorpher farbloser und hygroskopischer Feststoff isoliert.

C₁₀H₂₆O₉N₃P (363.3 g/mol)

Ausbeute: 85 mg (84 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff

[α]_D²⁰: + 19.5° (c = 1.0, Wasser)

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 5.53 (dd, 1H, H-1); 4.02 (m, 1H, H-2); 3.97 (m, 1H, H-5); 3.92 (m, 2H, H-6a und H-6b); 3.86 (dd, 1H, H-3); 3.60 (dd, 1H, H-4); 2.02 (m, 1H, CH₂); 1.11 (d, 6H, 2xCH₃) ppm.

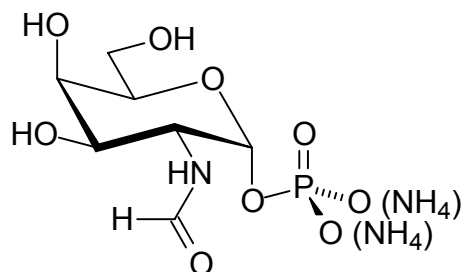
³J_{1,P} = 7.1; J_{1,2} = 3.1; J_{2,3} = 10.3; J_{3,4} = 9.7; J_{4,5} = 9.6; J_{5,6a} = 4.3; J_{5,6b} = 2.7; J_{6a,6b} = 12.7 Hz

¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 178.6 (CO); 94.7 (d, C-1); 73.1 (C-5); 71.2 (C-3); 69.9 (C-4); 60.6 (C-6); 53.9 (d, C-2); 28.7 (CH); 12.6 (CH₃) ppm.

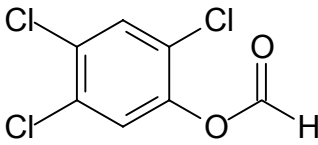
²J_{C-1,P} = 6.1; ³J_{C-2,P} = 8.3 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = 2.15 ppm.

2-Desoxy-2-formylamido-α-D-galactopyranosylphosphat (32)



Herstellung von 2,4,5-Trichlorphenylformiat¹⁷⁴

 Zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 3 g (65 mmol) 98 %iger Ameisensäure in 80 ml Ethylacetat werden 10.9 g (55 mmol) 2,4,5-Trichlorphenol gefolgt von 11.4 g (55 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) gegeben und eine Stunde zunächst bei 0°C, dann 3 weitere Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die sich bildende Suspension wird mit 100 ml Ethylacetat verdünnt, filtriert und 2 mal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung sowie einmal mit Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat und Einengen bis zur Trockne wird der rohe Rückstand aus 1-Bromhexan umkristallisiert. Erhalten werden 5.5 g (44 %) 2,4,5-

Trichlorphenylformiat als farbloser kristalliner Feststoff. Dieser findet für die nachfolgende selektive *N*-Formylierungsreaktion als Formylierungsreagenz Verwendung.

$C_7H_3Cl_3O_2$; $M = 225.46$ g/mol; IR (KBr): $\nu = 1729$ cm^{-1} ; Smp.: 69-70 °C, Lit.: 66-67 °C¹⁷⁴.

2-Desoxy-2-formylamido- α -D-galactopyranosylphosphat

Abweichend von AAV 3 zur selektiven *N*-Acylierung von 2-Aminohexosylphosphaten werden 49.5 mg (0.1 mmol) des Triethylammoniumsalzes von α -Galactopyranosaminy-1-phosphat (**18**) zusammen mit 22.5 mg (0.1 mmol) Trichlorphenylformiat und 13 mg (17 μ l, 0.1 mmol) Diisopropylethylamin (DIPEA) in 3 ml absolutem Dimethylformamid gelöst und 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnung mit 50 ml deionisiertem Wasser und Neutralisation mit 0.1 M salzsaure Lösung wird lyophilisiert und der Rückstand an Biogel P2 mit 0.25 M Ammoniumhydrogencarbonat eluiert.

Es werden 26 mg (81 %) der Titelverbindung **32** als farbloser, schaumartig amorpher Feststoff nach Gefriertrocknung erhalten.

$C_7H_{20}O_9N_3P$ (321.22 g/mol)

Ausbeute: 26 mg (81 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff

$[\alpha]_D^{20}$: + 58.5° (c = 1.0, Wasser)

1H -NMR (400.14 MHz, D_2O): $\delta = 5.66$ (dd, 1H, H-1); 4.48 (m, 1H, H-2); 4.14 (dt, 1H, H-5); 4.07 (dd, 1H, H-4); 3.99 (dd, 1H, H-3); 3.71 (m, 2H, H-6a und H6b) ppm.

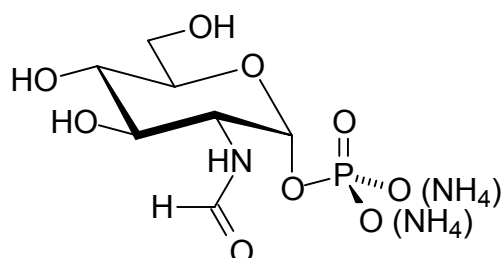
$^3J_{1,P} = 6.9$; $J_{1,2} = 3.3$; $J_{2,3} = 10.7$; $J_{3,4} = 2.8$; $J_{4,5} < 2$; $J_{5,6a} = 6.1$; $J_{5,6b} = 6.1$; $J_{6a,6b} = 12.0$ Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): $\delta = 168.1$ (CO); 91.0 (d, C-1); 72.0 (C-5); 68.5 (C-4); 66.8 (C-3); 61.4 (C-6); 51.7 (d, C-2) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 4.9$; $^3J_{C-2,P} = 7.9$ Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): $\delta = 0.93$ ppm.

2-Desoxy-2-formylamido- α -D-glucopyranosylphosphat (**33**)



Abweichend von AAV 3 werden 59 mg (0.12 mmol) des Triethylammoniumsalzes von α -Glucopyranosaminy-1-phosphat (**23**) zusammen mit 27 mg (0.1 mmol) 2,4,5-Trichlorphenylformiat und 15.5 mg (20.5 μ l, 0.12 mmol) Diisopropylethylamin (DIPEA) in 3 ml absolutem Dimethylformamid gelöst und 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnung mit 50 ml deionisiertem Wasser und Neutralisation mit 0.1 M salzsaurer Lösung wird lyophilisiert und der Rückstand an Biogel P2 mit 250 mM Ammoniumhydrogencarbonat eluiert. Es werden 30 mg (78 %) der Titelverbindung **33** als farbloser schaumartig amorpher Feststoff nach Gefriertrocknung erhalten.

$C_7H_{20}O_9N_3P$ (321.22 g/mol)

Ausbeute: 30 mg (78 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff

$[\alpha]_D^{20}$: + 66.5° (c = 1.0, Wasser)

1H -NMR (400.14 MHz, D_2O): δ = 5.52 (dd, 1H, H-1); 4.01 (m, 1H, H-2); 3.97 (m, 1H, H-5); 3.89 (m, 2H, H-6a und H-6b); 3.83 (dd, 1H, H-3); 3.57 (dd, 1H, H-4) ppm.

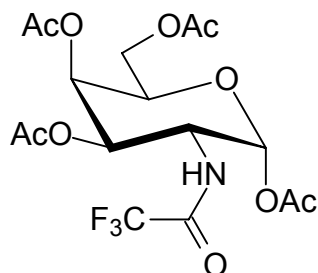
$^3J_{1,P}$ = 7.1; $J_{1,2}$ = 3.3; $J_{2,3}$ = 10.3; $J_{3,4}$ = 9.7; $J_{4,5}$ = 9.6; $J_{5,6a}$ = 4.3; $J_{5,6b}$ = 2.6; $J_{6a,6b}$ = 12.7 Hz

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 179.1 (CO); 94.7 (d, C-1); 73.2 (C-5); 71.2 (C-3); 69.6 (C-4); 60.2 (C-6); 53.6 (d, C-2) ppm.

$^2J_{C-1,P}$ = 6.1; $^3J_{C-2,P}$ = 8.3 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = 1.58 ppm.

2-Desoxy-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-trifluoroacetamido-α-D-galactopyranose (**35**)



Zu einer Suspension von 4.95 g (23 mmol) D-Galactosaminhydrochlorid in 70 ml absolutem Methanol werden nacheinander bei Raumtemperatur und unter Rühren 5.82 g (8 ml, 57.5 mmol) Triethylamin gefolgt von 4.6 g (3 ml, 25.3 mmol) Ethyltrifluoroacetat zugetropft. Bereits nach 15 Minuten geht die Suspension in eine dunkelorange bis braune Lösung über. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Nach Entfernen aller flüchtigen Komponenten im Vakuum wird der hellbraune Rückstand, bei dem es sich um rohe 2-Desoxy-2-trifluoroacetamido-α/β-D-galactopyranose (**34**) handelt, in 50 ml trockenem Pyridin aufgenommen und mit 46.8 g (43.4 ml, 460 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt. Es wird abermals über Nacht gerührt, das übrige Pyridin / Essigsäureanhydridgemisch im Vakuum abgezogen und das verbliebene braune Öl an Kieselgel (Petrolether / Ethylacetat 3:2) gereinigt.

Es werden 10.12 g (~ 100 %) eines mit 1.25 g (12 %) farblosem Kristallisat (α-Anomer **35α**) durchsetzten hellgelben Öls (β-Anomer **35β**) erhalten. Dies entspricht einem α/β-Anomerenverhältniss von näherungsweise 1 : 10. Eine analytische Menge des kristallinen α-Anomers wurde NMR-spektroskopisch charakterisiert.

C₁₆H₂₀O₁₀F₃N (443.33 g/mol)

Ausbeute: 10.12 g (~ 100%) hellgelber ölicher Kristallbrei, davon 1.25 g (12.3 %) α-anomerer kristalliner farbloser Feststoff.

[α]_D²⁰: + 37° (c = 1.0, Chloroform)

Maldi-TOF (DHB, positive mode): m/z = 466 [M + K]⁺, 482 [M + Na]⁺.

α -Anomer

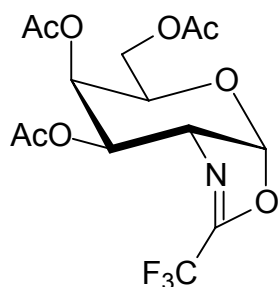
$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, D_2O): δ = 6.23 (d, 1H, H-1); 5.40 (dd, 1H, H-4); 5.23 (dd, 1H, H-3); 4.62 (m, 1H, H-2); 4.21 (dt, 1H, H-5); 4.04 (m, 2H, H-6a und H-6b), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.14 (s, 3H, OAc); 1.98 (s, 3H, OAc); 1.97 (s, 3H, OAc) ppm.

$J_{1,2}$ = 3.6; $J_{2,3}$ = 11.1; $J_{3,4}$ = 3.1; $J_{4,5}$ < 2; $J_{5,6a}$ = 6.6; $J_{5,6b}$ = 7.1; $J_{6a,6b}$ = 11.2 Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, D_2O): δ = 171.6 (CO); 170.8 (CO); 170.5 (CO); 169.1 (CO); 90.7 (C-1); 69.1 (C-5); 67.9 (C-3); 66.8 (C-4); 61.5 (C-6); 48.3 (C-2); 21.2 (CH_3); 21.1 (CH_3); 21.0 (CH_3); 19.9 (CH_3) ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (470.59 MHz, D_2O): δ = - 76.4 ppm.

2-Trifluormethyl-(1,2-didesoxy-3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-galactopyrano)[2,1-d]2-oxazolin (37)



10.1 g (22.8 mmol) eines Anomerengemisches von 2-Desoxy-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-trifluoracetamido-D-galactopyranose (**35**) wird in 3 ml Chloroform angelöst und unter Eiskühlung mit 25.7 g (55 ml, 0.32 mol) einer Mischung von 33 % Bromwasserstoff in Eisessig versetzt. Es wird 3.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, die praktisch schwarze Reaktionslösung mit 150 ml Dichlormethan verdünnt und 3 mal mit je 50 ml 20 %iger kalter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat wird im Vakuum zur Trockne eingengt und 7.1 g (67 %) rohes 2-Desoxy-3,4,6-tri-O-acetyl-2-

trifluoracetamido- α -D-galactopyranosylbromid (**36**) als dunkelbrauner amorpher Feststoff erhalten, der ohne weitere Aufreinigung in der nachfolgenden Herstellung der Verbindung **37** verwendet wird. Das Bromid wird in 150 ml absolutem Acetonitril gelöst, mit 2 g (2.2 ml, 16.8 mmol) *sym*-Collidin versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Nach Einengen wird der Rückstand mit Petrolether / Ethylacetat (2:1) sowie 1 %igem Zusatz an Triethylamin an Kieselgel gereinigt.

Es werden 3.26 g (37 %) des Oxazolins **37** gewonnen.

$C_{14}H_{16}O_8F_3N$ (383.28 g/mol)

Ausbeute: 3.26 g (37 %) farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20}$: + 52 (c = 1.0, Chloroform)

Ber.: C 43.87 H 4.21 N 3.65

Gef.: C 44.01 H 4.23 N 3.25

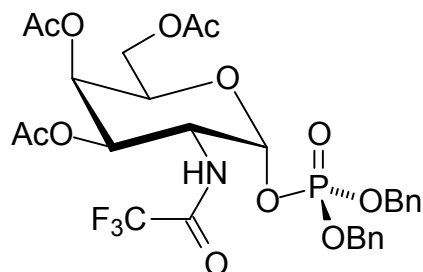
1H -NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.22 (d, 1H, H-1); 5.39 (dd, 1H, H-4); 4.82 (dd, 1H, H-3); 4.21 (dq, 1H, H-2); 4.16 (m, 2H, H-5 und H-6a); 4.07 (dd, 1H, H-6b), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.01 (bs, 6H, 2 \times OAc) ppm.

$J_{1,2}$ = 7.1; $J_{2,3}$ = 8.1; $J_{3,4}$ = 3.6; $J_{4,5}$ = 2.0; $J_{5,6a}$ = 6.1; $J_{5,6b}$ = 7.1; $J_{6a,6b}$ = 11.7 Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.8 (CO); 170.3 (CO); 170.1 (CO); 105.5 (C-1); 71.5 (C-5); 70.6 (C-3); 64.8 (C-4); 62.0 (C-2); 61.8 (C-6); 21.1 (CH_3); 21.0 (CH_3); 20.9 (CH_3) ppm.

^{19}F -NMR (470.59 MHz, $CDCl_3$): δ = - 71.5 ppm.

Dibenzyl-(2-desoxy-2-trifluoracetamido-3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl)phosphat (38**)**



3.24 g (8.45 mmol) 2-Trifluormethyl-(1,2-didesoxy-3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-galactopyrano)[2,1-d]2-oxazolin (**37**) und 2.58 g (9.3 mmol) Dibenzylphosphat werden zusammen in 50 ml absolutem 1,2-Dichlorethan unter Argonatmosphäre bei 100 °C refluxiert. Nach 6 Stunden lässt sich kein Oxazolin **37** detektieren und es wird zum dunkelroten Sirup eingeengt, welcher nach Reinigung an Kieselgel mit Petrolether / Ethylacetat (2:1) 3.04 g (54 %) des Trifluoracetamidogalactopyranosylphosphats **38** in Form des reinen α -Anomers liefert. Ein entsprechendes β -Anomer wird nicht beobachtet.

$C_{28}H_{31}O_{12}F_3NP$ (661.52 g/mol)

Ausbeute: 3.04 g (54 %) farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20}$: + 28° (c = 1.0, Chloroform)

Ber.: C 50.84 H 4.72 N 2.12

Gef.: C 50.92 H 4.72 N 1.41

Maldi-TOF (DHB, positive mode): m/z = 700 [M + K]⁺, 684 [M + Na]⁺.

Keine Kationenspezies [M – (BnO)₂PO₂]⁺ detektiert.

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃): δ = 7.30 (m, 10 H, 2×Ph); 5.72 (dd, 1H, H-1); 5.43 (dd, 1H, H-4); 5.18 (dd, 1H, H-3); 4.88 (m, 4H, 2×CH₂Ph); 4.57 (m, 1H, H-2); 4.25 (dt, 1H, H-5); 4.06 (dd, 1H, H-6a); 3.97 (dd, 1H, H-6b); 2.12 (s, 3H, OAc); 1.93 (s, 3H, OAc); 1.91 (s, 3H, OAc) ppm.

$^3J_{1,P} = 6.1$; $J_{1,2} = 3.1$; $J_{2,3} = 11.7$; $J_{3,4} = 3.1$; $J_{4,5} < 2$; $J_{5,6a} = 6.6$; $J_{5,6b} = 6.6$; $J_{6a,6b} = 11.2$ Hz.

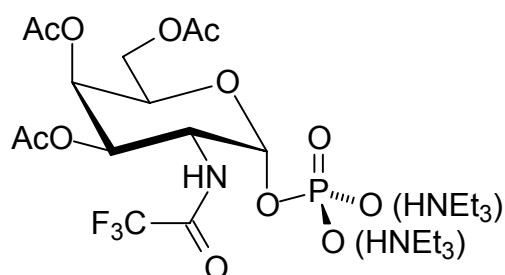
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, D_2O): $\delta = 170.9$ (CO); 170.7 (CO); 170.4 (CO); 129.4, 129.2, 129.1, 128.6, 128.5 (2 \times Ph); 96.2 (d, C-1); 70.5, 70.6 (2 \times CH₂Ph); 69.3 (C-5); 67.5 (C-3); 66.9 (C-4); 61.7 (C-6); 48.8 (d, C-2); 21.0 (CH₃); 20.9 (CH₃); 20.8 (CH₃) ppm.

$^2J_{\text{C-1,P}} = 6.4$; $^3J_{\text{C-2,P}} = 7.6$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.5 MHz, CDCl_3): $\delta = -1.95$ ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (470.59 MHz, CDCl_3): $\delta = -76.1$ ppm.

Bis(triethylammonium) (2-desoxy-2-trifluoroacetamido-3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl)phosphat (39)



Zu einer Lösung von 404 mg (0.61 mol) Dibenzyl-(2-desoxy-2-trifluoroacetamido-3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl)phosphat (**38**) in 6 ml Ethanol wird eine katalytische Menge 10%iges Palladium auf Aktivkohle-Reagenz zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur und Normaldruck-Wasserstoffatmosphäre gerührt.

Es wird über Celite filtriert und das Filtrat eingengt. Danach folgt die Reinigung des farblosen schaumigen Rückstands an Kieselgel mit einem Gemisch Chloroform / Methanol / Triethylamin (60:39:1). Es werden 269 mg (64 %) des α -Phosphats **39** in Form des Bis(triethylammonium)-Salzes als farbloser Feststoff gewonnen.

$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{P}$ (668.54 g/mol)

Ausbeute: 269 mg (64 %) farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20}$: + 17.5° (c = 1.0, Wasser)

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 5.61 (dd, 1H, H-1); 5.39 (dd, 1H, H-4); 5.32 (dd, 1H, H-3); 4.55 (dd, 1H, H-2); 4.46 (dt, 1H, H-5); 4.07 (dd, 1H, H-6a); 3.96 (dd, 1H, H-6b); 2.89 (q, 10H, N-CH₂CH₃); 2.10 (s, 3H, OAc); 1.96 (s, 3H, OAc); 1.88 (s, 3H, OAc); 1.20 (t, 15H, N-CH₂CH₃) ppm.

³J_{1,P} = 7.1; J_{1,2} = 2.6; J_{2,3} = 11.2; J_{3,4} = 3.1; J_{4,5} < 2; J_{5,6a} = 7.6; J_{5,6b} = 6.1; J_{6a,6b} = 11.2 Hz.

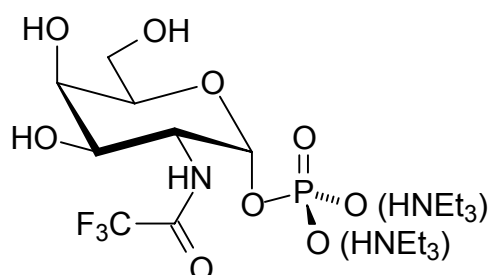
¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 171.0 (CO); 170.8 (2×CO); 93.9 (d, C-1); 69.1 (C-3); 67.8 (C-4 und C-5); 61.8 (C-6); 49.8 (d, C-2); 45.7 (N-CH₂CH₃); 21.2 (CH₃); 21.1 (CH₃); 21.0 (CH₃); 9.2 (N-CH₂CH₃) ppm.

²J_{C-1,P} = 6.3; ³J_{C-2,P} = 7.1 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = - 2.10 ppm.

¹⁹F-NMR (470.59 MHz, D₂O): δ = - 75.3 ppm.

Bis(triethylammonium) (2-desoxy-2-trifluoroacetamido-α-D-galactopyranosyl)-phosphat (40)



Herstellung einer methanolischen Guanidinlösung aus Guanidinhydrochlorid

201 mg (2.1 mmol) Guanidinhydrochlorid werden in 5 ml absolutem Methanol gelöst und 110 mg (2.03 mmol) festes Natriummethoxid zugegeben. Unter Fällung von Natriumchlorid wird eine Stunde bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre

gerührt, die Suspension durch einen Kanülenfilter filtriert und als klare Lösung erhalten. Die so bereite methanolische Guanidinlösung wird ohne weitere Aufreinigung für die nachfolgende selektive Deacetylierung von (2-Desoxy-2-trifluoracetamido-3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl)phosphat (**39**) verwendet.

Bis(triethylammonium)-(2-desoxy-2-trifluoracetamido- α -D-galactopyranosyl)-phosphat

Methode 1 (durch Deacetylierung mit methanolischem Guanidin)

Eine zuvor frisch bereitete Lösung von Guanidin (2.1 mmol, 3 equiv.) in trockenem Methanol wird zu 468 mg (0.7 mmol) Bis(triethylammonium) (2-Desoxy-2-trifluoracetamido-3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl)phosphat (**39**) gegeben und gegebenenfalls mit wenig absolutem Methanol verdünnt, bis sich ein pH-Wert von 11.5 einstellt. Es wird nicht länger als 3 Stunden bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt, mit 0.1 M salzsaurer Lösung bis pH 7.5 neutralisiert, kurz gerührt und zunächst bei 30°C eingengt, und dann letzte Reste Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. Der gelbe Rückstand wird an Biogel P2 mit 250 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung eluiert und liefert 239 mg (88 %) der Titelverbindung **40** in Form des farblosen Ammoniumsalzes.

Methode 2 (durch selektive Trifluoracetylierung)

Zu einer Suspension von 340 mg (0.74 mmol) des Triethylammoniumsalzes von Galactopyranosaminyl-1-phosphat (**18**) in 10 ml absolutem Methanol werden zunächst 175 μ l (186 mg, 1.84 mmol) trockenes Triethylamin, gefolgt von 100 μ l (115 mg, 0.81 mmol) Ethyltrifluoracetat gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Einengen im Vakuum wird der sirupöse Rückstand an Biogel P2 mit Wasser als Eluens gereinigt. Es werden 386 mg (97 %) der Titelverbindung **40** in Form des Triethylammoniumsalzes als farbloses Pulver erhalten.

$C_{20}H_{28}O_9F_3N_3P$ (542.43 g/mol)

Ausbeute: 386 mg (97 %) farbloser Feststoff.

$[\alpha]_D^{20}$: + 64° (c = 1.0, Wasser)

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 5.44 (dd, 1H, H-1); 4.23 (dd, 1H, H-2); 4.17 (dt, 1H, H-5); 4.02 (dd, 1H, H-3); 3.99 (dd, 1H, H-4); 4.73 (dd, 1H, H-6a); 3.70 (dd, 1H, H-6b); 3.14 (q, 8H, N-CH₂CH₃); 1.22 (t, 15H, N-CH₂CH₃) ppm.

³J_{1,P} = 7.3; J_{1,2} = 3.2; J_{2,3} = 10.4; J_{3,4} = 2.8; J_{4,5} < 2; J_{5,6a} = 7.1; J_{5,6b} = 6.1; J_{6a,6b} = 11.8 Hz.

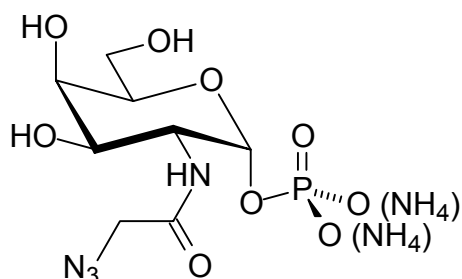
¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 93.8 (d, C-1); 71.8 (C-5); 69.0 (C-4); 67.8 (C-3); 61.6 (C-6); 52.7 (d, C-2); 47.1 (N-CH₂CH₃); 8.6 (N-CH₂CH₃) ppm.

²J_{C-1,P} = 6.1; ³J_{C-2,P} = 7.1 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = - 3.06 ppm.

¹⁹F-NMR (470.59 MHz, D₂O): δ = - 75.5 ppm.

2-(2-Azidoacetamido)-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**41**)



58 mg (0.14 mmol) 2-(2-Bromacetamido)-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**28**) werden an einer mit 2 M Tetrabutylammoniumchloridlösung konditionierten Ionenaustauschersäule Dowex 50W-X8 zum Tetrabutylammoniumsalz eluiert und nach Gefriertrocknung zusammen mit 39 mg (0.14 mmol) Tetrabutylammoniumazid drei Tage bei Raumtemperatur in 3 ml Methanol gerührt. Es wird mit 30 ml deionisiertem Wasser verdünnt, gefriergetrocknet an Biogel P2 mit 0.25 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung als Eluens gereinigt. Dabei werden 33 mg (63 %) des Azidozuckerphosphats **41** erhalten.

$C_8H_{21}O_9N_6P$ (376.26 g/mol)

Ausbeute: 33 mg (63 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff

$[\alpha]_D^{20}$: + 33° (c = 1.0, Wasser)

IR (KBr): 2086 (ν -N₃) cm^{-1} .

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 5.61 (dd, 1H, H-1); 4.37 (m, 1H, H-2); 4.24 (m, 1H, H-5); 4.07 (dd, 1H, H-4); 4.05 (dd, 1H, H-3); 3.80 (m, 2H, H-6a und H-6b); 2.62 (s, 2H, CH₂) ppm.

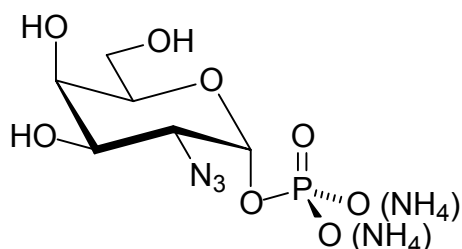
$^3J_{1,P}$ = 7.1; $J_{1,2}$ = 3.2; $J_{2,3}$ = 10.3; $J_{3,4}$ = 3.3; $J_{4,5}$ < 2; $J_{5,6a}$ = 6.3; $J_{5,6b}$ = 6.1; $J_{6a,6b}$ = 12.6 Hz

¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 171.9 (CO); 94.7 (d, C-1); 74.6 (CH₂); 72.3 (C-5); 68.7 (C-4); 67.6 (C-3); 61.2 (C-6); 50.3 (d, C-2) ppm.

$^2J_{C-1,P}$ = 5.9; $^3J_{C-2,P}$ = 7.8 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = 2.67 ppm.

2-Azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (42)



Unmittelbar vor der Reaktion wird eine Lösung von Trifluorsulfonylazid nach AAV 1 in der dort angegebenen Menge hergestellt und tropfenweise zu einer Lösung von 158 mg (0.61 mmol) 2-Amino-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**18**), 127 mg (0.92 mmol) Kaliumcarbonat und einer katalytischen Menge Kupfersulfat-pentahydrat in 10 ml eines Gemisch aus deionisiertem Wasser / Methanol (3 : 2) gegeben. In diese

Suspension werden nacheinander weitere 14.5 ml Methanol, gefolgt von 7 ml deionisiertem Wasser eingebracht und die so bereitete noch merklich trübe Lösung 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigung erfolgte nach Filtration durch Elution an Biogel P2 mit 250 mM Ammoniumhydrogencarbonat als Eluens unter Erhalt von 115 mg (59 %) des 2-Azidogalactopyranosylphosphats **42** in Form eines farbloses Feststoffpulver.

$C_6H_{18}O_8N_5P$ (319.21 g/mol)

Ausbeute: 115 mg (59 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff

$[\alpha]_D^{20}$: + 41° (c = 1.0, Wasser)

IR (KBr): 2087 (ν -N₃) cm^{-1} .

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 5.49 (dd, 1H, H-1); 4.08 (dt, 1H, H-5); 4.02 (dd, 1H, H-3); 3.95 (dd, 1H, H-4); 3.67 (m, 2H, H-6a und H6b); 3.44 (m, 1H, H-2) ppm.

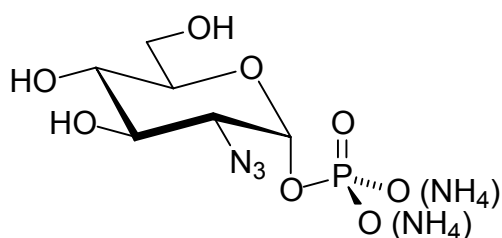
$^3J_{1,P}$ = 6.9; $J_{1,2}$ = 3.6; $J_{2,3}$ = 10.9; $J_{3,4}$ = 3.3; $J_{4,5}$ < 2; $J_{5,6a}$ = 7.4; $J_{5,6b}$ = 5.1; $J_{6a,6b}$ = 12.0 Hz.

¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 94.0 (d, C-1); 71.8 (C-5); 69.3 (C-4); 67.7 (C-3); 61.6 (C-6); 60.4 (d, C-2) ppm.

$^2J_{C-1,P}$ = 5.6; $^3J_{C-2,P}$ = 7.8 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = - 0.26 ppm.

2-Azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**43**)



Eine nach AAV 1 frisch hergestellte Lösung von Trifluorsulfonylazid in Dichlormethan (14.8 mmol) wird tropfenweise zu einer Lösung von 112 mg (0.43 mmol) 2-Amino-2-desoxy- α -D-glucopyranosylphosphat (**23**), 90 mg (0.65 mmol) Kaliumcarbonat und einer katalytischen Menge Kupfersulfat-pentahydrat in 10 ml eines Gemisch aus deionisiertem Wasser / Methanol (3 : 2) gegeben. In diese Suspension werden nacheinander weitere 13 ml Methanol, gefolgt von 5 ml deionisiertem Wasser eingebracht und die so bereitete fast klare Lösung 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration und anschließender Elution an Biogel P2 mit 250 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung als Eluens werden 87 mg (63 %) des Azidogluco-sylphosphats **43** in Form eines farblosen hygroskopischen Feststoffpulvers isoliert.

$C_6H_{18}O_8N_5P$ (319.21 g/mol)

Ausbeute: 87 mg (63 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff

$[\alpha]_D^{20}$: + 23.5° (c = 1.0, Wasser)

IR (KBr): 2089 (ν -N₃) cm⁻¹.

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 5.62 (dd, 1H, H-1); 4.25 (m, 1H, H-2); 3.89 (m, 1H, H-5); 3.85 (dd, 1H, H-3); 3.83 (dd, 1H, H-6a); 3.80 (dd, 1H, H-6b); 3.58 (dd, 1H, H-4) ppm.

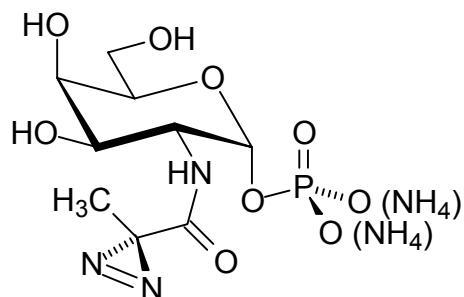
³J_{1,P} = 7.1; J_{1,2} = 3.2; J_{2,3} = 10.5 ; J_{3,4} = 9.7; J_{4,5} = 9.6; J_{5,6a} = 4.3; J_{5,6b} = 2.7; J_{6a,6b} = 13.0 Hz.

¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 94.7 (d, C-1); 73.2 (C-5); 71.2 (C-3); 70.2 (C-4); 64.3 (d, C-2); 60.7 (C-6) ppm.

²J_{C-1,P} = 5.3 ; ³J_{C-2,P} = 8.1 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = - 0.29 ppm.

2-(2-Azipropionylamido)-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (44)



Herstellung von *N*-(2-Azipropionyl)-oxysuccinimid

300 mg (3.4 mmol) Brenztraubensäure (2-Oxopropionsäure) werden in 5 ml deionisiertem Wasser gelöst, unter Rühren mit 40 %iger Tetrabutylammoniumhydroxidlösung bis zum Neutralpunkt versetzt und lyophilisiert. Das so gewonnene Tetrabutylammoniumpyruvat wird in 5 ml eines Gemisches abs. Methanol / abs. Dichlormethan (4:1) gelöst und auf ca. – 50°C gekühlt. Nun werden ca. 25 ml Ammoniak in diese Lösung einkondensiert und vier Stunden bei ca. – 20°C gerührt. Anschließend werden 460 mg (1.2 equiv., 4.1 mmol) Hydroxylamin-*O*-sulfonsäure, gelöst in wenig abs. Methanol, bei – 50°C zugetropft. Nach einer Stunde Rühren wird die Kühlung entfernt und über Nacht unter Verflüchtigung des Ammoniaks bei Raumtemperatur gerührt. Von festen Reaktanden wird abfiltriert und das Filtrat bei 30°C im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in Methanol aufgenommen und mit 2 ml Triethylamin versetzt, gefolgt von der Titration mit einer 10 %igen methanolischen Iod-Lösung bis zur bleibenden Gelbfärbung. Es wird abermals eingengt und der Rückstand in deionisiertem Wasser an einer Ionentauschersäule Dowex 50W-X8 (saure Form) eluiert und gefriergetrocknet. Es werden nacheinander 10 ml abs. Dichlormethan, 380 mg (3.3 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid und unter Eiskühlung 1.01 g (4.6 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid gefolgt von 10 mg 4-Pyrrolidinopyridin hinzugegeben und vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Vom Harnstoff wird abfiltriert und nach Entfernung des Lösungsmittels an Kieselgel mit Cyclohexan / Ethylacetat (7:1) säulenchromatographisch aufgereinigt. Es werden 221 mg (33 %) *N*-(2-Azipropionyl)-oxysuccinimid als Feststoff erhalten.

2-(2-Azipropionylamido)-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat

Nach AAV 5 werden 44 mg (0.17 mmol) 2-Amino-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**18**) mit *N*-(2-Azipropionyl)-oxysuccinimid zur Reaktion gebracht. Es werden 50 mg (78 %) der Titelverbindung **44** als farbloser amorpher Feststoff nach Gefriertrocknung erhalten.

C₉H₂₂O₉N₅P (375.28 g/mol)

Ausbeute: 50 mg (78 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff.

[α]_D²⁰: + 68° (c = 1.0, Wasser)

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 5.18 (dd, 1H, H-1); 3.90 (m, 1H, H-2); 3.85 (dt, 1H, H-5); 3.73 (dd, 1H, H-4); 3.64 (dd, 1H, H-3); 3.44 (m, 2H, H-6a und H6b); 1.87 (s, 3H, CH₃) ppm.

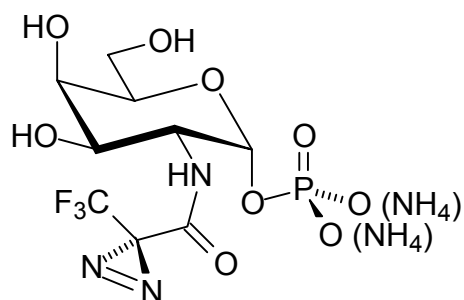
³J_{1,P} = 7.6; J_{1,2} = 3.1; J_{2,3} = 10.6; J_{3,4} = 3.2; J_{4,5} < 2; J_{5,6a} = 6.4; J_{5,6b} = 6.0; J_{6a,6b} = 12.0 Hz.

¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 177.8 (CO); 94.7 (d, C-1); 72.6 (C-5); 69.4 (C-4); 68.3 (C-3); 62.2 (C-6); 50.4 (d, C-2); 28.9 (CN₂); 20.8 (CH₃) ppm.

²J_{C-1,P} = 5.6; ³J_{C-2,P} = 7.8 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = 0.52 ppm.

2-(2-Azi-3,3-trifluorpropionylamido)-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (45)



Herstellung von *N*-(2-Azi-3,3,3-trifluorpropionyl)-oxysuccinimid

500 mg (4.9 mmol) Ethyl-3,3,3-trifluorpyruvat werden zu 10 ml 1 M schwefelsaurer Lösung gegeben und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wird jeweils dreimal mit 20 ml Ether sowie dreimal mit 20 ml Ethylacetat extrahiert und nach Einengen der vereinten organischen Extrakte eine wässrige Lösung des Rückstands unter Rühren mit 40 %iger Tetrabutylammoniumhydroxidlösung bis zum Neutralpunkt versetzt und gefriergetrocknet. Das Tetrabutylammoniumsalz der Trifluorbrenztraubensäure in 5 ml eines Gemisches abs. Methanol / abs. Dichlormethan (3:1) wird auf ca. – 50°C abgekühlt und ca. 20 ml Ammoniak in diese Lösung einkondensiert. Nach vier Stunden Rühren bei ca. – 20°C wird eine Lösung von 560 mg (5 mmol) Hydroxylamin-*O*-sulfonsäure in wenig Methanol langsam hinzugegeben und eine weitere Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Über Nacht lässt man die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmen, filtriert einmal und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und bei 30°C. Nach Aufnahme des Rückstands in 10 ml 10 %iger methanolischer Triethylamin-Lösung wird mit einer 10 %igen methanolischen Iod-Lösung bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Es wird abermals eingeeengt und der Rückstand in deionisiertem Wasser an einer Ionenaustauscher-säule Dowex 50W-X8 (saure Form) eluiert und gefriergetrocknet. Der Rückstand in 10 ml abs. Dichlormethan wird zunächst mit 515 mg (4.5 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, gefolgt von 1.36 g (6.2 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid und 10 mg 4-Pyrrolidinopyridin unter Eiskühlung versetzt. Nach drei Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird von festen Komponenten abfiltriert und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Cyclohexan / Ethylacetat (5:1) liefert 222 mg (28 %) des *N*-(2-Azi-3,3,3-trifluorpropionyl)-oxysuccinimidesters als hellgelbes Pulver.

2-(2-Azi-3,3,3-trifluorpropionylamido)-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat

Nach AAV 5 werden 42 mg (0.16 mmol) 2-Amino-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**18**) mit *N*-(2-Azi-3,3,3-trifluorpropionyl)-oxysuccinimid selektiv *N*-acyliert. Es werden 56 mg (81 %) der Titelverbindung **45** als farbloser amorpher Feststoff nach Gefriertrocknung erhalten.

$C_9H_{19}O_9N_5PF_3$ (429.25 g/mol)

Ausbeute: 56 mg (81 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff.

$[\alpha]_D^{20}$: + 75° (c = 1.0, Wasser)

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 5.21 (dd, 1H, H-1); 3.92 (m, 1H, H-2); 3.87 (dt, 1H, H-5); 3.74 (dd, 1H, H-4); 3.67 (dd, 1H, H-3); 3.45 (m, 2H, H-6a und H6b) ppm.

³J_{1,P} = 7.4; J_{1,2} = 3.3; J_{2,3} = 10.5; J_{3,4} = 3.1; J_{4,5} < 2; J_{5,6a} = 6.5; J_{5,6b} = 6.1; J_{6a,6b} = 12.7 Hz.

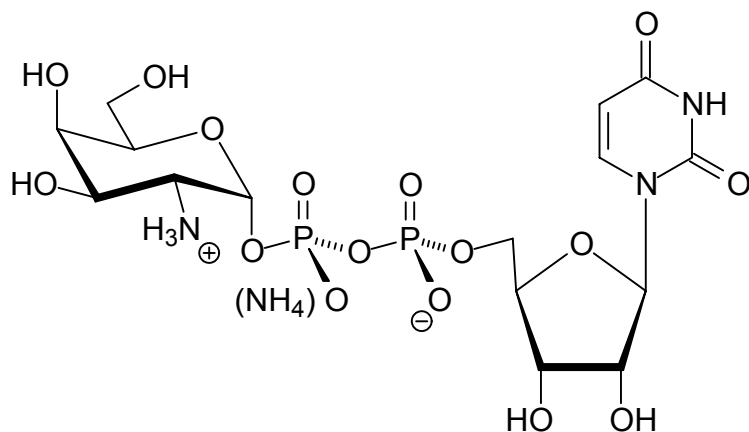
¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 176.2 (CO); 94.3 (d, C-1); 72.1 (C-5); 69.2 (C-4); 68.2 (C-3); 62.1 (C-6); 50.4 (d, C-2); 29.7 (CN₂) ppm.

²J_{C-1,P} = 5.7; ³J_{C-2,P} = 7.6 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = - 0.15 ppm.

¹⁹F-NMR (470.59 MHz, D₂O): δ = - 72.3 ppm.

Uridin-5'-(2-amino-2-desoxy-α-D-galactopyranosyldiphosphat) (46)



Methode 1 (mit Galactose-1-phosphaturidyl-Transferase)

Sowohl 442 mg (1.6 mmol) 2-Amino-2-desoxy-α-D-galactopyranosylphosphat (**18**) als auch 732 mg (1.2 mmol) Uridindiphosphoglucose (UDP-Glc) werden getrennt voneinander in jeweils 20 ml einer Lösung von 5mM 2-Mercaptoethanol in Wasser gelöst. Jeweils 0.5 ml aus beiden Lösungen werden zu 20 x 1 ml Portionen

zusammengegeben und jede dieser kombinierten Lösungen mit 0.5 U des Enzyms Galactose-1-phosphat-Uridyl-Transferase (E.C. 2.7.7.12) behandelt. Es wird der pH-Wert jeder einzelnen Lösung auf pH 8.7 eingestellt und 3 Tage im Thermoschüttler bei 30°C inkubiert. Innerhalb dieser Zeit wird alle 24 Stunden der pH-Wert sofern abweichend auf pH 8.7 korrigiert. Die einzelnen Lösungen werden im folgenden zusammengegeben, gefriergetrocknet, zunächst an Biogel P2 mit 250 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung eluiert und zuletzt mit deionisiertem Wasser an Biogel P2 entsalzt. Nach dem Lyophilisieren der Fraktionen der Titelverbindung, werden 112 mg (12 %) Uridindiphosphogalactosamin **46** als farbloses und stark hygroskopisches Pulver gewonnen.

Methode 2 (durch Hydrogenolyse aus **57**)

Zu einer Lösung von 17 mg Uridin-5'-(2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl-diphosphat) (**57**) (26.6 μ mol) in 2 ml deionisiertem Wasser werden 35 mg (0.55 mmol) Ammoniumformiat gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur und einer Wasserstoffatmosphäre unter Normaldruck gerührt. Es wird mit 20 ml deionisiertem Wasser verdünnt, einmal gefriergetrocknet und der Rückstand unter Entsalzen an Biogel P2 mit deionisiertem Wasser als Eluens gereinigt. 12 mg (77 %) an **46** werden in Form des Ammoniumsalzes nach Gefriertrocknung erhalten.

Methode 3 (durch De-trifluoracetylierung von **55**)

Es werden 30 mg Uridin-5'-(2-desoxy-2-trifluoracetamido- α -D-galactopyranosyl-diphosphat) (**55**) (43.1 μ mol) in 3 ml einer wässrigen Lösung von 1 M Ammoniumcarbonat gelöst, eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend gefriergetrocknet. Nach Entsalzen an Biogel P2 mit deionisiertem Wasser werden nahezu quantitativ 25 mg (97 %) des UDP-Galactosamins **46** als hygroskopisches Ammoniumsalz nach Lyophilisation isoliert.

$C_{16}H_{30}O_{16}N_4P_2$ (596.38 g/mol)

Ausbeute: 112 mg (12 %) nach Methode 1, Ammoniumsalz, farbloses
hygroskopisches Pulver
12 mg (77 %) nach Methode 2, Ammoniumsalz, farbloses
hygroskopisches Pulver

25 mg (97 %) nach Methode 3, Ammoniumsalz, farbloses
hygroskopisches Pulver

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 7.65 (d, 1H, H-6''); 5.68 (d, 1H, H-1'); 5.66 (d, 1H, H-5''); 5.55 (dd, 1H, H-1); 4.07 (m, 2H, H-2' und H-3'); 3.98 (m, 1H, H-4'); 3.94 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 3.90 (m, 1H, H-5); 3.78 (dd, 1H, H-3); 3.75 (dd, 1H, H-4); 3.44 (m, 2H, H-6a und H-6b); 3.22 (m, 1H, H-2); ppm.

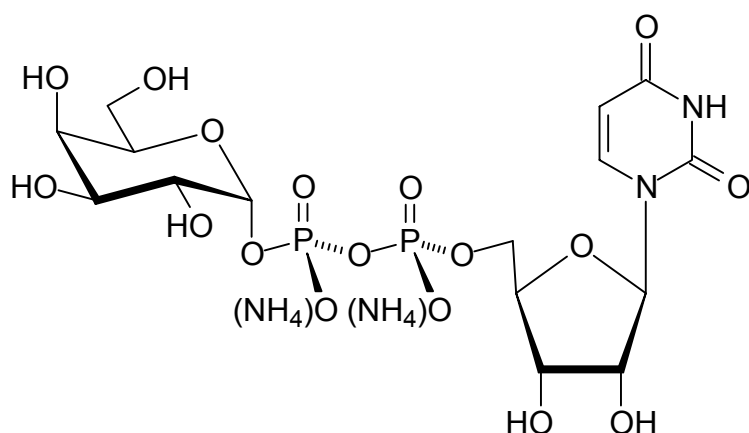
³J_{1,P} = 6.9; J_{1,2} = 3.6; J_{2,3} = 10.7; J_{3,4} = 3.3; J_{4,5} < 2; J_{5,6a} = 5.7; J_{5,6b} = 5.1; J_{6a,6b} = 12.0;
J_{1',2'} = 3.6; J_{5'',6''} = 8.1 Hz.

¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 165.2 (C-4''); 150.3 (C-2''); 142.0 (C-6''); 103.0 (C-5''); 93.6 (d, C-1); 88.9 (C-1'); 83.5 (d, C-4'); 74.1 (C-3'); 72.6 (C-5); 70.0 (C-2'); 68.4 (C-3); 67.1 (C-4); 65.5 (d, C-5'); 61.2 (C-6); 51.3 (d, C-2); ppm.

²J_{C-1,P} = 5.6; ³J_{C-2,P} = 9.2; ³J_{C-4',P} = 8.7; ²J_{C-5',P} = 5.6 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = -9.90 und -12.2 ppm.

Uridin-5'-(α-D-galactopyranosyldiphosphat) (47)



Methode 1 (mit Triethylammonium- α -D-galactopyranosylphosphat):

Unter Anwendung von AAV 4 werden 68 mg (261 μ mol) des Triethylammoniumsalzes von α -D-Galactopyranosylphosphat (**5**) mit 300 mg (1.7 eq., 444 μ mol) Uridinmonophospho-Morpholidat-Reagenz zur Umsetzung gebracht. Es werden nach Aufarbeitung und Gefriertrocknung 50 mg (32 %) der Titelverbindung **47** in Form des Ammoniumsalzes als hygroskopisches farbloses Pulver erhalten.

Methode 2 (mit Octylammonium- α -D-galactopyranosylphosphat):

Es wird nach Methode 1 verfahren, hingegen anstelle des Triethylammoniumsalzes 75 mg (288 μ mol) α -D-Galactopyranosylphosphat (**5**) ins *n*-Octylammoniumsalz umgewandelt und zusammen mit 330 mg (1.7 eq. 488 μ mol) Uridin-monophospho-Morpholidatkupplungsreagenz gemäß AAV 4 mit der dort angegebenen Menge 1*H*-Tetrazol umgesetzt. Gewonnen werden nach Aufarbeitung und Gefriertrocknung 52 mg (30 %) der Titelverbindung **47** in Form des Ammoniumsalzes als hygroskopisches farbloses Pulver.

C₁₅H₃₀O₁₇N₄P₂ (600.37 g/mol)

Ausbeute: 50 mg (32 %) nach Methode 1, Ammoniumsalz, farbloses hygroskopisches Pulver

52 mg (30 %) nach Methode 2, Ammoniumsalz, farbloses hygroskopisches Pulver

¹H-NMR (500.13 MHz, D₂O): δ = 7.89 (d, 1H, H-6''); 5.93 (d, 1H, H-1'); 5.92 (d, 1H, H-5''); 5.58 (dd, 1H, H-1); 4.32 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.23 (m, 1H, H-4'); 4.17 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 4.12 (m, 1H, H-5); 3.97 (dd, 1H, H-4); 3.86 (dd, 1H, H-3); 3.75 (m, 1H, H-2); 3.68 (m, 2H, H-6a und H-6b) ppm.

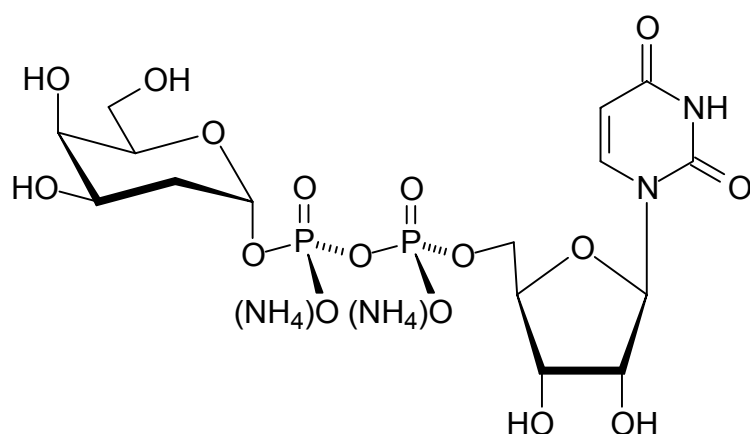
³J_{1,P} = 7.1; J_{1,2} = 2.8; J_{2,3} = 10.4; J_{3,4} = 3.2; J_{4,5} < 2; J_{5,6a} = 5.7; J_{5,6b} = 6.3; J_{6a,6b} = 12.3; J_{1',2'} < 5.0 ; J_{5'',6''} = 7.9 Hz.

¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 165.1 (C-4''); 150.2 (C-2''); 142.0 (C-6''); 103.0 (C-5''); 96.2 (d, C-1); 88.8 (C-1'); 83.6 (d, C-4'); 74.1 (C-3'); 72.3 (C-5); 70.0 (C-2'); 69.7 (C-4); 69.5 (C-3); 68.7 (d, C-5'); 65.3 (d, C-2); 61.4 (C-6) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 5.1$; $^3J_{C-2,P} = 8.1$; $^3J_{C-4',P} = 7.9$; $^2J_{C-5',P} = 5.1$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.5 MHz, D_2O): $\delta = -10.5$ und 12.2 ppm.

Uridin-5'-(2-desoxy- α -D-galactopyranosyldiphosphat) (**48**)



Methode 1 (mit 5 Äquivalenten 1H-Tetrazol):

Gemäß AAV 4 werden 31 mg (127 μmol) (2-Desoxy- α -D-galactopyranosyl)-phosphat (**13**) ins Triethylammoniumsalz umgewandelt und zusammen mit 137 mg (1.6 eq., 203 μmol) des 4-Morpholin- N,N' -dicyclohexylcarboxamidinium-Salzes von Uridin-5'-monophospho-morpholidat und abweichend von AAV4 45 mg (5.05 eq., 642 μmol) 1H-Tetrazol zur Umsetzung gebracht. Die Aufarbeitung durch dreimalige Reinigung an Biogel P2 mit 250 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung als Eluens und abschließende Gefriertrocknung führen zu 24 mg (32 %) des 2-Deoxyzuckernukleotids **48** als farbloses stark hygroskopisches Ammoniumsalz in Form eines Feststoffpulvers.

Methode 2 (ohne 1H-Tetrazol):

AAV 5 folgend werden 44 mg (180 μmol) (2-Desoxy- α -D-galactopyranosyl)-phosphat (**13**) ins Triethylammoniumsalz umgewandelt und zusammen mit 191 mg (283 μmol) des 4-Morpholin- N,N' -dicyclohexylcarboxamidinium-uridin-5'-monophospho-morpholidat zur Reaktion gebracht. Nach zweimaligem Eluieren an Biogel P2 mit 250 mM

Ammoniumhydrogencarbonatlösung und einmal mit deionisiertem Wasser sowie abschließender Gefriertrocknung werden 33 mg (31 %) des Nukleotidzuckers **48** gewonnen.

$C_{15}H_{30}O_{16}N_4P_2$ (584.37 g/mol)

Ausbeute: 24 mg (32 %) nach Methode 1, Ammoniumsalz, farbloses hygroscopisches Pulver

33 mg (31 %) nach Methode 2, Ammoniumsalz, farbloses hygroscopisches Pulver

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): δ = 8.01 (d, 1H, H-6''); 6.03 (d, 1H, H-1'); 6.02 (d, 1H, H-5''); 5.48 (dd, 1H, H-1); 4.46 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.37 (m, 1H, H-4'); 4.26 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 4.01 (dd, 1H, H-3); 3.95 (dd, 1H, H-4); 3.88 (bt, 1H, H-5); 3.68 (m, 2H, H-6a und H-6b); 2.11 (ddd, 1H, H-2_{ax}); 2.05 (ddd, 1H, H-2_{eq}) ppm.

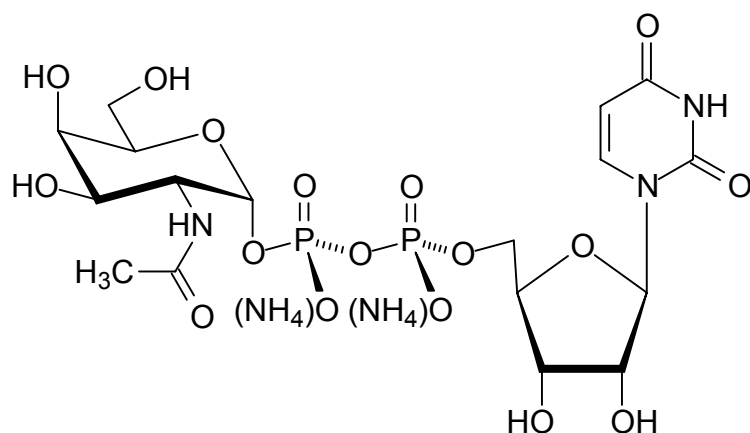
$^3J_{1,P} = 7.1$; $J_{1,2ax} = 3.5$; $J_{1,2eq} < 2$; $^2J_{2ax,2eq} = 13.5$; $J_{2ax,3} = 11.7$; $J_{2eq,3} = 5.7$; $J_{3,4} = 3.2$; $J_{4,5} < 2$; $J_{5,6a} = 5.6$; $J_{5,6b} = 6.1$; $J_{6a,6b} = 10.9$; $J_{1',2'} = 4.9$; $J_{5'',6''} = 8.1$ Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 166.6 (C-4''); 152.5 (C-2''); 142.0 (C-6''); 103.0 (C-5''); 92.7 (d, C-1); 88.8 (C-1'); 83.6 (d, C-4'); 74.1 (C-2'); 72.0 (C-5); 70.0 (C-3'); 68.9 (C-4); 66.5 (C-3); 65.3 (d, C-5'); 61.9 (C-6); 32.7 (d, C-2) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 5.9$; $^3J_{C-2,P} = 8.3$; $^3J_{C-4',P} = 9.1$; $^2J_{C-5',P} = 5.3$ Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): δ = -10.5 und -12.7 ppm.

Uridin-5'-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyldiphosphat) (**49**)



Methode 1 (mit reinem Pyridin als Lösungsmittel):

Unter Anwendung von AAV 5 werden 55 mg (164 μ mol) 2-Acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**24**) ins Triethylammoniumsalz überführt und mit 185 mg (1.65 eq., 270 μ mol) Uridinmonophospho-Morpholidat in reinem absolutem Pyridin umgesetzt. Es werden nach Aufarbeitung und Gefriertrocknung 34 mg (32%) der Titelverbindung **49** in Form des Ammoniumsalzes als hygroskopisches farbloses Pulver erhalten.

Methode 2 (in einem Lösungsmittelgemisch DMF / Pyridin 1 : 1):

55 mg (164 μ mol) des Ammoniumsalzes von 2-Acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**24**) werden nach Elution durch eine Dowex 50W-X8-Ionenaustauschersäule in Form des Triethylammoniumsalzes gewonnen und nach Gefriertrocknung AAV 5 folgend mit 185 mg (1.65 eq., 270 μ mol) des Uridinmonophosphomorpholidat-Kupplungsreagenzes in einem Solventengemisch DMF und Pyridin 1 : 1 zur Reaktion gebracht. Nachfolgende Aufarbeitung durch Reinigung an Biogel P2 und abschließende Gefriertrocknung liefert 35 mg (33 %) der Titelverbindung **49** als farbloses stark hygroskopisches Ammoniumsalz in Form eines gepulverten Feststoffs.

Methode 3 (im Reaktionsmedium DMF / Pyridin 2 : 1):

Methode 2 in Anlehnung an AAV 5 folgend werden 55 mg (164 μ mol) des Ammoniumsalzes von 2-Acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**24**) ins Triethylammoniumsalz überführt und mit 185 mg (1.65 eq., 270 μ mol) des Uridinmonophosphomorpholidat-Kupplungsreagenzes im Lösungsmittelgemisch DMF / Pyridin 2 : 1 zur Reaktion gebracht. Nach Durchführung aller beschriebenen Reinigungsschritte werden 37 mg (35 %) UDP-GalNAc (**49**) isoliert.

$C_{15}H_{30}O_{17}N_4P_2$ (641.42 g/mol)

Ausbeute: 34 mg (32 %) nach Methode 1, Ammoniumsalz, farbloses hygroscopisches Pulver
35 mg (33 %) nach Methode 2, Ammoniumsalz, farbloses hygroscopisches Pulver
37 mg (35 %) nach Methode 3, Ammoniumsalz, farbloses hygroscopisches Pulver

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): δ = 8.02 (d, 1H, H-6''); 6.05 (d, 1H, H-1'); 6.03 (d, 1H, H-5''); 5.61 (dd, 1H, H-1); 4.44 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.35 (m, 1H, H-4'); 4.33 (m, 1H, H-2); 4.28 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 4.24 (m, 1H, H-5); 4.11 (dd, 1H, H-4); 4.03 (dd, 1H, H-3); 3.82 (m, 2H, H-6a und H-6b); 2.15 (s, 3H, CH_3) ppm.

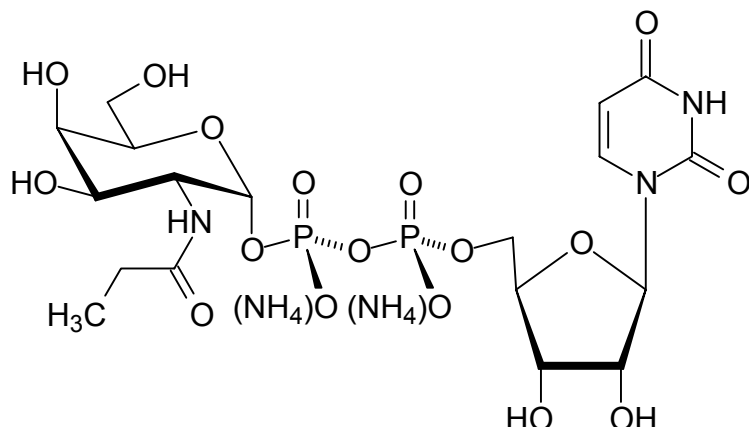
$^3J_{1,P} = 7.1$; $J_{1,2} = 3.3$; $J_{2,3} = 10.9$; $J_{3,4} = 3.0$; $J_{4,5} < 2$; $J_{5,6a} = 7.4$; $J_{5,6b} = 6.1$; $J_{6a,6b} = 13.5$;
 $J_{1',2'} = 4.8$; $J_{5'',6''} = 8.1$ Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 179.3 (CO); 166.6 (C-4''); 152.5 (C-2''); 142.0 (C-6''); 103.0 (C-5''); 95.2 (d, C-1); 88.8 (C-1'); 83.6 (d, C-4'); 74.1 (C-2'); 72.4 (C-5); 70.0 (C-3'); 68.7 (C-4); 68.0 (C-3); 65.3 (d, C-5'); 61.4 (C-6); 50.0 (d, C-2); 22.5 (CH_3) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 6.3$; $^3J_{C-2,P} = 8.4$; $^3J_{C-4',P} = 9.1$; $^2J_{C-5',P} = 5.4$ Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): δ = -10.0 und -12.3 ppm.

Uridin-5'-(2-desoxy-2-propionylamido- α -D-galactopyranosyldiphosphat) (**50**)



Unter Anwendung von AAV 5 werden 92 mg (177 μ mol) des Triethylammoniumsalzes von 2-Propionylamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**25**) mit 195 mg (284 μ mol) Uridinmonophospho-Morpholidat-Reagenz zur Umsetzung gebracht. Es werden nach Aufarbeitung und Gefriertrocknung 35 mg (31 %) der Titelverbindung **50** in Form des Ammoniumsalzes als stark hygroskopisches farbloses Pulver erhalten.

$C_{19}H_{37}O_{17}N_5P_2$ (669.47 g/mol)

Ausbeute: 35 mg (31 %), Ammoniumsalz, farbloses stark hygroskopisches Pulver

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): δ = 8.09 (d, 1H, H-6''); 6.11 (d, 1H, H-1'); 6.09 (d, 1H, H-5''); 5.67 (dd, 1H, H-1); 4.55 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.41 (m, 1H, H-4'); 4.37 (m, 3H, H-2 und H-5'a und H-5'b); 4.33 (m, 1H, H-5); 4.17 (dd, 1H, H-4); 4.10 (dd, 1H, H-3); 3.89 (m, 2H, H-6a und H-6b); 2.49 (q, 2H, CH_2); 1.25 (t, 3H, CH_3) ppm.

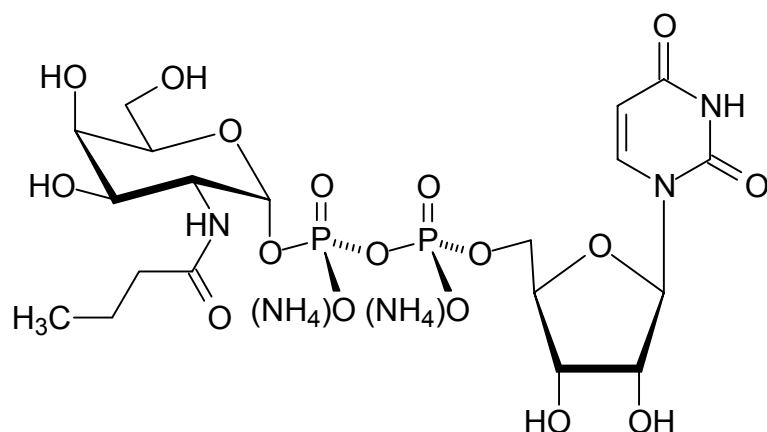
$^3J_{1,P}$ = 7.1; $J_{1,2}$ = 3.3; $J_{2,3}$ = 10.9; $J_{3,4}$ = 3.1; $J_{4,5}$ < 2; $J_{5,6a}$ = 6.4; $J_{5,6b}$ = 5.6; $J_{6a,6b}$ = 11.7; $J_{1',2'}$ = 4.3; $J_{5'',6''}$ = 8.1 Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 179.3 (CO); 166.6 (C-4''); 152.5 (C-2''); 142.1 (C-6''); 103.0 (C-5''); 95.2 (d, C-1); 88.9 (C-1'); 83.6 (d, C-4'); 74.2 (C-2'); 72.4 (C-5); 70.1 (C-3'); 68.8 (C-4); 68.0 (C-3); 65.4 (d, C-5'); 61.4 (C-6); 50.0 (d, C-2); 29.5 (CH_2); 9.89 (CH_3) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 6.3$; $^3J_{C-2,P} = 8.4$; $^3J_{C-4',P} = 9.1$; $^2J_{C-5',P} = 5.4$ Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D₂O): $\delta = -10.0$ und -12.2 ppm.

Uridin-5'-(2-desoxy-2-butylamido- α -D-galactopyranosyldiphosphat) (**51**)



89 mg (167 μ mol) 2-Butylamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**26**) in Form des Triethylammoniumsalzes werden mit 181 mg (264 μ mol) des Uridinmonophospho-Kupplungsreagenzes nach AAV 5 zur Reaktion gebracht.

Nach Aufarbeitung an Biogel P2 und abschließender Gefriertrocknung der Titelverbindung **51**, werden 35 mg (32 %) derselbigen als farbloses, stark hygroskopischer Ammoniumsalz erhalten.

C₂₀H₃₉O₁₇N₅P₂ (683.50 g/mol)

Ausbeute: 35 mg (32 %), Ammoniumsalz, farbloses stark hygroskopisches Pulver

1H -NMR (400.13 MHz, D₂O): $\delta = 8.09$ (d, 1H, H-6''); 6.10 (d, 1H, H-1'); 6.09 (d, 1H, H-5''); 5.66 (dd, 1H, H-1); 4.50 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.40 (m, 1H, H-4'); 4.36 (m, 3H, H-2 und H-5'a und H-5'b); 4.32 (m, 1H, H-5); 4.18 (m, 1H, H-4); 4.09 (dd, 1H, H-3); 3.90 (m, 2H, H-6a und H-6b); 3.45 (t, 2H, CH₂); 1.75 (m, 2H, CH₂); 1.05 (t, 3H, CH₃) ppm.

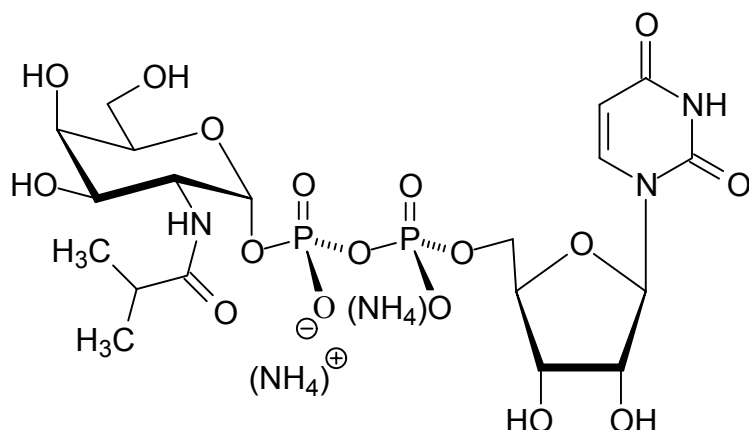
$^3J_{1,P} = 7.0$; $J_{1,2} = 3.4$; $J_{2,3} = 10.7$; $J_{3,4} = 3.3$; $J_{4,5} < 2$; $J_{5,6a} = 6.4$; $J_{5,6b} = 5.3$; $J_{6a,6b} = 11.7$;
 $J_{1',2'} = 5.3$; $J_{5'',6''} = 8.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, D_2O): $\delta = 178.4$ (CO); 160.7 (C-2'' und C-4''); 142.0 (C-6''); 103.0 (C-5''); 95.2 (d, C-1); 88.9 (C-1'); 83.6 (d, C-4'); 74.1 (C-2'); 72.4 (C-5); 70.0 (C-3'); 68.8 (C-4); 67.9 (C-3); 65.3 (d, C-5'); 61.4 (C-6); 50.0 (d, C-2); 38.0 (CH_2); 19.3 (CH_2); 13.2 (CH_3) ppm.

$^2J_{\text{C-1,P}} = 6.5$; $^3J_{\text{C-2,P}} = 8.6$; $^3J_{\text{C-4',P}} = 9.2$; $^2J_{\text{C-5',P}} = 5.6$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.5 MHz, D_2O): $\delta = -10.7$ und -12.2 ppm.

Uridin-5'-(2-desoxy-2-isobutyramido- α -D-galactopyranosyldiphosphat) (**52**)



68 mg (128 μmol) 2-Desoxy-2-isobutyramido- α -D-galactopyranosylphosphat (**27**) werden nach AAV 5 ins Triethylammoniumsalz überführt um darauf mit 138 mg (202 μmol) des Uridinmonophospho-Kupplungsreagenzes zur Reaktion gebracht zu werden. Nachfolgende Aufarbeitung durch Reinigung an Biogel P2 und abschließende Gefriertrocknung liefert 24 mg (28 %) der Titelverbindung **52** als farbloses stark hygroskopisches Ammoniumsalz.

$\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{O}_{17}\text{N}_5\text{P}_2$ (683.50 g/mol)

Ausbeute: 24 mg (28 %), Ammoniumsalz, farbloses stark hygroskopisches Pulver

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 8.07 (d, 1H, H-6''); 6.12 (d, 1H, H-1'); 6.10 (d, 1H, H-5''); 5.67 (dd, 1H, H-1); 4.53 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.39 (m, 1H, H-4'); 4.35 (m, 3H, H-2 und H-5'a und H-5'b); 4.30 (m, 1H, H-5); 4.15 (m, 1H, H-4); 4.07 (dd, 1H, H-3); 3.87 (m, 2H, H-6a und H-6b); 1.98 (m, 1H, CH₂); 1.07 (d, 6H, 2xCH₃) ppm.

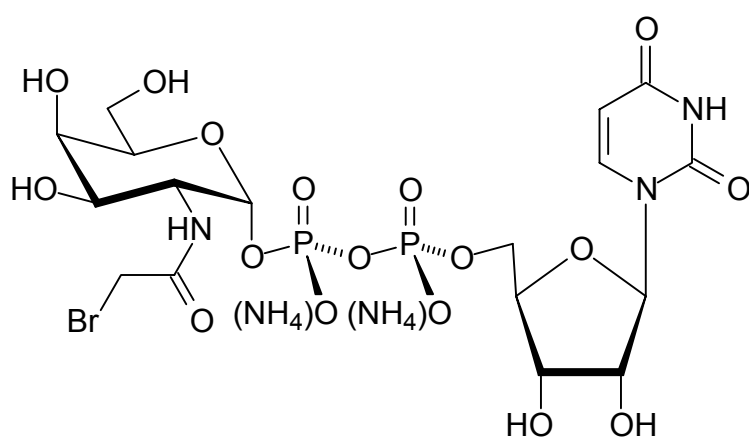
³J_{1,P}= 7.1; J_{1,2}= 3.5; J_{2,3}= 10.9; J_{3,4}= 3.1; J_{4,5}< 2; J_{5,6a}= 6.4; J_{5,6b}= 5.6; J_{6a,6b}= 11.7; J_{1',2'}= 4.7; J_{5'',6''}= 8.1 Hz.

¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 178.7 (CO); 166.5 (C-4''); 152.3 (C-2''); 142.0 (C-6''); 103.1 (C-5''); 95.1 (d, C-1); 88.9 (C-1'); 83.6 (d, C-4'); 74.1 (C-2'); 72.4 (C-5); 70.3 (C-3'); 68.8 (C-4); 68.0 (C-3); 65.3 (d, C-5'); 61.3 (C-6); 50.1 (d, C-2); 28.7 (CH); 12.7 (CH₃) ppm.

²J_{C-1,P}= 6.3; ³J_{C-2,P}= 8.6; ³J_{C-4',P}= 9.1; ²J_{C-5',P}= 5.6 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = -10.7 und -12.1 ppm.

Uridin-5'-(2-(2-bromacetamido)-2-desoxy-α-D-galactopyranosyldiphosphat) (53)



Nach AAV 5 werden 39 mg (67 μmol) 2-(2-Bromacetamido)-2-desoxy-α-D-galactopyranosylphosphat (**28**) in Form des Triethylammoniumsalzes mit 77 mg (112 μmol) (4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinium)uridin-5'-monophospho-

morpholidat bei Raumtemperatur umgesetzt. Aufarbeitung durch Elution an Biogel P2 und abschließende Gefriertrocknung der Titelverbindung liefert 14 mg (30 %) eines farbloses hygroskopisches Ammoniumsalzes des Nukleosiddiphosphozuckers **53**.

$C_{18}H_{37}O_{17}N_5P_2Br$ (735.34 g/mol)

Ausbeute: 14 mg (30 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): δ = 8.09 (d, 1H, H-6''); 6.00 (d, 1H, H-5''); 6.01 (d, 1H, H-1'); 5.64 (dd, 1H, H-1); 4.54 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.40 (m, 1H, H-4'); 4.38 (m, 1H, H-2); 4.29 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 4.25 (m, 1H, H-5); 4.09 (dd, 1H, H-4); 4.06 (dd, 1H, H-3); 3.81 (m, 2H, H-6a und H-6b); 2.70 (m, 2H, CH_2) ppm.

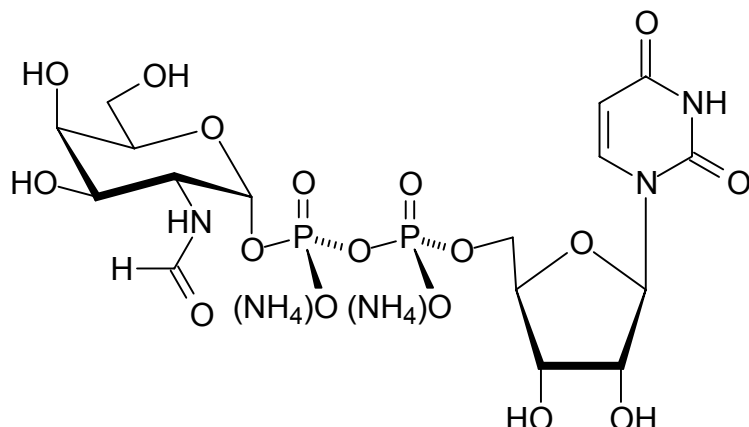
$^3J_{1,P} = 7.1$; $J_{1,2} = 3.3$; $J_{2,3} = 10.7$; $J_{3,4} = 3.3$; $J_{4,5} < 2$; $J_{5,6a} = 6.4$; $J_{5,6b} = 5.9$; $J_{6a,6b} = 12.0$;
 $J_{1',2'} < 5.5$; $J_{5'',6''} = 8.1$ Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 171.6 (CO); 166.6 (C-4''); 152.2 (C-2''); 142.1 (C-6''); 103.0 (C-5''); 94.8 (d, C-1); 88.9 (C-1'); 83.7 (d, C-4'); 74.8 (CH_2); 74.2 (C-3'); 72.5 (C-5); 68.8 (C-4); 67.8 (C-3); 65.3 (d, C-5'); 61.4 (C-6); 50.2 (d, C-2) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 6.2$; $^3J_{C-2,P} = 8.4$; $^3J_{C-4',P} = 9.0$; $^2J_{C-5',P} = 5.3$ Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): δ = -10.1 und -11.6 ppm.

Uridin-5'-(2-desoxy-2-formamido- α -D-galactopyranosyldiphosphat) (54)



Unter Anwendung der AAV 5 werden 32 mg (65 μ mol) des Triethylammoniumsalzes von 2-Desoxy-2-formamido- α -D-galactopyranosylphosphat (**32**) mit 71 mg (104 μ mol) Uridinmonophospho-Morpholidat-Reagenz zur Umsetzung gebracht. Es werden nach Aufarbeitung durch Reinigung an Biogel P2 und Gefriertrocknung 12 mg (29 %) der Titelverbindung **54** in Form des Ammoniumsalzes als stark hygroskopisches farbloses Pulver erhalten.

$C_{17}H_{33}O_{17}N_5P_2$ (641.42 g/mol)

Ausbeute: 12 mg (29 %), Ammoniumsalz, farbloses stark hygroskopisches Pulver

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): δ = 8.01 (d, 1H, H-6''); 6.03 (d, 1H, H-1'); 6.01 (d, 1H, H-5''); 5.61 (dd, 1H, H-1); 4.45 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.37 (m, 1H, H-4'); 4.35 (m, 1H, H-2); 4.26 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 4.20 (m, 1H, H-5); 4.12 (dd, 1H, H-4); 4.01 (dd, 1H, H-3); 3.78 (m, 2H, H-6a und H-6b) ppm.

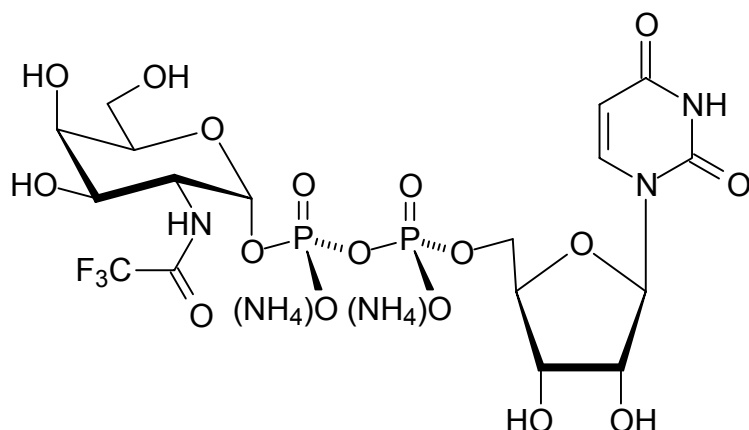
$^3J_{1,P}$ = 7.0; $J_{1,2}$ = 3.2; $J_{2,3}$ = 10.7; $J_{3,4}$ = 3.1; $J_{4,5}$ < 2; $J_{5,6a}$ = 7.2; $J_{5,6b}$ = 6.3; $J_{6a,6b}$ = 12.9; $J_{1',2'}$ = 4.7; $J_{5'',6''}$ = 8.1 Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 169.0 (CO); 166.4 (C-4''); 152.4 (C-2''); 142.0 (C-6''); 103.1 (C-5''); 95.3 (d, C-1); 88.6 (C-1'); 83.5 (d, C-4'); 74.2 (C-2'); 72.4 (C-5); 70.1 (C-3'); 68.6 (C-4); 67.9 (C-3); 65.2 (d, C-5'); 61.5 (C-6); 51.2 (d, C-2) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 5.7$; $^3J_{C-2,P} = 8.3$; $^3J_{C-4',P} = 8.9$; $^2J_{C-5',P} = 5.3$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.5 MHz, D_2O): $\delta = -10.0$ und -12.4 ppm.

Uridin-5'-(2-desoxy-2-trifluoracetamido- α -D-galactopyranosyldiphosphat) (**55**)



Gemäß AAV 5 werden 115 mg (212 μmol) des Triethylammoniumsalzes von 2-Desoxy-2-trifluoracetamido- α -D-galactopyranosylphosphat (**40**) mit 233 mg (1.6 eq., 340 μmol) des Uridinmonophosphomorpholidat-Kupplungsreagenzes zur Reaktion gebracht. Nach Aufarbeitung durch mehrmalige Reinigung an Biogel P2 mit Wasser als Eluens und abschließende Gefriertrocknung resultieren 45 mg (31 %) der Titelverbindung **55** als farbloses stark hygroskopisches Ammoniumsalz in Form eines pulverigen Feststoffs.

$\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_{17}\text{N}_5\text{P}_2\text{F}_3$ (695.39 g/mol)

Ausbeute: 45 mg (31 %) Ammoniumsalz, farbloses hygroskopisches Pulver

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, D_2O): $\delta = 8.02$ (d, 1H, H-6''); 6.05 (d, 1H, H-1'); 6.03 (d, 1H, H-5''); 5.61 (dd, 1H, H-1); 4.44 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.35 (m, 1H, H-4'); 4.33 (m, 1H, H-2); 4.28 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 4.24 (m, 1H, H-5); 4.11 (dd, 1H, H-4); 4.03 (dd, 1H, H-3); 3.82 (m, 2H, H-6a und H-6b) ppm.

$^3J_{1,P} = 7.1$; $J_{1,2} = 3.3$; $J_{2,3} = 10.9$; $J_{3,4} = 3.0$; $J_{4,5} < 2$; $J_{5,6a} = 7.4$; $J_{5,6b} = 6.1$; $J_{6a,6b} = 13.5$;
 $J_{1',2'} = 4.8$; $J_{5'',6''} = 8.1$ Hz.

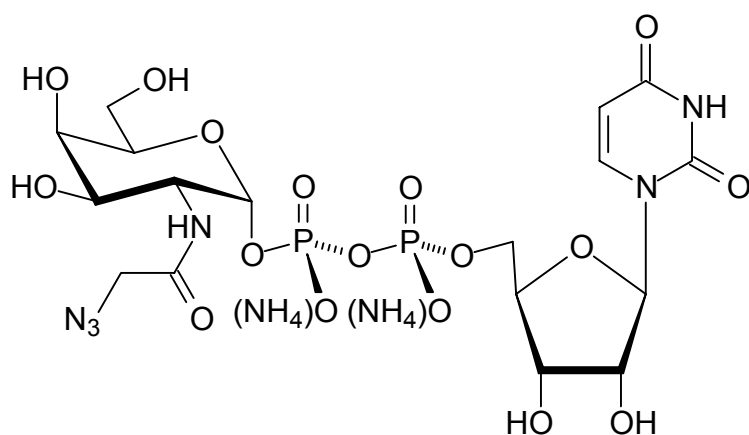
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, D_2O): $\delta = 179.3$ (CO); 166.6 (C-4''); 152.5 (C-2''); 142.0 (C-6''); 103.0 (C-5''); 95.2 (d, C-1); 88.8 (C-1'); 83.6 (d, C-4'); 74.1 (C-2'); 72.4 (C-5); 70.0 (C-3'); 68.7 (C-4); 68.0 (C-3); 65.3 (d, C-5'); 61.4 (C-6); 52.6 (d, C-2) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 6.3$; $^3J_{C-2,P} = 8.4$; $^3J_{C-4',P} = 9.1$; $^2J_{C-5',P} = 5.4$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.5 MHz, D_2O): $\delta = -10.1$ und -12.2 ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (470.59 MHz, D_2O): $\delta = -75.8$ ppm.

Uridin-5'-(2-(2-azidoacetamido)-2-desoxy- α -D-galactopyranosyldiphosphat) (**56**)



Gemäß AAV 5 werden 29 mg (77 μmol) 2-(2-Azidoacetamido)-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**41**) in Form des Triethylammoniumsalzes mit 87 mg (127 μmol) (4-Morpholin- N,N' -dicyclohexylcarboxamidinium)uridin-5'-monophosphormorpholidat bei Raumtemperatur umgesetzt. Aufarbeitung durch Reinigung an Biogel P2 und abschließende Gefriertrocknung der Titelverbindung **56** führt zu 11 mg (21 %) eines farbloses hygroskopisches Ammoniumsalzes der Nukleosid-diphosphogalactose.

$C_{18}H_{34}O_{17}N_8P_2$ (696.46 g/mol)

Ausbeute: 11 mg (21 %), Ammoniumsalz, farbloser hygroskopischer Feststoff.

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): δ = 8.09 (d, 1H, H-6''); 6.00 (d, 1H, H-5''); 6.01 (d, 1H, H-1'); 5.64 (dd, 1H, H-1); 4.54 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.40 (m, 1H, H-4'); 4.38 (m, 1H, H-2); 4.29 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 4.25 (m, 1H, H-5); 4.09 (dd, 1H, H-4); 4.06 (dd, 1H, H-3); 3.81 (m, 2H, H-6a und H-6b); 2.70 (s, 2H, CH_2) ppm.

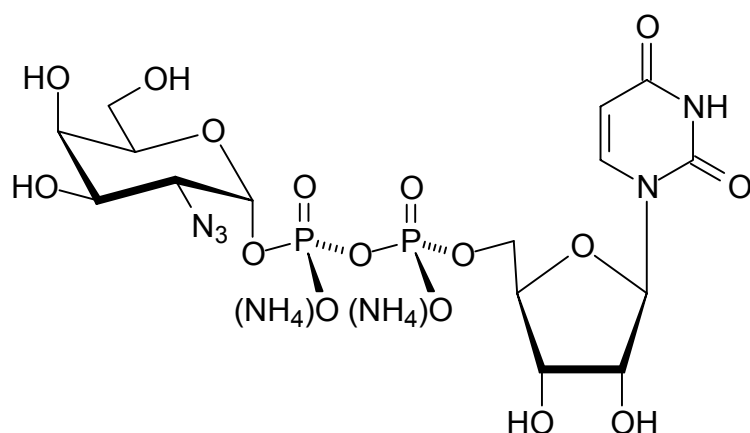
$^3J_{1,P} = 7.1$; $J_{1,2} = 3.3$; $J_{2,3} = 10.7$; $J_{3,4} = 3.3$; $J_{4,5} < 2$; $J_{5,6a} = 6.4$; $J_{5,6b} = 5.9$; $J_{6a,6b} = 12.0$;
 $J_{1',2'} < 5.5$; $J_{5'',6''} = 8.1$ Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 171.6 (CO); 166.6 (C-4''); 152.2 (C-2''); 142.1 (C-6''); 103.0 (C-5''); 94.8 (d, C-1); 88.9 (C-1'); 83.7 (d, C-4'); 74.8 (CH_2); 74.2 (C-3'); 72.5 (C-5); 68.8 (C-4); 67.8 (C-3); 65.3 (d, C-5'); 61.4 (C-6); 50.2 (d, C-2) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 6.2$; $^3J_{C-2,P} = 8.4$; $^3J_{C-4',P} = 9.0$; $^2J_{C-5',P} = 5.3$ Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): δ = -10.1 und -11.6 ppm.

Uridin-5'-(2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyldiphosphat) (57)



Unter Anwendung von AAV 5 werden 90 mg (185 μ mol) des Triethylammoniumsalzes von 2-Azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**42**)

mit 203 mg (295 μmol) (4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinium)uridin-5'-monophosphomorpholidat zur Umsetzung gebracht. Nach Reinigung an Biogel P2, gefolgt von der Gefriertrocknung der Titelverbindung **57** werden 28 mg (25 %) eines farbloses hygroskopisches Ammoniumsalzes des Nukleosiddiphosphoazidozuckers erhalten.

$\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_{16}\text{N}_7\text{P}_2$ (639.41 g/mol)

Ausbeute: 28 mg (25 %), Ammoniumsalz, farbloser stark hygroskopischer Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, D_2O): δ = 7.92 (d, 1H, H-6''); 5.94 (d, 1H, H-5''); 5.93 (d, 1H, H-1'); 5.66 (dd, 1H, H-1); 4.32 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.22 (m, 1H, H-4'); 4.18 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 4.14 (m, 1H, H-5); 4.05 (m, 1H, H-3); 4.00 (m, 1H, H-4); 3.68 (m, 2H, H-6a und H-6b); 3.54 (m, 1H, H-2); ppm.

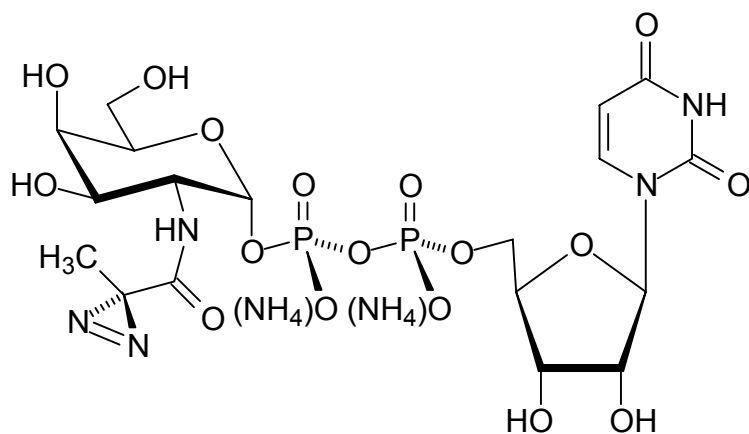
$^3J_{1,\text{P}} = 7.3$; $J_{1,2} = 3.5$; $J_{2,3} = 10.7$; $J_{3,4} = 3.2$; $J_{4,5} < 2$; $J_{5,6\text{a}} = 6.1$; $J_{5,6\text{b}} = 6.0$; $J_{6\text{a},6\text{b}} = 12.0$;
 $J_{1',2'} < 5.5$; $J_{5'',6''} = 8.2$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, D_2O): δ = 166.6 (C-5''); 152.2 (C-2''); 142.1 (C-6''); 103.1 (C-5''); 95.0 (d, C-1); 88.8 (C-1'); 83.7 (d, C-4'); 74.2 (C-3'); 72.3 (C-5); 70.1 (C-2'); 69.1 (C-4); 67.7 (C-3); 65.3 (d, C-5'); 61.3 (C-6); 60.1 (d, C-2) ppm.

$^2J_{\text{C-1},\text{P}} = 6.1$; $^3J_{\text{C-2},\text{P}} = 8.7$; $^3J_{\text{C-4'},\text{P}} = 8.7$; $^2J_{\text{C-5'},\text{P}} = 5.6$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.5 MHz, D_2O): δ = -10.3 und -12.1 ppm.

Uridin-5'-(2-(2-azipropionylamido)-2-desoxy- α -D-galactopyranosyldiphosphat)
(58)



Gemäß AAV 5 werden 47 mg (125 μ mol) 2-(2-Azipropionylamido)-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**44**) nach Überführung ins Triethylammoniumsalz mit 138 mg (1.64 equiv., 0.205 mmol) 4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinium-uridin-5'-monophosphomorpholidat gekuppelt. Mehrfache aufreinigende Elution an Biogel P2 mit 250 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung liefert 12 mg (14 %) des photosensitiven Zuckernukleotids **58**.

$C_{18}H_{33}O_{17}N_7P_2$ (681.44 g/mol)

Ausbeute: 12 mg (14 %) ,Ammoniumsalz, farbloser hygroskopisches Feststoff.

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): δ = 8.08 (d, 1H, H-6''); 6.01 (d, 1H, H-1'); 5.99 (d, 1H, H-5''); 5.52 (dd, 1H, H-1); 4.37 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.38 (m, 1H, H-4'); 4.23 (m, 1H, H-2); 4.16 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 4.13 (m, 1H, H-5); 4.02 (dd, 1H, H-4); 3.97 (dd, 1H, H-3); 3.72 (m, 2H, H-6a und H-6b):1.86 (s, 3H, CH_3) ppm.

$^3J_{1,P}$ = 7.5; $J_{1,2}$ = 3.3; $J_{2,3}$ = 10.1; $J_{3,4}$ = 3.3; $J_{4,5}$ < 2; $J_{5,6a}$ = 7.1; $J_{5,6b}$ = 6.0; $J_{6a,6b}$ = 12.5; $J_{1',2'}$ = 4.9; $J_{5'',6''}$ = 7.7 Hz.

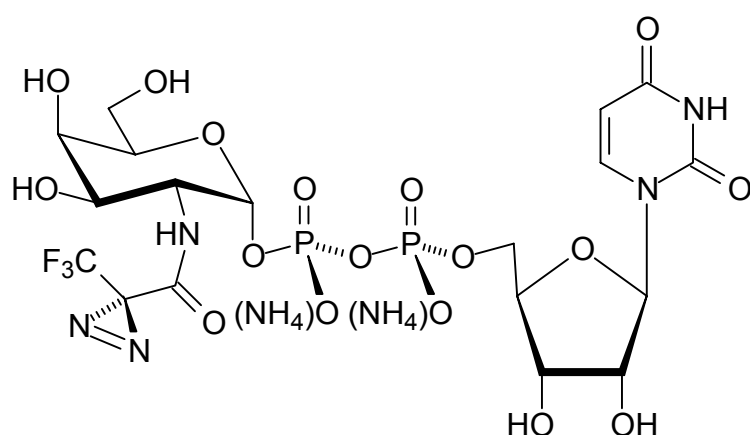
^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 179.1 (CO); 166.5 (C-4''); 152.1 (C-2''); 141.9 (C-6''); 102.9 (C-5''); 94.5 (d, C-1); 88.8 (C-1'); 83.5 (d, C-4'); 73.9 (C-2'); 72.2 (C-5);

70.0 (C-3'); 68.6 (C-4); 67.7 (C-3); 65.2 (d, C-5'); 61.2 (C-6); 49.8 (d, C-2); 28.7 (CN₂); 20.5 (CH₃) ppm.

²J_{C-1,P} = 6.1; ³J_{C-2,P} = 8.3; ³J_{C-4',P} = 9.0; ²J_{C-5',P} = 5.3 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = -10.0 und -11.9 ppm.

Uridin-5'-(2-(2-azi-3,3,3-trifluorpropionylamido)-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl-diphosphat) (59)



Gemäß AAV 5 werden 51 mg (119 μmol) 2-(2-Azi-3,3,3-trifluorpropionylamido)-2-desoxy-α-D-galactopyranosylphosphat (**45**) ins Triethylammoniumsalz umgewandelt und mit 132 mg (1.65 equiv., 0.196 mmol) des 4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexyl-carboxamidinium-Salzes von Uridin-5'-monophosphomorpholidat zur Reaktion gebracht. Nach Reinigung an Biogel P2 werden 16 mg (18 %) des Zuckernukleotids **59** isoliert.

C₁₈H₃₀O₁₇N₇P₂F₃ (735.42 g/mol)

Ausbeute: 16 mg (18 %) , Ammoniumsalz, farbloses hygroskopisches Pulver.

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 8.07 (d, 1H, H-6''); 6.09 (d, 1H, H-1'); 6.08 (d, 1H, H-5''); 5.57 (dd, 1H, H-1); 4.48 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.39 (m, 1H, H-4'); 4.35 (m,

1H, H-2); 4.27 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 4.24 (m, 1H, H-5); 4.13 (dd, 1H, H-4); 4.03 (dd, 1H, H-3); 3.80 (m, 2H, H-6a und H-6b) ppm.

$^3J_{1,P} = 7.3$; $J_{1,2} = 3.2$; $J_{2,3} = 10.6$; $J_{3,4} = 3.1$; $J_{4,5} < 2$; $J_{5,6a} = 7.3$; $J_{5,6b} = 6.3$; $J_{6a,6b} = 12.9$;
 $J_{1',2'} = 4.5$; $J_{5'',6''} = 7.9$ Hz.

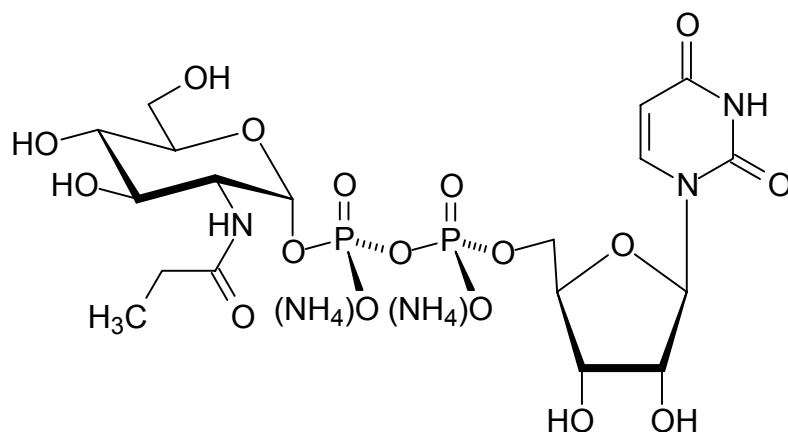
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, D_2O): $\delta = 177.9$ (CO); 165.3 (C-4''); 151.9 (C-2''); 141.8 (C-6''); 102.9 (C-5''); 94.6 (d, C-1); 88.6 (C-1'); 83.3 (d, C-4'); 73.8 (C-2'); 72.0 (C-5); 70.0 (C-3'); 68.5 (C-4); 67.7 (C-3); 65.2 (d, C-5'); 61.3 (C-6); 49.9 (d, C-2); 29.4 (CN_2) ppm.

$^2J_{\text{C-1,P}} = 6.3$; $^3J_{\text{C-2,P}} = 7.9$; $^3J_{\text{C-4',P}} = 8.7$; $^2J_{\text{C-5',P}} = 5.3$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.5 MHz, D_2O): $\delta = -10.1$ und -12.2 ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (470.59 MHz, D_2O): $\delta = -71.6$ ppm.

Uridin-5'-(2-desoxy-2-propionylamido- α -D-glucopyranosyldiphosphat) (60)



Unter Anwendung von AAV 5 werden 83 mg (166 μmol) des Triethylammoniumsalzes von 2-Propionylamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosylphosphat (**29**) mit 183 mg (266 μmol) Uridinmonophospho-Morpholidat-Reagenz zur Umsetzung gebracht. Es werden nach Aufarbeitung und Gefriertrocknung 36 mg (30

%) der Titelverbindung **60** in Form des Ammoniumsalzes als stark hygroskopisches farbloses Pulver erhalten.

$C_{19}H_{37}O_{17}N_5P_2$ (669.47 g/mol)

Ausbeute: 36 mg (30 %), Ammoniumsalz, farbloses stark hygroskopisches Pulver.

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): δ = 7.95 (d, 1H, H-6''); 5.98 (d, 1H, H-1'); 5.97 (d, 1H, H-5''); 5.53 (dd, 1H, H-1); 4.37 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.30 (m, 1H, H-4'); 4.24 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 4.00 (m, 1H, H-2); 3.95 (m, 1H, H-5); 3.89 (m, 2H, H-6a und H-6b); 3.82 (dd, 1H, H-3); 3.57 (dd, 1H, H-4); 2.50 (q, 2H, CH_2); 1.27 (t, 3H, CH_3) ppm.

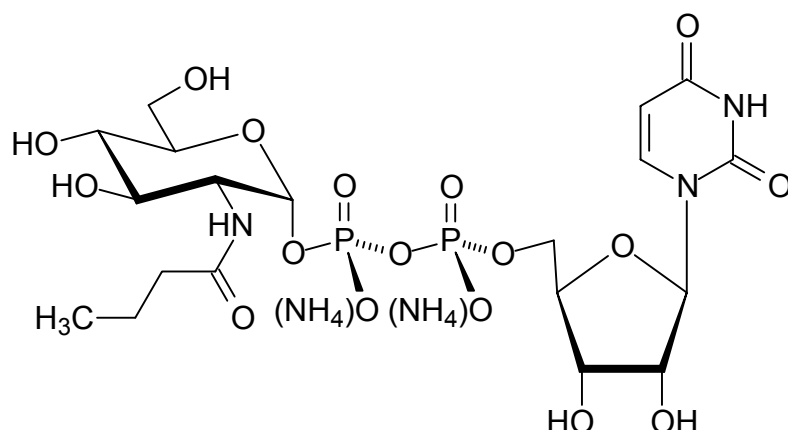
$^3J_{1,P}$ = 7.3; $J_{1,2}$ = 3.1; $J_{2,3}$ = 10.5; $J_{3,4}$ = 9.7; $J_{4,5}$ = 9.6; $J_{5,6a}$ = 4.3; $J_{5,6b}$ = 2.6; $J_{6a,6b}$ = 12.9; $J_{1',2'}$ = 4.0; $J_{5'',6''}$ = 8.1 Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 179.3 (CO); 166.7 (C-4''); 152.5 (C-2''); 141.7 (C-6''); 102.9 (C-5''); 94.8 (d, C-1); 88.7 (C-1'); 83.5 (d, C-4'); 74.2 (C-2'); 73.3 (C-5); 71.1 (C-3); 69.8 (C-3'); 69.7 (C-4); 65.2 (d, C-5'); 60.6 (C-6); 53.9 (d, C-2); 29.7 (CH_2); 9.92 (CH_3) ppm.

$^2J_{C-1,P}$ = 6.1; $^3J_{C-2,P}$ = 8.3; $^3J_{C-4',P}$ = 9.1; $^2J_{C-5',P}$ = 5.3 Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): δ = -10.6 und -12.3 ppm.

Uridin-5'-(2-desoxy-2-butyramido- α -D-glucopyranosyldiphosphat) (**61**)



71 mg (133 μ mol) 2-Butyramido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**30**) in Form des Triethylammoniumsalzes werden mit 147 mg (215 μ mol) des Uridinmonophospho-Kupplungsreagenzes nach AAV 5 zur Reaktion gebracht.

Nach Aufarbeitung an Biogel P2 und abschließender Gefriertrocknung der Titelverbindung **61**, werden 30 mg (33 %) als farbloses, stark hygroskopischer Ammoniumsalz erhalten.

$C_{20}H_{39}O_{17}N_5P_2$ (683.50 g/mol)

Ausbeute: 30 mg (33 %), Ammoniumsalz, farbloses stark hygroskopisches Pulver

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): δ = 7.98 (d, 1H, H-6''); 5.99 (d, 1H, H-1'); 5.98 (d, 1H, H-5''); 5.54 (dd, 1H, H-1); 4.37 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.32 (m, 1H, H-4'); 4.25 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 4.02 (m, 1H, H-2); 3.97 (m, 1H, H-5); 3.90 (m, 2H, H-6a und H-6b); 3.85 (dd, 1H, H-3); 3.59 (dd, 1H, H-4); 3.41 (t, 2H, CH_2); 1.72 (m, 2H, CH_2); 1.03 (t, 3H, CH_3) ppm.

$^3J_{1,P}$ = 7.1; $J_{1,2}$ = 3.3; $J_{2,3}$ = 10.4; $J_{3,4}$ = 9.7; $J_{4,5}$ = 9.6; $J_{5,6a}$ = 4.3; $J_{5,6b}$ = 2.7; $J_{6a,6b}$ = 12.7; $J_{1',2'}$ = 4.1; $J_{5'',6''}$ = 8.1 Hz.

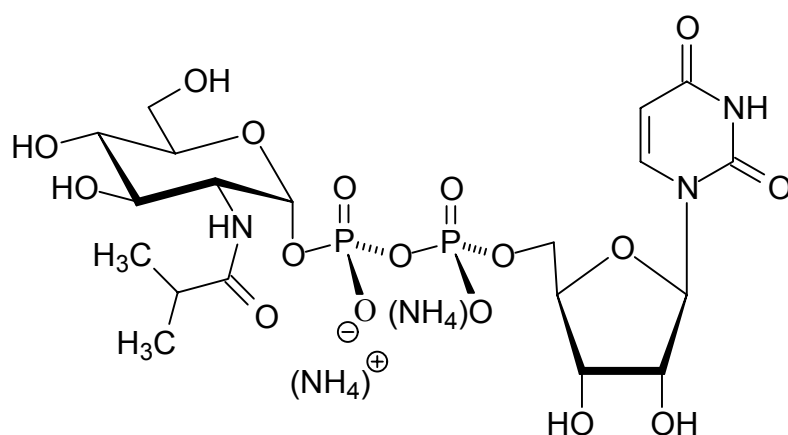
^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 177.8 (CO); 166.9 (C-4''); 152.3 (C-2''); 141.6 (C-6''); 103.0 (C-5''); 94.6 (d, C-1); 88.5 (C-1'); 83.4 (d, C-4'); 74.1 (C-2'); 73.1 (C-5);

71.0 (C-3); 69.8 (C-3'); 69.7 (C-4); 65.1 (d, C-5'); 60.4 (C-6); 53.7 (d, C-2); 37.7 (CH₂); 19.1 (CH₂); 13.1 (CH₃) ppm.

²J_{C-1,P} = 6.3; ³J_{C-2,P} = 8.3; ³J_{C-4',P} = 9.1; ²J_{C-5',P} = 5.1 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = -10.2 und -12.1 ppm.

Uridin-5'-(2-desoxy-2-isobutyramido-α-D-glucopyranosyldiphosphat) (**62**)



60 mg (113 μmol) 2-Desoxy-2-isobutyramido-α-D-galactopyranosylphosphat (**31**) werden nach AAV 5 ins Triethylammoniumsalz überführt und darauf mit 125 mg (183 μmol) des Uridinmonophospho-Kupplungsreagenzes zur Reaktion gebracht. Nachfolgende Aufarbeitung durch Reinigung an Biogel P2 und abschließende Gefriertrocknung liefern 23 mg (30 %) der Titelverbindung **62** als farbloses stark hygroskopisches Ammoniumsalz.

C₂₀H₃₉O₁₇N₅P₂ (683.50 g/mol)

Ausbeute: 23 mg (30 %), Ammoniumsalz, farbloses stark hygroskopisches Pulver

¹H-NMR (400.13 MHz, D₂O): δ = 7.99 (d, 1H, H-6''); 6.00 (d, 1H, H-1'); 5.98 (d, 1H, H-5''); 5.55 (dd, 1H, H-1); 4.36 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.33 (m, 1H, H-4'); 4.25 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 4.04 (m, 1H, H-2); 3.98 (m, 1H, H-5); 3.92 (m, 2H, H-6a und H-

6b); 3.87 (dd, 1H, H-3); 3.61 (dd, 1H, H-4); 2.01 (m, 1H, CH₂); 1.10 (d, 6H, 2xCH₃) ppm.

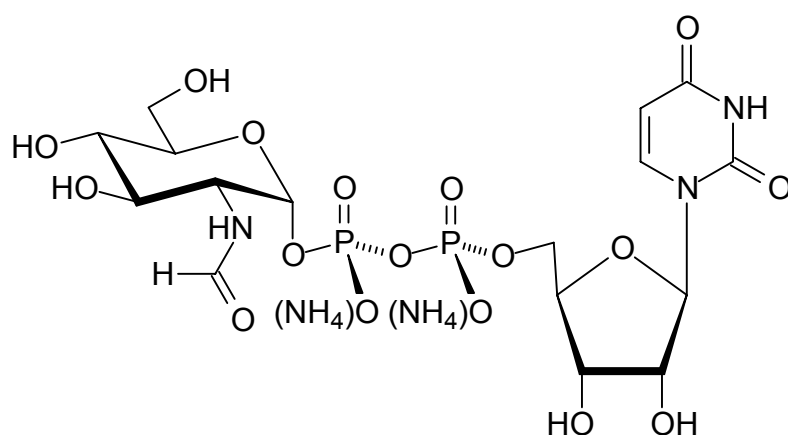
³J_{1,P} = 7.3; J_{1,2} = 3.3; J_{2,3} = 10.1; J_{3,4} = 9.6; J_{4,5} = 9.6; J_{5,6a} = 4.3; J_{5,6b} = 2.7; J_{6a,6b} = 12.5; J_{1',2'} = 4.0; J_{5'',6''} = 8.1 Hz.

¹³C-NMR (100.61 MHz, D₂O): δ = 178.8 (CO); 166.4 (C-4''); 152.2 (C-2''); 141.5 (C-6''); 103.2 (C-5''); 94.6 (d, C-1); 88.4 (C-1'); 83.4 (d, C-4'); 74.2 (C-2'); 73.1 (C-5); 71.1 (C-3); 69.9 (C-3'); 69.7 (C-4); 65.1 (d, C-5'); 60.5 (C-6); 53.8 (d, C-2); 28.8 (CH); 12.7 (CH₃) ppm.

²J_{C-1,P} = 6.3; ³J_{C-2,P} = 8.5; ³J_{C-4',P} = 9.1; ²J_{C-5',P} = 5.1 Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = -10.3 und -12.3 ppm.

Uridin-5'-(2-desoxy-2-formamido-α-D-glucopyranosyldiphosphat) (**63**)



Unter Anwendung der AAV 5 werden 38 mg (78 μmol) des Triethylammoniumsalzes von 2-Desoxy-2-formamido-α-D-glucopyranosylphosphat (**33**) mit 85 mg (125 μmol) Uridinmonophospho-Morpholidat-Reagenz zur Reaktion gebracht. Es werden nach Aufarbeitung durch Reinigung an Biogel P2 und Gefriertrocknung 14 mg (28 %) der Titelverbindung **63** in Form des Ammoniumsalzes als stark hygroskopisches farbloses Pulver erhalten.

$C_{17}H_{33}O_{17}N_5P_2$ (641.42 g/mol)

Ausbeute: 14 mg (28 %), Ammoniumsalz, farbloses stark hygroskopisches Pulver

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): δ = 7.96 (d, 1H, H-6''); 5.98 (d, 1H, H-1'); 5.97 (d, 1H, H-5''); 5.53 (dd, 1H, H-1); 4.37 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.30 (m, 1H, H-4'); 4.24 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 4.02 (m, 1H, H-2); 3.96 (m, 1H, H-5); 3.90 (m, 2H, H-6a und H-6b); 3.83 (dd, 1H, H-3); 3.57 (dd, 1H, H-4) ppm.

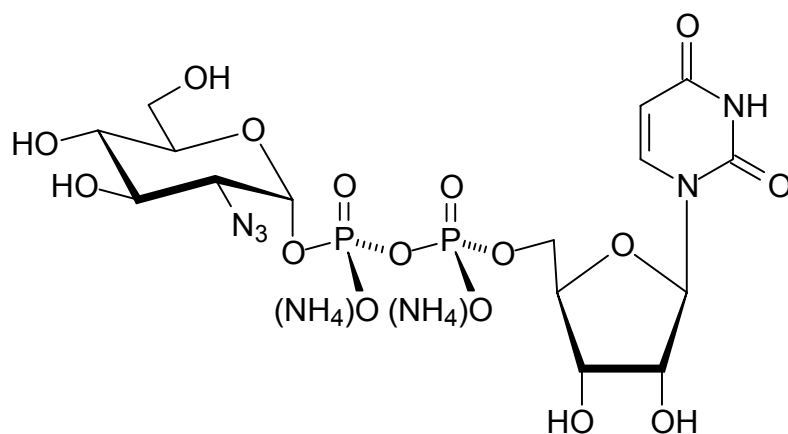
$^3J_{1,P}$ = 7.3; $J_{1,2}$ = 3.3; $J_{2,3}$ = 10.5; $J_{3,4}$ = 9.7; $J_{4,5}$ = 9.6; $J_{5,6a}$ = 4.3; $J_{5,6b}$ = 2.5; $J_{6a,6b}$ = 12.9; $J_{1',2'}$ = 4.1; $J_{5'',6''}$ = 8.1 Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 179.2 (CO); 166.7 (C-4''); 152.4 (C-2''); 141.6 (C-6''); 102.8 (C-5''); 94.5 (d, C-1); 88.5 (C-1'); 83.3 (d, C-4'); 74.0 (C-2'); 73.1 (C-5); 71.0 (C-3); 69.6 (C-3'); 69.5 (C-4); 65.1 (d, C-5'); 60.3 (C-6); 53.7 (d, C-2) ppm.

$^2J_{C-1,P}$ = 6.1; $^3J_{C-2,P}$ = 8.1; $^3J_{C-4',P}$ = 9.1; $^2J_{C-5',P}$ = 5.3 Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): δ = -10.4 und -12.1 ppm.

Uridin-5'-(2-azido-2-desoxy- α -D-glucopyranosyldiphosphat) (64)



Unter Anwendung von AAV 5 werden 78 mg (160 μ mol) des Triethylammoniumsalzes von 2-Azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylphosphat (**43**) mit 176 mg (256 μ mol) (4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidinium)uridin-5'-monophosphomorpholidat zur Umsetzung gebracht. Nach Reinigung an Biogel P2, gefolgt von Gefriertrocknung der Titelverbindung, werden 28 mg (25 %) eines farbloses hygroskopisches Ammoniumsalzes des Nucleosiddiphosphoazidozuckers **64** erhalten.

$C_{16}H_{31}O_{16}N_7P_2$ (639.41 g/mol)

Ausbeute: 29 mg (28 %), Ammoniumsalz, farblos stark hygroskopischer Feststoff

1H -NMR (400.13 MHz, D_2O): δ = 7.93 (d, 1H, H-6''); 5.95 (d, 1H, H-1'); 5.96 (d, 1H, H-5''); 5.64 (dd, 1H, H-1); 4.34 (m, 2H, H-2' und H-3'); 4.27 (m, 1H, H-2); 4.23 (m, 1H, H-4'); 4.18 (m, 2H, H-5'a und H-5'b); 3.90 (m, 1H, H-5); 3.86 (dd, 1H, H-3); 3.84 (dd, 1H, H-6a); 3.79 (dd, 1H, H-6b); 3.58 (dd, 1H, H-4) ppm.

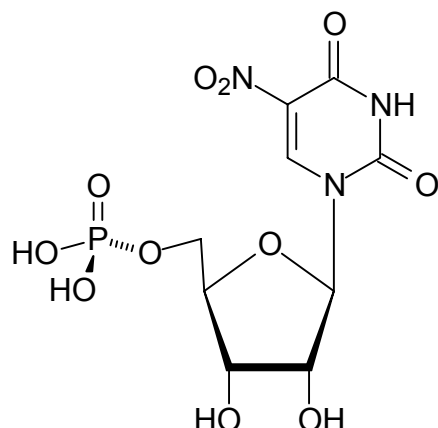
$^3J_{1,P} = 7.1$; $J_{1,2} = 3.2$; $J_{2,3} = 10.5$; $J_{3,4} = 9.7$; $J_{4,5} = 9.6$; $J_{5,6a} = 4.3$; $J_{5,6b} = 2.7$; $J_{6a,6b} = 12.7$; $J_{1',2'} = 4.3$; $J_{5'',6''} = 8.1$ Hz.

^{13}C -NMR (100.61 MHz, D_2O): δ = 166.7 (C-4''); 152.3 (C-2''); 141.9 (C-6''); 103.3 (C-5''); 94.8 (d, C-1); 88.9 (C-1'); 83.6 (d, C-4'); 74.2 (C-2'); 73.3 (C-5); 71.0 (C-3); 70.1 (C-3'); 70.3 (C-4); 65.4 (d, C-5'); 64.1 (d, C-2); 60.6 (C-6) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 5.9$; $^3J_{C-2,P} = 8.1$; $^3J_{C-4',P} = 9.1$; $^2J_{C-5',P} = 5.4$ Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): δ = - 10.3 und - 12.5 ppm.

5'-Nitrouridinyl-5-phosphat (65)



Das Natriumsalz des Monophosphouridins gelöst in 1 ml deionisiertem Wasser wird durch Elution auf einer Ionentauschersäule Dowex 50W-X8 (saure Form) in den freien Phosphorsäuremonoester überführt (pH = 1.6). Nach Gefriertrocknung werden 306 mg der freien Säure in Form eines amorphen farblosen Feststoffs erhalten, der in 10 ml absolutem Dimethylformamid gelöst und bei 4°C mit 2.86 g (~ 25 equiv., 24.5 mmol) Nitrosyltetrafluoroborat versetzt wird. Es wird 6 Stunden bei Raumtemperatur und Argonatmosphäre gerührt, dann 4 ml Wasser zugegeben und im Vakuum sowie bei 30°C auf ein Endvolumen von ca. ~ 4 ml eingeeengt. Es wird mit 8 ml 1 M salzsaurer Lösung verdünnt, weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschliessend durch Zugabe von festem Ammoniumhydrogencarbonat neutralisiert. Nach Waschen mit 10 ml Diethylether wird der wässrige Extrakt zweimal an Biogel P2 mit Wasser als Eluens gereinigt und nach Gefriertrocknung 266 mg (72 %) das nitrierte Uridin **65** als hellgelber Feststoff gewonnen. Alternativ lässt sich die nach der Etherextraktion erhaltene unaufgereinigte wässrige Lösung für die nachfolgende Reduktion mit Zink verwenden.

$C_9H_{12}O_{11}N_3P$ (369.18 g/mol)

Ausbeute: 266 mg (72 %), hellgelber amorpher Feststoff.

1H -NMR (500.13 MHz, D_2O): δ = 8.13 (d, 1H, H-6'); 6.00 (d, 1H, H-1); 4.42 (dd, 1H, H-2); 4.36 (dd, 1H, H-3); 4.25 (m, 1H, H-4); 4.02 (ddd, 1H, H-5a); 3.96 (ddd, 1H, H-5b) ppm.

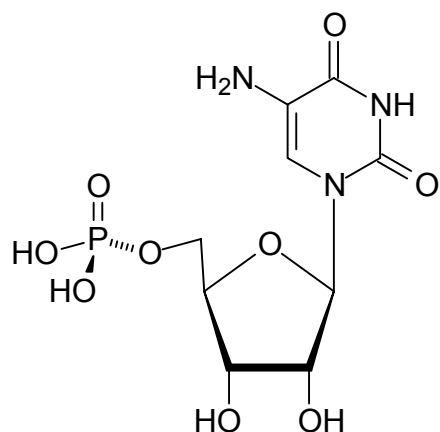
$J_{1,2} = 4.1$; $J_{2,3} = 5.1$; $J_{3,4} = 5.6$; $J_{4,5} = 2.5$; $J_{5a,5b} = 11.7$; ${}^3J_{5a,P} = 4.6$; ${}^3J_{5b,P} = 3.6$ Hz.

${}^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, D_2O): $\delta = 166.7$ (C-4'); 152.4 (C-2'); 142.5 (C-6'); 103.1 (C-5'); 88.6 (C-1); 84.7 (d, C-4); 74.3 (C-2); 70.5 (C-3); 63.5 (d, C-5) ppm.

${}^3J_{\text{C-4,P}} = 9.1$; ${}^2J_{\text{C-5,P}} = 4.1$ Hz.

${}^{31}\text{P-NMR}$ (202.5 MHz, D_2O): $\delta = 4.6$ ppm.

5'-Aminouridiny-5-phosphat (**66**)



244 mg (0.66 mmol) 5'-Nitrouridiny-5-monophosphat (**65**) in 6 ml 20 mM salzsaurer Lösung (pH = 1.70) werden auf 4 g aktivierten Zinkstaub gegeben und ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration der Suspension wird mit 4 ml Wasser nachgewaschen und das Filtrat auf ca. 2 ml eingengt. Unter gleichzeitiger Reinigung und Konversion in die freie Säure und wird auf einer Ionenaustauschersäule Dowex 50W-X8 (freie Säure) mit deionisiertem Wasser eluiert. Jene Fraktionen mit einem Absorptionsmaximum von 290 nm werden gesammelt und lyophilisiert. Erhalten werden 62 mg (28 %) der Titelverbindung **66** in Form des freien Phosphorsäuremonoesters.

$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_9\text{N}_3\text{P}$ (339.20 g/mol)

Ausbeute: 62 mg (28 %), farbloser bis hellgelber amorpher Feststoff.

¹H-NMR (500.13 MHz, D₂O): δ = 8.13 (d, 1H, H-6'); 6.02 (d, 1H, H-1); 4.43 (dd, 1H, H-2); 4.38 (dd, 1H, H-3); 4.24 (m, 1H, H-4); 4.03 (ddd, 1H, H-5a); 3.97 (ddd, 1H, H-5b) ppm.

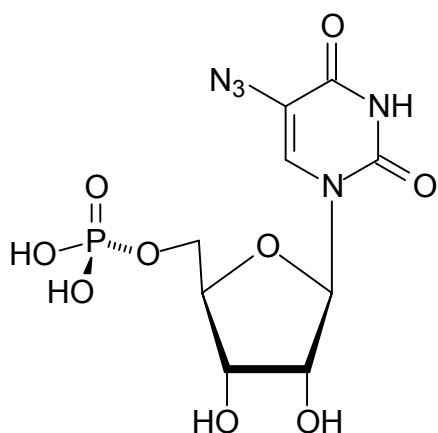
$J_{1,2} = 4.0$; $J_{2,3} = 5.3$; $J_{3,4} = 5.6$; $J_{4,5} = 2.5$; $J_{5a,5b} = 11.9$; $^3J_{5a,P} = 4.5$; $^3J_{5b,P} = 3.6$ Hz.

¹³C-NMR (125.77 MHz, D₂O): δ = 166.7 (C-4'); 152.7 (C-2'); 143.2 (C-6'); 103.3 (C-5'); 88.7 (C-1); 84.8 (d, C-4); 74.8 (C-2); 70.6 (C-3); 63.5 (d, C-5) ppm.

$^3J_{C-4,P} = 11.3$; $^2J_{C-5,P} = 5.1$ Hz.

³¹P-NMR (202.5 MHz, D₂O): δ = 4.7 ppm.

5'-Azidouridiny-5-phosphat (67)



60 mg (177 μmol) 5'-Aminouridiny-5-phosphat (**66**) werden in 3 ml 1 M salzsaurer Lösung aufgenommen und bei 0°C mit einer wässrigen Lösung von 15 mg (217 μmol) Natriumnitrit in 2 ml deionisiertem Wasser versetzt. Nach 10 Minuten wird 1 ml einer 4 M Natriumazid-Lösung zugegeben, 30 Minuten bei 0°C und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit festem

Ammoniumhydrogencarbonat neutralisiert, an Biogel P2 mit Wasser gereinigt und an Sephadex G-10 entsalzt.

Das so gewonnene Ammoniumsalz des Azidonukleotids **67** wird nach Ionenaustausch mittels Elution an Dowex 50W-X8 (saure Form) in die freie Säure überführt, und es resultierten 40 mg (62 %) nach Gefriertrocknung.

$C_9H_{12}O_9N_5P$ (365.20 g/mol)

Ausbeute: 40 mg (62 %), farbloses hygroskopisches Pulver.

1H -NMR (500.13 MHz, D_2O): δ = 8.14 (d, 1H, H-6'); 6.05 (d, 1H, H-1); 4.44 (dd, 1H, H-2); 4.39 (dd, 1H, H-3); 4.27 (m, 1H, H-4); 4.05 (ddd, 1H, H-5a); 3.98 (ddd, 1H, H-5b) ppm.

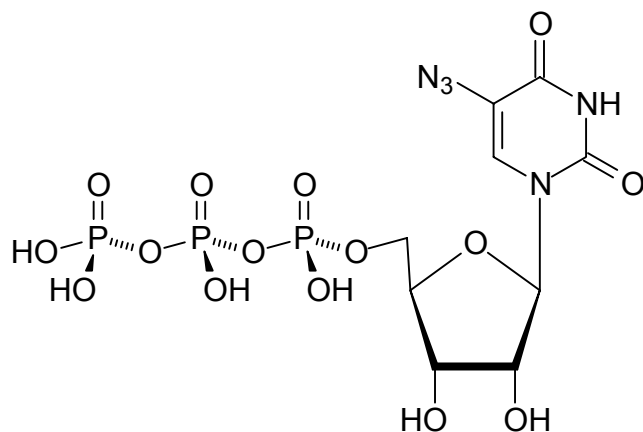
$J_{1,2} = 4.3$; $J_{2,3} = 5.3$; $J_{3,4} = 5.7$; $J_{4,5} = 2.5$; $J_{5a,5b} = 11.7$; $^3J_{5a,P} = 4.7$; $^3J_{5b,P} = 3.6$ Hz.

^{13}C -NMR (125.77 MHz, D_2O): δ = 166.6 (C-4'); 152.2 (C-2'); 142.3 (C-6'); 102.9 (C-5'); 88.6 (C-1); 84.8 (d, C-4); 74.3 (C-2); 70.6 (C-3); 63.6 (d, C-5) ppm.

$^3J_{C-4,P} = 11.7$; $^2J_{C-5,P} = 5.3$ Hz.

^{31}P -NMR (202.5 MHz, D_2O): δ = 4.6 ppm.

5'-AzidouridinyI-5-triphosphat (**68**)



30 μl (157 μmol) Diphenylphosphochloridat und 50 μl (210 mmol) Tri-*n*-butylamin werden zu einer Lösung von 76 mg (106 μmol) Tri-*n*-butylammonium-5'-azidouridiny-5-phosphat (**67**) in 0.5 ml absolutem Dimethylformamid und 3.5 ml absolutem Dioxan gegeben. Nach drei Stunden Rühren bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre wird die Lösung in 25 ml Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Der Rückstand wird mit einer Lösung von 112 mg (127 μmol) Bis(tri-*n*-butylammonium)pyrosphosphat in 3 ml absolutem Pyridin aufgenommen und zwei weitere Stunden unter strikten Schlenkbedingungen bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von wenig Diethylether wird rohes Pyridinium-uridin-5'-triphosphat gefällt, in 1 ml deionisiertem Wasser aufgenommen und an einer Ionenaustauschersäule Dowex 50W-X8 (saure Form) in die freie Säure umgewandelt. Es werden 17 mg (31 %) des Azidonukleosidtriphosphats **68** als stark hygroskopisches farbloses Pulver erhalten.

$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_{15}\text{N}_5\text{P}_3$ (525.16 g/mol)

Ausbeute: 17 mg (31 %), farbloser hygroskopischer Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (500.13 MHz, D_2O): δ = 8.14 (d, 1H, H-6'); 6.03 (d, 1H, H-1); 4.44 (dd, 1H, H-2); 4.37 (dd, 1H, H-3); 4.27 (m, 1H, H-4); 4.03 (ddd, 1H, H-5a); 3.97 (ddd, 1H, H-5b) ppm.

$J_{1,2} = 4.3$; $J_{2,3} = 5.1$; $J_{3,4} = 5.7$; $J_{4,5} = 2.5$; $J_{5a,5b} = 11.9$; $^3J_{5a,P} = 4.3$; $^3J_{5b,P} = 3.7$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.77 MHz, D_2O): δ = 166.7 (C-4'); 152.2 (C-2'); 142.3 (C-6'); 103.0 (C-5'); 88.5 (C-1); 84.7 (d, C-4); 74.3 (C-2); 70.4 (C-3); 63.8 (d, C-5) ppm.

$^3J_{\text{C-4},\text{P}} = 11.7$; $^2J_{\text{C-5},\text{P}} = 5.1$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.46 MHz, D_2O): δ = - 9.5, - 10.1 und - 21.7 ppm.

8. Literatur

1. R.Schauer, *Trends Biochem. Sci.* **1985**, 10, 357-360.
2. L.Lefrancois, L.Pudington, C.E.Machamber, J.M.Bevan, *J.Exp.Med.* **1985**, 162, 1275-1293.
3. R.B.Kemp, *J.Cell Sci.* **1970**, 6, 751-766.
4. T.Feizi, *Nature* **1985**, 314, 53-57.
5. N.Sharon, H.Lis in H.Neurath, R.J.Hill (Eds.), *The Proteins*, Academic Press, New York, **1982**, Vol.5, 3rd Ed.
6. J.C.Paulson in P.M.Conn, *The Receptors*, Academic Press, New York, **1985**, Vol.2, 131.
7. T.W.Rademacher, R.B.Parekh, R.A.Dwek, *Ann.Rev.Biochem.* **1988**, 57, 785-838.
8. W.E.van Heyningen, *J.Gen.Microbiol.* **1959**, 20, 291-300.
9. W.E.van Heyningen, *J.Gen.Microbiol.* **1959**, 20, 301-309.
10. W.E.van Heyningen, *J.Gen.Microbiol.* **1959**, 20, 310-320.
11. R.W.Ledeen, R.K.Yu, *Methods Enzymol.* **1982**, 83, 139-191.
12. H.Wiegandt, *New Compr.Biochem.* **1985**, 10, 199-205.
13. L.Svennerholm, A.K.Asbury, R.A.Reisfeld, K.Sandhoff, K.Suzuki, G.Tettamanti, G.Toffano (Eds.), „Biological Function of Gangliosides“, *Progress in Brain Research*, Elsevier, Amsterdam, **1994**, Vol. 101.
14. Y.Nagai, *Behav.Brain Res.* **1995**, 66, 99-106.
15. G.van Echten, K.Sandhoff, *J.Neurochem.* **1989**, 52, 207-212.
16. A.Schwarz, A.H.Futerman, *Biochim.Biophys.Acta* **1996**, 1286, 247-251.
17. K.-A.Karlsson, *Trends Biochem.Sci.* 1984, 9, 453-458.
18. S.-L.Hakamori, *J.Biol.Chem.* **1990**, 265, 18 713-716.
19. K.-A.Karlsson, *Rev.Biochem.* **1989**, 58, 309-350.
20. L.Svennerholm, *J.Neurochem.* **1963**, 10, 613-618.
21. E.C.Mandon, I.Ehse, J.Rother, G.van Echten, K.Sandhoff, *J.Biol.Chem.* **1992**, 267, 11144-11148.
22. K.Hirschberg, J.Rodger, A.H.Futerman, *Biochem.J.* **1993**, 290, 751-757.
23. P.E.Braun, E.E.Snell, *J.Biol.Chem.* **1968**, 243, 3775-3783.
24. W.Stoffel, D.LeKim, G.Sticht, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* **1968**, 349, 664-666.
25. K.Sandhoff, G.van Echten, *Adv.Lipid Res.* **1993**, 26, 119-202.
26. E.R.Smith, A.H.Merrill Jr., *J.Biol.Chem.*, **1995**, 270, 18749-18755.

27. Y.A.Hannun, *J.Biol.Chem.* **1994**, 269, 3125-3129.
28. T.Okazaki, N.Domae, R.M.Bell, Y.A.Hannun, *Trends Glycosci.Glycotechnol.* **1994**, 6, 278-281.
29. A.Olivera, H.Zhang, R.O.Carlson, M.E.Matte, R.R.Schmidt, S.Spiegel, *J.Biol.Chem.*, **1994**, 269, 17924-17928.
30. D.E.Ong, R.N.Brady, *J.Biol.Chem.* **1973**, 248, 3884-3888.
31. W.Stoffel, K.Bister, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* **1974**, 355, 911.-915.
32. A.H.Merrill Jr., E.Wang, *J.Biol.Chem.* **1986**, 261, 3764-3769.
33. J.Rother, G.van Echten, G.Schwarzmann, K.Sandhoff, *Biochem.Biophys. Res. Commun.* **1992**, 189, 14-18.
34. H.Coste, M.B.Martel, R.Got, *Biochim.Biophys.Acta* **1989**, 858, 6-10.
35. A.H.Futerman, R.E.Pagano, *Biochem. J.* **1991**, 280, 295-302.
36. D.Jeckel, A.Karrenbauer, K.N.J.Burger, G.van Meer, F.Wieland, *J.Cell Biol.* **1992**, 117, 259-263.
37. M.Trinchera, M.Fabbri, R.Ghidoni, *J.Biol.Chem.* **1991**, 266, 20907-20912.
38. M.Saito, M.Saito, A.Rosenberg, *Biochemistry* **1984**, 23, 1043-1046.
39. A.Carruthers, E.M.Carey, *J.Neurochem.* **1983**, 41, 22-26.
40. H.P.Siegrist, T.Burkart, U.N.Wiesmann, N.N.Herschkowitz, M.A.Spycher, *J.Neurochem.* **1979**, 33, 497-501.
41. G.van Meer, *Rev.Cell Biol.* **1989**, 5, 247-250.
42. R.E.Pagano, *Curr.Opin.Cell.Biol.* **1990**, 2, 652-657.
43. R.N.Collins, G.Warren, *J.Biol.Chem.* **1992**, 267, 24906-24911.
44. W.Stoffel, K.Bister, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* **1973**, 354, 169-174.
45. R.E.Pagano, O.C.Martin, *Biochemistry* **1988**, 27, 4439-4445.
46. R.R.Hiebsch, T.J.Raub, B.W.Wattenberg, *J.Biol.Chem.* **1991**, 266, 20323-20328.
47. H.Lannert, K.Gorgas, I.Meißner, F.T.Wieland, D.Jeckel, *J.Biol.Chem.* **1998**, 273, 2939-2944.
48. G.van Echten, K.Sandhoff, *J.Biol.Chem.* **1993**, 268, 5341-5344.
49. K.I.-P.J.Hidari, I.Kawashima, T.Tai, F.Inagaki, Y.Nagai, Y.Sanai, *Eur.J.Biochem.* **1994**, 221, 603-607.
50. D.J.Carey, C.W.Hirschberg, *J.Biol.Chem.* **1981**, 256, 989-993.
51. K.E.Creek, D.J.Morre, *Biochim.Biophys.Acta* **1981**, 643, 292-296.
52. B.Fleischer, *J.Cell Biol.* **1981**, 89, 246-249.
53. H.K.M.Yusuf, G.Pohlentz, K.Sandhoff, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1983**, 80, 7075-7078.

54. H.Lannert, C.Bünning, D.Jeckel, F.T.Wieland, *FEBS Lett.* **1994**, 342, 91-93.
55. H.Miller-Podraza, P.H.Fishman, *Biochemistry* **1982**, 21, 3265-3270.
56. W.W.Young Jr., M.S.Lutz, W.A.Blackburn, *J.Biol.Chem.* **1992**, 267, 12011-12015.
57. G.Pohlentz, D.Klein, G.Schwarzmann, D.Schmitz, K.Sandhoff, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1988**, 85, 7044-7048.
58. H.Iber, C.Zacharias, K.Sandhoff, *Glycobiology*, **1992**, 2, 137-140.
59. H.Iber, K.Sandhoff, *FEBS Lett.* **1989**, 254, 124-128.
60. H.Iber, G.van Echten, K.Sandhoff, *Eur.J.Biochem.* **1991**, 195, 115-118.
61. K.Nara, Y.Watanabe, I.Kawashima, T.Tai, Y.Nagai, Y.Sinai, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1996**, 238, 647-652.
62. S.Tsuji, *J.Biochem.*, **1996**, 120, 1.
63. K.Sandhoff, T.Kolter, *Trends Cell Biology*, **1996**, 6, 98-101.
64. C.Scriver, A.L.Beaudet, W.S.Sly, D.Valle (Eds.), „*The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*“, McGraw-Hill, New York, 7th Edn., **1994**, Vol. 2.
65. G.Scheel, E.Acevado, E.Conzelmann, H.Nehrkorn, K.Sandhoff, *Eur.J.Biochem.* **1982**, 127, 245-248.
66. E.M.Meier, G.Schwarzmann, W.Fürst, K.Sandhoff, *J.Biol.Chem.* **1991**, 266, 1879-1887.
67. W.Fürst, K.Sandhoff, *Biochem.Biophys.Acta* **1992**, 1126, 1.
68. E.Mehl, H.Jatzekowitz, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* **1964**, 339, 260-263.
69. D.Schnabel, M.Schröder, K.Sandhoff, *FEBS Lett.* **1991**, 284, 57-59.
70. V.Bradova, F.Smid, B.Ulrich-Bott, W.Roggendorf, B.C.Paton, K.Harzer, *Hum.Genet.* **1993**, 92, 143-147.
71. J.K.Burkhardt, S.Hüttler, A.Klein, W.Möbius, A.Habermann, G.Griffiths, K.Sandhoff, *Eur.J.Cell Biol.* **1997**, 73, 10-15.
72. S.-C.Li, S.Sonnino, G.Tettamanti, Y.-T.Li, *J.Biol.Chem.* **1988**, 263, 6588-6591.
73. A.Klein, M.Henseler, C.Klein, K.Suzuki, K.Harzer, K.Sandhoff, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 200, 1440-1444.
74. M.W.Ho, J.S.O'Brien, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1971**, 68, 2810-2813.
75. H.-J.Kytzia, K.Sandhoff, *J.Biol.Chem.* **1985**, 260, 7568-7572.
76. V.Chowdry, F.H.Westheimer, *Rev.Biochem.* **1979**, 48, 293-325.
77. H.Bayley, J.R.Knowles, *Methods Enzym.* **1977**, 46, 69-114.
78. D.I.Schuster, W.C.Probst, G.K.Ehrlich, G.Singh, *Photochem. Photobiol.* **1989**, 49, 785-804.
79. H.Gronemeyer, M.V.Govindan, *Molecul.Cell Endocr.* **1986**, 46, 1.

80. A.M.Tometsko, F.M.Richards, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1980**, 346, 1.
81. F.K.-Hibert, I.Kapfer, M.Goeldner, *Angew.Chem.* **1995**, 107, 1391-1408.
82. S.A.Fleming, *Tetrahedron* **1995**, 46, 12479-12520.
83. H.Bayley in T.S.Work, R.H.Burdon, *Photogenerated Reactions in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier, Amsterdam, **1983**.
84. J.S. Fedan, G.K.Hogaboom, J.P.O'Donnell, *Biochem.Pharmacol.* **1984**, 33, 1167-1172.
85. Y.Hatanaka, H.Nakayama, Y.Kanaoka, Y.Gosei, K.Kyokaishi, *Chem.Pharm.Bull.* **1988**, 46, 1041-1114.
86. D.I.Schuster, W.C.Probst, G.K.Ehrlich, G.Singh, *Photochem.Photobiol.* **1989**, 49, 785-789.
87. H.Morrison in *Bioorganic Photochemistry*, Wiley, Vol.1, **1990**.
88. A.Singh, R.Thornton, F.H.Westheimer, *J.Biol.Chem.* **1962**, 237, 3006-3009.
89. M.Saljoughian, *Isot.Phys.Biomed.Sci.* **1991**, 1, 114-136.
90. T.J.Mende, L.S.Schulman, D.G.Baden, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 5307-5310.
91. C.-S.Kuhn, J.Lehmann, K.Sandhoff, *Bioconjugate Chem.* **1992**, 3, 230-233.
92. B.Liessem, G.J.Glombitza, F.Knoll, J.Lehmann, J.Kellermann, F.Lottspeich, K.Sandhoff, *J.Biol.Chem.* **1995**, 270, 23693-23698.
93. J.M.Gonzalez-Ros, A.M.Fernandez, G.Fernandez-Ballester, J.A.Ferragut, J.Castresana, J.L.R.Arrondo, *Jerusalem Symp.Quantum Chem.Biochem.* **1992**, 25, 213-227.
94. A.Wolf, T.M.Fritzsche, B.Rudy, W.E.Trommer, *FEBS Lett.* **1987**, 212, 203-207.
95. K.Schneider, H.W.Zimmermann, *Histochemistry* **1994**, 101, 135-138.
96. H.Chuan, J.Lin, J.H.Wang, *J.Biol.Chem.* **1989**, 264, 7981-7988.
97. J.Stackhouse, F.H.Westheimer, *J.Org.Chem.* **1981**, 46, 1891-1898.
98. P.K.Pal, P.S.Coleman, *J.Biol.Chem.* **1990**, 265, 14996-15002.
99. J.E.Rosen, *Proc.SPIE-Int.Soc.Opt.Eng.* **1993**, 1885, 349-352.
100. Y.Watanabe, M.Hirata, T.Ogasawara, T.Koga, S.Ozaki, *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **1991**, 1, 399-402.
101. M.E.Salvucci, A.J.Charan, B.Haley, *Biochemistry* **1992**, 31, 4479-4483.
102. J.Casanova, Z.D.Horowitz, R.P.Copp, W.R.McIntyre, A.Pascual, H.H.Samuels, *J.Biol.Chem.* **1984**, 259, 12084-12091.
103. A.Pascual, J.Casanova, H.H.Samuels, *J.Biol.Chem.* **1982**, 257, 9640-9647.
104. Y.-Z.Li, J.P.Kirby, M.W.George, M.Poliakoff, G.B.Schuster, *J.Am.Chem.Soc.* **1988**, 110, 8092-9098.
105. R.A.G.Smith, J.R.Knowles, *J.Chem.Soc.,Perkin Trans.2* **1975**, 686-694.

106. J.Brunner, *Trends Cell Biol.* **1996**, 6, 154-159.
107. J.Brunner, H.Senn, F.M.Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 3313-3318.
108. A.Singh, E.R.Thornton, F.H.Westheimer, *J.Biol.Chem.* **1962**, 237, 3007-3008.
109. V.Chowdry, R.Vaughan, F.H.Westheimer, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1976**, 1406-1408.
110. W. Curatolo, R.Ramachandran, C.M.Gupta, G.Khorana, *Biochemistry* **1981**, 20, 1374-1378.
111. C.G.Schuette, B.Pierstorff, S.Huettler, K.Sandhoff, *Glycobiology* **2001**, 11, 81-90.
112. R.E.Shapiro, C.D.Specht, B.E.Collins, A.S.Specht, B.E.Collins, A.S.Woods, R.J.Cotter, R.L.Schnaar, *J.Biol.Chem.* **1997**, 272, 30380-30387.
113. S.M.Fueshko, C.L.Schengrund, *J.Neurochem.* **1992**, 59, 527-530.
114. T.Pacuszka, P.H.Fishman, *Glycobiology*, **1992**, 2, 251-256.
115. T.Pacuska, M.Panasiewicz, 1995, *Biochim.Biophys.Acta*, **1995**, 1257, 265-270.
116. A.M.Fra, M.Masserini, P.Palestini, S.Sonnino, K.Simons, *FEBS Lett.* **1995**, 375, 11-14.
117. E.M.Meier, D.Schummer, K.Sandhoff, *Chem.Physics Lipids* **1990**, 55, 103-108.
118. Y.Hatanaka, M.Hashimoto, K.I.Hidari, Y.Sanai, Y.Tezuka, Y.Nagai, Y.Kanaoka, *Chem.Pharm.Bull.* **1996**, 44, 1111-1114.
119. R.R.Drake, P.Zimniak, B.E.Haley, R.Lester, A.D.Elbein, A.Radomska, *J.Biol.Chem.* **1991**, 266, 23257-23260.
120. R.L.Halcomb, H.Huang, C.-H.Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11315-11322.
121. R.Stiller, J.Thiem, *Liebigs Ann.Chem.* **1992**, 467-471.
122. G.F.Herrmann, P.Wang, G.-J.Shen, G.-J., C.-H.Wong, C.-H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1994**, 33, 1241-1242.
123. D.Gygax, P.Spies, T.Winkler, U.Pfaar, *Tetrahedron* **1991**, 47, 5119-5122.
124. U.Korf, J.Thimm, J.Thiem, *Synlett* **1991**, 313-314.
125. C.-H.Wong, S.L.Haynie, G.M.Whitesides, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 5416-5418.
126. L.Elling, M.Grothus, M.-R.Kula, *Glycobiology*, **1993**, 3, 349-355.
127. S.Roseman, J.J.Distler, J.G.Moffat, H.G.Khorana, *J.Am.Chem.Soc.* **1961**, 83, 659-664.
128. J.G.Moffat, *Methods Enzymol.* **1966**, 8, 136-141.
129. C.L.F.Meyers, M.Oberthür, J.W.Anderson, D.Kahne, C.T.Walsh, *Biochemistry* **2003**, 42, 4179-4189.
130. T.Uchiyama, O.Hindsgaul, *J.Carbohydr.Chem.* **1998**, 17, 1181-1190.
131. M.Oberthür, C.Leimkuhler, D.Kahne, *Org.Lett.* **2004**, 6, 17, 2873-2876.
132. H.G.Khorana, G.M.Tenner, J.G.Mofatt, E.H.Pol, *Chem. und Ind.* **1956**, 1523.

133. A.M.Michelson, A.R.Todd, *J.Chem.Soc.* **1955**, 2632-2638.
134. F.Eckstein, I.Ritz, *Angew. Chem.* **1967**, 79, 684, 939; F.Eckstein, I.Ritz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1967**, 6, 695, 949.
135. R.L.Letsinger, V.Mahadevan, *J.Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3526-3527.
136. R.L.Letsinger, W.B.Lunsford, *J.Am.Chem.Soc.*, **1976**, 98, 3655-3661.
137. D.Lazarević, J.Thiem, *Carbohydr.Res.* **2002**, 337, 2187-2194.
138. A.Zwierzak, M.Kluba, *Tetrahedron* **1971**, 27, 3163-3170.
139. S.Sabesan, S.Neira, *Carbohydr. Res.* **1992**, 223, 169-185.
140. G.Srivastava, O.Hindsgaul, M.M.Palcic, *Carbohydr. Res.* **1992**, 245, 137-144.
141. J.W.Perich, R.B.Johns, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 101-102.
142. J.W.Perich, R.B.Johns, *Synth. Commun.* **1988**, 142-144.
143. M.M.Sim, H.Kondo, C.-H.Wong, *J.Am.Chem.Soc.* **1993**, 115, 2260-2267.
144. P.Westerduin, G.H.Veenemann, J.E.Marugg, G.A.van der Marel, J.H.van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 1211-1214.
145. S.Liemann, W.Klaffke, *Liebigs Ann.* **1995**, 1779-1787.
146. K.Fukase, T.Kamikawa, Y.Iwai, *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1991**, 64, 3267-3273.
147. O.Eyrisch, G.Sinerius, W.-D.Fessner, *Carbohydr. Res.* **1993**, 238, 287-306.
148. P.Westerduin, G.H.Veenemann, J.H.van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1987**, 106, 601-606.
149. P.Westerduin, G.H.Veenemann, G.A.van der Marel, J.H.van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 6271-6274.
150. R.R.Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 213-236; R.R.Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, 25, 212-235.
151. H.Paulsen, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 851-867; H.Paulsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 29, 823-839.
152. H.Kunz, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 297-311; H.Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1987**, 26, 294-308.
153. A.Munch-Petersen, H.M.Kalckar, E.Cutolo, E.Smith, *Nature* **1953**, 172, 1036-141.
154. L.F.Leloir, *Arch.Biochem. and Biophys.* **1951**, 33, 186-192.
155. R.G.Hansen, R.A.Freedland, *J.Biol.Chem.* **1955**, 303-307.
156. J.Niggemann, J.Thiem, *Liebigs Ann.* **1995**, 535-538.
157. K.Adelhorst, G.M.Whitesides, *Carbohydr. Res.* **1993**, 242, 69-76.
158. T.Furuta, H.Torigai, T.Osawa, M.Iwamura, *J.Chem.Soc., Perkin Trans I* **1993**, 3139-3142.

159. R.Roy, F.D.Tropper, C.Grand-Maître, *Can.J.Chem.* **1991**, 69, 1462-1467.
160. C.D.Warren, Y.Konami, R.W.Jeanloz, *Carbohydr. Res.* **1973**, 30, 257-279.
161. M.Basu, T.De, K.K.Das, J.W.Kyle, H.C.Chon, R.J.Schaeper, S.Basu, *Methods Enzymol.* **1987**, 138, 575-607.
162. M.Basu, *Glycobiology* **1991**, 1, 469-473.
163. N.Taniguchi, A.Makita, *J.Biol.Chem.* **1984**, 259, 5637-5642.
164. R.J.Schaeper, K.K.Das, Z.Li, S.Basu, *Carbohydr.Res.* **1992**, 236, 227-244.
165. Y.Hashimoto, M.Sekine, K.Iwasaki, A.Suzuki, *J.Biol.Chem.* **1993**, 268, 25857-25864.
166. K.Sango, O.N.Johnson, C.A.Kozak, R.L.Proia, *Genomics* **1995**, 27, 824-827.
167. Y.Nagata, S.Yamashiro, J.Yodoi, K.O.Lloyd, H.Shiku, K.Furukawa, *J.Biol.Chem.* **1992** 267, 12082-12089.
168. K.Furukawa, H.Soejima, N.Niikawa, H.Shiku, *J.Biol.Chem.* **1996**, 271, 20836-20842.
169. J.-L.Chien, T.Williams, S.Batu, *J.Biol.Chem.* **1973**, 248, 1778-1785.
170. N.Taniguchi, N.Yokosawa, S.Gasa, A.Makita, *J.Biol.Chem.* **1982**, 257, 10631-10637.
171. K.K.Das, M.Basu, S.Basu, C.H.Evans, *Carbohydr.Res.* **1986**, 149, 119-136.
172. Yoshida, T.Hara, H.Ikenaga, M.Takeuchi, *Glycoconjugate J.* **1995**, 12, 824-828.
173. J.E.Heidlas, W.J.Lees, P.Pale, G.M.Whitesides, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 146-151.
174. J.Martinez, J.Laur, *Synthesis* **1982**, 979-981.
175. A.Vasella, C.Witzig, J.-L.Chicara, M.Martin-Lomas, *Helv. Chim. Acta* **1991**, 74, 2073-2077.
176. P.B.Alper, S.-C.Hung, C.-H.Wong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6029-6032.
177. H.Schene, H.Waldmann, *Synthesis* **1999**, 1411-1422.
178. C.H.Marzabadi, R.W.Franck, *Tetrahedron* **2000**, 56, 8385-8417.
179. R.J.Ferrier, N.J.Prasad, *J.Chem.Soc.* **1969**, 570-575.
180. K.Tatsuka, K.Fujimoto, M.Kinoshita, S.Umezawa, *Carbohydr. Res.* **1977**, 54, 85-104.
181. J.Thiem, H.Karl, J.Schwentner, *Synthesis* **1978**, 696-698.
182. J.Thiem, J.Schwentner, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 459-462.
183. S.Sabesan, S.Neira, *J.Org.Chem.* **1991**, 56, 5468-5472.
184. J.R.Falck, C.Mioskowski, V.Bolitt, S.-G.Lee, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 5812-5813.
185. N.Kaila, M.Blumenstein, H.Bielawska, R.W.Franck, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4576-4578.
186. R.U.Lemieux, R.M.Ratcliffe, *Can.J.Chem.* **1979**, Vol. 57, 1244-1251.

187. R.U.Lemieux, R.M.Ratcliffe, Patent: *DE 28 16 340 A 1*, **1978**; CAN 90:87846; AN 1979:87846.
188. G.Grundler, R.R.Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1826-1847.
189. W.S.Trahanovsky, J.Cramer, *J.Org.Chem.* **1971**, 39, 570575.
190. W.S.Trahanovsky, M.D.Robbins, *J.Am.Chem.Soc.* **1971**, 93, 5256-5259.
191. F.J.Ballard, *Biochem J.* **1966**, 98, 347-352.
192. D.G.Walker, H.H.Khan, *Biochem J.* **1968**, 108, 169-175.
193. R.F.Sala, S.L.MacKinnon, M.M.Palcic, M.E.Tanner, *Carbohydr. Res.* **1998**, 306, 127-136.
194. J.C.Sheehan, D.D.H.Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 1154-1159.
195. M.Waki, J.Meienhofer, *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 2019-2026.
196. A.R.Day, R.J.Freer, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1979**, 13, 334-339.
197. A.R.Day, N.Muthukumaraswamy, R.J.Freer, *Peptides* **1980**, 1, 187-194.
198. W.Stevens, A.V.Es, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1965**, 84, 1274-1278.
199. M. Shiozaki, Y.Kobayashi, N.Ishida, M.Arai, T.Hiraoka, *Carbohydr. Res.* **1991**, 222, 57-68.
200. J.-N.Bertho, A.Coué, D.F.Ewing, J.W.Goodby, P.Letellier, G.Mackenzie, D.Plusquellec, *Carbohydr. Res.* **1997**, 300, 341-346.
201. M.L.Wolfrom, P.J.Congliaro, *Carbohydr. Res.* **1969**, 11, 63-76.
202. J.Poisson, C.Miet, N.Kunesch, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 3569-3572.
203. K.L.Kiick, E.Saxon, D.A.Tirrell, C.R.Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, 99, 19-24.
204. S.J.Luchansky, H.C.Hang, E.Saxon, J.R.Grunwell, C.Yu, C.H.Dube, C.R.Bertozzi, *Meth. Enzymol.* **2003**, 362, 249-272.
205. L.Cotarca, P.Delogu, A.Nardelli, V.Sunjic, *Synthesis* **1996**, 554-576.
206. E.J.Corey, A.G.Myers, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 33, 3559-3562.
207. H.O.House, J.Blankley, F.J.Sauter, *Org. Synth.* **1973**, 258-262.
208. L.Friedman, R.L.Little, W.R.Reichle, *Org. Synth.* **1973**, 1055-1057.
209. B.Erni, H.G.Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 3888-3896.
210. A.Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130.
211. R.A.Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720.
212. A.Kobata, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 319-324.
213. N.Sharon, H.Lis, *Sci. Am.* **1993**, 1, 82-89.
214. N.Sharon, H.Lis, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218, 1-27.

215. S.J.Danishefsky, M.T.Bilodeau, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 1380-1419.
216. O.J.Hindsgaul, *Carbohydr. Chem.* **1995**, 18, 1043-1087.
217. K.Toshima, K.Tatsuka, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 1503-1531.
218. J.Banoub, P.Boullanger, D.Lafont, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1167-1195.
219. C.-H.Wong, R.L.Halcomb, Y.Ichikawa, T.Kajimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 521-546.
220. V.Wittman, C.-H.Wong, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2144-2147.
221. Heidlas, J.E., W.J.Lees, P.Pale, G.M.Whitesides, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 152-157.
222. T.E.Barmann, *Enzyme Handbook*, **1985**, Springer, New York, 1st Edn.
223. H.Weckbecker, D.O.R.Keppler, *Eur. J. Biochem.* **1982**, 128, 163-169.
224. R.J.Guillory, S.J.Jeng, *Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1983**, 42, 2826-2830.
225. J.Czarneckie, R.Gaehlen, B.Haley, *Methods Enzymol.* **1979**, 56, 642-653.
226. H.U.Blank, J.J.Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 7175-7176.
227. T.K.Bradshaw, D.W.Hutchinson, *Chem. Soc. Rev.* **1977**, 6, 43-63.
228. R.K.Evans, B.E.Haley, *Biochemistry* **1987**, 26, 269-276.
229. I.Wempen, I.Ldoerr, L.Kaplan, J.J.Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 1624-1629.
230. G.-F.Huang, P.F.Torrence, *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 3821-3824.
231. R.Luhrmann, U.Schwarz, H.G.Gassen, *FEBS Lett.* **1973**, 32, 55-58.
232. A.M.Michelson, *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, 91, 1-13.
233. G.Weckbecker, D.O.R.Keppler, *Biochem. Pharmacol.* **1984**, 33, 2291-2296.
234. C.J.Cavender, V.J.Shiner, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3567-3569.

9. Gefahrenhinweise

	R-Sätze	S-Sätze	Gefahren- symbole
Aceton	11-36-66-67	9-16-26	F, Xi
Acetonitril	11-23/24/25	16-27-45	F, T
Acetylchlorid	11-14-34	9-16-26-45	F, C
Ameisensäure	35	23.2-26-45	C
Ammoniakgas	34-50	26-36/37/39-45-61	C, N
Benzylalkohol	20/22	26	Xn
Brenztraubensäure	34	26-36/37/39-45	C
α -Bromacetyl bromid	14-34	26-36/37/39-45	C
2-Bromessigsäure	23/24/25-35-50	26-36/37/39-45-61	T, C, N
Bromwasserstoff in	34-37	7/9-23.2-26-	C
Essigsäure (33 %-ig)		36/37/39-45	
Buttersäure	34	26-36-45	C
Chloroform	22-38-40-48/20/22	36/37	Xn
<i>syn</i> -Collidin	10-22-36/38	23.2	Xn
Cyclohexan	11-38-50/53-65-67	9-16-25-33- 60-61-62	F, Xn, N
3-Chlorperbenzoesäure	7-36/37/38	3/37-14.10- 36/37/39	O, Xi
Dibenzyl- <i>N,N</i> -diiso- propylphosphoramidit	36/37/38	26-36	
1,2-Dichlorethan	45-11-E22-36/37/38	53-45	T, F
Dichlormethan	40	23.2-24/25-36/37	Xn
Dicyclohexylcarbodiimid	22-24-41-43	24-26-37/39-45	T
Diisopropylethylamin	11-20/22-34	16-26-36/37/39	F, C
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	61-E20/21-36	53-45	T
Diphenylphosphochloridat	34	26-36/37/39-45	C
1,4-Dioxan	11-19-36/37-40-66	9-16-36/37-46	F, Xn
Ethylacetat	11-36-66-67	16-26-33	F, Xi

	R-Sätze	S-Sätze	Gefahren-Symbole
Ethyl-2,2,2-trifluoracetat	11-36	9-16-26	F, Xi
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	7-21/22-23-34-44	52/53 3/7-14.11- 26-36/37/39-45	O, T
Essigsäure	10-35	23.2-26-45	C
Essigsäureanhydrid	10-20/22-34	26-36/37/39-45	C
Ethanol	11	7-16	F
Guanidinhydrochlorid	22-36/38	22	Xn
Hydroxylamin-O-sulfonsäure	34	26-36/37/39-45	C
Imidazol	22-34	22-26-36/37/39-45	C
Isobuttersäure	21/22		Xn
Kaliumcarbonat	36/37/38	22-26	Xi
Kaliumhydroxid	22-35	26-36/37/39-45	C
Kupfer(II)-sulfat-pentahydrat	22-36/38-50/53	22-60-61	Xn, N
2-Mercaptoethanol	22-24-34-51/53	26-36/37/39-45-61	T, N
Methanol	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45	F, T
Natriumhydroxid	45	26-37/39-45	C
Natriumazid	28-32-50/53	28.1-45-60-61	T+, N
Natriumnitrit	8-25-50	45-61	O, T, N
Nitrosyltetrafluoroborat	31-34	7/8-26-36/37/39-45	C
<i>n</i> -Octylamin	20/21/22-34-50	26-36/37/39-45-61	C, N
Palladium / Aktivkohle	7-36/37/38	17-26-36	F, Xi
Palladium(II)-oxid	36/38	26-28.1	Xi
Petrolether (50/70)	12-65	9-16-23.2-24-33-62	F, Xn
Propionsäure	34	23.2-36-45	C
Pyridin	11-20/21/22	26-28.1	F, Xn
Pyridinhydrochlorid	22-36/38	22	Xn
4-Pyrrolidinopyridin	25-35	26-36/37/39-45	T

	R-Sätze	S-Sätze	Gefahren- symbole
Salzsäure (37 %-ig)	34-37	26-36/37/39-45	C
Schwefelsäure	35	26-3045	C
Tetrahydrofuran	11-19-36/37	16-29-33	F, Xi
1H-Tetrazol	11	7-15	F
Toluol	11-20	16-25-29-33	F, Xn
Tri- <i>n</i> -butylamin	22-23/24-38-51/53	36/37-45-61	T, N
Triethylamin	11-20/21/22-35	3-16-26-29- 36/37/39	F, C
Triethylammoniumchlorid	34	26-36/37/39-45	C
Trifluormethansulfon- säureanhydrid	35	26-36/37/39-45	C
Zink (-staub)	50/53	60-61	N

Lebenslauf Daniel Lazarević
 geboren am 30.12.1974 in Hamburg

Schulbildung	08/80 – 07/81	Grundschule Slomanstieg, Hamburg
	08/81 – 07/84	Grundschule Ifflandstrasse, Hamburg
	09/84 – 06/93	Gymnasium Lerchenfeld, Hamburg
	05/91 – 03/93	Berufsfachschule für chem.-tech. Assistenz, Gymnasium Altona, Hamburg
Studium	10/93 – 11/95	Grundstudium Chemie, Universität Hamburg
	11/95	Vordiplom
	12/95 – 12/99	Hauptstudium Chemie, Universität Hamburg
	07/99 – 12/99	Diplomarbeit, Arbeitskreis Prof. Dr. J. Thiem
	12/99	Diplom
	04/00 – 03/05	Doktorarbeit, Arbeitskreis Prof. Dr. J. Thiem
Industriepraktika	08/97 – 10/97	Fachpraktikum der BASF AG, Ludwigshafen „Synthese lipohiler Derivate der Ascorbinsäure und des Retinols“
	10/99	HPLC-Grundkurs, Merck Eurolab, Darmstadt
Auslands- aufenthalte	03/02 – 04/02 und 12/02 – 01/03	Forschungsaufenthalte am Institut für Biologie und medizinische Genetik der Universität Prag, Tschechische Republik, Arbeitskreis Prof. Dr. V. Kren
Beruflicher Werdegang	08/99 – 12/99	Mitarbeiter der NMR-Abteilung des Instituts für Organische Chemie, Universität Hamburg
	04/00 – 03/01	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 470 „Glycostrukturen in Biosystemen“
	seit 04/01	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Assistent im organisch-chemischen Nebenfachpraktikum

Publikationen

“Synthesis of symmetric difucopyranose dianhydrides”,

M.Ludewig, D.Lazarević, J.Kopf, J.Thiem, *J.Chem.Soc.,Perkin Trans.1* **1998**, 1751-1752.

“Syntheses of unnatural N-substituted UDP-galactosamines as alternative substrates for N-acetylgalactosaminyl transferases”,

D.Lazarević, J.Thiem, *Carbohydr.Res.* **2002**, 337, 2187-2194.

“N-Substituted UDP-glucosamine analogues as artificial substrates for N-acetylglucosaminyl transferases”

D.Lazarević, J.Thiem, *Carbohydr.Res.* **2005**, *submitted*.

