

**Aufbau und Untersuchung modifizierter
Neuraminsäuredonoren zur regio- und
stereoselektiven Sialylierung durch Trans-
Sialidase (*Trypanosoma cruzi*)**

Dissertation

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

vorgelegt von

Andreas Schroven

aus Barßel

Hamburg 2007

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

Tag der Disputation: 19. Oktober 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2005 bis August 2007 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. J. Thiem am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. J. Thiem danke ich für die interessante Aufgabenstellung und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit

für Christine

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcCl	Acetylchlorid
AcOH	Essigsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bn	Benzyl
Bz	Benzoyl
CMP-Neu5Ac	Cytidinmonophosphat- <i>N</i> -acetylneuraminsäure
CTP	Cytidintriphosphat
DANA	2,3-Dehydro-2-desoxy- <i>N</i> -acetylneuraminsäure
DBU	1,4-Diaza-bicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschicht-Chromatogramm
DCM	Dichlormethan
DMAP	4-Dimethylamino-pyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EE	Ethylacetat / Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LacNAc	<i>N</i> -Acetyllactosamin
Lsg	Lösung
ManNAc	<i>N</i> -Acetylmannosamin
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MU-OH	4-Methyl-umbelliferon
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5But	<i>N</i> -Butanoylneuraminsäure
Neu5Gc	<i>N</i> -Glycolylneuraminsäure
Neu5Prop	<i>N</i> -Propanoylneuraminsäure
PE	Petrolether
PEP	Phosphoenolpyruvat
PhSH	Thiophenol
Piv	Pivaloyl

*p*NP-OH

PP

PTC

RT

T.c. / *T. cruzi*

TBA-HSO₄

Tf

THF

Trt

UDP-GlcNAc

UTP

para-Nitrophenol

Pyrophosphat

Phasentransferkatalyse

Raumtemperatur

Trypanosoma cruzi

Tetrabutylammoniumhydrogensulfat

Triflyl

Tetrahydrofuran

Trityl

Uridindiphosphat-*N*-acetylglucosamin

Uridintriphosphat

1	Einleitung	1
1.1	Vorkommen und Bedeutung von Neuraminsäuren	2
1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> , Chagas-Krankheit und Trans-Sialidase	4
1.3	Chemische Synthese sialylierter Oligosaccharide	8
1.4	Enzymatische Synthese sialylierter Oligosaccharide	10
2	Zielsetzung	13
3	Sialylallolactose zur Detektion der synaptischen Fusion	14
3.1	Darstellung von α -Methyl-allolactosid als Neu5Ac-Akzeptor	17
3.2	Darstellung des Neu5Ac-Donors	18
3.3	Enzymatische Übertragung von Neu5Ac	19
4	Darstellung potenzieller Donorsubstrate	20
4.1	Vollständige Deacetylierung der Neuraminsäure zur späteren Modifizierung	23
4.2	Darstellung <i>N</i> -acylmodifizierter Donorderivate	26
4.3	Darstellung des <i>N</i> -Glycolylneuraminsäure-Donors	33
4.4	Darstellung des Azids der Neuraminsäure	39
4.5	Selektive Acylierung der endständigen OH-Gruppe	41
5	Enzymatische Übertragungen	43
6	NMR-spektroskopische Reaktionsverfolgung	45
7	Enzymkinetik	48
8	Zusammenfassung	52
9	Summary	54
10	Experimenteller Teil	55
10.1	Allgemeine Methoden	55
10.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	56
10.3	Spezielle Arbeitsvorschriften	57
11	Sicherheitshinweise	114
12	Literatur	116

1 Einleitung

Kohlenhydrate stellen mit ihrer strukturellen Vielfalt neben den Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden eine der vier Hauptklassen von Biomolekülen dar.^[1] Grundbaustein aller Kohlenhydrate sind Monosaccharide. Es wird angenommen, dass weltweit 200 Milliarden Tonnen Kohlenhydrate pro Jahr durch Photosynthese aus Wasser und Kohlendioxid gebildet werden.^[2] So bilden sie den mit Abstand größten Anteil an organischen Verbindungen auf der Erde und erfüllen in zahlreichen natürlichen Prozessen wichtige Aufgaben. Sie dienen zum Beispiel in Form von Stärke in Pflanzen und Glycogen in Tieren als Energiespeicher, der schnell zu Glucose abgebaut werden kann. Cellulose, das bedeutendste Biopolymer, ist Bestandteil nahezu aller pflanzlichen Zellwände. ATP ist ein Zuckerderivat und dient im Körper als universelle Energiequelle. Ribose und Desoxyribose sind Teile des Grundgerüsts der DNA. Des Weiteren sind Heterooligosaccharide Bestandteil von Zellwänden und spielen dort eine wichtige Rolle in Erkennungsprozessen.

Kohlenhydrate stellten lange Zeit ein schwierig zu bearbeitendes Gebiet dar. So war bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts lediglich die allgemeine Summenformel $C_6H_{12}O_6$ für Glucose bekannt, die zumindest formal ein Hydrat des Kohlenstoffes nahe legte. Die Probleme lagen in erster Linie in der anspruchsvollen Isolierung von Produkten, da häufig schwer zu kristallisierende Verbindungen erhalten wurden. Mit den wachsenden Möglichkeiten der Analytik ist in den vergangenen Jahrzehnten auch das Verständnis bezüglich der Rolle von Kohlenhydraten in biologischen Prozessen gestiegen. Man erkannte in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts die zentrale Bedeutung der zahlreichen, anfangs für zufällig aufgebaut gehaltenen Glykokonjugate.^[3] Diese sind in allen Lebewesen vorhanden und an nahezu allen interzellulären Prozessen beteiligt. An ihren Enden tragen diese Zelloberflächen-Glykokonjugate häufig Neuraminsäuren, ein aus einem Grundgerüst von neun Kohlenstoffatomen aufgebautes Saccharid, das in Form von zahlreichen Derivaten im Körper zu finden ist.

1.1 Vorkommen und Bedeutung von Neuraminsäuren

Neuraminsäuren sind als terminale Monosaccharide Baustein vieler Glykokonjugate. Durch ihre endständige Position als Bestandteil komplexerer Oligosaccharide sind Neuraminsäuren an vielen biologischen Prozessen essentiell beteiligt. Erstmals wurden sie 1941 von E. Klenk aus Glycolipiden des Gehirns isoliert und nachgewiesen.^[4] Seither sind über 50 natürliche Derivate der Neuraminsäure gefunden worden, die sich vor allem in ihren Substitutionsmustern unterscheiden. Beispielsweise sind als *N*-Substituenten neben Acetyl und Glycolyl auch Phosphoryl, Sulfonyl und Lactoyl nachgewiesen worden.^[5] Der bedeutendste Vertreter, in jeder Spezies zu finden, ist die *N*-Acetylneuraminsäure **1** (Neu5Ac).

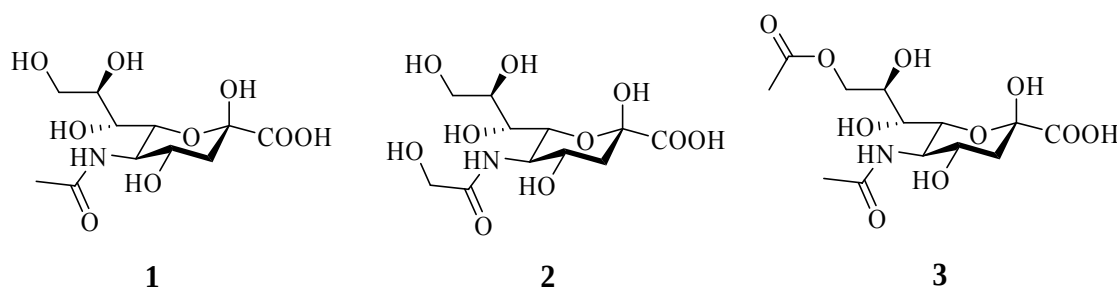


Abb. 1: Die wichtigsten Derivate der Neuraminsäure

Die Erklärung für das Auftreten so vieler Derivate liegt in der Notwendigkeit einer spezifischen Erkennung, zum Beispiel bei der Differenzierung von Zellen, aber auch bei allen anderen interzellulären Erkennungsprozessen. So erkennen sialinsäurebindende Lectine (Siglecs) sehr spezifisch unterschiedliche Neuraminsäurestrukturen, die auf der „Zielseite“ exprimiert werden müssen. Beispielsweise bevorzugt das Siglec-2/CD22 der Maus *N*-Glycolylneuraminsäure **2** (Neu5Gc) gegenüber Neu5Ac, während Siglec-1/Sialoadhesin von Mensch und Maus Neu5Ac bevorzugt.^[6, 7] Neben ihrer Funktion im Zusammenhang mit der Zell-Zell-Erkennung haben Neuraminsäuren auch maskierende Funktion. Dies wird in Untersuchungen zum Abbau von Erythrozyten deutlich. Die auf der Oberfläche an Galactose gebundene Neuraminsäure wird experimentell durch Sialidase abgespalten und die so behandelten Erythrozyten wieder dem Blutstrom zugeführt. Die auf diese Weise „demaskierten“ Galactose-Einheiten werden durch entsprechende Rezeptoren der Leberzellen erkannt, und die Erythrozyten innerhalb von Stunden abgebaut.^[8-10] Die maskierende Rolle der Neuraminsäure, insbesondere der 9-*O*-acetylierten Form **3**, wird ebenfalls in der Entwicklung zahlreicher Tumorzellen deutlich.^[11]

GD3, ein in geringen Konzentrationen in Zellen vorkommendes Gangliosid, das am terminalen Ende zwei Neu5Ac trägt, induziert zum Beispiel bei defektem Erbmaterial die Apoptose, also den programmierten Zelltod. Hierbei spielt die Erkennung des GD3 durch Mitochondrien eine zentrale Rolle. In Tumorzellen liegt ein erhöhter Anteil der Neuraminsäure des GD3 9-*O*-acetyliert vor, wodurch ihre Erkennung verhindert wird. Die Acetylierung von Neuraminsäuren versetzt die Zelle in die Lage den programmierten Zelltod zu verhindern und trotz eines Gendefektes, der normalerweise die Apoptose auslösen würde, zu wuchern. Störungen in der Biosynthese der Neuraminsäure haben entsprechend der wichtigen Rolle drastische Auswirkungen. So ist der klassische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Knock-Out, also der Knock-Out des Schlüsselenzyms der Neuraminsäurebiosynthese (Abb. 2), in der Maus schon im embryonalen Stadium letal.^[12]

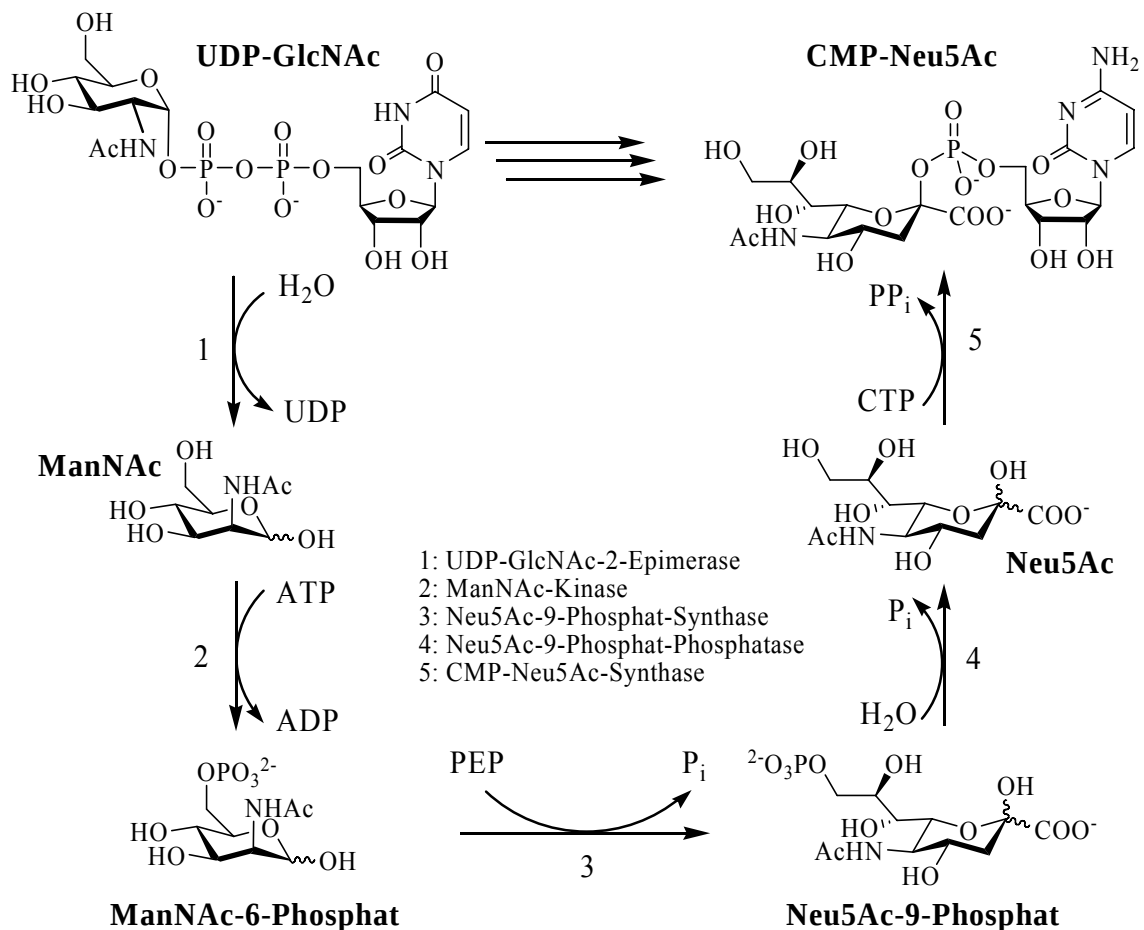


Abb. 2: Biosynthese von CMP-Neu5Ac als Vorläufer sialylierter Oligosaccharide

Während im Serum und auf den Erythrozyten des gesunden Menschen ausschließlich Neu5Ac zu finden ist, wurde bereits früh herausgefunden, dass im Tierreich ein mehr oder weniger ausgewogener Anteil an Neu5Gc in Serum und Erythrozyten vorhanden ist.^[13]

Das Fehlen der Glycolylneuraminsäure im menschlichen Körper geht auf eine Mutation des Gens zurück, das die CMP-Neu5Ac-Hydroxylase kodiert. Diese fand nach unseren letzten gemeinsamen Vorfahren mit Schimpansen und Bonobos und vor dem Auftreten des Neandertalers statt.^[14] Da diese signifikante Veränderung als einer der wichtigen Schritte der Evolution des Menschen angesehen wird, werden große Anstrengungen unternommen den genauen Zeitpunkt der Mutation zu bestimmen.

Affenart	Erythrozyt	Serum
Orang-Utan	Neu5Gc+++; Neu5Ac+	Neu5Gc+; Neu5Ac+++
Schimpanse	Neu5Gc+++; Neu5Ac+	Neu5Gc+; Neu5Ac+++
Gorilla	Neu5Gc+++; Neu5Ac+	Neu5Gc+; Neu5Ac+++
Lemur	Neu5Gc; Neu5Ac	Neu5Gc+++; Neu5Ac+
Rhesusaffe	Neu5Gc+++; Neu5Ac+	Neu5Gc+++; Neu5Ac+

Tabelle 1: +++ = vorwiegend; + = in geringer Menge

Neu5Gc lässt sich entgegen der beschriebenen Mutation auch in humanen Tumorzellen in größeren Mengen nachweisen. Es werden in diesem Zusammenhang mehrere Theorien diskutiert. Sehr spekulativ ist eine „Reaktivierung“ der CMP-Neu5Ac-Hydroxylase. Möglich ist auch eine Aufnahme über die Nahrung, Spaltung durch entsprechende Sialidasen und anschließenden Einbau in der Tumorzelle.^[15] Diese Tatsachen machen Neu5Gc zu einem interessanten Molekül für zahlreiche Untersuchungen.

1.2 *Trypanosoma cruzi*, Chagas-Krankheit und Trans-Sialidase

Trypanosomen gehören zur Gruppe der geißeltragenden Protozoen und kommen als Parasiten in Kalt- und Warmblütern vor. Verbreitungsgebiete sind vor allem Tropen und Subtropen. *Trypanosoma brucei*, der Erreger der Schlafkrankheit, findet sich hauptsächlich in Afrika, während *Trypanosoma cruzi*, der Erreger der Chagas-Krankheit (Amerikanische Trypanosomie), in Süd- und Mittelamerika beheimatet ist. Die Chagas-Krankheit, benannt nach Carlos Chagas, der sie 1909 als erster beschrieb, gehört zu den fünf großen Tropenkrankheiten.^[16] Laut WHO sind ca. 11 Mio. Menschen, hauptsächlich in Südamerika, infiziert. Es wird zwischen dem akuten und dem chronischen Stadium unterschieden. Im akuten Stadium, in der sich ca. zehn bis zwanzig Tage nach der Infektion erste Symptome

zeigen, kommt es häufig zu Müdigkeit, Fieber und Schwellungen an der Infektionsstelle, meistens am Auge. Bei Kindern kann es zu gefährlichen Hirnschwellungen kommen. Im chronischen Stadium sind vor allem das Nervensystem, Herz und der Darm betroffen. Die Krankheit führt innerhalb von zehn bis zwanzig Jahren zur Vergrößerung und Schädigung des Herzmuskels. Im Gastrointestinaltrakt kann es zu starken Aufweitungen des Darmes und der Speiseröhre kommen. Unbehandelt verläuft die Krankheit tödlich. Das Infektionsrisiko ist stark von den Lebensbedingungen abhängig und kann durch gezielte Insektenbekämpfung minimiert werden.

Die Chagas-Krankheit wird hauptsächlich durch Raubwanzen als Vektoren übertragen. Diese hinterlassen beim Stich Kot auf der Haut. Die Trypanosomen gelangen durch Reiben von Schleimhäuten, zum Beispiel am Auge, in den Wirt. Nach Eindringen in den Wirt wird Neu5Ac mit Hilfe der Trans-Sialidase des Pathogens auf die Zelloberfläche der Trypanosomen übertragen, wodurch sich diese der Erkennung durch das Immunsystem entziehen.^[17, 18]

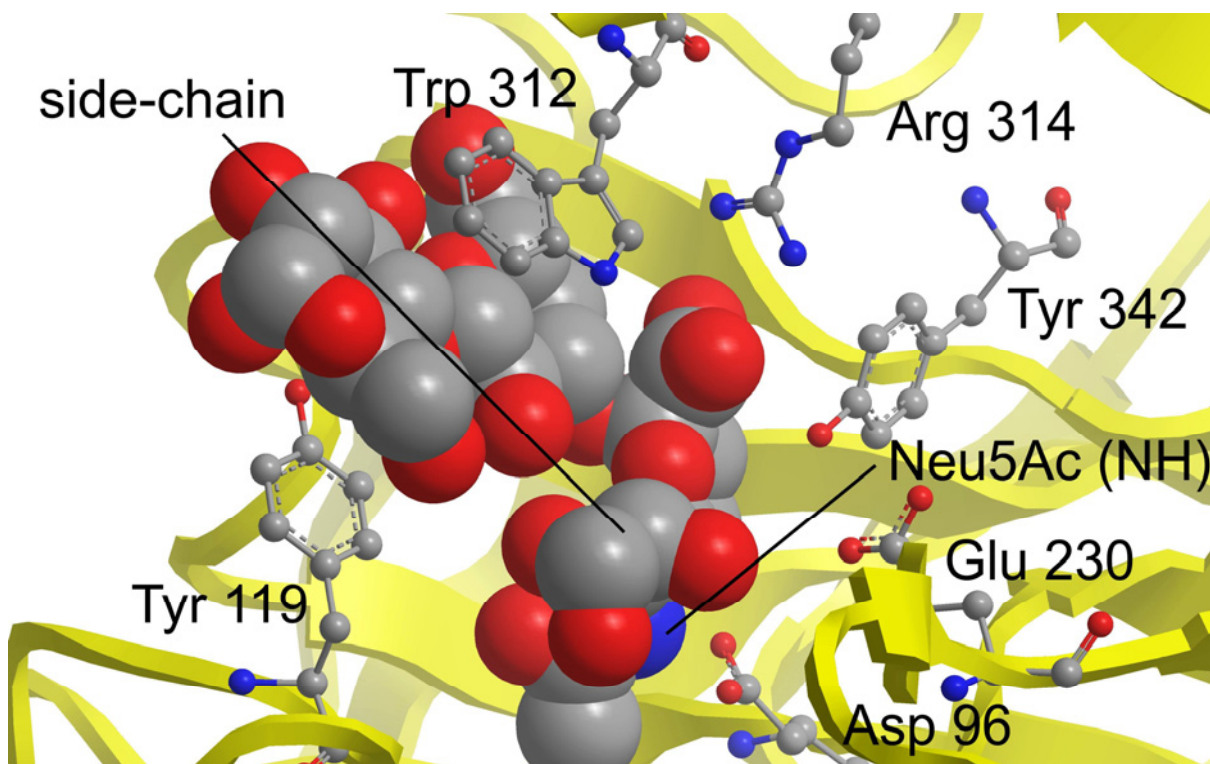


Abb. 3: Sialyllactose im Komplex mit Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi*^[19]

Die epimastigote Form von *T. cruzi* trägt keine Trans-Sialidase und befindet sich im mittleren Darm des Vektors. Erst im unteren Darm wandelt sie sich in die trypomastigote Form um, die nun Trans-Sialidase exprimiert. Die verschiedenen Formen lassen sich anhand der Position

der Geißel zum Zellkern und ihrer Länge unterscheiden. Bei der trypomastigoten Form befindet sich die Geißel hinter dem Zellkern, bei der epimastigoten Form vor dem Zellkern, bei der amastigoten Form ist die Geißel kaum zu erkennen. Auf Grund ihrer wichtigen Funktion bei der Infektion wurden Versuche zur Kristallisation und Strukturaufklärung der Trans-Sialidase unternommen. Man fand heraus, dass sich das Protein in zwei ausgeprägte Strukturen gliedert. Zum einen in einen katalytisch aktiven *N*-terminalen β -Propeller und zum anderen in eine C-terminal Lektin-ähnliche Domäne.^[20-22] Zunächst gelang es, Sialidase aus *Trypanosoma rangeli* zu kristallisieren und aus der Struktur erste gesicherte Rückschlüsse auf den Transfer durch *T.c.* Trans-Sialidase zu ziehen.^[23] 2002 gelang die Kristallisation von *T.c.* Trans-Sialidase in Komplex mit 2,3-Dehydro-2-desoxy-*N*-acetylneuraminsäure (DANA).^[20] Abbildung 3 zeigt das katalytische Zentrum der *T.c.* Trans-Sialidase mit den an der Reaktion beteiligten Aminosäuren sowie Sialyllactose als Substrat (Michaelis-Komplex).^[19]

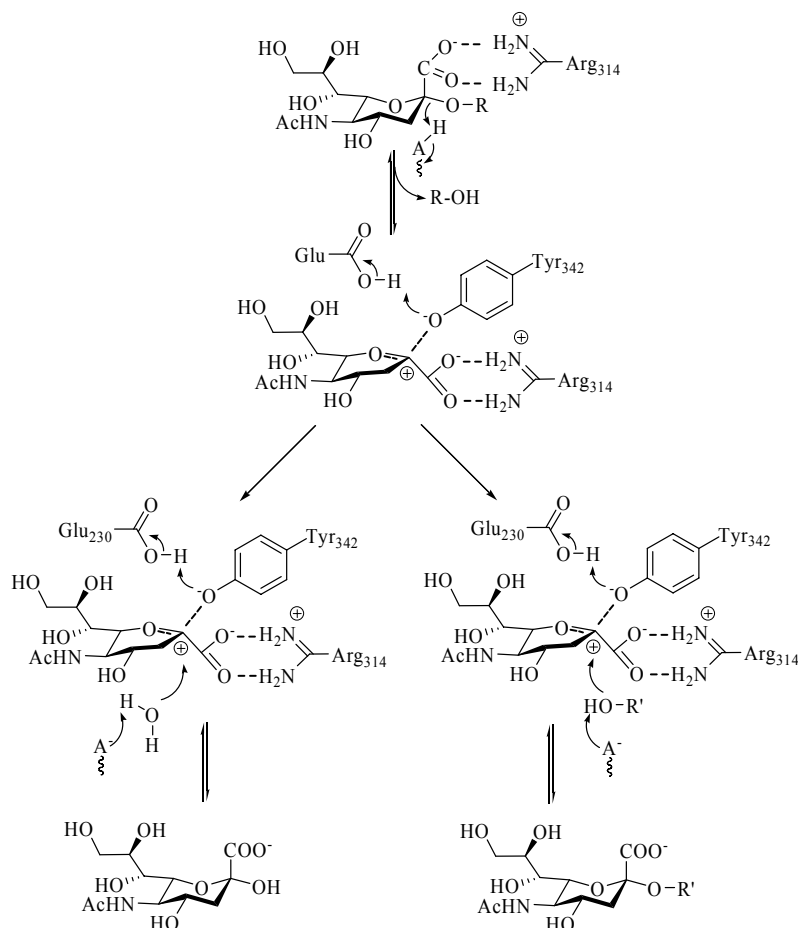


Abb. 4: Enzymatische Transglycosylierung am Beispiel von *T.c.*-Trans-Sialidase

Mit Hilfe der Kristallstrukturen ließ sich der Mechanismus der enzymatischen Neu5Ac-Übertragung durch Trans-Sialidase von *T.c.* weitgehend klären. Die Trans-Sialidase aus *T. c.*

gehört zur Familie der Sialidasen (Hydrolasen), zeigt aber in Gegenwart geeigneter Akzeptormoleküle ausschließlich Transferase-Aktivität.^[24, 25] Neu5Ac wird in der katalytisch aktiven Domäne durch Arg₃₁₄ an der Säurefunktion ionisch und durch Asp₉₆ an der Amid-Funktion über Wasserstoffbrücken gebunden, während die lactosidische Gruppe des Oligosaccharides durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Tyr₁₁₉ und Trp₃₁₂ „geklammert“ wird (Abb. 3).^[26] Der kationische Übergangszustand wird über Wechselwirkungen mit Tyr₃₄₂ stabilisiert (Abb. 4).^[23, 27, 28]

Geeignete Akzeptorsubstrate sind lediglich β -Galactose oder Oligosaccharide mit terminal gebundener β -Galactose, da *T.c.* Trans-Sialidase ausschließlich $\alpha(2-3)$ -Bindungen zwischen Neuraminsäure und Galactose erkennt. Bindet ein Donorsubstrat an das Protein, so verändert es seine Konformation in einer Art die es einem geeigneten Akzeptorsubstrat ermöglicht ebenfalls an das Enzym zu binden.^[29] Die Bindung des Akzeptors erfolgt sehr exakt. Dies macht sich in der außerordentlichen Regioselektivität der Transferreaktion auf das C-3 der Galactose bemerkbar. Die meisten Sialidasen, die unter geeigneten Bedingungen auch zum Transfer von Neu5Ac genutzt werden, bilden neben einem Hauptprodukt weitere Regioisomere.^[30]

Trotz detaillierter Kenntnisse des Übertragungsmechanismus ist es bis heute nicht gelungen Inhibitoren der Trans-Sialidase zu finden. Bereits 1969 wurde als Inhibitor der Sialidase des Influenza Virus das Glycal der Neuraminsäure 5 (Neu5Ac2en) vorgeschlagen.^[31, 32] Aufbauend auf dieser Erkenntnis wurden mittlerweile kommerziell erfolgreiche Wirkstoffe, wie zum Beispiel Tamiflu[®], gegen das Influenza-Virus auf Basis von Neuraminidase-Hemmern entwickelt.^[33] Diese mimikrieren den Oxocarbenium-Übergangszustand der Übertragung und blockieren so das Protein. Dieser Ansatz zeigt trotz der ausgeprägten Verwandtschaft zu den Sialidasen kaum Wirkung. So zeigt Neu5Ac2en bei *T.c.* Trans-Sialidase im Vergleich mit Influenza-Sialidase erst bei ca. 100facher Konzentration leichte Inhibierung. Dies kann zum einen an der Ausrichtung von Neu5Ac in der Bindungstasche relativ zum Protein liegen, die sich von der in Sialidasen wesentlich unterscheidet. Zum anderen fehlt den Sialidasen die „lactose binding site“ der Trans-Sialidase, die erst durch die Bindung von Neu5Ac an das Protein aus Tyr₁₁₉ und Trp₃₁₂ gebildet wird.^[34] Diese Tatsache scheint die Einbeziehung potentieller Akzeptorstrukturen in Strategien zur Entwicklung von Inhibitoren notwendig zu machen. Ausgehend vom Wissen um die „lactose binding site“ wurden Versuche zur Inhibierung durch Lactitol durchgeführt.^[34] Das Ergebnis einer Inhibierung durch Sialyllactitol steht aber im Gegensatz zur Tatsache, das Sialyllactitol als ein

Donorsubstrat der Trans-Sialidase aus *T.c.* identifiziert wurde.^[35] Es scheint sich bei diesen Ergebnissen also eher um eine Konkurrenz zwischen Lactitol und anderen eingesetzten Verbindungen zu handeln, in der Lactitol die bevorzugte Akzeptorstruktur darstellt und dadurch die Sialylierung anderer Oligosaccharide verhindert.

1.3 Chemische Synthese sialylierter Oligosaccharide

Zur Untersuchung der Rolle unterschiedlicher Neuraminsäurederivate in biologischen Prozessen ist der Zugang zu größeren Mengen ihrer Glycoside von erheblicher Bedeutung.^[36] Die chemische Darstellung von Oligosacchariden wurde erst durch die Koenigs-Knorr-Methode ermöglicht, bei der Glycosylhalogenide mit geeigneten nucleophilen Gruppen in Gegenwart von Schwermetallsalzen verknüpft werden.^[37] Koenigs *et al.* stellten nach ihrer Methode 1901 zunächst einfache Glycoside von Monosacchariden dar, legten damit aber den Grundstein für stereoselektive Oligosaccharidsynthesen. Mit dem wachsenden Interesse an Glycosiden, auch von so seltenen Zuckern wie Sialinsäuren, wuchs die Anzahl an effizienteren Glycosylierungsmethoden.^[38] Glycosidische Bindungen der Sialinsäuren wurden im Allgemeinen durch die Reaktion eines vollständig geschützten und aktivierten Sialinsäuredonors, der eine Abgangsgruppe am anomeren Kohlenstoff enthält, mit einem entsprechend geschützten Akzeptor, der lediglich eine freie OH-Gruppe besitzt, geknüpft. Der Substituent an der zum anomeren Kohlenstoff benachbarten Hydroxyfunktion des Donors hat dabei einen wesentlichen Einfluss auf die Stereoselektivität der Reaktion. Die Abwesenheit jeglicher dirigierender Gruppen am benachbarten Kohlenstoffatom des anomeren Zentrums von Sialinsäuren erschwert in Folge dieser Tatsache eine gewünschte stereoselektive Glycosylierung.^[36, 39] Das als Intermediat gebildete Carbeniumion geht in Folge einer 2,3-Eliminierung unter Abspaltung eines Protons leicht in das Glycal 5 über und wird so bei modifizierten Koenigs-Knorr-Glycosylierungen als Nebenprodukt gefunden.^[40-42] Aus diesen Gründen wurden Versuche mit ungewöhnlichen Abgangsgruppen und Promotoren durchgeführt. Verknüpfungen, die in einem direkten Syntheseschritt zum Glycosid führen, werden in diesem Zusammenhang als „direkte Methoden“ bezeichnet. Als Promotoren werden unter anderem Ag_2CO_3 (Koenigs-Knorr) und $\text{Hg}(\text{CN})_2/\text{HgBr}_2$ (Helferich) verwendet, wobei die Wahl des Promotors erheblichen Einfluss auf Ausbeute und Stereoselektivität hat.^[43, 44] Bei zwei Reaktionen mit identischem Donor und Akzeptor können bei Verwendung zweier unterschiedlicher Promotoren völlig verschiedene Ausbeuten und Anomerenverhältnisse erhalten werden.

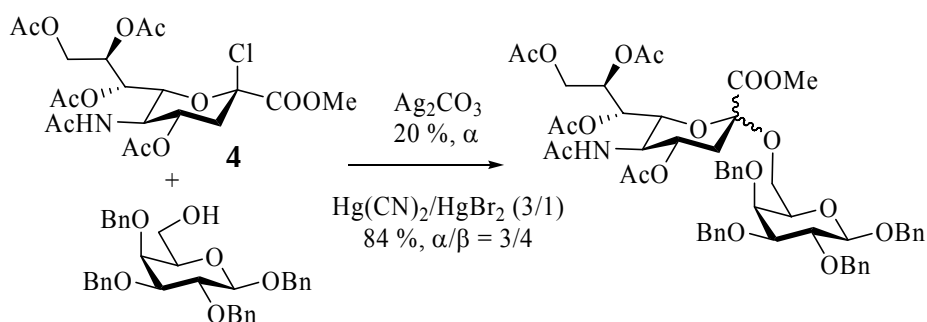


Abb. 5: Abhängigkeit der Produktverteilung vom Promotor^[45, 46]

Der Einfluss verschiedener Reaktionsbedingungen wird in Abb. 5 an den oben genannten Reagenzien verdeutlicht. Einen weiteren Ansatz für stereoselektive Glycosylierungen stellen die „indirekten chemischen Methoden“ dar. Hier wird am benachbarten C-3 oder C-1 eine Funktion eingeführt, die einen Nachbargruppen-Effekt auf C-2 ausübt.^[47] Auf diese Weise ist es möglich, den Angriff von einer Seite sterisch zu verhindern und so ein Anomer zu bevorzugen. Das Prinzip dieser Methoden wird in Abb. 6 verdeutlicht. Das abgebildete 2,3-Dehydro-Derivat 5 lässt sich in hohen Ausbeuten durch 2,3-Eliminierung, wie bereits oben als Nebenreaktion von Glycosylierungen berichtet, aus dem Methylester der Acetochlorneuraminsäure 4 darstellen und dient als Ausgangsverbindung für die Einführung zahlreicher dirigierender Gruppen.^[48]

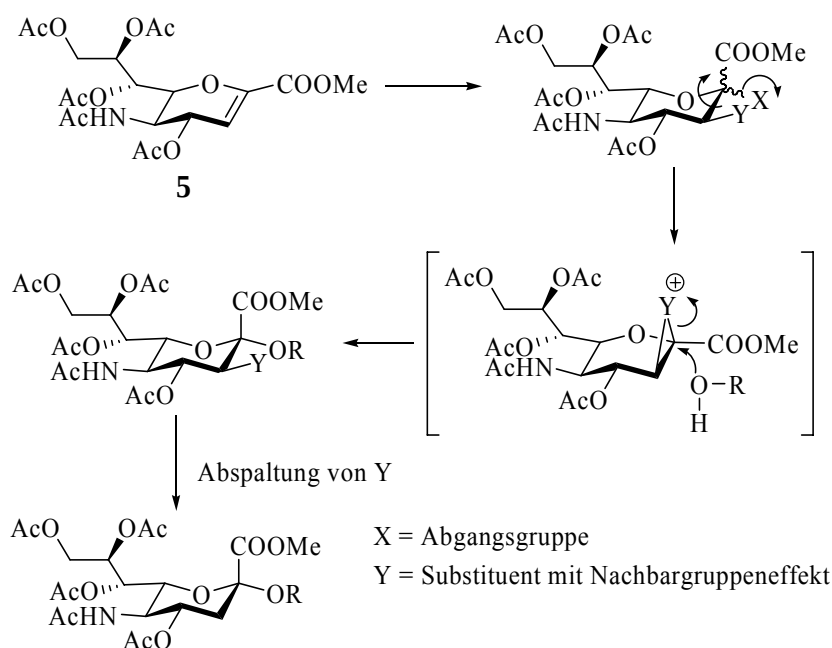


Abb. 6: Taktik bei stereoselektiven Glycosylierungen nach der „indirekten chemischen Methode“^[38]

1.4 Enzymatische Synthese sialylierter Oligosaccharide

In den vergangenen Jahrzehnten haben sich enzymatische Synthesekonzepte in der Chemie immer weiter durchgesetzt. Der Einsatz von Enzymen zur stereo- und regioselektiven Knüpfung glycosidischer Bindungen birgt zahlreiche Vorteile gegenüber den klassisch chemischen Methoden. Neben der Vermeidung giftiger und umweltschädigender Substanzen liegt ein großer Vorteil in der hohen Selektivität enzymatischer Oligosaccharidsynthesen. Durch geeignete Wahl des Proteins lässt sich die Bildung von Stereo- und Regioisomerengemischen ohne aufwendige Schutzgruppenstrategie ausschließen. Daher lassen sich die Produkte häufig durch einfache Größenausschlusschromatographie reinigen. Zur Synthese sialylierter Oligosaccharide lassen sich sowohl Sialidasen als auch Transsialidasen einsetzen. Sialidasen hydrolysieren *in vivo* glycosidische Bindungen der Neuraminsäure, sind aber unter geeigneten Bedingungen auch in der Lage solche zu knüpfen. Dies ist der Fall wenn geeignete Akzeptormoleküle, zum Beispiel durch entsprechend hohe Konzentrationen, gegenüber Wasser bevorzugt an das Glycosid herangeführt werden und so das Intermediat der Hydrolyse nucleophil abgefangen werden kann.^[30, 49, 50]

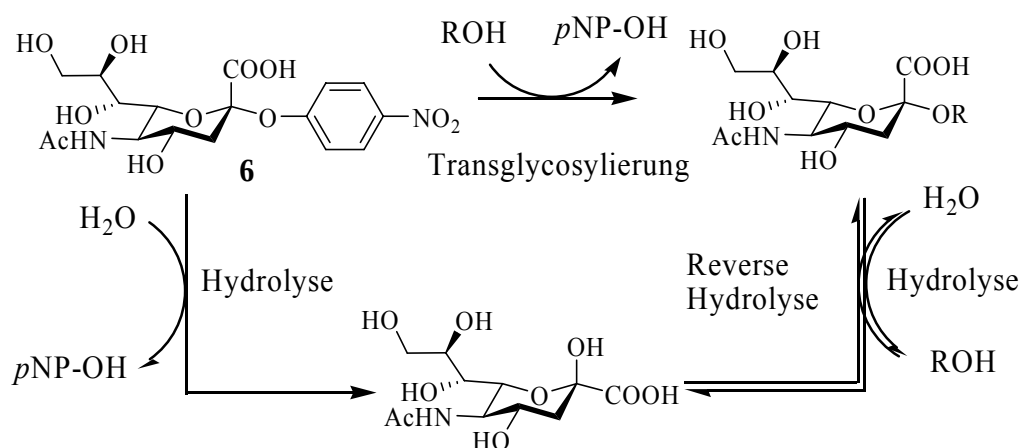


Abb. 7: Reaktionsschema der Transglycosylierung durch Sialidasen

Entsprechend dem thermodynamischen Ansatz kann die Substratkonzentration erhöht werden, bis sich über die „Reverse Hydrolyse“ das Glycosid bildet. Entscheidend ist hier eine hohe Akzeptorkonzentration und eine in Grenzen erhöhte Temperatur. Eine weitere Möglichkeit der thermodynamischen Kontrolle bietet sich in der Entfernung des Glycosids aus der

Reaktionslösung, wodurch das Gleichgewicht auf die Seite der Glycosidbildung gezogen werden kann.^[30]

Bei der kinetisch kontrollierten Transglycosylierung werden aktivierte Derivate, wie zum Beispiel *p*-Nitrophenylglycoside, verwendet. Da auch das Glycosylierungsprodukt hydrolysiert werden kann, ist es erforderlich, die Reaktion im Maximum der Produktbildung abubrechen, da sonst die Ausbeute auf die der Gleichgewichtskonzentration der reversen Hydrolyse zurückfällt. Die Produktverteilung ergibt sich aus dem Gleichgewicht zwischen der Hydrolyse des aktivierten Glycosids, des Transglycosylierungsproduktes, sowie der reversen Hydrolyse.^[51, 52] Ein typisches Reaktionsprofil, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit HPLC-chromatographisch nach einer modifizierten Vorschrift von Bergh *et al.* aufgenommen wurde,^[53] ist in Abbildung 8 zu sehen.

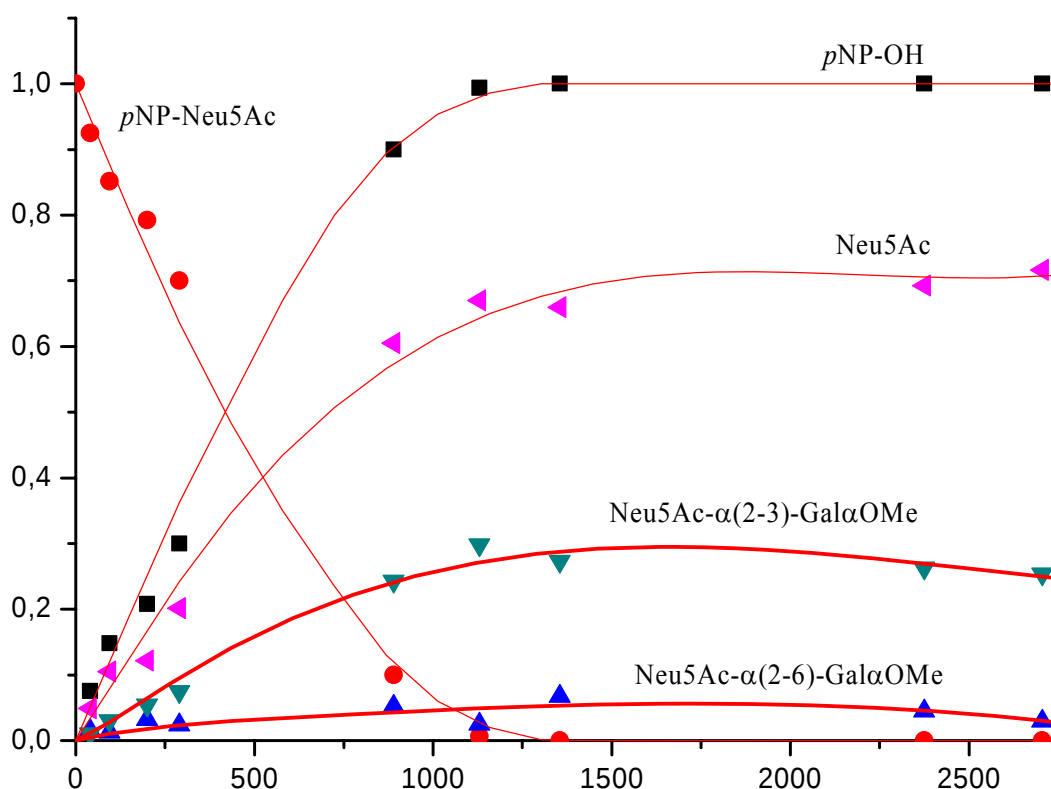


Abb. 8: Normierter Umsatz in zeitlicher Abhängigkeit [min]

Dargestellt ist die Transglycosylierung der Neuraminsäure von *p*NP-Neu5Ac auf Methyl- α -D-galactopyranosid mit Hilfe von Sialidase aus *Salmonella typhimurium*, einem Auslöser der humanen Gastroenteritis.^[54] Das typische Durchlaufen eines „Produktmaximums“, an dem die Reaktion abgebrochen werden sollte, ist hier bei ca. 1500 min zu erkennen. Die Ausbeute an

diesem Punkt beträgt ca 30 %. Des Weiteren bilden sich zwei Regioisomere bestehend aus dem Hauptprodukt mit $\alpha(2-3)$ - und dem Nebenprodukt mit (2-6)-Verknüpfung.

Im Gegensatz zu Hydrolasen ist der Einsatz von Transferasen nicht auf eine Ausbeute beschränkt, die sich durch das Gleichgewicht aus Transglycosylierung, reverser Hydrolyse und Hydrolyse ergibt. Diese lassen sich in Transferasen des Leloir und des Non-Leloir Typs unterteilen. Leloir-Transferasen setzen Glycosylester von Nucleosidmono- und diphosphaten um, während Non-Leloir-Transferasen die entsprechenden Phosphate als Substrat umsetzen.^[55, 56] Sialyltransferasen gehören zum Leloir-Typ und akzeptieren CMP-Neu5Ac *in vitro* und *in vivo* als natürliches Substrat.

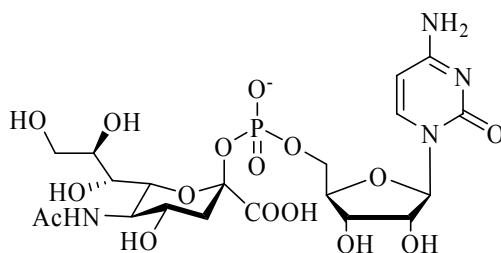


Abb. 9: CMP-Neu5Ac

CMP-Neu5Ac stellt die einzige natürliche Verbindung einer Sialinsäure dar, die als β -Anomer vorliegt. Damit ist sie im Organismus vor dem Abbau durch α -spezifische Sialidasen geschützt. Für die Anwendung von Sialyltransferasen stellt die schwere Zugänglichkeit des teuren und instabilen CMP-Neu5Ac ein Problem dar. Des Weiteren wirkt freies CMP als Inhibitor der Sialyltransferase. Daher wurden Multienzym-Synthesen entwickelt, in denen CMP-Neu5Ac *in situ* regeneriert werden kann und auf diese Weise zu hohe Konzentrationen von CMP in der Reaktionslösung vermieden werden. Zudem reicht der Einsatz von katalytischen Mengen CMP-Neu5Ac.^[57, 58]

Trans-Sialidasen vereinen sowohl die Vorteile von Sialidasen als auch von Sialyltransferasen bei der Übertragung von Neu5Ac. Zum einen besitzen sie, wie Sialidasen, eine hohe Toleranz gegenüber potenziellen Donorstrukturen. Daher können leichter zugängliche Verbindungen als CMP-Neu5Ac zur Übertragung eingesetzt werden. Zum anderen bieten sie die Möglichkeit hohe Ausbeuten zu erzielen, da sie in Anwesenheit geeigneter Akzeptor-Verbindungen das Produkt nicht hydrolysieren.^[59, 60]

2 Zielsetzung

In den vergangenen Jahrzehnten hat das Verständnis interzellulärer Prozesse stetig zugenommen. Man erkannte dabei die fundamentale Bedeutung sialylierter Glycoproteine und etablierte zahlreiche Synthesen zur Darstellung solcher Oligosaccharide. Neben klassisch chemischen Methoden, die über komplexe Schutzgruppenchemie das Auftreten unerwünschter Stereo- und Regioisomere zu vermeiden suchen, gelangten in den vergangenen Jahren enzymatische Strategien in den Blickpunkt der organischen Synthesechemie. Etabliert haben sich hier vor allem Sialidasen und Sialyltransferasen zur Knüpfung glycosidischer Bindungen der Neuraminsäure. Die Vermeidung aufwendiger und ausbeutemindernder Schutzgruppenchemie geht aber mit dem Nachteil relativ geringer Ausbeuten bei der Sialylierung mit Sialidasen und der schlechten Verfügbarkeit des teuren bzw. aufwendig zu regenerierenden CMP-Neu5Ac beim Einsatz von Sialyltransferasen einher.

Transsialidasen vereinen die Vorteile beider Enzymtypen ohne deren Nachteile. Sie gehören zur Familie der Sialidasen, weisen also deren hohe Toleranz gegenüber modifizierten Donorsubstraten auf, zeigen aber in Gegenwart geeigneter Akzeptorstrukturen keine Hydrolyse der Produkte. Für den Einsatz in der organischen Synthese ist die Verfügbarkeit des Enzyms in relativ großen Mengen und in hoher Reinheit notwendig. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Trans-Sialidase aus *T. cruzi* wurde am Institut für Biochemie der Universität Hamburg durch Dr. Patrick Ziegelmüller rekombinant aus *E. coli* exprimiert. Die Vorschrift zur Expression und der Klon stammen aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. C. Frasch.^[34, 61]

Bereits in früheren Arbeiten zeigte *T.c.* Trans-Sialidase Toleranz gegenüber Derivatisierungen der lactosidischen Akzeptorstruktur sowie gegenüber Kettenverkürzungen der Neuraminsäure auf der Donorseite.^[62, 63] Aufbauend auf diesen Arbeiten liegt der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Darstellung potenzieller Donorderivate der Trans-Sialidase aus *T. cruzi* auf Basis *p*-Nitrophenyl-aktivierter Neuraminsäure, insbesondere Derivatisierung des *N*-Substituenten der Neuraminsäure. Hierbei wird zum einen die Eignung von *T.c.* Trans-Sialidase zur enzymatischen Darstellung derivatisierter Neuraminsäure-Oligosaccharide ermittelt. Zum anderen lassen sich aus den Ergebnissen weitere Rückschlüsse zur Reaktivität des Proteins ziehen. Diese erleichtern unter Umständen die Suche nach geeigneten Inhibitoren der Trans-Sialidase.

3 Sialylallolactose zur Detektion der synaptischen Fusion

Der Synaptische-Vesikel-Zyklus:

Bei der synaptischen Transmission werden mit hoher Geschwindigkeit Informationen von einer Nervenzelle auf eine andere Übertragen. Ein entscheidender Vorgang ist dabei der Zyklus synaptischer Vesikel (Abbildung 10).^[64, 65]

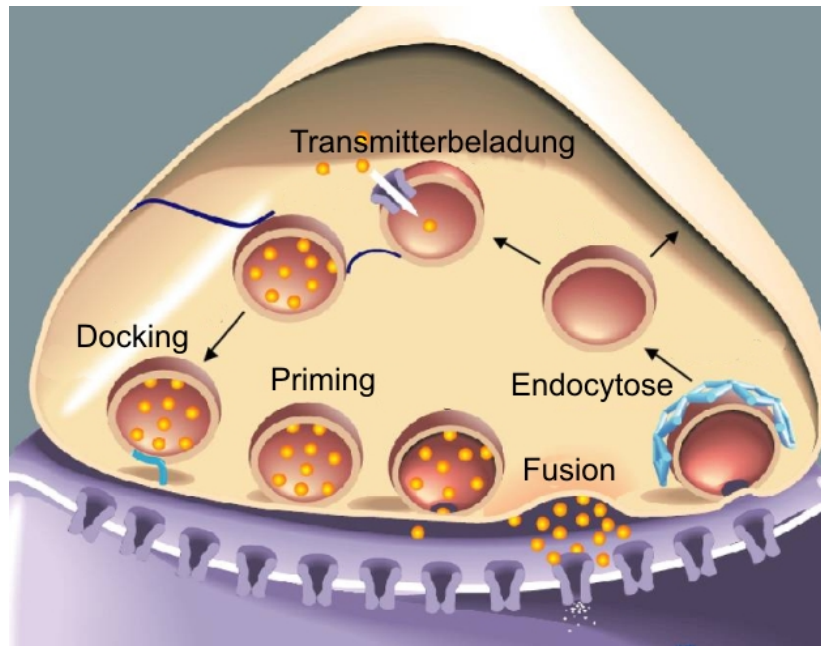


Abb. 10: Synaptischer Vesikel-Zyklus

Die mit der Plasmamembran fusionierten Vesikel werden nach der Transmitterausschüttung in die Präsynapse zurückgeführt. Dabei werden die Vesikel durch vesikuläres Synaptotagmin und einem Adapterprotein mit einem Clathrinmantel umhüllt.^[66] Anschließend werden die Vesikel durch die GTPase Dynamin von der Vakuolenmembran getrennt und der Clathrinmantel abgespalten.^[67] Nach der Transmitterbeladung im Zytosol stehen die Vesikel einer erneuten Exocytose, bei der es zur Fusion zwischen Plasmamembran und Vesikel kommt, zur Verfügung.^[68] Ein gesamter Zyklus dauert weniger als eine Minute, wobei die Exozytose weniger als 1 ms, die Endozytose ca. 5 s und die Regeneration der Vesikel die restliche Zeit beansprucht.^[69, 70]

IPTG und Allolactose als Induktor des *lac*-Repressors:

Das Lactose-Repressor-Protein reguliert die Synthese von Enzymen des Lactosemetabolismus. Der Repressor bindet an bestimmte Sequenzen des Genoms, dem

Operator, und verhindert so die Synthese der mRNA. In der Gegenwart von Induktor-Molekülen verändert das Protein seine Konformation und die Affinität des Repressorproteins zur DNS wird gesenkt. Dabei wird die Promotor-Region für die Bindung der RNA-Polymerase freigegeben und es erfolgt die Transkription des Genoms. Der natürliche Induktor des Lactose-Operons ist Allolactose **8**. Als künstlicher Induktor wird häufig Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) **7** eingesetzt, da es nicht im Lactosemetabolismus abgebaut wird und daher seine Konzentration konstant bleibt.^[71-73]

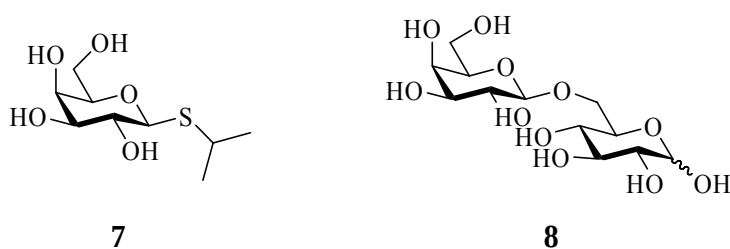


Abb. 11: Künstlicher und natürlicher Induktor des *lac*-Repressors

MRS zur Detektion molekularer Wechselwirkungen:

Heute können sehr einheitliche magnetische Nanopartikel mit definierter Oberfläche hergestellt werden, an die sich kovalent Oligonucleotide, Nukleinsäuren, kleine Moleküle, Peptide und Rezeptorliganden binden lassen.^[74-77] Zur Messung der Wechselwirkungen zwischen großen Molekülen können Nanopartikel, die aus einem ca. 3 nm großen colloidalen superparamagnetischen Eisenoxidgerüst bzw. „superparamagnetic iron oxide particle“ (SPIO) umgeben von einer Epichlorhydrin gebundenen aminierten Dextranhülle bestehen, verwendet werden. Es ergeben sich Partikelgrößen von 45 ± 4 nm.^[78] Bei der Selbstanordnung solcher nanomagnetischen Partikel in wässrigem Medium zu größeren Einheiten steigt die Effizienz, mit der das superparamagnetische Eisenoxidgerüst eines einzelnen Partikels die Spin-Spin-Relaxationszeiten (T_2) der Protonen des umgebenden Wassers erhöht.^[77] Die Nanopartikel bilden also einen „Magnetic-Relaxation-Switch“ (MRS). Die veränderten Relaxationszeiten können mit Hilfe von NMR- und „Magnetic Resonance Imaging“-Technik (MRI) bestimmt werden.

Verfolgung der synaptischen Vesikelfusion mit Hilfe der MRI-Technik:

In den Vesikeln wird Sialidase exprimiert, die neben den Transmittern bei der Fusion mit der präsynaptischen Membran in den synaptischen Spalt entlassen wird.^[79] Hier soll Neu5Ac maskierte Allolactose durch Hydrolyse der glycosidischen Bindung von Neu5Ac zum

natürlichen Induktor umgesetzt werden, der die sofortige Dissoziation von *lac*-Repressor und DNA bewirkt. Als Kontrastmittel bei der Verfolgung der synaptischen Vesikelfusion dienen sowohl an den *lac*-Repressor als auch an den Operator gebundene SPIOs (Abb. 12).

vorliegenden Arbeit auf chemoenzymatischem Weg α -Methyl-sialylallolactosid **9** als maskierter Induktor des *lac*-Repressors dargestellt.

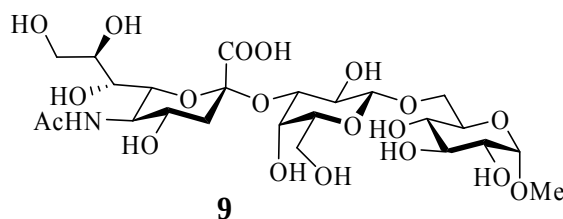


Abb. 13: Neu5Ac-maskierter Induktor des Lactose-Operons

Die Synthese des α -Methylglycosides an Stelle des Anomerengemisches erleichtert die notwendigen Reinigungsschritte, da jeweils einheitliche Produkte als Zwischenstufen an Stelle von Anomerengemischen erhalten werden. Da im Fall des IPTG der Isopropyl-Rest an Stelle der Glucose durch den Repressor erkannt wird ist kein Einfluss der zusätzlichen Methylgruppe auf die Induktoraktivität der Allolactose zu erwarten.

3.1 Darstellung von α -Methyl-allolactosid als Neu5Ac-Akzeptor

Für die Synthese des Neuraminsäureakzeptors wurde die Trichloracetimidatmethode nach Schmidt *et al.* gewählt.^[80-84] Nach dieser Methode werden Saccharide als *O*-Glycosyltrichloracetimide aktiviert. Ausgehend vom Anomerengemisch der peracetylierten Galactose **10 α /10 β** wurde unter Abspaltung der anomeren Acetylgruppe durch Ammoniumcarbonat das Tetraacetat **11** erhalten. Die Aktivierung zum α -Trichloracetimidat **12** erfolgte unter Einwirkung der starken Base DBU mit Trichloracetonitril in DCM. Die Synthese des an 6-OH-freien Derivats **16** erfolgte ausgehend von Methyl- α -D-glucopyranosid (**13**) durch Tritylierung mit Triphenylmethylchlorid in Pyridin in einer Ausbeute von 86 %. Die Benzoylierung der verbleibenden OH-Gruppen wurde in Pyridin unter katalytischer Zugabe von DMAP mit Benzoylchlorid in einer Ausbeute von 54 % durchgeführt. Die Abspaltung der extrem säurelabilen Tritylgruppe erfolgte durch Lösen in 90 %iger Trifluoressigsäure innerhalb weniger Minuten. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde Verbindung **16** in 88 %iger Ausbeute erhalten. Der Galactosedonor **12** und das Akzeptorsubstrat **16** wurden mit Hilfe des Promotors TMS-OTf in DCM in einer Ausbeute von 45 % zum peracylierten Disaccharid **17** umgesetzt. Die Abspaltung der Acylgruppen

erfolgte mit Ammoniak in Methanol. Verbindung **18** konnte in einer Ausbeute von 66 % isoliert werden.^[85]

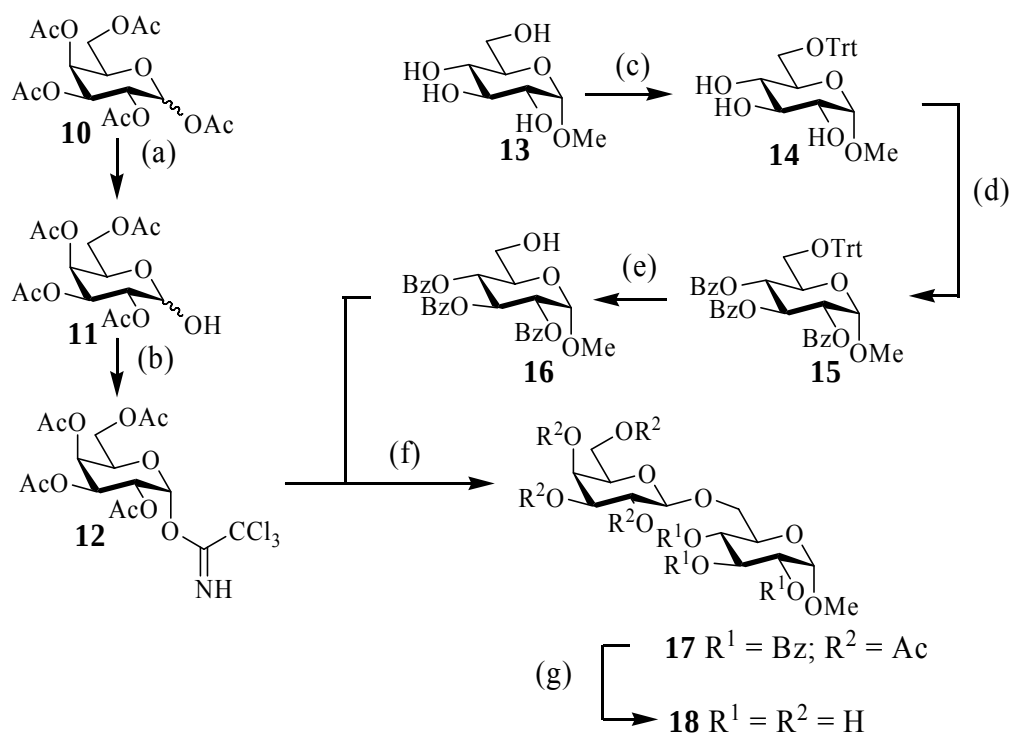


Abb. 14: Darstellung des Allolactosids **18** zur enzymatischen Sialylierung: a) $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, DMF; b) DBU, Trichloroacetonitril, DCM; c) TrtCl/Py, 40 °C; d) BzCl/Py, RT; e) 90% CF_3COOH , 0 °C; f) TMS-OTf/DCM, -20 °C; g) 10 % NH_3/MeOH , RT

3.2 Darstellung des Neu5Ac-Donors

Die Darstellung der *p*NP-aktivierten Neuraminsäure **6** erfolgte nach der bewährten Methode von Rothermel *et al.* ausgehend von Neu5Ac **1**.^[86] Durch Lösen von Neu5Ac **1** in Methanol unter Zugabe des Ionentauschers Amberlite IR 120 (H^+) wurde der Methylester der *N*-Acetylneuraminsäure **19** in 82 % Ausbeute gewonnen. Die Peracetylierung von **19** durch Essigsäureanhydrid in Pyridin lieferte das Anomerengemisch des peracetylierten Neuraminsäuremethylesters **20 α /20 β** in 95 %iger Ausbeute in einem Anomerenverhältnis von 1/3. Kuhn *et al.* erhalten an dieser Stelle neben dem Anomerengemisch auch das Tetraacetat, das eine freie OH-Gruppe an C-2 trägt. Diese konnte im ^1H -NMR hier jedoch nicht als Bestandteil des Produktgemisches nachgewiesen werden. Die Aktivierung der Neuraminsäure zum Glycosylchlorid wurde nach Kuhn *et al.*^[87] in Acetylchlorid unter Zugabe geringer Mengen Methanol durch HCl in 95 %iger Ausbeute durchgeführt. Entgegen der Literatur, nach der das Chlorid des peracetylierten Neu5Ac-Methylesters nur sehr kurze Zeit zu lagern

war, erwies sich **4** als über Monate hinweg stabil. Die Glycosylierung mit *p*NP-OH wurde in einem Zweiphasensystem bestehend aus DCM und 1 M NaOH unter starkem Rühren durchgeführt und lieferte innerhalb von zwei Stunden das *p*NP-Glycosid der Neuraminsäure **21** in 55 %iger Ausbeute ausschließlich als α -Anomer. Die Abspaltung der *O*-Acetylgruppen erfolgte nach Zemplén *et al.* in Methanol mit Natriummethanolat mit einer Ausbeute von 61 % und die Verseifung des Methylesters **22** gelang durch Lösen in 0.1 M NaOH innerhalb einer halben Stunde und lieferte den Neuraminsäuredonor **6** in quantitativer Ausbeute.

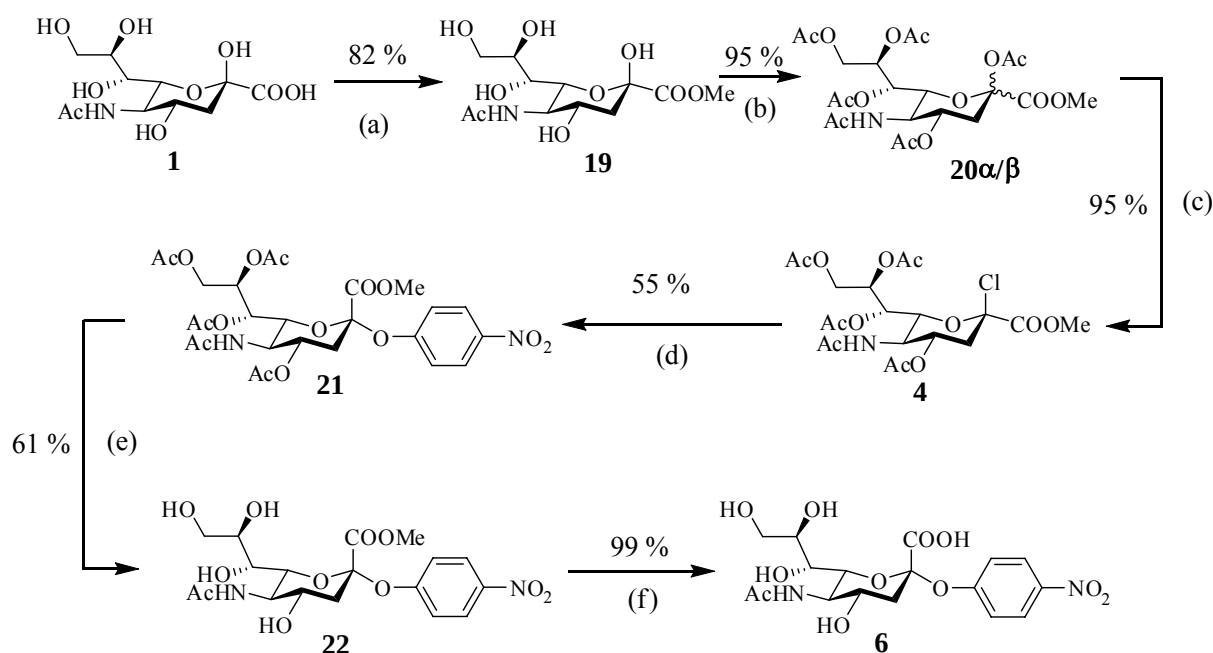


Abb. 15: Darstellung des Neu5Ac-Donors **6**: a) MeOH/H⁺, RT; b) Ac₂O/Py, RT; c) AcCl/MeOH, RT; d) TBA-HSO₄/1 M NaOH/DCM/*p*NP-OH, RT; e) NaOMe/MeOH, RT; f) 0.1 M NaOH

3.3 Enzymatische Übertragung von Neu5Ac

Die Verwendung von Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* findet seit den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts Anwendung in der Synthese sialylierter Lactosederivate und ist auch im hiesigen Arbeitskreis zur Darstellung solcher Verbindungen etabliert.^[62, 63, 88, 89] In ersten Versuchen erfolgte die Inkubation mit relativ geringen Donorkonzentrationen (ca. 20 μ mol/mL) und einem leichten Überschuß von 1.1 Äquivalenten des Akzeptors bei einem pH-Wert von 6.9 (Cacodylat/HCl-Puffer) und einer Temperatur von 37 °C.^[90] Die Enzymaktivität ist stark abhängig vom verwendeten Puffer (pH-Wert), den Akzeptorstrukturen und der Inkubationstemperatur. Im Verlauf weiterer Untersuchungen

stellte sich heraus, dass sich die Ausbeute durch Modifikationen der Inkubationsbedingungen steigern lassen.^[91]

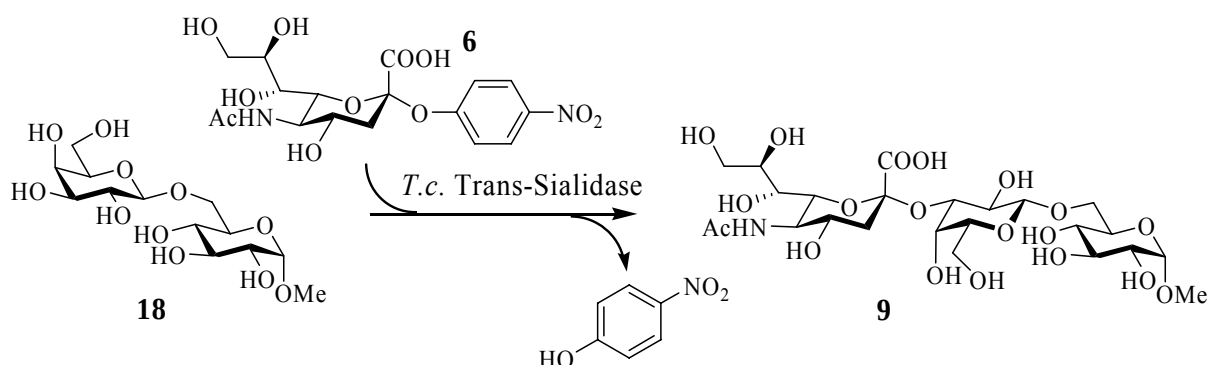


Abb. 16: Enzymatische Übertragung von Neu5Ac auf α -Methyl-allolactosid **18**

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde unter Annahme der Akzeptanz der $\beta(1-6)$ -Verknüpfung auf Akzeptorseite die Inkubation mit 25 μmol Donor und 35 μmol Akzeptor in 1 mL Tris-HCl-Puffer bei pH = 7.5 und einer Temperatur von 37 °C unter Zugabe von 80 μL Enzymlösung (1.3 mg Enzym/mL) für 24 h durchgeführt. Nach größenausschlusschromatographischer Reinigung konnte **9** in einer sehr guten Ausbeute von 87 % erhalten werden. Allolactose stellte sich damit als besserer Akzeptor als alle zuvor getesteten Derivate heraus. Der Grund hierfür könnte die erhöhte Flexibilität einer $\beta(1-6)$ -Verknüpfung gegenüber einer $\beta(1-3)$ -Verknüpfung sein.

4 Darstellung potenzieller Donorsubstrate

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, das T.c. Trans-Sialidase eine ausgeprägte Toleranz bezüglich Derivatisierungen der Glycerol-Seitenkette besitzt. Ausgehend von pNP-Neu5Ac konnten mit Hilfe einer Periodat-Oxidation, gefolgt von einer Reduktion durch Natriumcyanoborhydrid die seitenkettenverkürzten pNP-Oct5Ac und pNP-Hept5Ac dargestellt werden. Diese nicht natürlichen Donorsubstrate wurden in Ausbeuten von ca. 50 % enzymatisch auf Lactoside und LacNAc-Glycoside übertragen.^[63] Um weitere Erkenntnisse zur Toleranz der Trans-Sialidase zu erhalten sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit neben weiteren Derivatisierungen an der Glycerolseitenkette unterschiedlich N-acylierte Derivate der Neuraminsäure dargestellt und als pNP-Glycoside für die enzymatische Übertragung aktiviert werden.

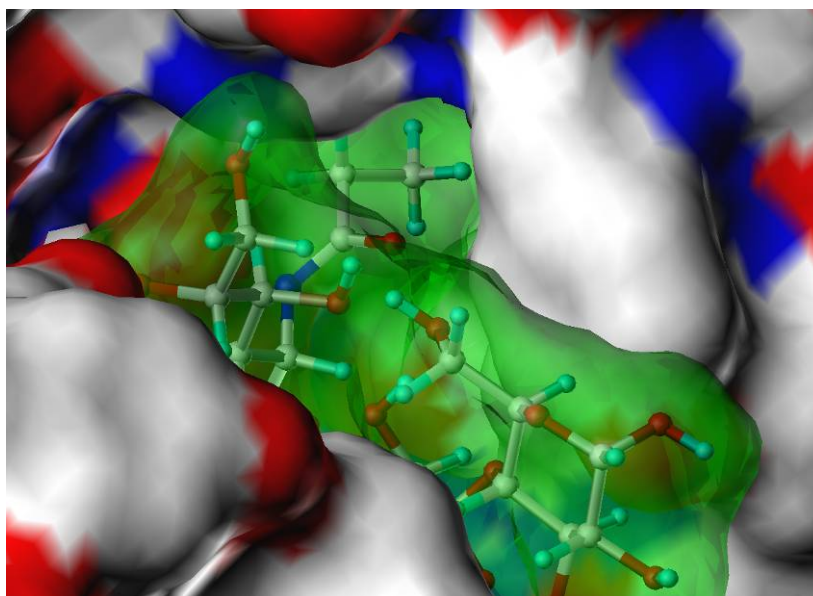


Abb. 17: Neu5Prop- α (2-3)-Gal- β (1-3)-Glc in Komplex mit Trans-Sialidase aus *T.c.*

Um von vornherein die Grenzen der Trans-Sialidase gegenüber Veränderungen der Acetylgruppe von Neu5Ac abschätzen zu können wurden mit Hilfe des Molecular Modelling Tools „SYBYL“, auf Basis vorhandener Kristallstrukturen des Enzyms im Komplex mit Sialyllactose^[19], Modelle mit *N*-Propanoylneuraminsäure als Substrat erstellt.

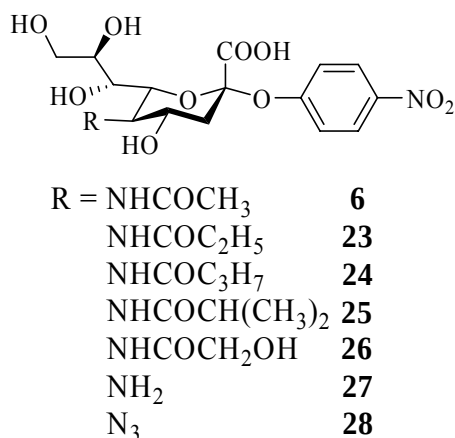


Abb. 18: Potenzielle Neuraminsäuredonoren mit variiertem Acylkomponente.

Sowohl bei Betrachtung der veröffentlichten Kristallstrukturen^[19] als auch der Modelling-Ergebnisse wird der Grund für die hohe Toleranz gegenüber Veränderungen der Seitenkette ersichtlich. Diese befindet sich im Komplex auf der dem Protein abgewandten Seite. Der Acyl-Substituent hingegen befindet sich tief in der Bindungstasche. In Abbildung 17 ist deutlich die Propanoyl-Gruppe in der Tiefe des Proteins in hydrophober Umgebung zu

erkennen. Des Weiteren wird der begrenzte Raum für Vergrößerungen dieser Gruppe deutlich. Um eine weitere Methylengruppe, wie dies bei Neu5But der Fall wäre, aufnehmen zu können würde die Trans-Sialidase ihre Konformation so weit verändern müssen, dass eine katalytische Aktivität sehr unwahrscheinlich erscheint. Die Verlängerung von Acetyl um eine Methylengruppe auf Propanoyl scheint hingegen noch möglich zu sein.

In Erwartung einer erfolgreichen enzymatischen Übertragung im Fall der *N*-Propanoylneuraminsäure **23** wurden zur Absicherung der oben erläuterten Erwägungen die sterisch anspruchsvolleren *N*-Butanoyl- **24** und *N*-Isobutanoylneuraminsäuredonoren **25** dargestellt. Auf Grund des ähnlichen Raumanspruchs im Vergleich mit *N*-Propanoyl und der hohen biologischen Relevanz der Glycolylneuraminsäure wurde ebenfalls in Erwartung einer enzymatischen Übertragbarkeit der Glycolylneuraminsäuredonor **26** dargestellt. Um weitere Hinweise bezüglich der Funktion der Acetylgruppe zu erhalten wurden zusätzlich das Amin **27** und das Azid **28** dargestellt (Abbildung 18).

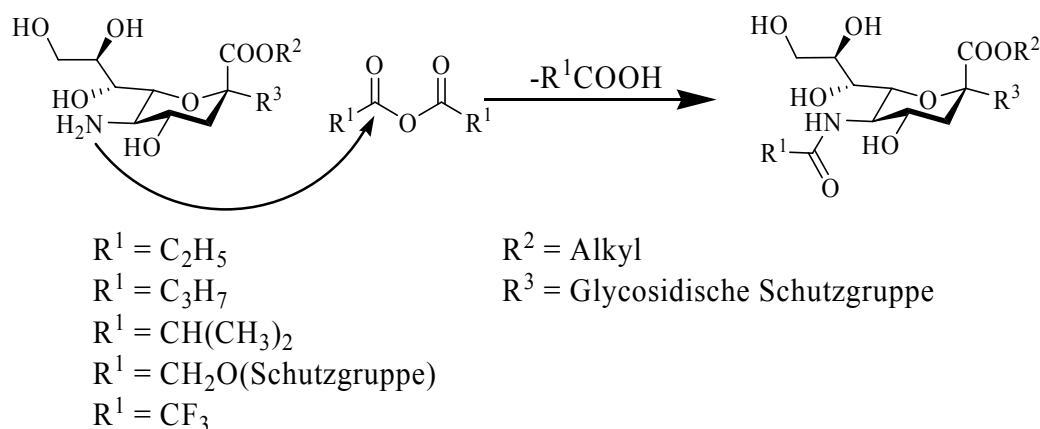


Abb. 19: Kernkonzept der Neuramisäure-Umacylierung der vorliegenden Arbeit

Kernproblem der Synthesen ist die selektive Acylierung desamins das zuvor durch Verseifung der Acetamid-Gruppe von Neu5Ac gewonnen wurde. Bei der *N*-Acylierung muss zwischen Amin- und Hydroxylfunktion differenziert und selektiv das Amin gegenüber den anderen Funktionen zur Reaktion gebracht werden. Prinzipiell kommen für Acylierungen als Chloride oder Anhydride aktivierte Säuren in Frage. Die Regioselektivität der Reaktion lässt sich durch die Wahl eines alkoholischen Lösungsmittels gewährleisten. Hier würde die höhere Nucleophilie desamins gegenüber der Hydroxylgruppen durch die Konkurrenz mit dem Lösungsmittel ausgenutzt werden. Die höhere Reaktivität von Säurechloriden gegenüber den entsprechenden Anhydriden könnte sich aber negativ auf die Regioselektivität auswirken oder auf Grund einer zu heftigen Reaktion mit dem Lösungsmittel der Acylierung der

Neuraminsäure zuvorkommen. Daher fiel die Wahl auf die entsprechenden Anhydride als Acylierungsmittel. Anhydride der geschützten Glycolsäure sind allerdings auf Grund ihrer Labilität nicht kommerziell erhältlich und müssen direkt vor der Verwendung dargestellt werden.

Auf Grund der biologischen Relevanz der 9-*O*-acylierten Neuraminsäuren wurde neben Modifikationen am Amid auch der 9-*O*-Butanoylneuraminsäuredonor **29** dargestellt.

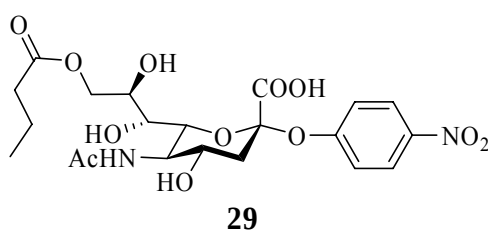


Abb. 20: Potenzieller Neuraminsäuredonor mit 9-*O*-Acylierung.

Da in der Synthese der *p*NP-aktivierten Donoren die Verseifung des Neuraminsäuremethylesters den letzten Schritt darstellt, muss die selektive Acylierung am *p*NP-Glycosid der Neuraminsäure erfolgen. Hierbei muss bei der Acylierung mindestens zwischen den Hydroxyfunktionen der Seitenkette und der OH-Gruppe an C-4 differenziert werden können. Bei einer Acylierung an OH-8 würde die entsprechende Gruppe auf Position 9 wandern. Daher führt diese Nebenreaktion nicht zu unerwünschten Regioisomeren. Acylierungen mit entsprechenden Orthoacetaten über die Stufe der Orthoester benötigen mindestens zwei OH-Gruppen in direkter Nachbarschaft. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Verbindung **29** basierend auf einer modifizierten Vorschrift nach Ogura *et al.* unter Verwendung von Trimethylorthobutytrat statt Trimethylorthoacetat dargestellt.^[92]

4.1 Vollständige Deacetylierung der Neuraminsäure zur späteren Modifizierung

Der Syntheseweg zu diesen Verbindungen führt in jedem Fall über das freie Amin der Neuraminsäure. Die mögliche Bildung der Schiff'schen Base (Abb. 21), die auf eine Deacetylierung der freien Neuraminsäure folgen würde, stellt eines der Hauptprobleme bei

der Derivatisierung des Acylsubstituenten dar.^[93] Hierbei wird in der offenkettigen Form der Neuraminsäure die Keto-Funktion an C-2 durch das nun freie Amin angegriffen. Unter Wasserabspaltung bildet sich ein äußerst stabiler Fünfring. Um diese unerwünschte Reaktion zu vermeiden wird die Ringöffnung durch eine glycosidische Schutzgruppe verhindert. Diese muss sowohl stark basischen als auch stark sauren Bedingungen standhalten, gleichzeitig aber leicht abspaltbar sein. *O*-Glycoside kommen auf Grund ihrer Säurelabilität nicht in Frage.

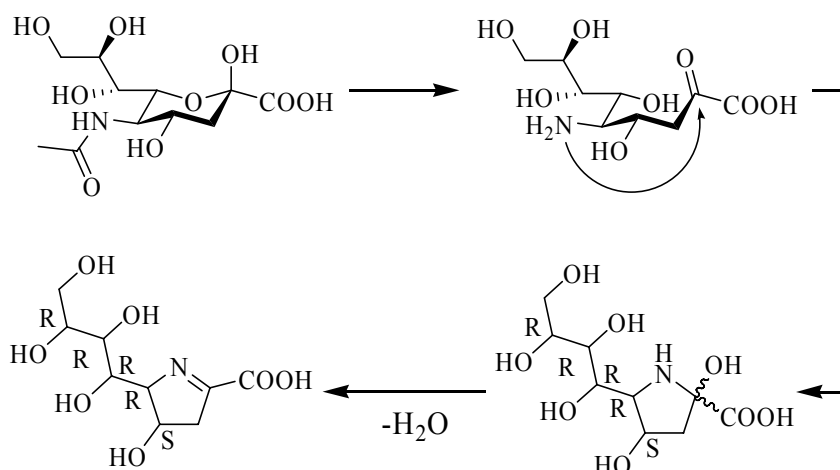


Abb. 21: Bildung der Schiff'schen Base aus freier Neuraminsäure

Thioglycoside hingegen erfüllen die Anforderung der Stabilität unter sauren und unter basischen Bedingungen.^[94] Sie lassen sich innerhalb von Minuten durch NBS in Aceton mit Wasser abspalten.^[95] Der Schwefel in Thioglycosiden ist ein weiches Nucleophil und reagiert relativ selektiv mit weichen Elektrophilen wie Schwermetallkationen und Halogenen. Sauerstoffatome in Kohlenhydraten stellen dagegen harte Nucleophile dar und können daher selektiv neben dem Schwefel funktionalisiert werden.^[96] Aus diesem Grund wurden die ersten Experimente mit Thioethyl- **31** und Thiophenylglycosiden **30** des peracetylierten Neuraminsäuremethylesters durchgeführt. Diese wurden nach Cao *et al.* phasentransferkatalytisch aus dem peracetylierten Chlorid des Neuraminsäuremethylesters **20** erhalten, das nach der etablierten Methode von Rothermel *et al.* dargestellt wurde.^[86, 97] Die Verbindungen **30** und **31** konnten in der phasentransferkatalytischen Glycosylierung in Ausbeuten von 63 % und 57 % erhalten werden. Die relativ geringen Ausbeuten der Phasentransferkatalyse (PTC) ergeben sich aus der Bildung des Glycals der Neuraminsäure, die bei basisch katalysierten Reaktionen von Neuraminsäurehalogeniden durch Eliminierung des axialen Protons an C-3 und konzertierter Eliminierung des Chlorids an C-2 immer zu finden ist. Die bimolekulare Eliminierung von HCl ist in β -konfigurierten Neuraminsäuren

durch die Tatsache, dass die beiden sich neu bildenden p-Orbitale der π -Bindung an C-2 und C-3 durch den 180° Winkel zwischen axialem Proton und axialem Chlor parallel zueinander liegen, stark begünstigt. Diese unerwünschte Nebenreaktion tritt gegenüber der Glycosylierung bei Verwendung sterisch gehinderter oder aus anderen Gründen in ihrer Reaktivität verminderter Akzeptoren in den Vordergrund.^[98, 99] So wurden im Vergleich zu den PTC-Glycosylierungen mit Hydroxylakzeptoren erhöhte Anteile des Glycals gefunden.

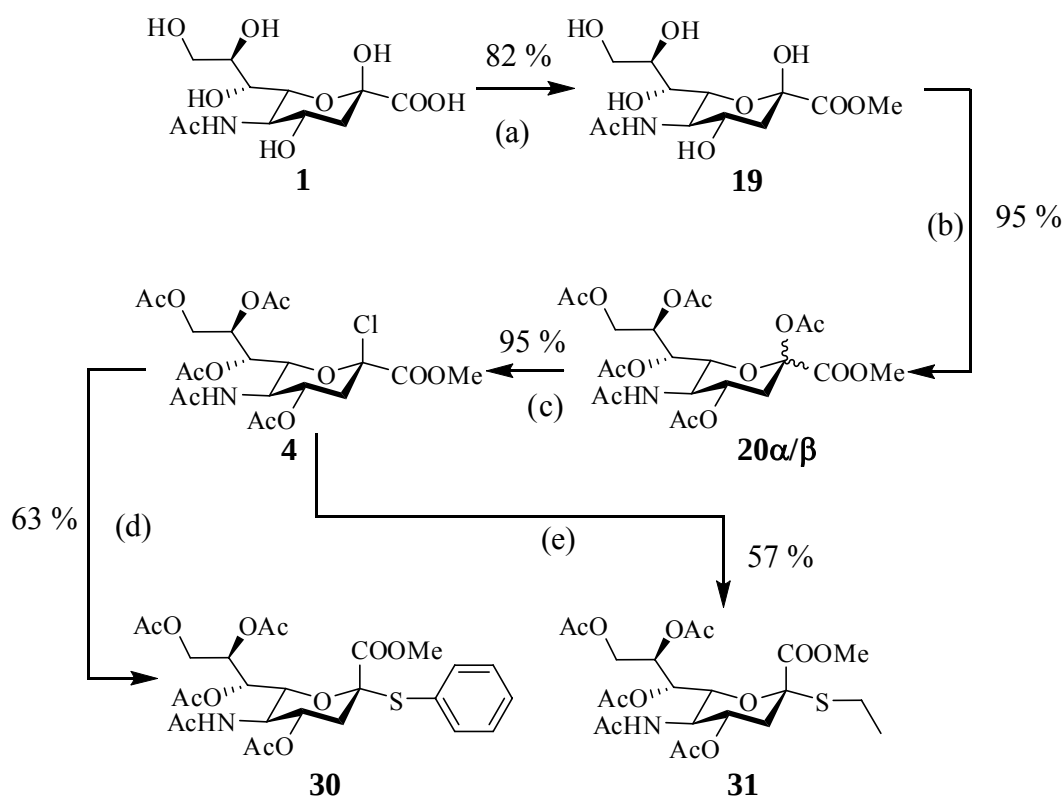


Abb. 22: Synthese von Neuraminsäurethioglycosiden: a) MeOH/DOWEX H⁺, RT, 1d; b) Ac₂O/Py, RT, 1d; c) AcCl/MeOH, RT, 2d; d) EE/1M Na₂CO₃/PhSH, RT, 3h; e) EE/1M Na₂CO₃/EtSH, RT, 3h

Ausgehend von den Thioglycosiden **30** und **31** wurden Versuche zur sauren Verseifung des Acetamids der Neuraminsäure durchgeführt. Eine saure Verseifung hat gegenüber der sonst an der Neuraminsäure üblichen basischen Hydrolyse des Amids den Vorteil, dass der Methylester für die weiteren Synthesen erhalten bleibt und nicht in einem weiteren Syntheseschritt neu dargestellt werden muss. Die Verwendung von Methansulfonsäure in Methanol, das mit dem gelösten Thioglycosid **31** 24 h unter Rückfluß erhitzt wurde führte zur weitgehenden Deacetylierung. Jedoch konnte das Produkt bei nahezu vollständigem Umsatz, der dünnschichtchromatographisch unter Anfärbung mit Ninhydrin detektiert wurde, säulenchromatographisch lediglich in Spuren isoliert werden. Daher wurde in den folgenden Versuchen zum Austausch der Acetylgruppe auf eine Isolierung des Amins verzichtet.

4.2 Darstellung *N*-acylmodifizierter Donorderivate

In den ersten Versuchen zur Darstellung eines nichtnatürlichen Donorderivates ohne vorherige Isolierung der vollständig deacetylierten Neuraminsäure sollte durch Acylierung mit Buttersäureanhydrid Verbindung **35** synthetisiert werden.

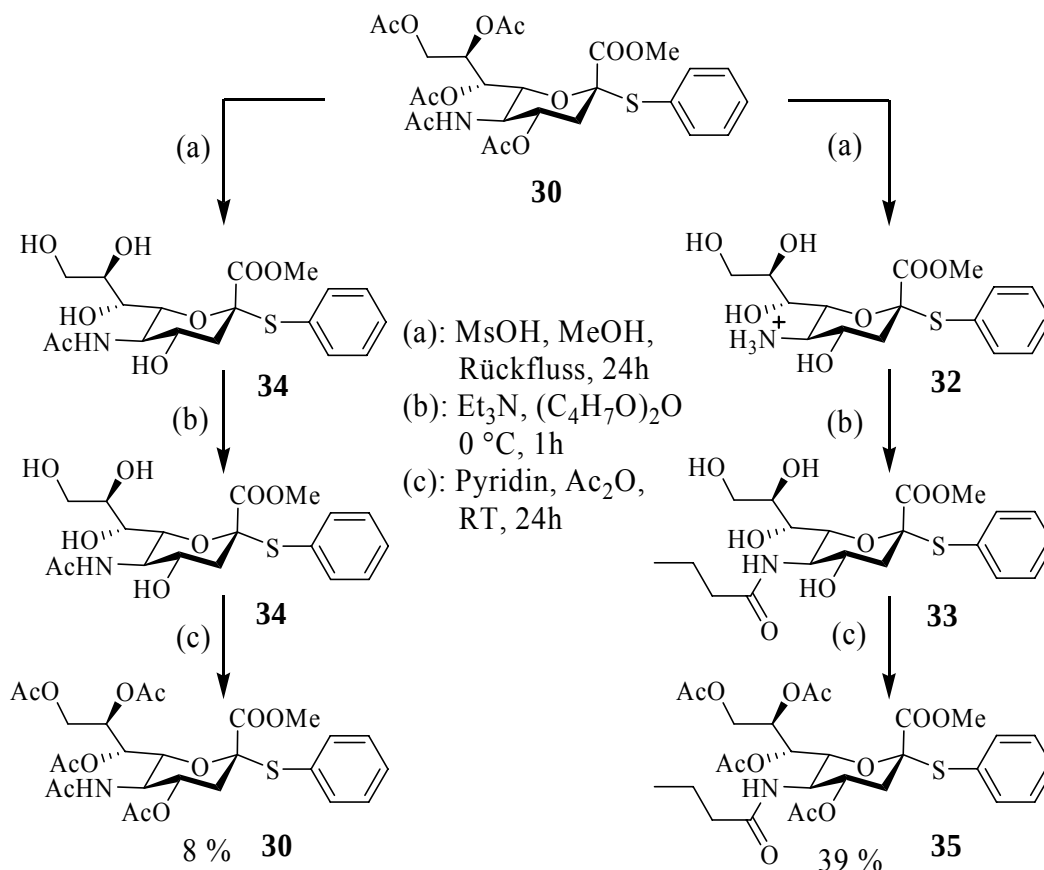


Abb. 23: Selektive *N*-Acylierung mit anschließender Peracetylierung am Beispiel des *N*-Butanoyl-Derivats

Die verminderte Polarität der Butanoyl- gegenüber einer Acetylgruppe erlaubt durch die resultierende Differenz der R_f -Werte bei der säulenchromatographischen Reinigung eine einfachere Abtrennung von der *N*-Acetylverbindung, die in geringen Mengen bei jeder Reaktion zurückgewonnen wurde. Zunächst wurde das Thioglycosid **30** wie in den ersten Versuchen zur Deacetylierung 24 h unter Rückfluss in Methanol mit Methansulfonsäure erhitzt. In Probeansätzen ließ sich auch bei längeren Reaktionszeiten vollständige Deacetylierung dünnschichtchromatographisch nicht detektieren. Stattdessen ging die Konzentration des Amins, das durch Ansprühen mit Ninhydrin von sich bildenden

Zersetzungsprodukten eindeutig unterschieden werden kann, zu Gunsten letzterer zurück. Daher wurde nach 24 h auf RT abgekühlt und durch Zugabe von Triethylamin neutralisiert. Durch weitere Zugabe wurden die für die Acylierung notwendigen basischen Bedingungen geschaffen. Um die Selektivität zu erhöhen und eine vorzeitige Veresterung des Acylierungsmittels mit dem alkoholischen Lösungsmittel zu verhindern wurde die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt und anschließend zwei Äquivalente Buttersäureanhydrid langsam zugetropft. Nach einer Stunde wurde auf vollständigen Umsatz geprüft und eventuell noch einmal ein Äquivalent Anhydrid zugegeben. Nach vollständiger Umsetzung des Amins wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Essigsäureanhydrid und Pyridin peracetyliert. Verbindung **35** konnte in 39 % Ausbeute über drei Stufen isoliert werden. Durch die nicht vollständige Deacetylierung wurden zusätzlich 8 % Edukt isoliert. Da im ersten Schritt, der sauren Esterspaltung, die sich bildenden Nebenprodukte einen geringeren R_f -Wert besitzen als das geschützte Thioglycosid, ist zu vermuten, dass ein erheblicher Teil der Ausbeuteverluste auf eine Spaltung des Thioglycosids und der Bildung der Schiff'schen Base zurückzuführen ist.

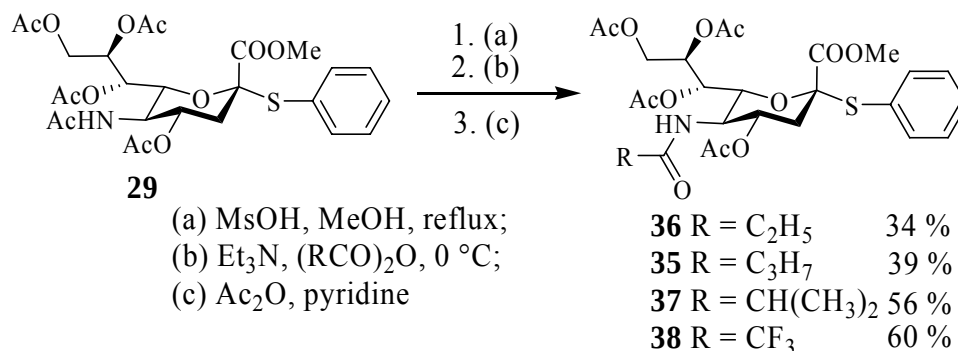


Abb. 24: Umacylierung des Neuraminsäure-Thioglycosides **29**

Auf dem selben Weg konnte die *N*-Isobutanoylneuraminsäure **37** unter Verwendung von Isobuttersäureanhydrid sogar in einer Ausbeute von 56 % erhalten werden. In diesem Ansatz wurden entsprechend geringere Mengen des Edukts von lediglich 4 % isoliert. *N*-Propanolyneuraminsäure **36** konnte durch Acylierung mit Propansäureanhydrid auf diesem Weg in einer Ausbeute von 34 % isoliert werden. Verbindung **38** wurde in einer Ausbeute von 60 % isoliert.

Um die entsprechenden *p*NP-Neuraminsäuredonoren, ausgehend von den Thiophenylglycosiden, darzustellen kommt zum einen eine direkte Glycosylierung unter Aktivierung durch NBS nach Nicolaou *et al.* in Frage,^[95] zum anderen aber auch der Umweg über die Neuraminsäurechloride mit anschließender PTC-Glycosylierung wie sie oben

beschrieben wurde. Der Nachteil der direkten Glycosylierung liegt in der mangelnden Stereoselektivität der Reaktion und dem sich daraus ergebenden Ausbeuteverlust bei der Trennung des Anomerengemisches. Nach der von Nicolaou *et al.* beschriebenen Methode lässt sich die thioglycosidische Bindung unter Zugabe von Wasser jedoch auch hydrolysieren.

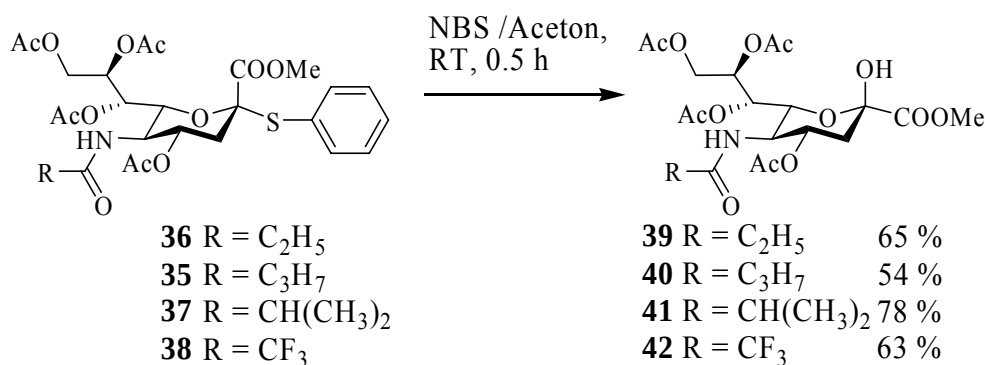


Abb. 25: Hydrolyse der Thioglycoside mit NBS nach Nicolaou

In der folgenden PTC-Glycosylierung wird selektiv das erwünschte α -Anomer gebildet. Zwar ist es auch mit der NBS-Methode möglich das Anomerenverhältnis durch Reaktionsführung in Acetonitril zu Gunsten des α -Anomers zu verschieben, jedoch kann dies ebenfalls durch die Verwendung des β -Chlorids von Neu5Ac, das praktisch quantitativ dargestellt werden kann, in einer PTC-Glycosylierung erreicht werden, die dann S_N2-artig verläuft. In Erwartung vergleichbarer Ausbeuten wurde die Hydrolyse und Aktivierung als Chlorid der direkten Glycosylierung vorgezogen.^[100] Die Hydrolyse erfolgte in Aceton und Wasser unter Zugabe von NBS bei Raumtemperatur. Die Lösung färbte sich nach Zugabe des NBS innerhalb weniger Minuten durch die Bildung von Br₂ braun und entfärbte sich innerhalb einer halben Stunde. Bei nicht vollständigem Umsatz wurde ein zweites mal NBS zugegeben und eine weitere halbe Stunde gerührt. Nach der zweiten Zugabe startete die Reaktion innerhalb weniger Sekunden. Die zuzugebende Menge NBS lässt sich auf Grund der Komplexität und der vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten schwierig ermitteln (Abb. 26). Zusätzlich kann NBS ungewöhnliche Reaktionen eingehen. So berichten zum Beispiel Johnson *et al.* die Umlagerung von NBS durch Licht in Chloroform zu Isocyansäurederivaten.^[101] Daher wurde, auch um unerwünschte Nebenreaktionen durch überschüssiges Brom zu vermeiden, NBS in kleineren Portionen zugegeben. Die Tatsache, dass nach vollständiger Entfärbung der Reaktionslösung, trotz Zugabe im Überschuss, kein weiterer Umsatz zu beobachten war und die wesentlich schnellere Reaktion nach Zugabe der zweiten Portion NBS stehen im Einklang

mit dem hier dargestellten Mechanismus, der zur Zeit noch nicht vollständig geklärt ist.^[100, 102]

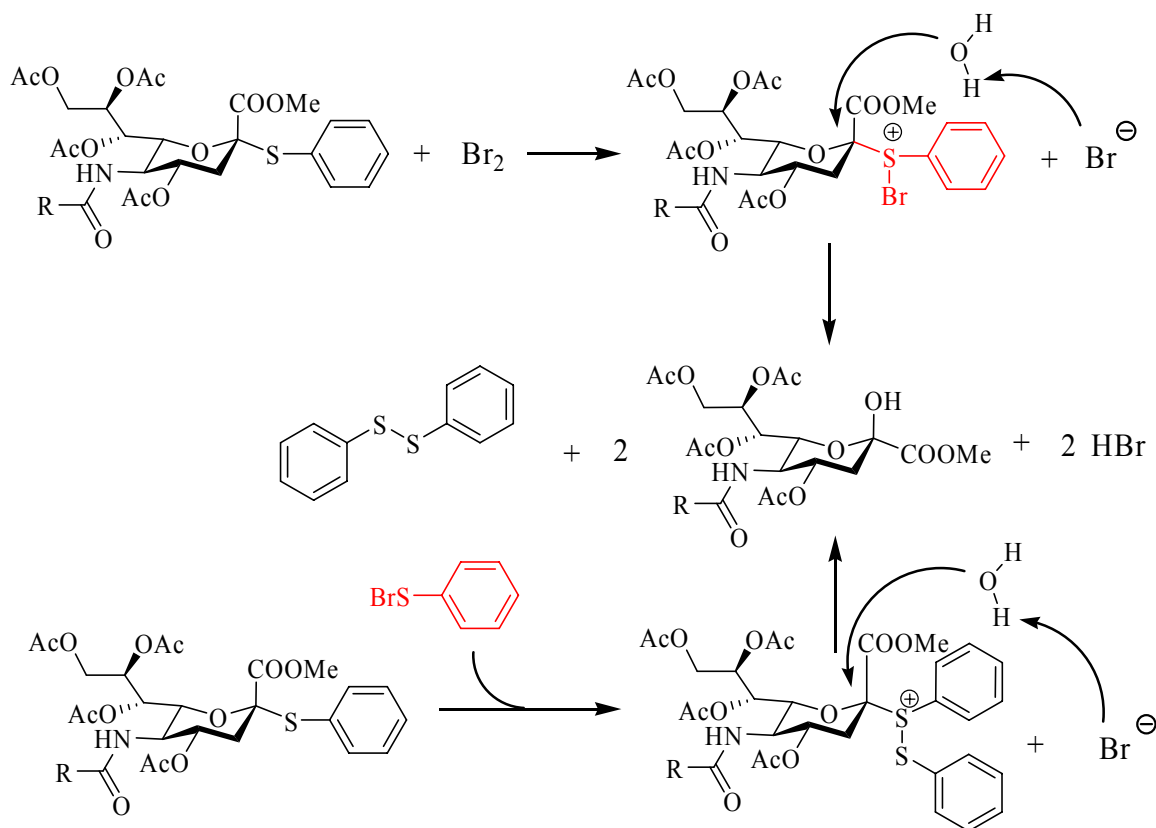


Abb. 26: Postulierter Mechanismus der NBS-Glycosylierung (im vorliegenden Fall mit H₂O)

Sowohl Br^+ als auch PhS^+ stellen sehr weiche Elektrophile dar, die mit freien Elektronenpaaren des Schwefels der Thioglycoside als gute Austrittsgruppe ein Sulfoniumintermediat bilden. Wie oben erwähnt, ließe sich in einer direkten Glycosylierung an dieser Stelle durch Acetonitril als Lösungsmittel das Anomerenverhältnis zum α -Produkt verschieben. Hier würde zunächst der Stickstoff des Acetonitrils vor dem Sauerstoff eines Neu5Ac-Akzeptors am anomeren Kohlenstoff angreifen. Dies geschieht bevorzugt axial. In einer anschließend $\text{S}_{\text{N}}2$ -artigen Reaktion würde der Akzeptor das Acetonitril verdrängen und so bevorzugt das α -Produkt bilden. Nach säulenchromatographischer Reinigung ergaben sich Ausbeuten von 50 – 78 %. Die Produkte lagen ausschließlich in Form ihrer β -Anomeren vor. Die Stereochemie lässt sich auf Grund der erkennbaren Kopplung des axialen Protons an C-3 mit dem Hydroxylproton mit Sicherheit bestimmen. Die ungewöhnliche Hochfeldverschiebung ist Folge einer intermolekularen Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoff des Methylesters und OH-2 und der daraus resultierenden Entschirmung der Protonen an C-3. Im Allgemeinen stellt das Bestimmen der Konfiguration

an C-2 der Neuraminsäure im ^1H -NMR auf Grund des fehlenden Protons am anomeren Kohlenstoff ein Problem dar. Man ist hier entweder auf Erfahrungswerte oder aufwendige 2D-Experimente angewiesen.^[98, 103]

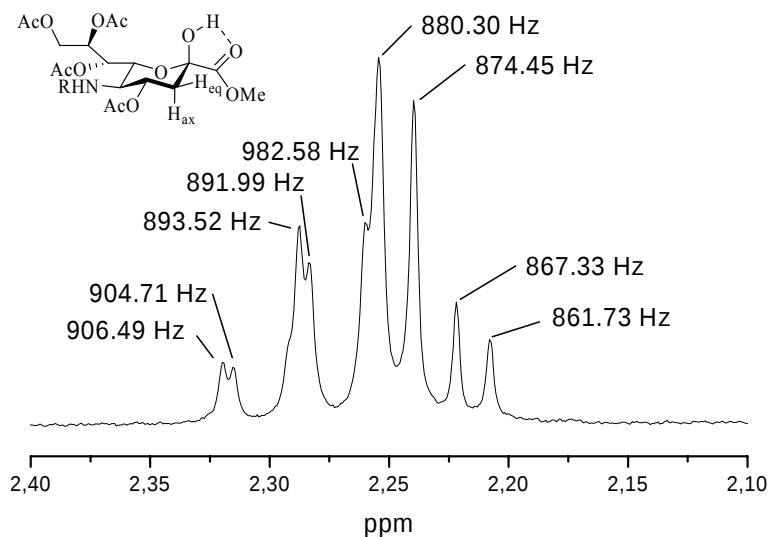


Abb. 27: H-3ax und H-3eq im ^1H -NMR zur Bestimmung der Konfiguration an C-2 nach der Hydrolyse

Die Tatsache, dass die 2-OH-freien Produkte ausschließlich als β -Anomer vorliegen, stellt im Zusammenhang mit der Synthese des peracetylierten Neuraminsäuremethylesters **20** einen interessanten Punkt dar. Hier gibt es in der Literatur teilweise widersprüchliche Aussagen.^[42, 104] Bei der Peracetylierung reagiert die OH-Gruppe an C-2 als letzte. Daher wird vor der Übertragung der letzten Acetylgruppe eine zu den nach Nicolaou *et al.* mit NBS entschützten Neuraminsäurederivaten analoge Verbindung erhalten, die nahezu ausschließlich als β -Anomer vorliegt. Im Produktgemisch der Peracetylierung findet sich aber mit einem Verhältnis von $\alpha/\beta = 1/3$ ein nicht unerheblicher Teil des α -Produkts. Es liegt also nahe, dass die Verschiebung der Anomerenverhältnisse aus einer wesentlich schnelleren Acylierung der Hydroxyfunktion in äquatorialer Position als in der axialen resultiert. Eine Erklärung könnte im aromatischen Lösungsmittel Pyridin liegen. Durch hydrophobe Stapel-effekte ist der Zugang oberhalb und unterhalb der Ringebene durch die Anlagerung des Lösungsmittels blockiert, wodurch ein Angriff auf eine äquatoriale OH-Gruppe gegenüber einer axialen begünstigt würde.

Die Darstellung der entsprechenden Chloride erfolgte wie oben beschrieben nach Rothermel *et al.* in Acetylchlorid unter Zugabe geringer Mengen Methanol in quantitativer Ausbeute ohne weitere Aufarbeitung.^[86]

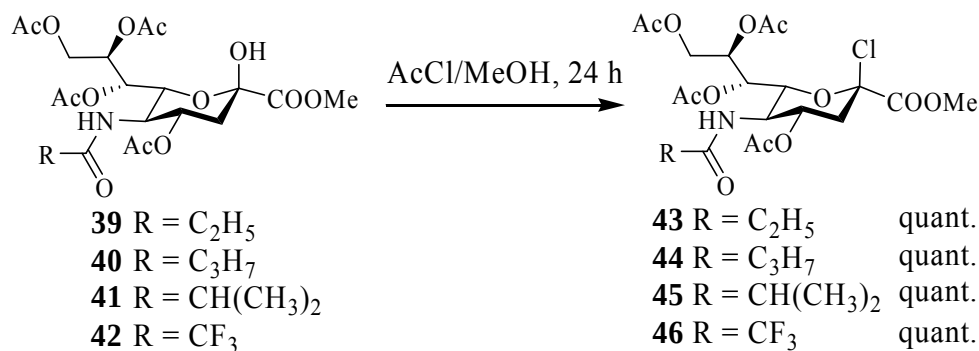


Abb. 28: Chlorierung am anomeren Kohlenstoff

In diesem Fall wurden allerdings keine peracetylierten Neuraminsäuren, sondern die 2-OH freien Derivate eingesetzt. Hier erfolgte die Acetylierung an OH-2 *in situ* vor der eigentlichen Substitution des Acetats durch Chlorid nach S_N1-artigem Mechanismus. Die Verbindungen **43**, **44**, **45** und **46** wurden ausschließlich in Form ihrer β-Anomere isoliert.

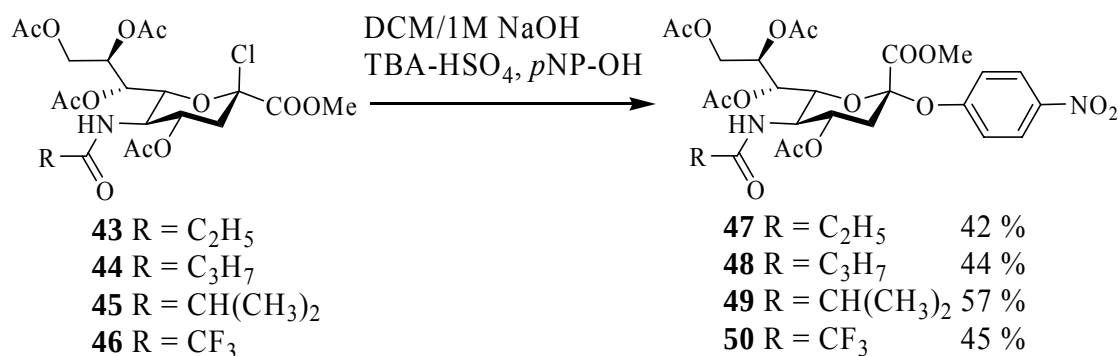


Abb. 29: Darstellung der *p*NP-Glycoside durch PTC-Glycosylierung

Die anschließende Umsetzung zu den *p*NP-Glycosiden erfolgte phasentransferkatalytisch im oben beschriebenen Zweiphasensystem aus DCM und 1 M NaOH-Lösung mit Tetrabutylammoniumhydrogensulfat als Phasentransferkatalysator. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnten die α-*p*NP-Glycoside **47**, **48**, **49** und **50** in Ausbeuten zwischen 42 % und 57 % isoliert werden. Auch hier wurden immer geringe Mengen des Glycals gebildet. Die Abspaltung der Acetester erfolgte nach Zemplén *et al.* basisch durch Natriummethanolat in Methanol unter Erhalt der Amidbindungen. Die Ausbeuten lagen nach säulenchromatographischer Aufarbeitung zwischen 64 % und 82 %.

Durch Lösen in 0.1 M NaOH konnten die erhaltenen Verbindungen quantitativ zu den Donorsubstraten **23**, **24**, **25** und **27** verseift werden.

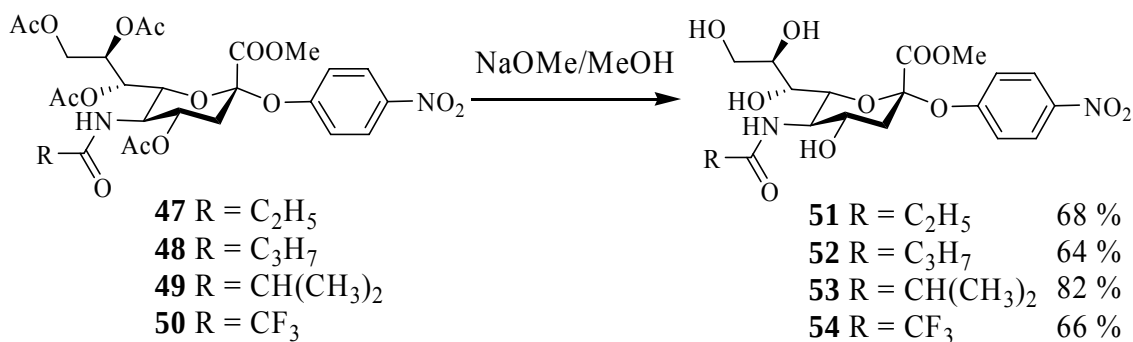


Abb. 30: Abspaltung der *O*-Acetylgruppen nach Zemplén

Um eventuelle Verunreinigungen durch kleinste Mengen Thiophenol, die sich auf die Enzymaktivität auswirken könnten, auszuschließen, wurden die Verbindungen über Biogel P-2 größenausschlusschromatographisch gereinigt.

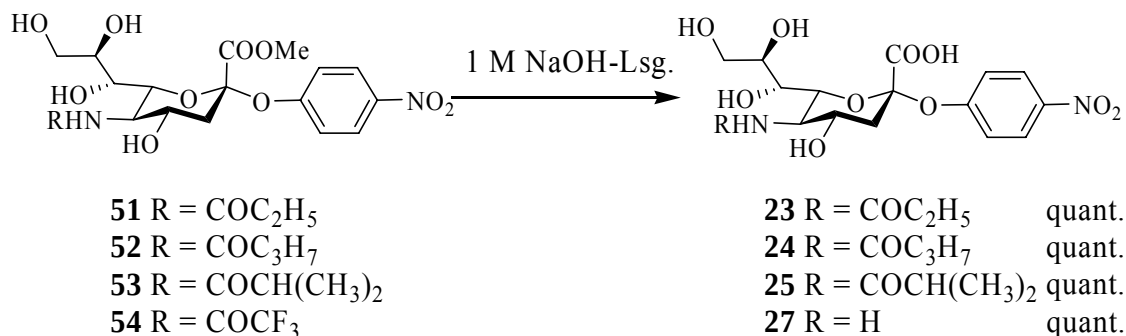


Abb. 31: Quantitative Verseifung in 0.1 M NaOH zu den Verbindungen **24**, **25**, **26** und **27**

4.3 Darstellung des *N*-Glycolylneuraminsäure-Donors

Kommerziell waren für die oben beschriebene Synthesestrategie keine als Anhydride aktivierten Glycolsäurederivate erhältlich. Daher wurden erste Versuche zur Darstellung von *N*-Glycolylneuraminsäurederivaten mit Benzyloxyacetylchlorid durchgeführt. Bei Verwendung von Methanol als Lösungsmittel zur selektiven Acylierung trat auch bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt zu heftige Reaktion mit dem Säurechlorid ein.

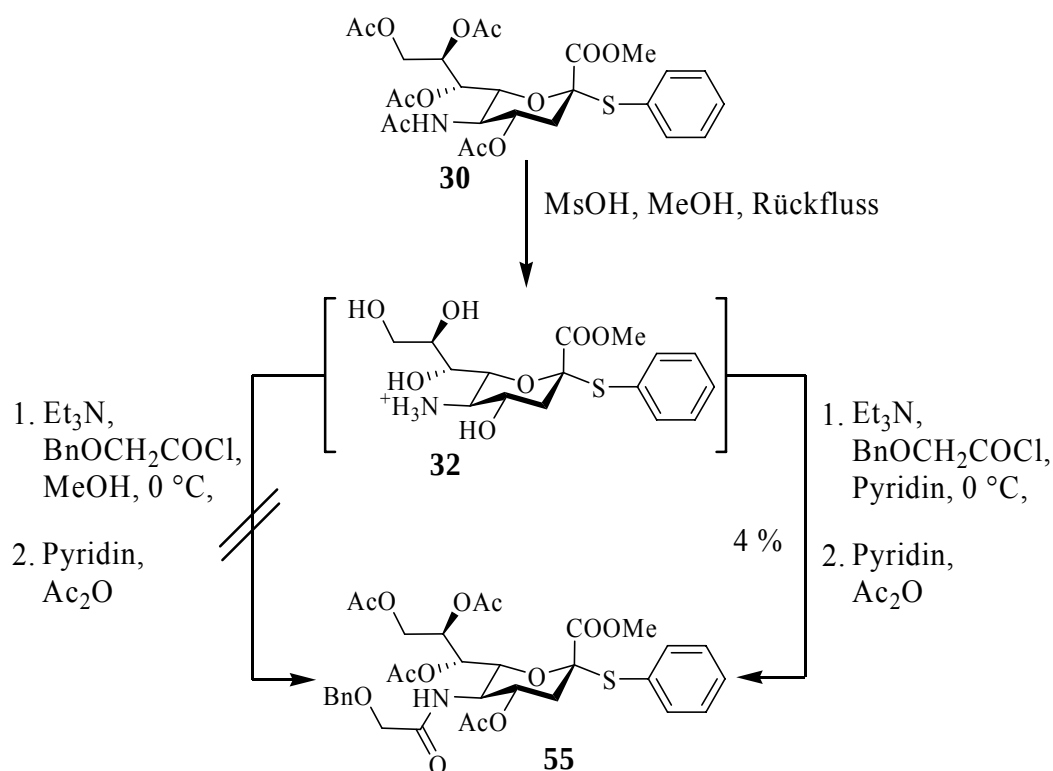


Abb. 32: Probeansätze zur Darstellung von Verbindung 7

Daher wurde in den folgenden Versuchen vor dem Acylierungsschritt das Methanol im Vakuum entfernt und durch Pyridin ersetzt. Die Reaktionslösung wurde dann auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und Benzyloxyacetylchlorid langsam zugetropft. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Reaktionslösung ließ auf eine hohe Zahl an Nebenprodukten schließen, die auf nicht selektive Acylierung und Mehrfachacylierung zurückzuführen sind. Die im Gemisch enthaltenen Produkte wurden unter Zugabe eines großen Überschusses an Essigsäureanhydrid acetyliert. Das gewünschte Produkt konnte nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung lediglich in einer Ausbeute von 4 % isoliert werden. Auf Grund der weiteren notwendigen Syntheseschritte zum Neuraminsäuredonor sind 4 % Ausbeute in einem so

frühen Stadium bei weitem nicht ausreichend. Daher war es notwendig die Glycolsäure auf eine andere Weise zu aktivieren. Sugata *et al.* setzten in ihrer Glycolylneuraminsäure-Synthese den *N*-Hydroxysuccinimidester der Benzyloxyessigsäure ein.^[105] Auf Grund der guten Erfahrungen mit dem Einsatz von Anhydriden und der Verfügbarkeit einer einfachen und sehr effektiven Synthese von Anhydriden aus den ohnehin vorhandenen Säurechloriden bot sich jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit erneut der Einsatz der entsprechenden Anhydride an.

Darstellung von Glycolsäureanhydriden über Phasentransferkatalyse:

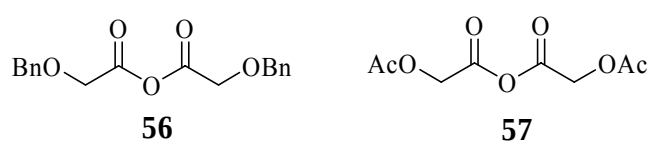


Abb. 33: Glycolsäureanhydride zur Darstellung von Neu5Gc

Die für die vorgesehene Synthesestrategie zur Darstellung von *N*-Glycolylneuraminsäure erforderlichen Anhydride sind kommerziell nicht erhältlich und wurden daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus den verfügbaren Säurechloriden dargestellt. Bei der Aufarbeitung erwiesen sich die entsprechenden Anhydride als sehr temperaturempfindlich. Daher kamen eine zu zeitaufwendige Aufarbeitung sowie Refluxieren bei der Synthese oder destillatives Entfernen aus einem Reaktionsgemisch, Vorgehensweisen die bei herkömmlichen Anhydridsynthesen durchaus üblich sind, nicht in Frage.^[106-109] Die phasentransferkatalytische Synthese von Anhydriden nach Plusquellec *et al.* bietet mit sehr milden und schnellen Reaktionsbedingungen gekoppelt mit einfacher Aufarbeitung eine effiziente Alternative.^[110] Ausgehend von den Säurechloriden werden hier in einem Zweiphasensystem bestehend aus einem unpolaren organischen Lösungsmittel und 20 %iger NaOH-Lösung mit Tetrabutylammoniumbromid als Phasentransferkatalysator symmetrische Anhydride dargestellt. Abbildung 34 zeigt den Mechanismus der Produktbildung. Der Phasentransferkatalysator dient hier ausschließlich dem Transport von Hydroxidionen in die organische Phase. Hier ist der erste Schritt mit der Hydrolyse von Säurechloriden identisch.^[111] Bevor HCl eliminiert werden würde, wird ein weiteres Äquivalent des Säurechlorids durch den nun nucleophilen Sauerstoff angegriffen und es bildet sich unter Eliminierung von HCl das Anhydrid. Die Aufarbeitung der Reaktion erfolgt durch Abtrennen

der organischen von der wässrigen Phase und Ausschütteln mit wässriger Natriumcarbonatlösung.

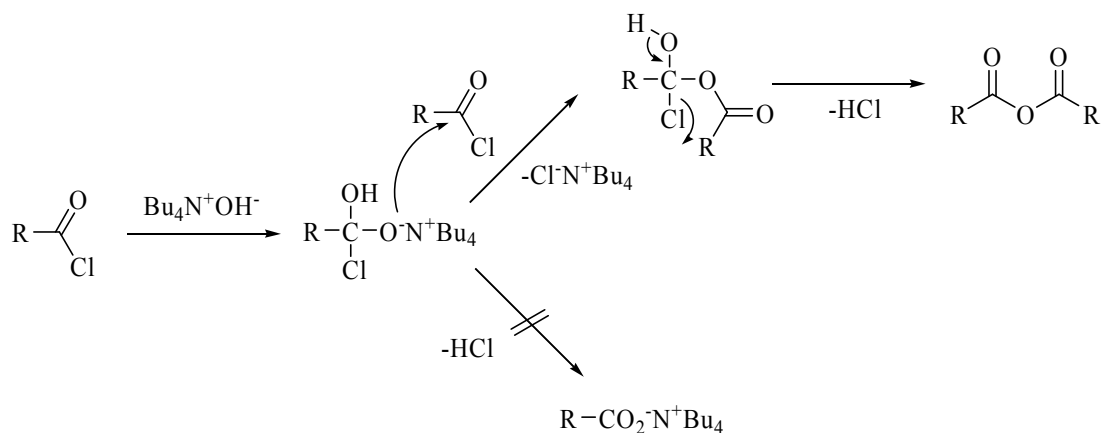


Abb. 34: Mechanismus der Anhydridsynthese nach Plusquellec *et al.*^[110]

Zur späteren Umsetzung mit der deacetylierten Neuraminsäure **32** wurde zunächst das benzylich geschützte Chlorid der Glycolsäure zum Anhydrid umgesetzt. In einem ersten Versuch mit 20 %iger NaOH-Lösung konnten lediglich Spuren von Produkt isoliert werden. Unter Berücksichtigung des in Abbildung 34 dargestellten Mechanismus liegt die Vermutung nahe, dass überschüssige Base vom Phasentransferkatalysator in die organische Phase transportiert wird und hier das gebildete Anhydrid hydrolysiert. In weiteren Versuchen unter Einsatz äquimolarer Mengen Base konnte die Ausbeute auf 58 % gesteigert werden.

Acetoxyessigsäureanhydrid **57** konnte auch in Spuren nicht isoliert werden. In weiteren Versuchen zur Synthese stellte sich heraus, dass sich **57** bei der Aufarbeitung zersetzt. Daher wurde die Reaktionslösung nach Abtrennen der wässrigen Phase direkt zur Synthese von Neu5Gc eingesetzt. Dies ermöglicht es von der Synthese bis zum Einsatz in der Acylierung die Temperatur unterhalb des Gefrierpunktes zu halten und dadurch die Zersetzung von **57** weitgehend zu vermeiden.

Erste Versuche zur Acylierung mit Benzyloxyessigsäureanhydrid:

Erste Versuche zur Acylierung mit dem durch Phasentransferkatalyse dargestellten Anhydrid der Benzyloxyessigsäure wurden sowohl am Thiophenyglycosid **30** als auch am Thioethylglycosid **31** durchgeführt, das ebenfalls nach Cao *et al.* dargestellt wurde.^[97] Mit dem Thiophenyl- **30** und dem Thioethylglycosid **31** wurden in der oben beschriebenen

Umacylierung vergleichbare Ergebnisse erzielt. Auf Grund der angenehmeren Handhabbarkeit von Thiophenol gegenüber Thioethanol durch seinen geringeren Dampfdruck wurde ausschließlich das Thiophenylglycosid **30** in den weiteren Synthesen eingesetzt. Ein weiterer Vorteil liegt in der leichteren UV-Detektierbarkeit entstehender Nebenprodukte wegen der aromatischen Funktion. Auch die Ausbeute in der Darstellung der Thioglycoside zur Umacylierung lag im Fall des Thiophenylglycosides **30** geringfügig höher als beim entsprechenden Thioethylglycosid **31**.

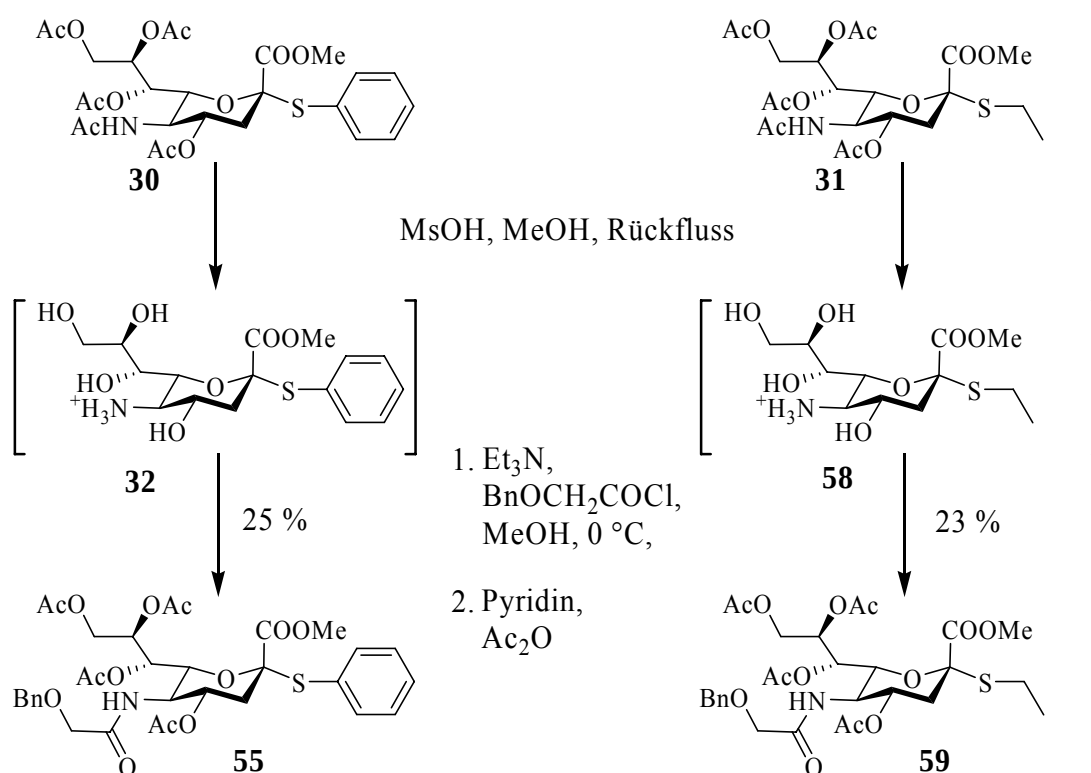


Abb. 35: Acylierungen mit Benzyloxyessigsäureanhydrid

Die anschließende Hydrolyse der glycosidischen Bindung erfolgte mit NBS in Aceton und Wasser. Die Chlorierung mit Acetylchlorid gelang in nahezu quantitativer Ausbeute von 99 %. Phasentransferkatalytisch konnte das *p*NP-Glycosid **62** in 49 %iger Ausbeute erhalten werden. Verseifung der Acetate nach Zemplén ergab Verbindung **63** in 43 %iger Ausbeute. Die Darstellung des Mylesters des Glycolylneuraminsäuredonors **64** sollte durch Hydrierung unter Abspaltung der Benzylgruppe erfolgen. In diesem Schritt kann es neben der gewollten Abspaltung der Schutzgruppe des Glycolsäuresubstituenten auch zur Reduktion der Nitrogruppe am *p*NP kommen.^[112-114] In der Hoffnung, die Abspaltung der Schutzgruppe würde vor der Reduktion zum Amin erfolgen, wurde die Reaktion sofort nach dünnschichtchromatographisch detektiertem Verbrauch des Edukts abgebrochen.

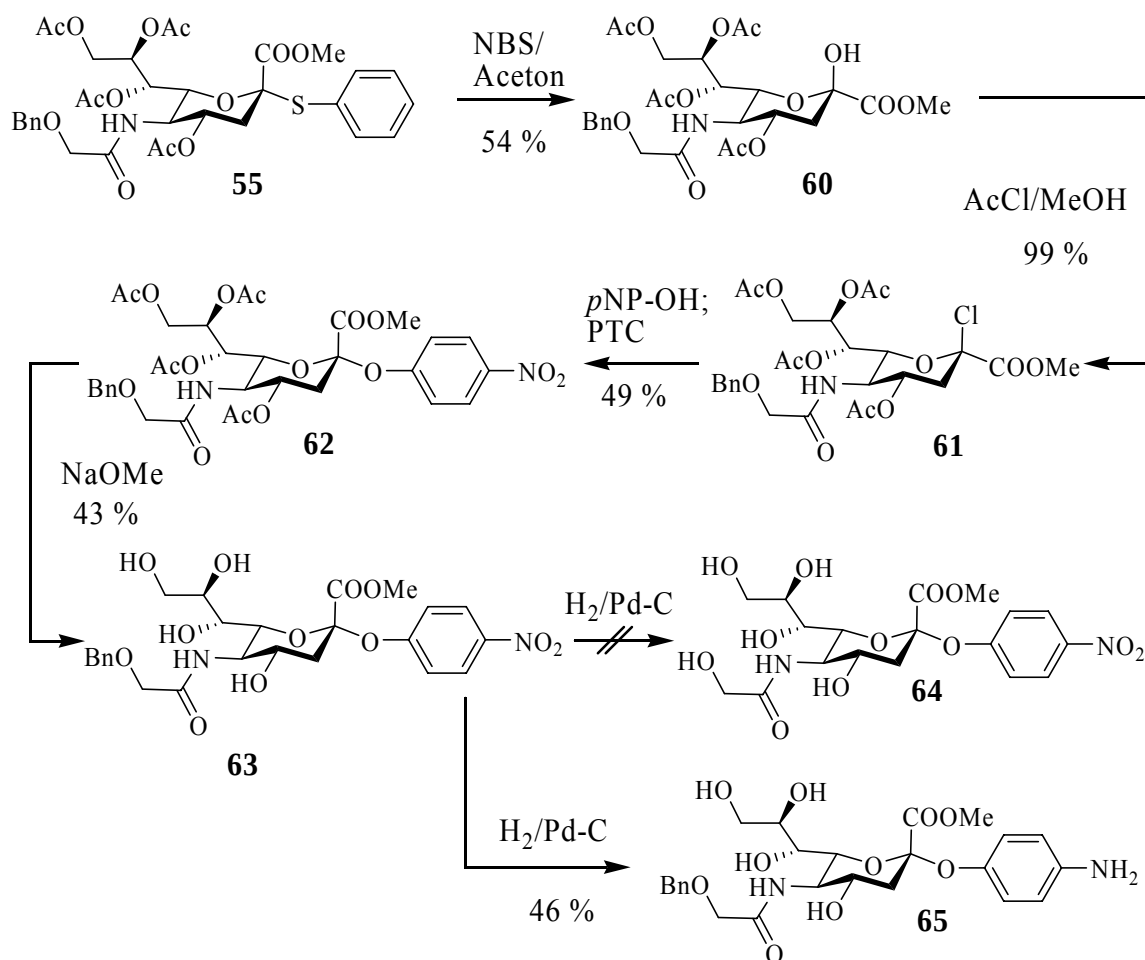


Abb. 36: Syntheseschritte in Richtung Glycolylneuraminsäuredonor

Anschließend Charakterisierung bestätigte die Bildung des Amins **65**. Da keine Fraktion isoliert werden konnte, in der die Benzylgruppe abgespalten worden wäre, lässt sich der Schluss einer weit schnelleren Reduktion zum Amin gegenüber der Abspaltung der Benzylgruppe ziehen.

Acylierung mit Acetessigsäureanhydrid:

Aus den oben genannten Gründen wurde zur Darstellung der Glycolylneuraminsäure auf das schwerer zu handhabende Acetoxyessigsäureanhydrid zurückgegriffen. Da sich dieses auf Grund seiner Empfindlichkeit nicht isolieren ließ, wurde die anhydridhaltige organische Schicht aus der Phasentransferkatalyse zur Darstellung der Anhydride ohne weitere Reinigung zur Acylierung der entschützten Neuraminsäure **32** eingesetzt. Hierdurch ließen sich durchgehend tiefe Temperaturen realisieren und durch zügiges Arbeiten die vorzeitige

Zersetzung des Anhydrids vermeiden. Bei diesem Vorgehen ist allerdings auf strikte Kontrolle des pH-Wertes bei Zugabe der Anhydridlösung zu achten, da diese erhebliche Mengen HCl enthält. Durch parallele Zugabe von Triethylamin ließ sich das basische Milieu aufrechterhalten. Das Produkt konnte nach Peracetylierung und säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 38 % erhalten werden. Da weder nach der Verseifung noch nach selektiver Acylierung mit dem nicht gereinigten Anhydrid, das neben HCl noch mit dem Phasentransferkatalysator verunreinigt war, die Zwischenprodukte isoliert wurden, stellt dies eine bemerkenswerte Ausbeute dar.

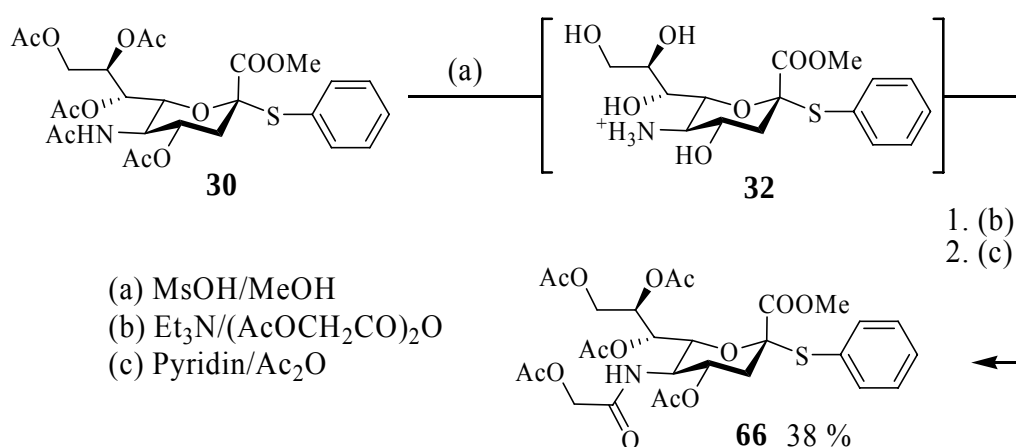


Abb. 37: Acylierung mit Acetoxyessigsäureanhydrid.

Wie in den oben beschriebenen Donorsynthesen erfolgte die Synthese der Donorstrukturen auch hier nicht über die direkte Glycosylierung mit NBS zum *p*NP-Glycosid, sondern über den Umweg der Abspaltung von Thiophenol mit NBS in Wasser und Aceton mit anschließender Chlorierung und phasentransferkatalytischer Umsetzung mit *p*NP-OH zum entsprechenden Glycosid **69**. Nach Abspaltung von Thiophenol konnte Verbindung **67** in einer Ausbeute von 65 % isoliert werden. Die Chlorierung erfolgte in einer Ausbeute von 95 %. Das *p*NP-Glycosid **69** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 47 % isoliert werden. Die Abspaltung der Acetylgruppen erfolgt wie oben beschrieben nach Zemplén *et al.* mit Natriummethanolat. In diesem Schritt wird, anders als bei der benzylgeschützten Glycolsäure, die Schutzgruppe der Hydroxyfunktion der Glycolsäure mit abgespalten und muss nicht später in einer zusätzlichen Stufe entfernt werden. Die Abspaltung der Acetylgruppen gelang in einer Ausbeute von 73 %. Der Methylester **64** wurde anschließend mit 0.1 M NaOH in einer Ausbeute von 98 % verseift. Die Verwendung der acetylgeschützten Glycolsäure bietet gegenüber der benzylgeschützten

in jedem Fall den Vorteil, dass die weiteren Syntheseschritte nach der selektiven Acylierung analog zu den oben beschriebenen Synthesen für die anderen *N*-Acyl-Derivate **23**, **24**, **25** und **27** der Neuraminsäure erfolgen können.

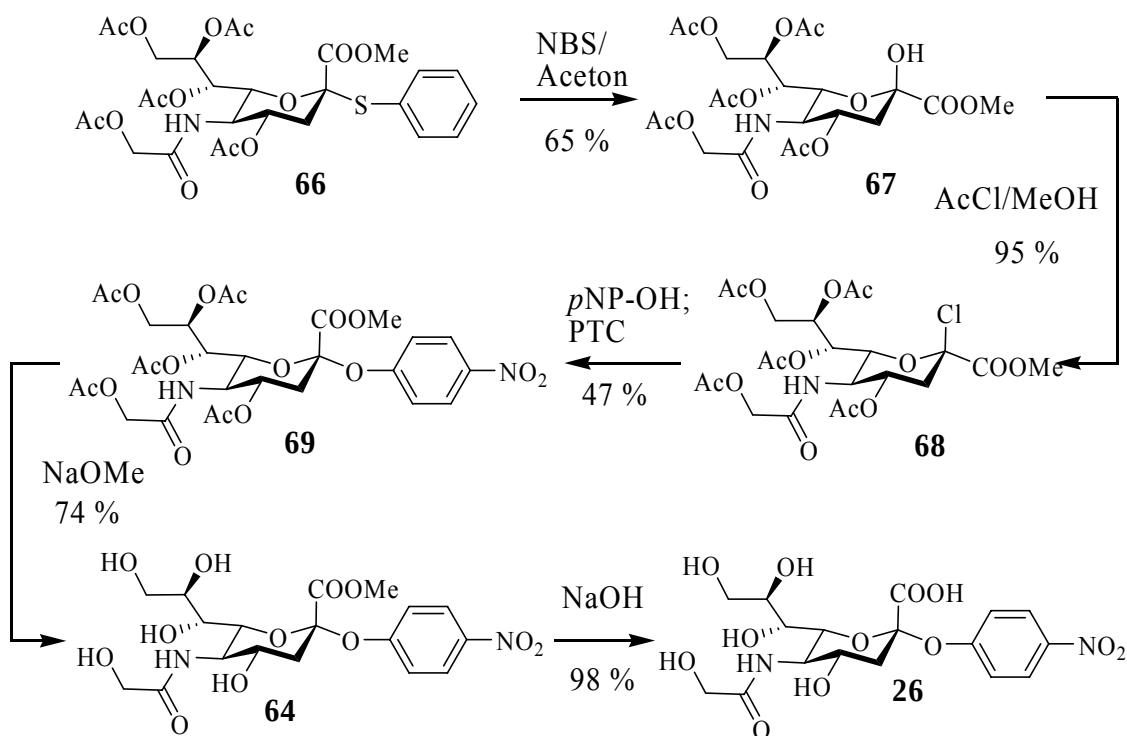


Abb. 38: Syntheseschritte zur Darstellung von *p*NP-aktivierter Glycolylneuraminsäure

4.4 Darstellung des Azids der Neuraminsäure

Aus dem Amin **27** lässt sich durch einen Cu(II)-katalysierten Diazotransfer nach Vasella und Wong in einem einzigen Schritt das als *p*NP-Glycosid aktivierte Azid der Neuraminsäure **28** darstellen.^[115-117]

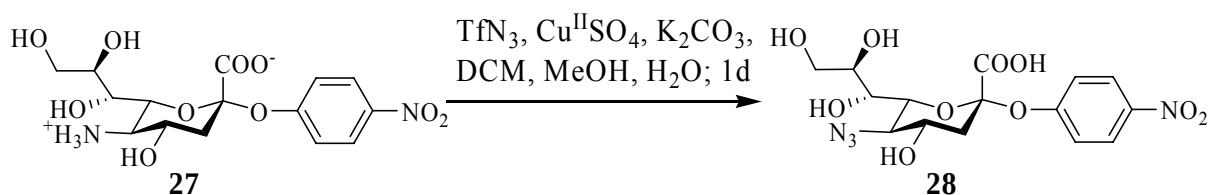


Abb. 39: Diazotransfer zum Azid der Neuraminsäure

Da es sich bei der Reaktion um einen nucleophilen Angriff des Amins auf das Triflylazid handelt bleibt die Stereochemie an C-5 der Neuraminsäure erhalten. In Abbildung 40 ist der

von Wong *et. al.* vorgeschlagene, noch nicht bewiesene, Mechanismus dargestellt. Nach diesem wird das Amin durch den Kupfer-Katalysator unter basischen Bedingungen komplexiert. Auf Grund der hohen Elektrophilie des Triflylazids kommt es anschließend zum nucleophilen Angriff durch das komplexierte Amin.

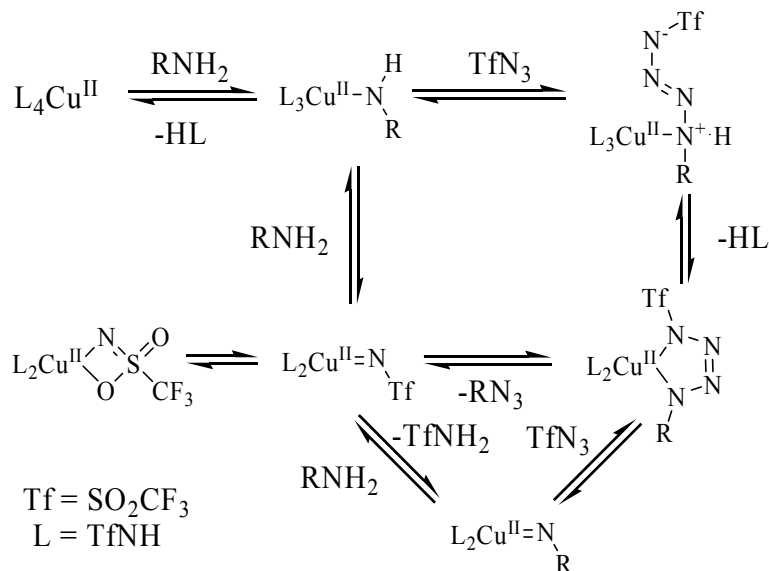


Abb. 40: Vorgeschlagener Mechanismus des Diazotransfers nach Wong *et. al.*^[116]

Nach Deprotonierung bildet sich ein durch Cu^{II} stabilisiertes Tetrazen. Der Abbau des Tetrazens könnte anschließend unter Freisetzung des Azids über eine [3+2] dipolare Cycloreversion zum Kupfertriflylimido-Komplex erfolgen.

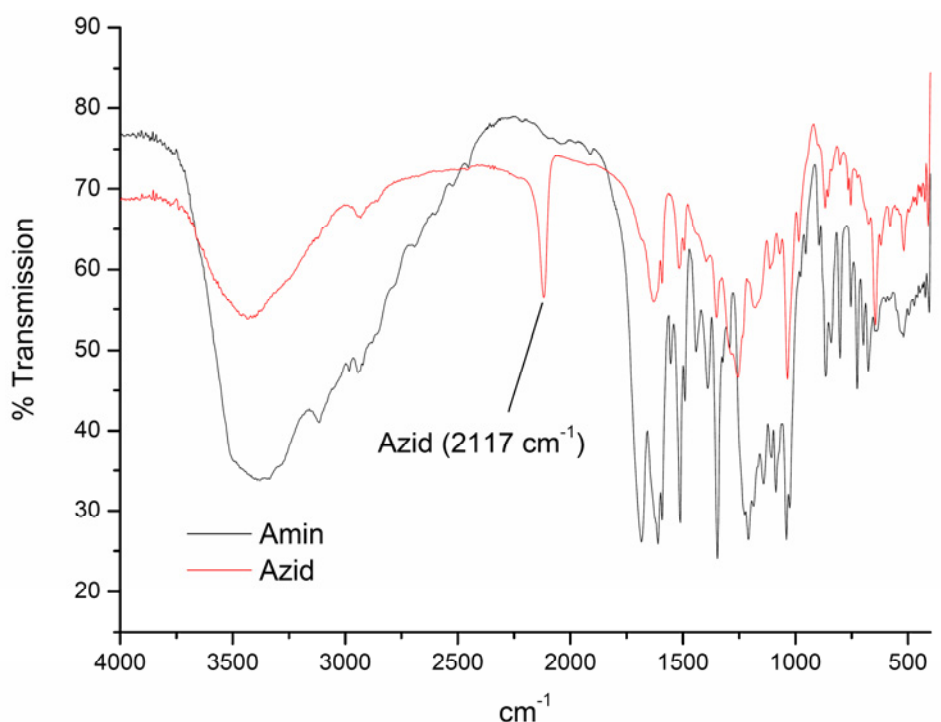


Abb. 41: Infrarotspektroskopischer Nachweis der Bildung des Azids durch charakteristische Bande

Die Triflylazidlösung in Dichlormethan wurde direkt vor der Reaktion angesetzt und in die Lösung aus Amin **27**, K₂CO₃ und CuSO₄ getropft. Das Produkt konnte nach einem Tag Reaktionszeit durch Reinigung an Biogel P2 in einer Ausbeute von 85 % isoliert werden. Die Bildung des Azids **28** wurde über die Tieffeldverschiebung von H-5 im ¹H-NMR im Vergleich mit dem Amin **27** und infrarotspektroskopisch durch die für Azide charakteristische Bande bei ca. 2100 cm⁻¹ nachgewiesen (Abbildung 41).

4.5 Selektive Acylierung der endständigen OH-Gruppe

Der entscheidende Schritt in der Darstellung des 9-*O*-acylierten Neuraminsäurederivates **29** ist die selektive Acetylierung der Hydroxyfunktion an C-9. Klassisch wird die erhöhte Reaktivität der primären OH-Gruppe genutzt, indem bei tiefen Temperaturen und verdünnter Lösung gearbeitet wird. Es scheint aber umständlich und zeitaufwändig, die optimalen Reaktionsbedingungen zu suchen. Als eleganter und schneller erwies sich der Syntheseweg über den entsprechenden Orthoester, der durch Reaktion der endständigen OH-Gruppen der Neuraminsäure mit Trialkylorthoestern selektiv dargestellt werden kann. Als Reagenz zur Acylierung wurde Trimethylorthobutytrat verwendet. Die Reaktion wurde in einigen Probeansätzen sowohl in DMSO als Lösungsmittel, als auch in Acetonitril geführt. Die in DMSO unlösliche *p*NP-Neu5Ac **6** ging nach Zugabe katalytischer Mengen *p*-Toluolsulfonsäure unter Bildung des Orthoesters **70** augenblicklich in Lösung.

Unter Zugabe von H₂O wurde **70** *in situ* zum 9-*O*-acylierten Derivat umgesetzt. Der für die säurekatalysierte Öffnung notwendige Katalysator war noch von der Bildung des Orthoesters in Lösung vorhanden und musste daher nicht mehr zusätzlich zugeführt werden. Die Reaktion wurde auf Grund der besseren Löslichkeit zunächst in DMSO geführt, wobei es sich wegen der hohen Siedetemperatur als langwierig herausstellte das Lösungsmittel zufriedenstellend im Vakuum zu entfernen. Als gute Alternative erwies sich Acetonitril, in dem das Edukt mit der Bildung des Orthoesters in Lösung ging, innerhalb von ca. 40 min quantitativ umgesetzt und anschließend hydrolysiert werden konnte. Die Reinigung der Produkte erfolgte nicht, wie von Ogura *et al.* beschrieben, über Ionenaustauscher-Harz, sondern durch säulenchromatographische Reinigung an RP-18 Kieselgel als stationäre Phase.^[92] Die Vorgehensweise zur Aufarbeitung nach Ogura *et al.* würde das Lösen des Produkts vom Harz mit einer Säure notwendig machen. Dies würde zur Spaltung der glycosidischen Bindung und

Verlust des Produkts führen. Durch die modifizierte Methode konnte Verbindung **29** in einer Ausbeute von 58 % isoliert werden.

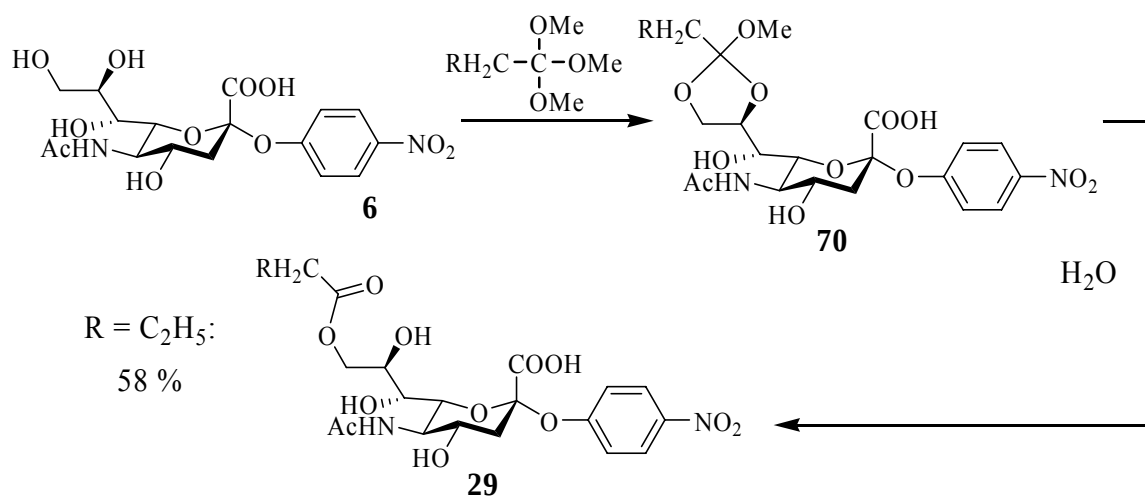


Abb. 42: Bildung und Hydrolyse des Orthoesters zur selektiven Acylierung

Die erfolgreiche regioselektive Acylierung an C-9 wurde an der Tieffeldverschiebung der Signale H-9a und H-9b im ^1H -NMR deutlich. Diese sind gegenüber den Signalen der nicht acylierten Verbindungen um ca. 0.5 ppm tieffeldverschoben. Ferner wurde diese Zuordnung durch eine HMBC-Messung belegt.

5 Enzymatische Übertragungen

Die enzymatische Übertragung der dargestellten Neuraminsäuredonoren erfolgte unter denselben Bedingungen, wie sie oben für die Darstellung der Sialylallolactose **9** beschrieben wurde. Da sich bei der Synthese von Verbindung **9** α -Methylallolactosid mit einer Ausbeute von 87 % als ausgezeichneter Akzeptor herausstellte, wurde diese auch bei den Untersuchungen zur Übertragbarkeit der verschiedenen Neuraminsäurederivate eingesetzt. So kann bei den folgenden Versuchen davon ausgegangen werden, dass die Akzeptorspezifität der Transsialidase nicht den limitierenden Faktor bei der Übertragung darstellt, sondern nahezu ausschließlich die Donorspezifität des Proteins in den Ergebnissen zum Ausdruck kommt. Die Inkubation erfolgte jeweils für 24 h, das Protein wurde anschließend durch Zugabe von Methanol denaturiert. Die Produkte wurden über Biogel P-2 größenauausschlußchromatographisch gereinigt und die Ausbeuten in Bezug auf den eingesetzten Donor bestimmt.

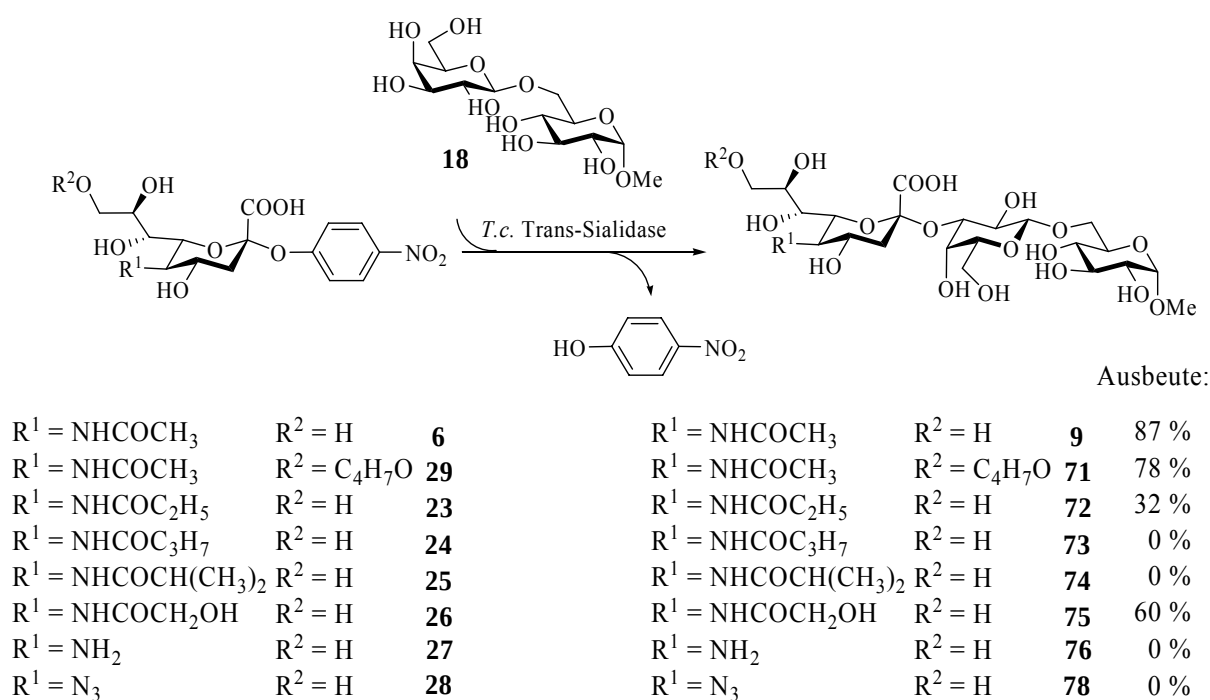


Abb. 43: Ausbeuten der enzymatischen Übertragung verschiedener Neuraminsäurederivate

Abbildung 43 zeigt die Ausbeuten der enzymatischen Übertragung der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Donorderivate der Neuraminsäure. Die Vermutungen, die sich aus der Betrachtung der oben beschriebenen Kristallstrukturen ergeben, werden durch die Ausbeuten

deutlich bestätigt. So befindet sich die Seitenkette der Neuraminsäure im Komplex mit der Trans-Sialidase auf der dem Protein abgewandten Seite. Dies spiegelt sich in einer nahezu gleich hohen Ausbeute bei dem 9-*O*-acylierten Derivat **71** im Vergleich zu Neu5Ac **9** wieder. Veränderungen am *N*-Substituenten hingegen führen entweder zu einem drastischen Einbruch in den Ausbeuten oder zu einem völligen Ausbleiben der Erkennung durch die Trans-Sialidase. Die Verlängerung der Acetylgruppe von Neu5Ac um eine Methylengruppe zu Neu5Prop führt zu einem Ausbeuteverlust von ehemals 87 % auf 32 %. Weitere Alkylverlängerungen werden nicht mehr toleriert. Die Gründe können zum einen im erhöhten sterischen Anspruch der Substituenten liegen. Zum anderen kann hier aber auch die Polarität eine wesentliche Rolle spielen. Diese Tatsache wird in der Übertragung der Glycolylneuraminsäure deutlich. Diese wird trotz des zur Propanoylneuraminsäure vergleichbaren sterischen Anspruchs in wesentlich höherer Ausbeute von 60 % übertragen. Hier könnte der größere Raumanspruch des Glycolylsubstituenten durch eine höhere Affinität des Substrats zum Protein, die durch die zusätzliche OH-Gruppe hervorgerufen wird, begründet sein.

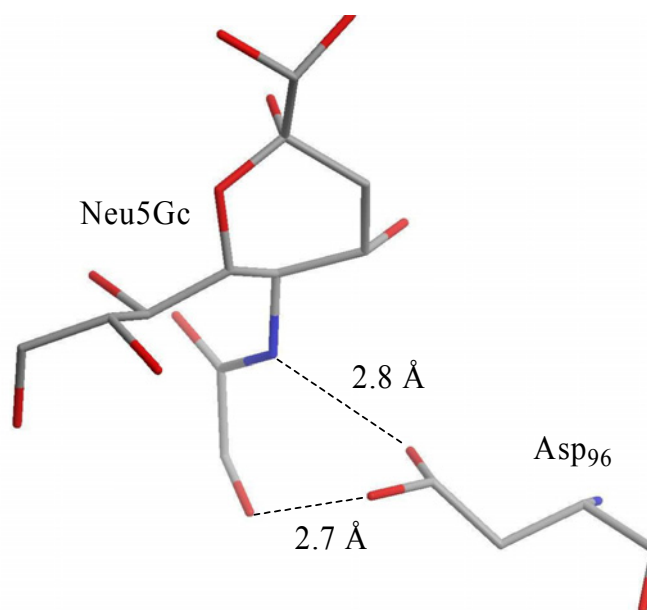


Abb. 44: H-Brücken zwischen Neu5Gc und Asp₉₆ in *T.c.* Trans-Sialidase

Abbildung 44 zeigt, basierend auf der Kristallstruktur von Sialyllactose in Komplex mit *T.c.* Trans-Sialidase, die entsprechenden Verhältnisse für Neu5Gc an Stelle von Neu5Ac. Die Asparaginsäure (Asp₉₆), die für die Bindung zum amidischen Stickstoff verantwortlich ist, liegt ebenso in der Reichweite zur zusätzlichen Hydroxylgruppe und erleichtert so über Wasserstoffbrücken die Bindung der Glycolylneuraminsäure an das Protein. Die Sauerstoffe

der freien Säure von Asp₉₆ befinden sich jeweils im Abstand von ca. 2.8 Å zum Stickstoff und zum Sauerstoff der OH-Gruppe des Glycolylsubstituenten.

Amin **27** und Azid **28** der Neuraminsäure sind nicht in der Lage Wasserstoffbrücken mit Asp₉₆ auszubilden und werden in der Folge nicht übertragen.

6 NMR-spektroskopische Reaktionsverfolgung

Die aus der enzymatischen Übertragung resultierenden Ausbeuten spiegeln im Wesentlichen die Vorstellungen, die sich aus Betrachtung der Kristallstrukturen ergeben, wider. Sie stellen aber lediglich eine „Momentaufnahme“ nach 24 h Reaktionszeit dar. Um Reaktionsverläufe direkt vergleichen zu können ist eine kontinuierliche Verfolgung der Reaktion notwendig. Hierfür kommen vor allem Reaktionsverfolgungen mittels HPLC oder ¹H-NMR in Frage. Die Verfolgung mittels NMR-Spektroskopie bietet gegenüber einer Verfolgung mit Hilfe der HPLC zahlreiche Vorteile. So lassen sich die einzelnen Signale direkt, oder indirekt über 2D-Experimente, bestimmten Verbindungen zuordnen. Bei Verwendung der HPLC-Technik müssen diese Verbindungen getrennt dargestellt und die Retentionszeiten bestimmt werden um Signale sicher zuordnen zu können. Unter Umständen kann bei der Verfolgung von enzymatischen Glycosylierungen die Bildung von Regioisomeren eine Trennung an der HPLC erschweren. Eine Trennung der in der Reaktionslösung enthaltenen Verbindungen ist bei Verwendung von NMR nicht notwendig.

Beispielsweise wurde der Nachweis der Hydrolyse von glycosidischen Bindungen der Neuraminsäure unter Retention an C-2 durch Sialidase aus *Salmonella typhimurium* durch Verfolgung der Reaktion mittels NMR durch Wilson *et al.* erbracht.^[118] Hier konnte allein durch die Lage der charakteristischen Signale der axialen und äquatorialen Protonen der Neuraminsäure an C-3 zwischen den Anomeren unterschieden und deren Umwandlung ineinander verfolgt werden. Die Informationen über solche dynamischen Gleichgewichte gehen bei HPLC-Messungen verloren und können daher mit dieser Methode nicht verfolgt werden. Die Umsätze zu definierten Zeiten werden über Vergleich der entsprechenden Signale im NMR-Spektrum bestimmt. Haselhorst *et al.* untersuchten die Hydrolyse verschiedener Neu5Ac-Derivate durch *T.c.* Trans-Sialidase ebenfalls an Hand der charakteristischen Signale der Protonen der Neuraminsäure an C-3 und deren Integration.^[26] In Kombination mit STD-NMR-Experimenten erwies sich diese Methode als sehr brauchbar und die resultierenden Ergebnisse wurden parallel durch die von Amaya *et al.* veröffentlichte

Kristallstruktur untermauert.^[19] Im Rahmen der Dissertation von Björn Neubacher im AK Thiem an der Universität Hamburg wurden mit dieser Methode die zeitlichen Verläufe von Übertragung und Hydrolyse verschiedener Donorderivate untersucht.^[91] Die Reaktionen wurden, wie in den oben beschriebenen Arbeiten, direkt in der Probe geführt, an der die Messungen vorgenommen wurden. Der entscheidende Nachteil dieses Verfahrens liegt in der kontinuierlichen Veränderung der Zusammensetzung der Probe. Dies macht weitere Untersuchungen, zum Beispiel durch 2D-Experimente unmöglich. Zudem ist die Zahl der „Scans“ eingeschränkt, was zu einem größeren Fehler der Integrale und damit der Bestimmung der Mengenverhältnisse in der Probe führt. Es ist also erstrebenswert die Proben zu jeweils definierten Zeitpunkten „einzufrieren“. Dies ermöglicht beliebig viele „Scans“ und damit eine sehr hohe Genauigkeit. Zusätzlich können weitere Experimente durchgeführt werden, die bei einer sich kontinuierlich verändernden Probe nicht möglich wären.

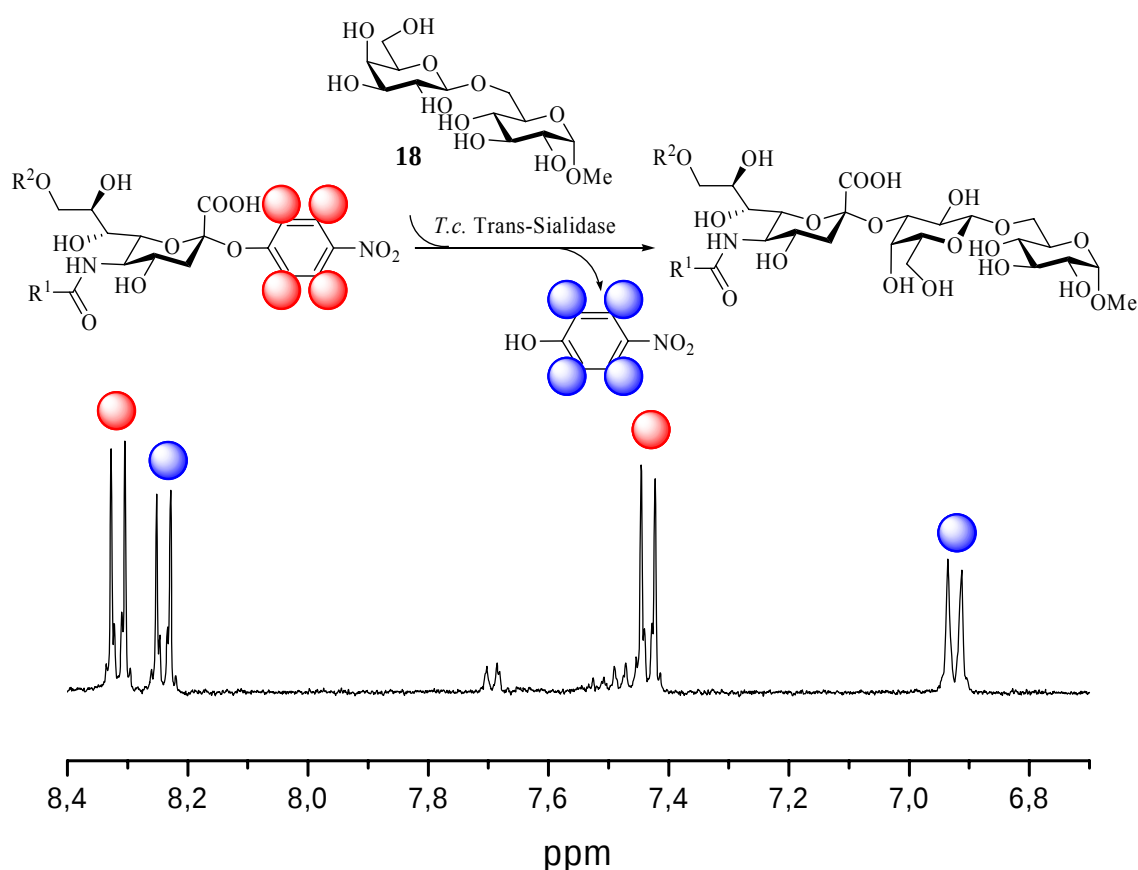


Abb. 45: NMR-Verfolgung an Hand der aromatischen Signale im ¹H-NMR

Aus diesen Gründen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht auf die herkömmliche Methode der NMR-Verfolgung zurückgegriffen. Substrate und Enzym wurden unter den gleichen Bedingungen inkubiert, wie sie oben für die dargestellten Trisaccharide beschrieben wurden. Zuvor wurden sowohl die Puffer- als auch Enzymlösung gefriergetrocknet, in D_2O gelöst und erneut gefriergetrocknet. 25 μmol Donorsubstrat wurden mit 35 μmol Akzeptor in 1 mL deuteriertem Tris-HCl-Puffer gelöst und mit 80 μL Enzymlösung in D_2O versetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurden 100 μL Reaktionslösung entnommen und in zuvor mit einem Gemisch aus $\text{MeOD}/D_2O = 1/1$ präparierte NMR-Röhrchen überführt. Hier wird das Protein durch MeOD denaturiert und der Zustand zu diesem Zeitpunkt „eingefroren“. Ein weiterer Vorteil liegt in der Tatsache, dass Messpunkte in beliebig kurzen Abständen genommen werden können. Diese sind lediglich durch das Überführen in die präparierten NMR-Röhrchen begrenzt. Abbildung 45 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt aus dem aromatischen Bereich eines NMR-Spektrums bei einem Umsatz von 45 %.

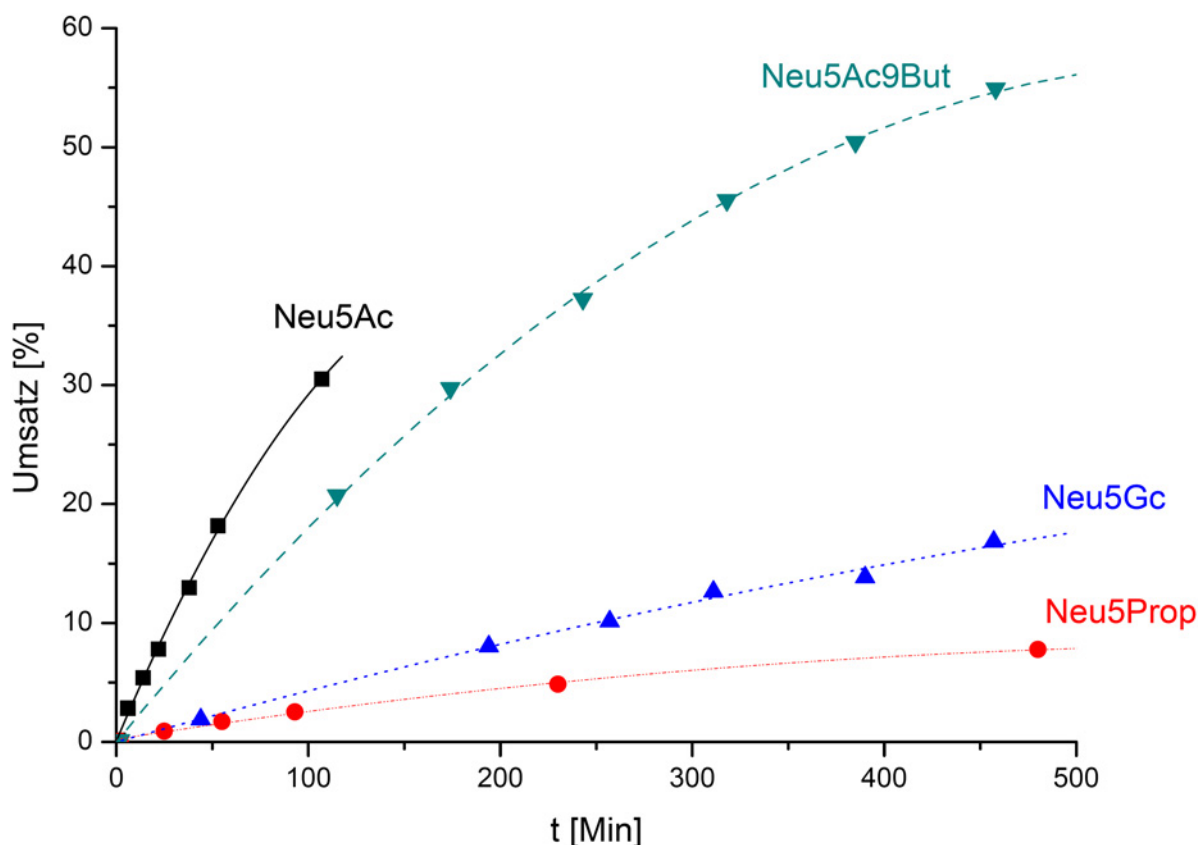


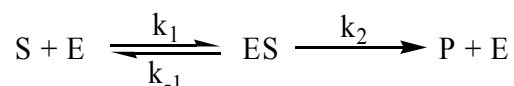
Abb. 46: NMR-Verfolgung an Hand der aromatischen Signale im ^1H -NMR

Abbildung 46 zeigt die mit Hilfe der beschriebenen Methode ermittelten Umsätze in zeitlicher Abhängigkeit. Die Verläufe spiegeln im Wesentlichen die Ergebnisse wieder, die aus der Bestimmung der Ausbeuten nach 24 h gewonnen wurden. Zu nennen sind hier die geringe

Auswirkung der 9-*O*-Acylierung auf die Reaktionsgeschwindigkeit und die schnellere Übertragung von Neu5Gc im Vergleich zu Neu5Prop trotz des vergleichbaren Raumanpruches der Substituenten. Aus den Reaktionsverläufen würden sich allerdings geringere Ausbeuten ergeben, als in den Versuchen zum Umsatz nach 24 h tatsächlich ermittelt wurden. Dies ist auf den Isotopeneffekt von Proton und Deuteronen zurückzuführen. Protonen sind sehr kleine Atome mit einer großen räumlichen Unbestimmtheit und gehorchen daher nicht mehr ausschließlich dem klassischen Modell. Ein Maß für diese Unbestimmtheit ist die deBroglie-Wellenlänge $\lambda = h / \sqrt{2mE}$, in der „h“ als Planck-Konstante, „m“ als Masse des betrachteten Teilchens und „E“ als seine Energie definiert sind. Bei der Annahme einer Energie von 20 kJ/mol ergeben sich daraus 0.63 Å für Protonen und 0.45 Å für Deuteronen. Da Protonen gewöhnlicher Weise über Abstände dieser Größenordnung hinweg übertragen werden, zeigen solche Reaktionen häufig ein nichtklassisches Verhalten, in dem der Isotopeneffekt besonders deutlich zum Ausdruck kommt.^[119] Dieser führt auch bei enzymatischen Reaktionen, in denen Protonenübertragungen eine Rolle spielen, zu einer Minderung der Reaktivität in deuterierten Lösungsmitteln.^[120-122]

7 Enzymkinetik

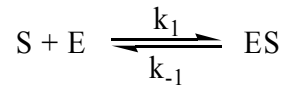
Enzymatische Umsetzungen werden üblicherweise durch die Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben. Nach ersten Untersuchungen enzymatischer Reaktionen^[123, 124] führten Michaelis und Menten eine genauere Untersuchung der Saccharosehydrolyse durch. Mit Hilfe der gewonnenen Daten gelang es ihnen eine mathematische Beschreibung enzymkatalysierter Reaktionen zu entwickeln.^[125] Demnach folgt der Bildung eines Enzym-Substratkomplexes ES die Umsetzung zum Produkt:



k_1 , k_{-1} und k_2 bilden hierbei die Geschwindigkeitskonstanten der Einzelreaktionen. Weiteren Annahmen durch Briggs *et al.* folgend lautet die heute übliche Form der Michaelis-Menten Gleichung, durch die die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration beschrieben wird:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

$v_{\max}$ stellt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung, die praktisch nie erreicht wird, und K_M die Michaelis-Menten-Konstante dar. Michaelis und Menten vernachlässigten in ihrer ursprünglichen Theorie, in ihrem speziellen Fall zufällig berechtigt, die Dissoziation von ES zum freien Enzym und Produkt und berücksichtigten so nur die Bildung und die Dissoziation von ES:



Es ergibt sich daraus:

$$K_s = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Die Erweiterung von Briggs *et al.* führte zur Einbeziehung von k_2 und damit zu:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Die Michaelis-Menten-Gleichung ist exakt nur für Anfangsgeschwindigkeiten enzymatischer Reaktionen gültig. Die Gründe liegen zum einen in der Rückreaktion und zum anderen in einer eventuellen Produkthemmung.

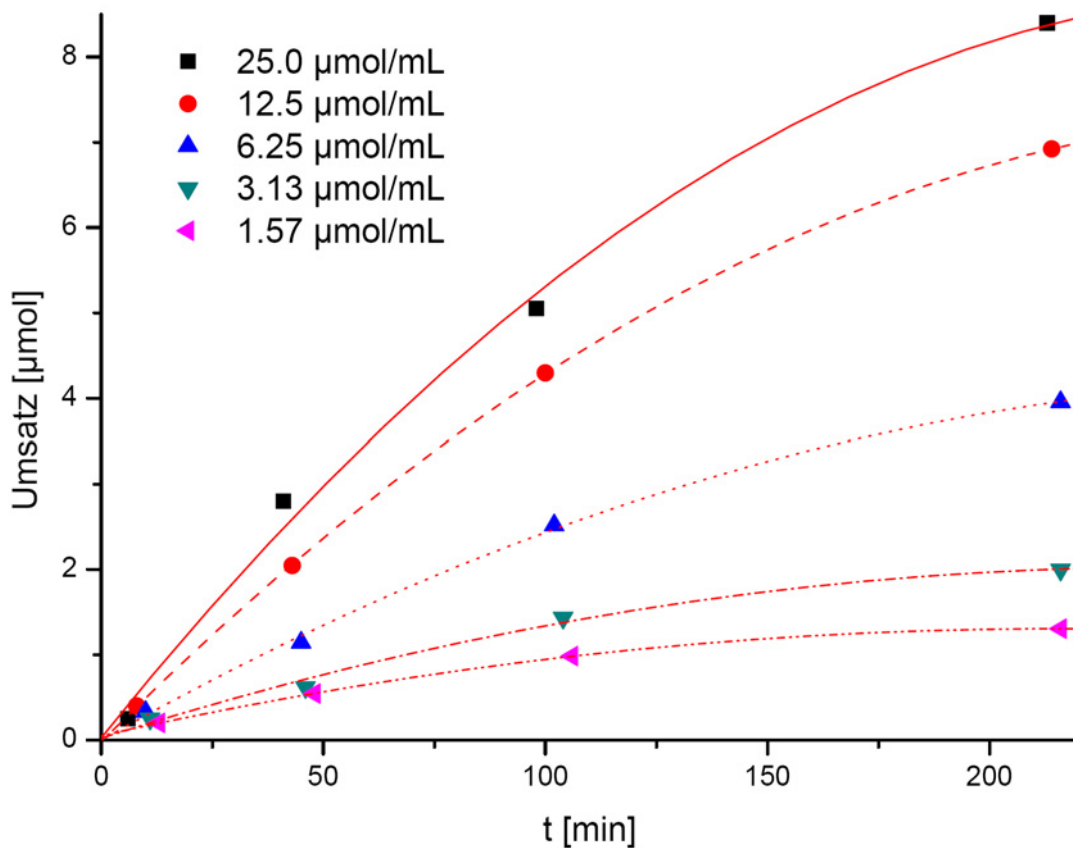


Abb. 47: Zeitabhängiger Umsatz bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (pNP-Neu5Ac 6)

Die charakteristischen Größen der Michaelis-Menten-Gleichung, K_M und $v_{\max}$, werden unter der Annahme der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration durch die Änderung der Konzentrationsverhältnisse bestimmt. Die kinetischen Daten für die Donorsubstrate **6**, **29**, **23** und **26** wurden durch die Verfolgung der enzymatischen Übertragung der Sialinsäurederivate bei verschiedenen Substratkonzentrationen gewonnen. Abbildung 47 zeigt beispielhaft die Übertragung von Neu5Ac bei definierten Substratkonzentrationen. Die jeweiligen Ableitungen im Nullpunkt ergeben die Startgeschwindigkeiten für die sich durch die Verdünnungsreihe ergebenden Substratkonzentrationen. Diese lassen sich in einem Michaelis-Menten-Diagramm (Abbildung 48) darstellen.

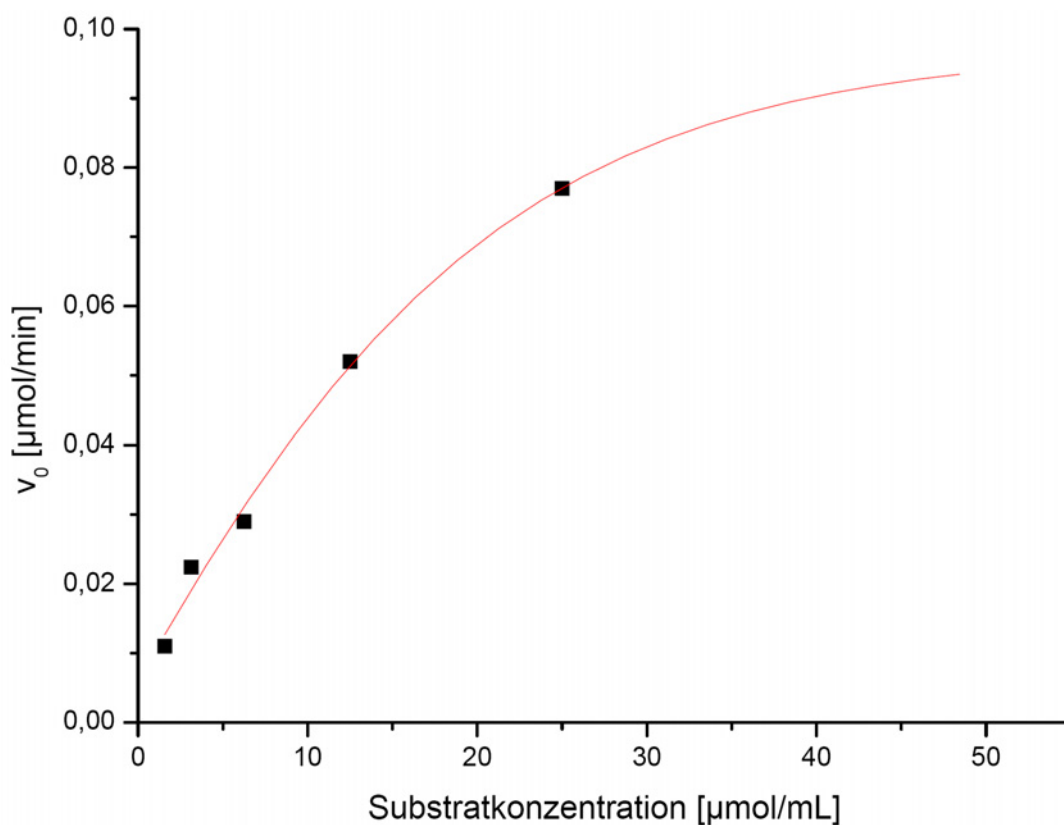


Abb. 48: Startgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration (pNP-Neu5Ac)

Üblicherweise werden K_M und $v_{\max}$ nicht direkt dem Michaelis-Menten-Diagramm entnommen. Es haben sich verschiedene Verfahren zur Linearisierung der Messwerte etabliert. Verfahren zur Ermittlung kinetischer Daten über die Linearisierung von Messpunkten stammen aus der Zeit, in der die Nicht-Lineare-Regression mit Hilfe von Rechnern nicht möglich war. Am weitesten verbreitet ist die doppelt-reziproke Auftragung

nach Lineweaver und Burk.^[126] Die Linearisierung erfolgt hier durch Kehrwertbildung der Michaelis-Menten-Gleichung:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Entsprechend lassen sich $v_{\max}$ und K_M aus dem y-Achsenabschnitt und der Steigung berechnen. Abbildung 49 zeigt die Auftragungen nach Lineweaver und Burk für alle untersuchten Donorderivate.

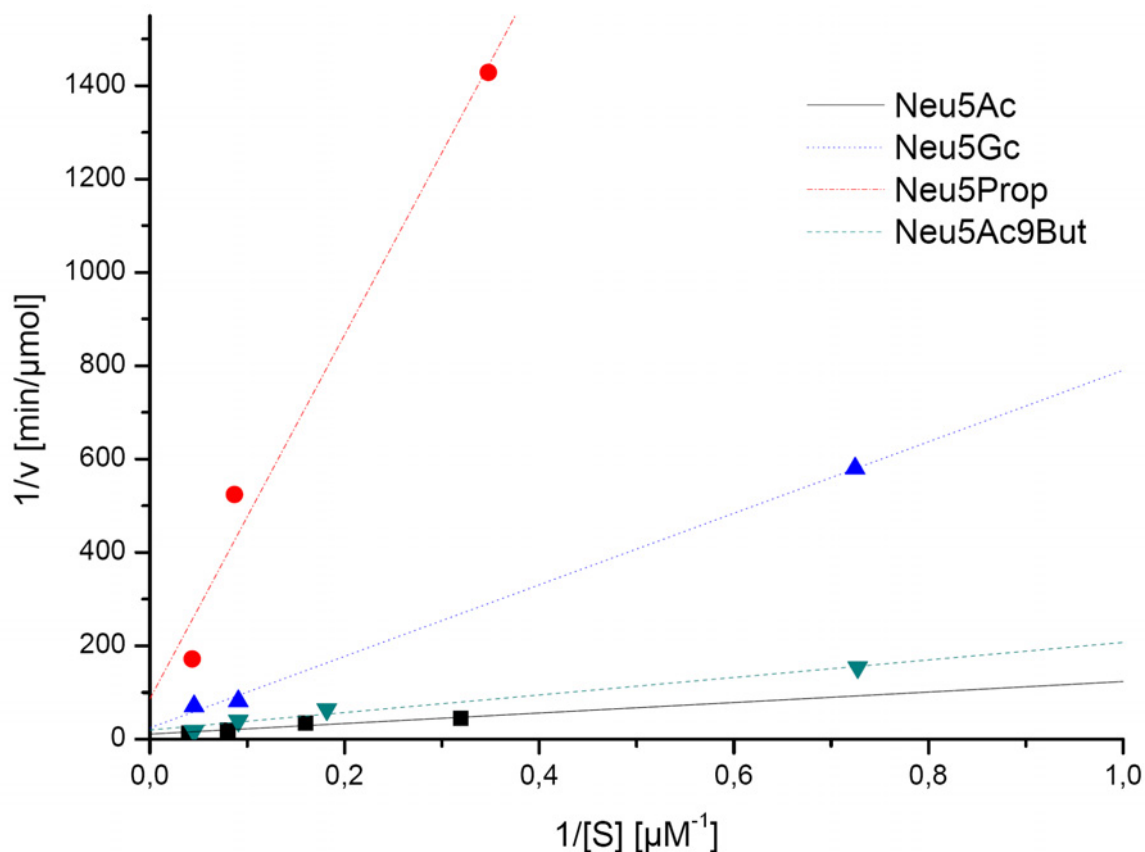


Abb. 49: Lineweaver-Burk-Diagramm für untersuchte Donorderivate

Die auf diese Weise erhaltenen kinetischen Daten sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Diese spiegeln im Wesentlichen die Beobachtungen aus der Konzentrationsverfolgung der enzymatischen Übertragung (Abbildung 46) wieder.

	K_M [nM]	$v_{\max}$ [nmol/min]
<i>p</i> NP-Neu5Ac	10	91
<i>p</i> NP-Neu5Gc	31	41
<i>p</i> NP-Neu5Prop	45	12
<i>p</i> NP-Neu5Ac9But	10	51

Tabelle 2: Kinetische Daten der untersuchten Donorderivate

8 Zusammenfassung

Trans-Sialidase ist ein membrangebundenes Enzym, das zur Superfamilie der Sialidasen gehört und *in vivo* für die Übertragung von Neu5Ac verantwortlich ist. Auf Grund ihrer Regio- und Stereospezifität stellt sie eine interessante Alternative zur chemischen Synthese sialylierter Oligosaccharide dar. Diese Eigenschaft wurde im Rahmen dieser Arbeit als Teil einer Kooperation mit dem Massachusetts Institute of Technology (Department of Brain & Cognitive Sciences) zur chemoenzymatischen Synthese von Sialylallolactose genutzt. Die enzymatische Übertragung von Neu5Ac gelang in einer Ausbeute von 87 %. Des Weiteren gelang es, verschiedene Neuraminsäurederivate darzustellen und als *p*NP-Glycoside für die enzymatische Umsetzung mit Trans-Sialidase aus *T.c.* zu aktivieren. Unter anderem gelang es, die biologisch sehr relevante Glycolylneuraminsäure auf diese Weise in einer Ausbeute von 60 % auf Allolactose als Akzeptor zu übertragen. Neu5Prop wurde in einer Ausbeute von 32 % transglycosyliert. Im Vergleich mit Neu5Gc stellt dieser Befund ein interessantes Ergebnis dar. Der vergleichbare Raumanspruch der Acylkomponenten der Neuraminsäure würde einen solchen Unterschied nicht rechtfertigen. Hier spielt die zusätzliche OH-Gruppe eine wesentliche Rolle. Anzunehmen ist eine höhere Affinität durch Stabilisierung über Wasserstoffbrücken durch Asp₉₆, das bei Neu5Ac für die Fixierung des amidischen Stickstoffes in der Bindungstasche der Trans-Sialidase verantwortlich ist. Derivatisierungen durch 9-*O*-Acylierung zeigten kaum Auswirkungen auf die erhaltenen Ausbeuten. So konnte Neu5Ac9But in einer Ausbeute von 78 % auf Allolactose übertragen werden. Die Ausbeuten spiegeln damit die Erwartungen wieder, die sich aus der Betrachtung der Kristallstrukturen von Trans-Sialidase aus *T.c.* ergeben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen somit die Nützlichkeit der Trans-Sialidase in der Darstellung sialylierter Oligosaccharide, insbesondere einiger nichtnatürlicher Derivate der Neuraminsäure. Zusätzlich können Rückschlüsse gezogen werden, die weitere Ansätze für das Design von Inhibitoren der Trans-Sialidase bieten. Zu nennen ist hier vor allem der Befund der besseren Übertragbarkeit von Neu5Gc gegenüber Neu5Prop, der Hinweis auf einen nicht unerheblichen Einfluss von Asp₉₆ ist.

Die Modifizierung der NMR-Verfolgung der enzymatischen Übertragung von Neu5Ac ermöglicht es Messpunkte in sehr kurzen zeitlichen Abständen zu nehmen, die sich dann in ihrer Zusammensetzung nicht mehr verändern. Dies ermöglicht weitere Untersuchungen, zum Beispiel die Bestimmung von Regioisomeren mit Hilfe von 2D-Experimenten. Zusätzlich ist

die Zahl der „Scans“ nicht beschränkt und es können daher sehr viel geringere Konzentrationen mit einem geringeren Fehler in den Integralen detektiert werden. Der geringere Fehler wird vor allem im Vergleich mit bei Reaktionsverfolgungen ebenfalls eingesetzten HPLC-Untersuchungen deutlich. Diese weisen einen sehr viel größeren Fehler auf und sind mit einem deutlich höheren Zeitaufwand verbunden.

9 Summary

Trans sialidase is a membrane-bound enzyme which belongs to the super family of sialidases and is, *in vivo*, responsible for the transfer of Neu5Ac. Because of its regio- and stereospecificity it presents an interesting alternative to the chemical synthesis of sialylated oligosaccharides. This characteristic was used here, in cooperation with the Massachusetts Institute of Technology (Department of Brain & Cognitive Sciences), in order to chemo-enzymatically synthesise sialylallolactose. In this case, the enzymatic transfer of Neu5Ac succeeded with a 87 % yield. Additionally, various neuraminic acid derivatives were synthesised and activated as *p*NP-glycosides for the enzymatic transformation with trans sialidase of *T.c.* Furthermore, the biologically highly relevant glycolyl neuraminic acid was successfully transferred with a 60 % yield onto the acceptor allolactose. Neu5Prop was transglycosylated with a yield of 32 %. The difference to the respective results of Neu5Gc is significant. The respective steric demand of the acyl components of the neuraminic acid does not explain this difference. Apparently, the additional OH group is of importance. A higher affinity due to the stabilisation by hydrogen bonds via Asp₉₆ is likely, which is responsible for the fixation of amidic nitrogen in the binding pocket of the trans sialidase.

The resulting yields hardly differed when derivatives of 9-*O*-acylation were tested. This way, Neu5Ac9But could be transferred onto allolactose in 78 % yield. The expectations of yield raised by the observation of crystalline trans sialidase of *T.c.* could be satisfied. Therefore, the conclusion of this study confirms the importance of trans sialidase in the synthesis of sialylated oligosaccharides, especially of certain unnatural derivatives. Moreover, inferences about the further design of inhibitors of trans sialidase can be made. Especially the higher transfer of Neu5Gc in comparison to Neu5Prop is significant, as it indicates the relevance of Asp₉₆.

The modification of kinetic NMR studies of the enzymatic transfer of Neu5Gc enables measurements within short intervals and constant sample composition. This enables further investigations, e.g. determination of regioisomers with the use of 2D experiments. Additionally, the number of scans is not limited and therefore much smaller concentrations can be detected with reduced errors for integration.

10 Experimenteller Teil

10.1 Allgemeine Methoden

Reaktionsführung:

Mit Ausnahme von Reaktionen, die in wässrigem Medium geführt wurden, kamen absolutierte Lösungsmittel unter Anwendung der Schlenk-Technik zum Einsatz. Lyophilisiert wurde an einer Alpha 1-4 LD (Christ).

Enzymatische Reaktionen wurden in einem Eppendorf Thermomixer Comfort in Eppendorf Einweggefäßen geführt. Pufferlösungen wurden mit bidestilliertem Wasser frisch angesetzt und pH-Werte mit einem Toledo MP220-pH-Meter bestimmt. Zentrifugiert wurde mit einer Eppendorf Centrifuge 5417 R.

Chromatographie:

Reaktionen wurden auf DC-Alufolien (Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) / RP-18 F_{254s} (Merck)) verfolgt. Die Detektion erfolgte mittels Besprühen mit 20%iger ethanolischer Schwefelsäure mit anschließender Wärmebehandlung oder durch Detektion im UV-Licht.

Die säulenchromatographische Reinigung der Produkte erfolgte nach der Flash-Methode mit Kieselgel Silica 32-63, 60 Å (ICN) oder Kieselgel 60 RP-18 (40-63 µm) (Merck) und den jeweils angegebenen Laufmitteln. Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch mit den oben angegebenen Mitteln detektiert.

Spektroskopie:

Die Messung der ¹H-NMR-Spektren (400 MHz) und der ¹³C-NMR-Spektren (101 MHz) erfolgten an einem AMX-400 der Firma Bruker. ¹H-NMR-Spektren (500 MHz) wurden auf einem DRX-500 der Firma Bruker gemessen. Die Signale konnten mit Hilfe von HH-COSY-, CH-COSY-, HMBC-, und HMQC-Experimenten zugeordnet werden. Die Spektren wurden

ohne Verwendung von Tetramethylsilan als Standard auf die jeweiligen charakteristischen Lösungsmittelsignale kalibriert.

Massenspektrometrie:

MALDI-TOF-MS wurde mit einem Bruker Biflex III (positive reflector mode, Matrix: 2,5-Dihydroxybenzoesäure, DHB) durchgeführt

Analytik:

Die Bestimmung der Drehwerte erfolgte an einem Perkin-Elmer-Polarimeter mit Hg-Lampe (546 nm, Küvettenlänge: 1 dm) bei 20 °C. Die Ermittlung der Schmelzpunkte wurde an einem Schmelzpunktbestimmer der Firma Apotec durchgeführt.

10.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Acetylierung freier OH-Gruppen

Die freien Verbindungen wurden in Pyridin gelöst und unter Eiskühlung mit einem Überschuss Ac_2O versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei RT gerührt und die Reaktion durch kodestillatives Entfernen des Lösungsmittels mit Toluol beendet. Unter Umständen erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung des Produkts.

AAV 2: Deacetylierung nach Zemplén

Die acylierten Verbindungen wurden in Methanol gelöst und mit frisch angesetzter methanolischer Natriummethanolatlösung versetzt und so auf einen pH-Wert von 8-9 eingestellt. Nach dünnschichtchromatographischer Prüfung auf Vollständigkeit der Reaktion wurde sie durch Neutralisation mit Amberlite IR 120 (H^+) beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und die Produkte säulenchromatographisch gereinigt.

AAV 3: Verseifung der Methylester

Die Edukte wurden in 0.1 M NaOH gelöst und bei RT gerührt. Die Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch verfolgt. Bei vollständigem Umsatz wurde die Reaktion durch Neutralisation mit Amberlite IR 120 (H^+) abgebrochen. Die Reaktionslösung wurde Gefriergetrocknet.

AAV 4: Transglycosylierung mit Trans-Sialidase aus *T. cruzi*

Zur Synthese der sialylierten Oligosaccharide wurden 25 μmol des jeweiligen Akzeptors mit 35 μmol des Akzeptors in 1 mL Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH = 7.5) gelöst. Die Lösung wurde mit 80 μL Enzymlösung (1.3 mg/mL Enzym) versetzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Laufmittel: Butanol/Essigsäure/Wasser = 5/2/2). Sie wurde durch Zugabe von Methanol abgebrochen, die Lösung zentrifugiert und vom denaturierten Protein abgetrennt. Die Reinigung erfolgte größenausschlusschromatographisch über Biogel P-2.

10.3 Spezielle Arbeitsvorschriften

Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2-chlor-3,5-didesoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat (**4**)

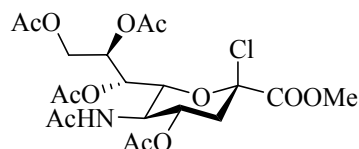
$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{ClNO}_{12}$ (509.13)

Ausbeute: 4.24 g (8.33 mmol, 97 %)

bräunlicher Feststoff, Smp.: 61 °C

R_f = 0.40 (Toluol/Aceton = 3/2)

$[\alpha]_{546}^{20} = -61$ (c 1, CHCl_3) Lit^[87]: $[\alpha]_D^{20} = -63$ (c 1, CHCl_3)



4.60 g (8.63 mmol) **20 α /20 β** werden bei 0 °C in 65 mL (0.91 mol) AcCl gelöst und tropfenweise mit 1.2 mL (30 mmol) MeOH versetzt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend bei geschlossenem Reaktionsgefäß ca. 17 h bei RT gerührt. Durch Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird die Reaktion abgebrochen und das Produkt getrocknet. Anschließend wird die Reaktion von neuem gestartet und nach 16 h wie oben abgebrochen. Lösungsmittelreste werden im Vakuum entfernt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.28 (dd, 1H, H-7); 5.21 (m, 2H, H-4/NH); 4.98 (ddd, 1H, H-8); 4.23 (dd, 1H, H-9a); 4.16 (dd, 1H, H-6); 4.01 (dd, 1H, H-5); 3.87 (dd, 1H, H-9b); 3.69 (s, 3H, COOCH_3); 2.59 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.09 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.93, 1.89, 1.86, 1.85, 1.72 (je s, 3H, COCH_3).

$^2J_{3ax,3eq} = 14.0$ Hz; $^3J_{3ax,4} = 10.9$ Hz; $^3J_{3eq,4} = 5.1$ Hz; $^3J_{4,5} = 10.7$ Hz; $^3J_{5,6} = 10.9$ Hz; $^3J_{6,7} = 2.7$ Hz; $^3J_{7,8} = 7.1$ Hz; $^3J_{8,9a} = 2.8$ Hz; $^3J_{8,9b} = 6.4$ Hz; $^2J_{9a,9b} = 12.6$ Hz.

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 97.00 (C-2); 70.30 (C-6); 70.25 (C-8); 69.14 (C-4); 67.23 (C-7); 62.46 (C-9); 54.22 (COOCH_3); 49.23 (C-5); 41.07 (C-3); 23.58 (COCH_3); 21.35, 21.24, 21.20, 21.17 (je COCH_3).

4-Nitrophenyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure) (6)

$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{11}$ (430.12)

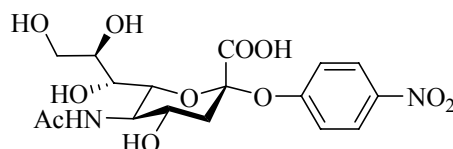
Ausbeute: 320 mg (0.74 mmol, 89 %)

farbloser Feststoff, Smp.: 136 °C

$R_f = 0.65$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 10/10/1$)

$[\alpha]_{546}^{20} = +98$ (c 1, H_2O) Lit^[86]: $[\alpha]_D^{20} = -53$ (c 1, MeOH)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 453.5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$



Unter Rühren werden 370 mg (0.83 mmol) **22** in 60 mL 0.1 M NaOH nach AAV3 gelöst und unter DC-Kontrolle (Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 10/10/1$) bei RT gerührt. Nach 50 Minuten wird mit Ionentauscher Amberlite IR 120 (H^+) neutralisiert und anschließend lyophilisiert.

^1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8.21 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.28 (d, 2H, H-b_{arom}); 4.21 (dd, 1H, H-6); 3.97 (dd, 1H, H-5); 3.87-3.80 (m, 3H, H-4/H-8/H-9a); 3.62 (dd, 1H, H-9b); 3.58 (dd, 1H, H-7); 2.83 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.05 (dd, 1H, H-3_{ax}); 2.04 (s, 3H, COCH_3).

$^2J_{3ax,3eq} = 13.0$ Hz; $^3J_{3ax,4} = 12.7$ Hz; $^3J_{3eq,4} = 4.8$ Hz; $^3J_{4,5} = 10.4$ Hz; $^3J_{5,6} = 10.4$ Hz; $^3J_{6,7} = 1.5$ Hz; $^3J_{7,8} = 8.9$ Hz; $^3J_{8,9b} = 6.6$ Hz; $^2J_{9a,9b} = 12.4$ Hz; $^3J_{(\text{Ha,Hb})\text{arom}} = 9.4$ Hz.

^{13}C -NMR (101 MHz, D_2O): δ [ppm] = 125.99 (C-a_{arom}); 120.18 (C-b_{arom}); 74.28 (C-6); 71.43 (C-8); 68.56 (C-7); 67.68 (C-4); 63.29 (C-9); 52.01 (C-5); 40.86 (C-3); 22.42 (COCH_3).

Methyl-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-galacto-D-glycero-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-6)- α -D-glucopyranosid (**9**)

$\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{NO}_{19}$ (647.58)

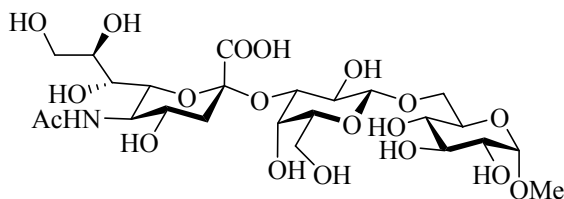
farbloser Feststoff, Smp.: 142 °C

R_f (BuOH/AcOH/ H_2O = 5/2/2) = 0.10

$[\alpha]_{546}^{20}$: +33 (c 1, H_2O)

Ausbeute: 14 mg (22 μmol , 87 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 670.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 686.3 $[\text{M}+\text{K}]^+$



11 mg (25 μmol) **6** werden mit 13 mg (35 μmol) α -Methyl-allolactosid (**18**) in 1 mL Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) nach AAV4 inkubiert. Durch Zugabe von 1.5 mL Ethanol wird die Reaktion beendet. Die Lösung wird 30 min. zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen. Dieser wird lyophilisiert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt an Biogel P2 (Laufmittel: H_2O).

^1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ [ppm] = 4.85 (d, 1H, H-1); 4.54 (d, 1H, H-1'); 4.22 (dd, 1H, H-6a); 4.14 (dd, 1H, H-3'); 4.00 (m, 17H, H-2/H-2'/H-3/H-4/H-4'/H-4''/H-5/H-5'/H-5''/H-6b/H-6'a/H-6'b/H-6''/H-7'/H-8''/H-9''a/H-9''b); 3.47 (s, 3H, OCH_3); 2.81 (dd, 1H, H-3''eq); 2.08 (s, 3H, COCH_3); 1.84 (dd, 1H, H-3''ax).

$^3J_{1,2} = 1.8$; $^3J_{1',2'} = 8.0$; $^3J_{2',3'} = 9.8$; $^3J_{3',4'} = 3.3$; $^3J_{3'',ax,4''} = 12.1$; $^2J_{3'',ax,3''eq} = 12.3$; $^3J_{3''eq,4''} = 4.5$; $^3J_{5,6a} = 2.0$; $^2J_{6a,6b}$ 11.8 Hz.

^{13}C -NMR (101 MHz, D_2O): δ [ppm] = 103.39 (C-1'); 100.10 (C-2''); 99.76 (C-1); 76.17 (C-3'); 75.29 (C-7''); 73.25, 73.23 (C-5'/C-6''); 72.15 (C-5); 71.49, 70.94, 69.52 (C-2/C-2'/C-8''); 69.45 (C-4); 68.69 (C-3); 68.56 (C-6); 68.41 (C-4''); 67.86 (C-4'); 62.91 (C-6'); 61.36 (C-9''); 55.63 (OCH_3); 52.03 (C-5''); 40.09 (C-3''); 22.40 (COCH_3).

Methyl-6-*O*-trityl- α -D-glucopyranosid (**14**)

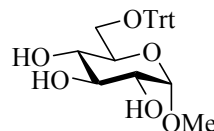
C₂₆H₂₈O₆ (436.19)

farbloser Feststoff, Smp.: 84 °C

R_f (CHCl₃/MeOH = 5/1) = 0.63

[α]₅₄₆²⁰: +27 (*c* 1, MeOH)

Ausbeute: 10.3 g (23.6 mmol, 86 %)



5.34 g (27.5 mmol) Methyl- α -D-glucopyranosid (**13**) und 9.22 g (33.0 mmol) Tritylchlorid werden in 40 mL abs. Pyridin gelöst und bei 40 °C 15 h gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Methanol und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum abgebrochen. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: CHCl₃/MeOH = 5/1) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 7.47 (dd, 6H, Trityl-ortho); 7.28 (dd, 6H, Trityl-meta); 7.22 (dddd, 3H, Trityl-para); 4.75 (d, 1H, H-1); 3.75 (ddd, 1H, H-5); 3.60 (dd, 1H, H-3); 3.51 (s, 3H, OCH₃); 3.43 (dd, 1H, H-2); 3.39 (dd, 1H, H-6a); 3.26 (dd, 1H, H-5); 3.22 (dd, 1H, H-6b).

³J_{1,2} = 3.8; ³J_{2,3} = 9.5; ³J_{3,4} = 9.4; ³J_{4,5} = 10.2; ³J_{5,6a} = 2.0; ³J_{5,6b} = 6.6; ²J_{6a,6b} = 9.9; ³J_{m,o} = 8.6; ³J_{m,p} = 8.6; ⁴J_{o,p} = 1.2 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 146.00 (C_{arom}CPh₂); 130.37 (C-ortho); 129.13 (C-meta); 128.43 (C-para); 101.55 (C-1); 88.09 (CPh₃); 75.85 (C-3); 74.01 (C-2); 72.93 (C-5); 72.69 (C-4); 65.36 (C-6); 55.84 (CH₃).

Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-6-*O*-trityl- α -D-glucopyranosid (**15**)

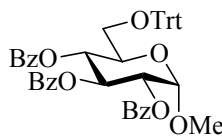
C₄₇H₄₀O₉ (748.27)

farbloser Feststoff

R_f (PE/EE = 5/2) = 0.37

[α]₅₄₆²⁰: +31 (*c* 1, CHCl₃)

Ausbeute: 9.26 g (12.4 mmol, 54 %)



10.0 g (22.9 mmol) **14** werden in 40 mL abs. Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 18.6 mL (160 mmol) Benzoylchlorid und 40 mg DMAP versetzt. Die Reaktion wird 24 h bei RT gerührt. Der Abbruch der Reaktion erfolgt durch Überführen der Lösung in 50 mL Eiswasser. Es werden 10 mL Methanol zugegeben und mit DCM ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit 2M HCl, gesättigter NaHCO₃-Lsg. und Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Laufmittel: PE/EE = 5/2) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 8.19-6.76 (m, 30H, H-arom); 6.65 (dd, 1H, H-3); 5.96 (dd, 1H, H-4); 5.59 (dd, 1H, H-2); 5.36 (d, 1H, H-1); 4.35 (ddd, 1H, H-5); 3.50 (dd, 1H, H-6a); 3.45 (dd, 1H, H-6b); 3.15 (s, 3H, OCH₃).

³J_{1,2} = 3.6; ³J_{2,3} = 10.4; ³J_{3,4} = 10.2; ³J_{4,5} = 10.2; ³J_{5,6a} = 2.5; ³J_{5,6b} = 5.3; ²J_{6a,6b} = 10.4 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 144.72 (C_{arom}CPh₂); 133.61, 133.34, 133.29, 130.62, 130.44, 130.38, 128.93, 128.82, 128.72 (C₆H₅COO); 129.51 (C_{Trityl}-ortho); 128.47 (C_{Trityl}-meta); 125.52 (C_{Trityl}-para); 97.87 (C-1); 87.66 (CPh₃); 73.23 (C-2); 71.90 (C-3); 70.58 (C-4); 70.23 (C-5); 63.69 (C-6); 55.49 (CH₃).

Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-α-D-glucopyranosid (**16**)

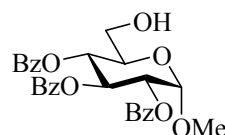
C₂₈H₂₆O₉ (506.16)

farbloser Feststoff

R_f (Toluol/EE = 8/1) = 0.12

[α]₅₄₆²⁰: +23 (c 1, CHCl₃)

Ausbeute: 970 mg (1.92 mmol, 88 %)



1.64 g (2.19 mmol) **15** werden unter Eiskühlung bei 0 °C in 3.5 mL 90 %iger Trifluoressigsäure gelöst und die Reaktion nach fünf Minuten dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: Toluol/EE = 10/1) auf quantitative Umsetzung geprüft. Die Reaktion wird durch Überführen in 100 mL kaltes DCM beendet. Die organische Phase wird jeweils zweimal mit ges. NaHCO₃-Lsg. und Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im

Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: Toluol/EE = 8/1) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 8.18-6.66 (m, 15H, H-arom); 6.66 (dd, 1H, H-3); 5.77 (dd, 1H, H-4); 5.48 (dd, 1H, H-2); 5.20 (d, 1H, H-1); 3.90 (ddd, 1H, H-5); 3.65 (dd, 1H, H-6a); 3.56 (dd, 1H, H-6b); 2.98 (s, 3H, OCH₃).

³J_{1,2} = 3.8; ³J_{2,3} = 9.9; ³J_{3,4} = 9.9; ³J_{4,5} = 9.9; ³J_{5,6a} = 2.3; ³J_{5,6b} = 4.3; ²J_{6a,6b} = 12.7 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 133.82, 133.68, 133.44 (je C-para); 130.57, 130.28, 130.03 (je C-ortho); 129.00, 128.97, 128.88 (je C-meta); 97.82 (C-1); 73.02 (C-2); 71.37 (C-3); 70.81 (C-5); 70.49 (C-4); 61.81 (C-6); 55.48 (CH₃)

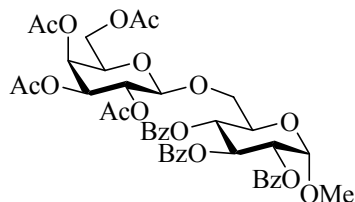
Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-6-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-**D**-galactopyranosyl)-
α-**D**-glucopyranosid (**17**)

C₄₂H₄₄O₁₈ (836.79)

farbloser Feststoff

[α]₅₄₆²⁰: +40 (*c* 1, CHCl₃)

Ausbeute: 38 mg (45 μmol, 45 %)



In einem ausgeheizten Kolben mit Molsieb 4Å werden 100 mg (203 μmol) **12** und 51 mg (101 μmol) **16** über Nacht im Vakuum getrocknet. Es werden 3 mL abs. Dichlormethan zugegeben, eine Stunde bei RT gerührt und anschließend auf -20 °C gekühlt und 150 μL TMS-OTf-Lösung (8 μL/mL DCM) zugegeben. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: PE/EE = 3/1) kontrolliert. Nach 30 min wird mit Et₃N neutralisiert, mit DCM verdünnt, Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: PE/EE = 3/1 → 1/1) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 8.17-8.15 (m, 2H, H-arom); 8.02-7.98 (m, 4H, H-arom); 6.99-6.77 (m, 9H, H-arom); 6.65 (dd, 1H, H-3); 5.77 (dd, 1H, H-4); 5.69 (dd, 1H, H-

2'); 5.55 (dd, 1H, H-2); 5.47 (dd, 1H, H-4'); 5.24 (d, 1H, H-1); 5.17 (dd, 1H, H-3'); 4.35 (ddd, 1H, H-5); 4.28 (d, 1H, H-1'); 4.14 (dd, 1H, H-6a); 4.06 (dd, 1H, H-6'a); 3.99 (dd, 1H, H-6'b); 3.67 (dd, 1H, H-6b); 3.33 (dd, 1H, H-5'); 3.17 (s, 3H, OCH₃); 1.93, 1.73, 1.62, 1.55 (je s, 3H, COCH₃).

³J_{1,2} = 3.6; ³J_{1',2'} = 7.9; ³J_{2,3} = 10.4; ³J_{2',3'} = 10.7; ³J_{3,4} = 9.9; ³J_{3',4'} = 3.6; ³J_{4,5} = 9.7; ³J_{4',5'} = 1.0; ³J_{5,6a} = 2.0; ³J_{5,6b} = 5.9; ³J_{5',6'a} = 6.6; ³J_{5',6'b} = 6.6; ²J_{6a,6b} = 10.7; ²J_{6'a,6'b} = 11.2 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 133.78, 133.66, 133.42 (C-para); 130.47, 130.29, 130.03 (C-ortho); 128.78, 128.66, 128.42 (C-meta); 102.19 (C-1'); 97.69 (C-1); 72.96 (C-2); 71.78 (C-3); 71.67 (C-3'); 71.28 (C-5'); 70.61 (C-4); 69.68 (C-2'); 69.59 (C-5); 68.85 (C-6); 67.72 (C-4'); 61.63 (C-6') 55.63 (OCH₃); 21.04, 20.65, 20.48, 20.28 (COCH₃).

Methyl-6-*O*-(β-D-galactopyranosyl)-α-D-glucopyranosid (**18**)

C₁₃H₂₄O₁₁ (356.32)

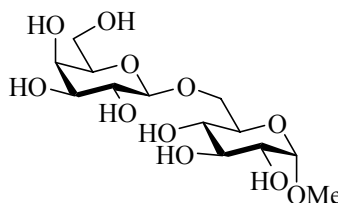
farbloser Feststoff

R_f (BuOH/AcOH/H₂O = 5/2/2) = 0.26

[α]₅₄₆²⁰: +76 (c 1, MeOH)

Ausbeute: 28 mg (79 μmol, 66 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 378.9 [M+Na]⁺



100 mg (120 μmol) **17** werden in 30 mL abs. MeOH gelöst und mit 10 % NH₃/MeOH versetzt bis pH = 9 erreicht ist. Die Lösung wird bei RT gerührt bis DC-Kontrolle vollständigen Umsatz anzeigt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Biogel P2) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 4.81 (d, 1H, H-1); 4.44 (d, 1H, H-1'); 4.19 (dd, 1H, H-6a); 3.93-3.88 (m, 2H, H-4'/H-6b); 3.83-3.73 (m, 3H, H-5/H-6'a/H-6'b); 3.72-3.64 (m, 3H, H-3/H-3'/H-4); 3.59-3.50 (m, 3H, H-2/H-2'/H-5'); 3.43 (s, 3H, OCH₃).

³J_{1,2} = 3.8; ³J_{1',2'} = 7.9; ³J_{5,6a} = 2.0; ²J_{6a,6b} = 10.7 Hz.

^{13}C -NMR (101 MHz, D_2O): δ [ppm] = 103.74 (C-1'); 99.76 (C-1); 75.51 (C-4); 73.33 (C-3'); 73.07 (C-3); 71.51 (C-2); 71.12 (C-2'); 70.95 (C-5); 69.59 (C-5'); 69.03 (C-4'); 68.72 (C-6); 61.38 (C-6'); 55.64 (OCH_3).

Methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat (**19**)

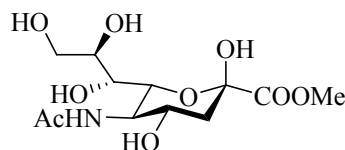
$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_9$ (323.12)

Ausbeute: 4.31 g (13.3 mmol, 82 %)

farbloser Feststoff, Smp.: 178 °C

R_f = 0.75 (EtOH/AcOH/ H_2O = 4/1/1)

$[\alpha]_{546}^{20}$ = -32 (c 1, H_2O) Lit^[87]: $[\alpha]_D^{20}$ = -46 (c 1, MeOH)



5.00 g (16.2 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure **1** werden mit 5.00 g gewaschenem Ionentauscher DOWEX 50W-8X (H^+) in 160 mL abs. Methanol suspendiert und 65 h bei RT gerührt. Das Ende der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch detektiert (Laufmittel: EtOH/AcOH/ H_2O = 4/1/1). Der Ionentauscher wird abfiltriert, mit Methanol gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

^1H -NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 4.08-4.00 (m, 2H, H-4/H-6); 3.85-3.81 (m, 2H, H-5/H-9a); 3.79 (s, 3H, COOCH_3); 3.71 (ddd, 1H, H-8); 3.63 (dd, 1H, H-9b); 3.49 (dd, 1H, H-7); 2.23 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.02 (s, 3H, COCH_3); 1.90 (dd, 1H, H-3_{ax}).

$^2J_{3\text{ax},3\text{eq}}$ = 13.0 Hz; $^3J_{3\text{ax},4}$ = 11.4 Hz; $^3J_{3\text{eq},4}$ = 4.8 Hz; $^3J_{4,5}$ = 8.2 Hz; $^3J_{5,6}$ = 10.9 Hz; $^3J_{6,7}$ = 1.3 Hz; $^3J_{7,8}$ = 8.9 Hz; $^3J_{8,9a}$ = 3.0 Hz; $^3J_{8,9b}$ = 5.8 Hz; $^2J_{9a,9b}$ = 11.4 Hz.

^{13}C -NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 95.57 (C-2); 71.22 (C-6); 70.98 (C-8); 69.10 (C-7); 66.75 (C-4); 63.74 (C-9); 53.24 (C-5); 52.03 (COOCH_3); 39.61 (C-3); 21.52 (COCH_3).

Methyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-**D**-glycero-**D**-galacto-2-nonulopyranosylonat (**20α/20β**)

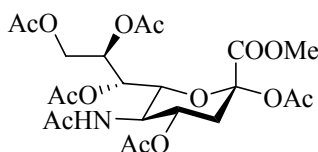
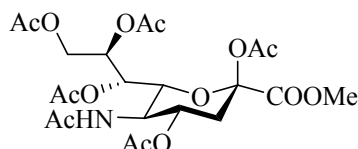
C₂₂H₃₁NO₁₄ (533.17)

Ausbeute: 5.00 g, β/α = 3/1

farbloser Schaum

R_f = 0.98 (DCM/MeOH = 10/1)

R_f = 0.64 (DCM/MeOH = 10/1)



Unter wasserfreien Bedingungen werden 2.84 g (8.79 mmol) **19** in 40 mL Pyridin aufgenommen und tropfenweise bei 0 °C mit 20 mL Ac₂O versetzt. Das Reaktionsgemisch wird ca. 17 h bei RT gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 10/1) verfolgt. Pyridin wird codestillativ mit Toluol entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: EE).

Methyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-*α*-**D**-glycero-**D**-galacto-2-nonulopyranosylonat:

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 5.91 (d, 1H, NH); 5.69 (dd, 1H, H-7); 5.61 (ddd, 1H, H-8); 5.17 (ddd, 1H, H-4); 4.98 (dd, 1H, H-6); 4.83 (dd, 1H, H-9a); 4.57 (ddd, 1H, H-5); 4.34 (dd, 1H, H-9b); 3.48 (s, 3H, COOCH₃); 2.69 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.10 (dd, 1H, H-3_{ax}); 2.00, 1.99, 1.80, 1.76, 1.73, 1.64 (je s, 3H, COCH₃).

²J_{3ax,3eq} = 13.0; ³J_{3ax,4} = 10.7; ³J_{3eq,4} = 4.6; ³J_{4,5} = 10.7; ³J_{5,6} = 10.9; ³J_{5,NH} = 10.2; ³J_{6,7} = 2.3; ³J_{7,8} = 4.1; ³J_{8,9a} = 1.6; ³J_{8,9b} = 6.6; ²J_{9a,9b} = 12.5 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 96.46 (C-2); 75.35 (C-6); 72.32 (C-8); 69.26 (C-4); 68.66 (C-7); 63.28 (C-9); 53.05 (COOCH₃); 49.43 (C-5); 37.87 (C-3); 23.40, 21.21, 21.06, 20.86, 20.60 (je COCH₃).

Methyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 5.63 (dd, 1H, H-7); 5.45 (ddd, 1H, H-8); 5.18 (ddd, 1H, H-4); 5.06 (dd, 1H, H-9a); 4.63 (d, 1H, NH); 4.51-4.42 (m, 2H, H-5/9b); 4.10 (dd, 1H, H-6); 3.45 (s, 3H, COOCH_3); 2.57 (dd, 1H, H-3_{eq}); 1.95 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.90, 1.84, 1.76, 1.72, 1.63, 1.61 (je s, 3H, COCH_3).

$^2\text{J}_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.5$; $^3\text{J}_{3\text{ax},4} = 11.5$; $^3\text{J}_{3\text{eq},4} = 5.1$; $^3\text{J}_{4,5} = 11.0$; $^3\text{J}_{5,6} = 10.6$; $^3\text{J}_{5,\text{NH}} = 10.2$; $^3\text{J}_{6,7} = 2.6$; $^3\text{J}_{7,8} = 3.8$; $^3\text{J}_{8,9\text{a}} = 2.3$; $^3\text{J}_{8,9\text{b}} = 7.3$; $^2\text{J}_{9\text{a},9\text{b}} = 12.2$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 98.43 (C-2); 74.13 (C-6); 73.43 (C-8); 68.92 (C-4); 68.69 (C-7); 63.27 (C-9); 53.23 (COOCH_3); 49.39 (C-5); 37.00 (C-3); 23.32, 21.13, 20.95, 20.81, 20.74, 20.66 (je COCH_3).

4-Nitrophenyl-(methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat) (**21**)

$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{15}$ (612.18)

Ausbeute: 1.64 g (2.68 mmol, 45 %)

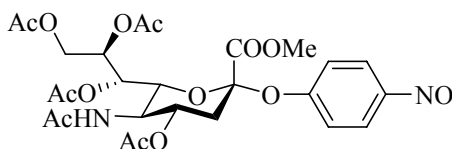
farbloser Feststoff, Smp.: 96 °C

$R_f = 0.41$ (EE)

$[\alpha]_{546}^{20} = +45$ (c 1, CHCl_3)

Lit^[86]: Smp. = 104 °C

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 635.1$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 651.1 $[\text{M}+\text{K}]^+$



3 x 1.00 g (5.89 mmol) **4** werden mit 3 x 800 mg TBA- HSO_4 und 3 x 420 mg (9.06 mmol) *p*-Nitrophenol in jeweils 10 mL Dichlormethan in jeweils einer Falcon-Tube gelöst und jeweils 8 mL 1M NaOH hinzugegeben. Es wird etwa drei Stunden bei RT stark gerührt. DC-Kontrolle (Laufmittel: EE). Abbruch der Reaktion erfolgt durch Ausschütteln mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: EE).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 8.16 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.11 (d, 2H, H-b_{arom}); 5.78 (ddd, 1H, H-8); 5.56 (dd, 1H, H-7); 4.97 (ddd, 1H, H-4); 4.74 (dd, 1H, H-6); 4.53-4.44 (m, 2H, H-5/H-9a); 4.30 (dd, 1H, H-9b); 3.16 (s, 3H, COOCH_3); 2.81 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.29 (dd, 1H, H-3_{ax}); 2.14, 1.92, 1.85, 1.66, 1.62 (je s, 3H, COCH_3).

$^2\text{J}_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.7$ Hz; $^3\text{J}_{3\text{ax},4} = 12.6$ Hz; $^3\text{J}_{3\text{eq},4} = 4.6$ Hz; $^3\text{J}_{4,5} = 10.5$ Hz; $^3\text{J}_{5,6} = 10.7$ Hz; $^3\text{J}_{6,7} = 2.0$ Hz; $^3\text{J}_{7,8} = 7.1$ Hz; $^3\text{J}_{8,9\text{a}} = 2.8$ Hz; $^3\text{J}_{8,9\text{b}} = 6.1$ Hz; $^2\text{J}_{9\text{a},9\text{b}} = 12.4$ Hz; $^3\text{J}_{(\text{Ha},\text{Hb})\text{arom}} = 9.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 126.12 (C-a_{arom}); 119.05 (C-b_{arom}); 74.59 (C-6); 69.74 (C-8); 68.61 (C-4); 67.58 (C-7); 62.72 (C-9); 53.01 (COOCH_3); 49.40 (C-5); 39.45 (C-3); 23.11, 21.11, 20.71, 20.64, 20.47 (je COCH_3).

4-Nitrophenyl-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate) (**22**)

$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{11}$ (444.14)

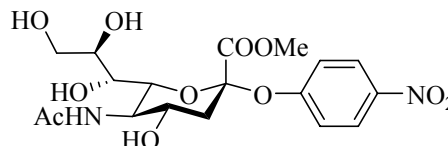
Ausbeute: 660 mg (1.49 mmol, 61 %)

farbloser Feststoff, Smp.: 92 °C

$R_f = 0.45$ (EE/MeOH = 4/1)

$[\alpha]_{546}^{20} = +60$ (c 1, MeOH)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 467.4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$



1.50 g (2.45 mmol) **21** werden in 37 mL MeOH gelöst und nach AAV2 mit NaOMe versetzt. DC-Kontrolle (Laufmittel: EE/MeOH) = 4/1) nach 1.5 h. Abbruch der Reaktion erfolgt durch Neutralisation unter Zugabe von Ionentauscher Amberlite IR 120 (H^+). Der Ionentauscher wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: EE/MeOH = 7/1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.20 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.34 (d, 2H, H-b_{arom}); 4.18 (dd, 1H, H-6); 3.92 (dd, 1H, H-5); 3.84-3.77 (m, 3H, H-4/H-8/H-9a); 3.73 (s, 3H, COOCH_3);

3.63 (dd, 1H, H-9b); 3.53 (dd, 1H, H-7); 2.78 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.05 (dd, 1H, H-3_{ax}); 2.03 (s, 3H, COCH₃).

$^2J_{3ax,3eq} = 13.0$ Hz; $^3J_{3ax,4} = 12.6$ Hz; $^3J_{3eq,4} = 4.6$ Hz; $^3J_{4,5} = 10.4$ Hz; $^3J_{5,6} = 10.5$ Hz; $^3J_{6,7} = 1.2$ Hz; $^3J_{7,8} = 8.9$ Hz; $^3J_{8,9a} = 2.8$ Hz; $^3J_{8,9b} = 5.9$ Hz; $^2J_{9a,9b} = 11.7$ Hz; $^3J_{(Ha,Hb)arom} = 9.4$ Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 125.19 (C-a_{arom}); 120.14 (C-b_{arom}); 100.80 (C-2); 75.14 (C-6); 70.84 (C-8); 69.05 (C-7); 66.79 (C-4); 64.02 (C-9); 52.49 (COOCH₃); 52.40 (C-5); 41.05 (C-3); 21.57 (COCH₃).

4-Nitrophenyl-(5-*N*-propanoyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure) (**23**)

C₁₈H₂₄N₂O₁₁ (444.39)

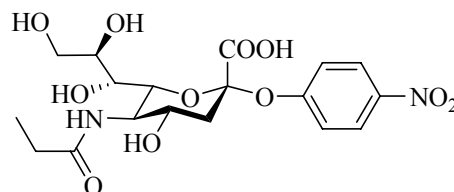
farbloser Feststoff, Smp.: 98 °C

R_f (CHCl₃/MeOH/H₂O) = 0.65

$[\alpha]_{546}^{20} = +70$ (*c* 1, H₂O)

Ausbeute: 70.5 mg (170 μ mol, 70 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 466.7$ [M+Na]⁺



Unter Rühren werden 112 mg (244 μ mol) **51** in 25 mL 0.1M NaOH nach AAV3 unter DC-Kontrolle (Laufmittel: EE/MeOH = 4/1) gelöst. Nach 50 Minuten erfolgt der Abbruch der Reaktion. Das Produkt wird größenausschlußchromatographisch (Biogel P2; Laufmittel: H₂O) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 8.21 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.28 (d, 2H, H-b_{arom}); 4.16 (dd, 1H, H-6); 3.96 (dd, 1H, H-5); 3.86-3.81 (m, 3H, H-4/H-8/H-9a); 3.62 (dd, 1H, H-9b); 3.56 (dd, 1H, H-7); 2.84 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.31 (ddd, 2H, CH₂-Prop); 2.02 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.12 (dd, 3H, CH₃).

$^2J_{3ax,3eq} = 13.0$; $^3J_{3ax,4} = 11.7$; $^3J_{3eq,4} = 4.8$; $^3J_{4,5} = 10.5$; $^3J_{5,6} = 10.4$; $^3J_{6,7} = 1.5$; $^3J_{7,8} = 8.9$; $^3J_{8,9b} = 6.6$; $^2J_{9a,9b} = 12.5$; $^3J_{CH_2,CH_3} = 7.6$; $^3J_{(Ha,Hb)arom} = 9.4$ Hz.

^{13}C -NMR (101 MHz, D_2O): δ [ppm] = 125.88 (C-a_{arom}); 120.46 (C-b_{arom}); 102.77 (C-2); 74.12 (C-6); 71.79 (C-4); 68.66 (C-7); 67.97 (C-8); 63.12 (C-9); 51.92 (C-5); 41.31 (C-3); 29.62 (CH_2 -Prop); 9.88 (CH_3 -Prop).

4-Nitrophenyl-(5-*N*-butanoyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure) (24)

$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_{11}$ (458.42)

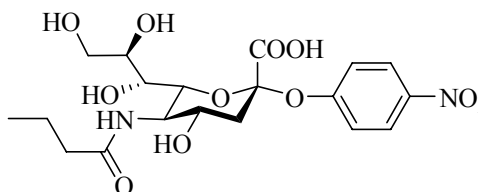
farbloser Feststoff, Smp.: 85 °C

R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$) = 0.70

$[\alpha]_{546}^{20} = +89$ (c 1, H_2O)

Ausbeute: 75 mg (0.16 mmol, 78 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 480.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$



Unter Rühren werden 99 mg (0.21 mmol) **52** in 25 mL 0.1M NaOH nach AAV3 unter DC-Kontrolle (Laufmittel: EE/MeOH = 4/1) bei RT gelöst. Nach 50 Minuten erfolgt der Abbruch der Reaktion. Das Produkt wird größenausschlußchromatographisch (Biogel P2; Laufmittel: H_2O) gereinigt.

^1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8.23 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.30 (d, 2H, H-b_{arom}); 4.17 (dd, 1H, H-6); 3.98 (dd, 1H, H-5); 3.88-3.79 (m, 3H, H-4/H-8/H-9a); 3.63 (dd, 1H, H-9b); 3.59 (dd, 1H, H-7); 2.82 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.29 (dd, 2H, CH_2 -a-But); 2.03 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.63 (dddd, 2H, CH_2 -b-But); 0.93 (dd, 3H, CH_3).

$^2J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.0$; $^3J_{3\text{ax},4} = 11.7$; $^3J_{3\text{eq},4} = 4.6$; $^3J_{4,5} = 10.2$; $^3J_{5,6} = 10.2$; $^3J_{6,7} = 1.3$; $^3J_{7,8} = 8.9$; $^3J_{8,9\text{b}} = 7.0$; $^2J_{9\text{a},9\text{b}} = 12.7$; $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 7.4$; $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.4$; $^3J_{(\text{Ha},\text{Hb})\text{arom}} = 9.4$ Hz.

^{13}C -NMR (101 MHz, D_2O): δ [ppm] = 125.93 (C-a_{arom}); 120.30 (C-b_{arom}); 74.13 (C-6); 71.70 (C-4); 68.75 (C-7); 67.94 (C-8); 63.14 (C-9); 52.00 (C-5); 41.39 (C-3); 38.23 (C-2-But); 19.39 (C-3-But); 13.21 (CH_3 -But).

4-Nitrophenyl-(5-*N*-isobutanoyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure) (**25**)

C₁₉H₂₆N₂O₁₁ (458.42)

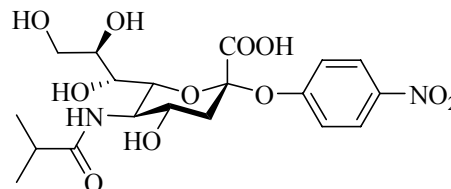
farbloser Feststoff, Smp.: 118 °C

R_f (CHCl₃/MeOH/H₂O) = 0.72

[α]₅₄₆²⁰ = +11 (*c* 1, H₂O)

Ausbeute: 48 mg (0.105 mmol, 99 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): *m/z* = 481.1 [M+Na]⁺



Unter Rühren werden 50 mg (0.106 mmol) **53** in 10 mL 0.1M NaOH nach AAV3 unter DC-Kontrolle (Laufmittel: EE/MeOH = 4/1) bei RT gelöst. Nach 50 Minuten erfolgt der Abbruch der Reaktion. Das Produkt wird größenausschlußchromatographisch (Biogel P2; Laufmittel: H₂O) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 8.21 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.28 (d, 2H, H-b_{arom}); 4.17 (dd, 1H, H-6); 3.94 (dd, 1H, H-5); 3.86-3.80 (m, 3H, H-4/H-8/H-9a); 3.62 (dd, 1H, H-9b); 3.53 (dd, 1H, H-7); 2.84 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.55 (h, 1H, CH-But); 2.02 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.12 (d, 3H, CH₃a-But); 1.11 (d, 3H, CH₃b-But).

²J_{3ax,3eq} = 12.8; ³J_{3ax,4} = 11.7; ³J_{3eq,4} = 4.6; ³J_{4,5} = 10.5; ³J_{5,6} = 10.4; ³J_{6,7} = 1.5; ³J_{7,8} = 8.9; ³J_{8,9b} = 6.6; ²J_{9a,9b} = 12.5; ³J_{CH2,CH3} = 7.6; ³J_{(CH,CH3a)But} = 7.1; ³J_{(CH,CH3b)But} = 7.1; ³J_{(Ha,Hb)arom} = 9.4 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm] = 125.91 (C-a_{arom}); 120.26 (C-b_{arom}); 102.68 (C-2); 74.14 (C-6); 71.73 (C-4); 68.70 (C-7); 67.78 (C-8); 63.10 (C-9); 51.81 (C-5); 41.35 (C-3); 35.58 (CH-But); 19.32 (CH₃a-But); 18.79 (CH₃b-But).

4-Nitrophenyl-(5-*N*-glycolyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure) (**26**)

C₁₇H₂₂N₂O₁₂ (446.36)

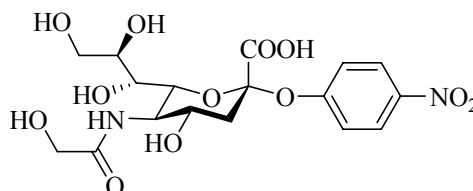
farbloser Feststoff, Smp.: 123 °C

R_f (CHCl₃/MeOH/H₂O = 10/10/1) = 0.79

[α]₅₄₆²⁰ = +83 (*c* 1, H₂O)

Ausbeute: 17 mg (38 μ mol, 98 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): *m/z* = 469.3 [M+Na]⁺



Unter Rühren werden 18 mg (39 μ mol) **64** in 5 mL 0.1M NaOH nach AAV3 unter DC-Kontrolle (Laufmittel: EE/MeOH = 3/1) bei RT gelöst. Nach 50 Minuten erfolgt der Abbruch der Reaktion. Das Rohprodukt wird größenausschlußchromatographisch (Biogel P2; Laufmittel: H₂O) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 8.24 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.31 (d, 2H, H-b_{arom}); 4.28 (dd, 1H, H-6); 4.15 (s, 2H, CH₂-Gc); 4.06 (dd, 1H, H-5); 3.93 (ddd, 1H, H-4); 3.89-3.84 (m, 2H, H-8/H-9a); 3.65 (dd, 1H, H-9b); 3.60 (dd, 1H, H-7); 2.88 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.05 (dd, 1H, H-3_{ax}).

²J_{3ax,3eq} = 12.7; ³J_{3ax,4} = 12.2; ³J_{3eq,4} = 4.6; ³J_{4,5} = 10.2; ³J_{5,6} = 10.4; ³J_{6,7} = 1.3; ³J_{7,8} = 8.9; ³J_{8,9b} = 6.6; ²J_{9a,9b} = 12.5; ³J_{(Ha,Hb)arom} = 9.3 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm] = 125.93 (C-a_{arom}); 120.32 (C-b_{arom}); 102.77 (C-2); 73.85 (C-6); 71.82 (C-4); 68.54 (C-7); 67.83 (C-8); 63.12 (C-9); 61.36 (CH₂-Gc); 51.77 (C-5); 41.27 (C-3).

4-Nitrophenyl-(5-amino-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure) (27)

C₁₅H₂₀N₂O₁₀ (388.33)

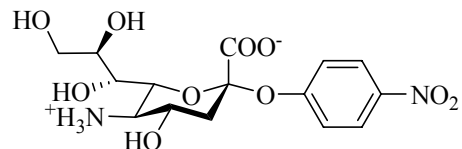
farbloser Feststoff, Smp.: 138 °C

R_f (BuOH/AcOH/H₂O = 5/2/2) = 0.53

[α]₅₄₆²⁰ = +41 (c 0.2, H₂O)

Ausbeute: 26 mg (67 μ mol, 99 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 411.4 [M+Na]⁺



Unter Rühren werden 34 mg (68 μ mol) **54** in 5 mL 0.15 M NaOH gelöst unter DC-Kontrolle (Laufmittel: EE/MeOH = 3/1) bei RT gelöst. Nach 7 h wird mit Ionentauscher Amberlite IR 120 (H⁺) neutralisiert und anschließend lyophilisiert. Das Rohprodukt wird größenausschlußchromatographisch (Biogel P2; Laufmittel: H₂O) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 8.22 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.27 (d, 2H, H-b_{arom}); 4.55 (dd, 1H, H-6); 3.98-3.89 (m, 2H, H-4/H-8); 3.86 (dd, 1H, H-9a); 3.79 (dd, 1H, H-7); 3.71 (dd, 1H, H-9b); 3.38 (dd, 1H, H-5); 2.88 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.05 (dd, 1H, H-3_{ax}).

²J_{3ax,3eq} = 12:7; ³J_{3ax,4} = 11:9; ³J_{3eq,4} = 4.6; ³J_{4,5} = 10.5; ³J_{5,6} = 10.2; ³J_{6,7} = 1.8; ³J_{7,8} = 8.9; ³J_{8,9a} = 2.5; ³J_{8,9b} = 5.6; ²J_{9a,9b} = 11.9; ³J_{(Ha,Hb)arom} = 9.4 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm] = 125.62 (C-a_{arom}); 119.97 (C-b_{arom}); 72.33 (C-6); 71.22 (C-4); 68.01 (C-7); 66.03 (C-8); 62.50 (C-9); 52.26 (C-5); 40.86 (C-3).

4-Nitrophenyl-(5-azido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure) (**28**)

$C_{15}H_{18}N_4O_{10}$ (414.32)

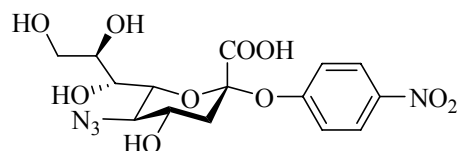
farbloser Feststoff, Smp.: 165 °C

R_f (BuOH/AcOH/H₂O = 5/2/2) = 0.66

$[\alpha]_{546}^{20} = +48$ (c 0.2, H₂O)

Ausbeute: 81 mg (196 μ mol, 85 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 437.3$ $[M+Na]^+$



1.92 g (29.6 mmol) Natriumazid werden in 5.4 mL Wasser gelöst und nach Zugabe von 4 mL DCM auf 2 °C abgekühlt. Unter starkem Rühren wird 1 mL Trifluormethansulfonsäureanhydrid über einen Zeitraum von fünf Minuten zugetropft und weitere zwei Stunden stark gerührt. Die organische Phase wird abgetrennt. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 4 mL DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 4 mL ges. Natriumcarbonatlösung gewaschen. Nach Abtrennung der wässrigen Phase kann die erhaltene Lösung von Triflylazid in DCM ohne weitere Reinigung in der Diazotransfer-Reaktion genutzt werden.

Die unmittelbar vor der Reaktion hergestellte Triflylazidlösung wird in der angegebenen Menge tropfenweise zu einer Lösung von 90.0 mg (232 μ mol) **27**, 48 mg (0.35 mmol) K₂CO₃ und einer katalytischen Menge Kupfersulfat-pentahydrat in 10 mL eines Gemisches aus Wasser / Methanol (3 / 2) gegeben. In diese Lösung werden nacheinander weitere 14.5 mL Methanol und 7 mL Wasser eingebracht und über Nacht bei RT gerührt. Die Reinigung erfolgt nach Filtration an Biogel P2.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 8.22 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.27 (d, 2H, H-b_{arom}); 4.09 (dd, 1H, H-6); 3.90-3.82 (m, 4H, H-4/H-7/H-8/H-9a); 3.67 (ddd, 1H, H-9b); 3.58 (dd, 1H, H-5); 2.82 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.02 (dd, 1H, H-3_{ax}).

$^2J_{3ax,3eq} = 12.7$; $^3J_{3ax,4} = 11.9$; $^3J_{3eq,4} = 4.8$; $^3J_{4,5} = 10.4$; $^3J_{5,6} = 10.4$; $^3J_{6,7} = 1.5$; $^3J_{8,9b} = 6.1$; $^3J_{9a,9b} = 12.2$; $^3J_{(Ha,Hb)arom} = 9.2$ Hz.

^{13}C -NMR (101 MHz, D_2O): δ [ppm] = 125.93 (C-a_{arom}); 120.26 (C-b_{arom}); 74.00 (C-6); 71.90 (C-4); 69.23 (C-7); 68.88 (C-8); 63.13 (C-9); 62.98 (C-5); 41.04 (C-3).

4-Nitrophenyl-(5-acetamido-9-*O*-butanoyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure) (**29**)

$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{12}$ (500.45)

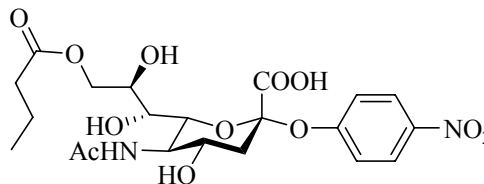
Ausbeute: 135 mg (270 μmol , 58 %)

farbloser Feststoff, Smp.: 143 °C

R_f = 0.52 (H_2O /Acetonitril = 4/1) (RP18)

$[\alpha]_{546}^{20} = +112$ (c 1, MeOH)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 523.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$



180 mg (419 μmol) **6** werden in 5 mL abs. Acetonitril suspendiert, 260 μL (1.67 mmol) Trimethylorthobutyrat und ca. 2 mg *p*-Toluolsulfonsäure zugegeben und bei RT gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: H_2O /Acetonitril = 4/1) verfolgt. Nach 1 h wird mit ca. 1 mL H_2O hydrolysiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt (RP18; Laufmittel: H_2O /Acetonitril = 4/1) und lyophilisiert.

^1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8.17 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.23 (d, 2H, H-b_{arom}); 4.33 (dd, 1H, H-9a); 4.19 (dd, 1H, H-6); 4.17 (dd, 1H, H-9b); 4.00 (ddd, 1H, H-8); 3.93 (dd, 1H, H-5); 3.78 (ddd, 1H, H-4); 3.59 (dd, 1H, H-7); 2.79 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.36 (dd, 2H, $\text{CH}_2(2)$ -But); 2.02 (s, 3H, COCH_3); 1.99 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.58 (sext, 2H, $\text{CH}_2(3)$ -But); 0.88 (dd, 3H, $\text{CH}_3(4)$ -But).

$^2J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.7$; $^3J_{3\text{ax},4} = 12.0$; $^3J_{3\text{eq},4} = 4.6$; $^3J_{4,5} = 10.3$; $^3J_{5,6} = 10.4$; $^3J_{6,7} = 1.3$; $^3J_{7,8} = 9.2$; $^3J_{8,9\text{a}} = 2.3$; $^3J_{8,9\text{b}} = 5.6$; $^2J_{9\text{a},9\text{b}} = 11.7$; $^3J_{(\text{Ha},\text{Hb})\text{arom}} = 9.2$; $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 7.1$; $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.4$ Hz.

^{13}C -NMR (101 MHz, D_2O): δ [ppm] = 177.27 (C-1); 160.36 (C-1-But); 125.89 (C-a_{arom}); 120.16 (C-b_{arom}); 102.58 (C-2); 74.04 (C-6); 69.38 (C-8); 68.76 (C-7); 67.94 (C-4); 66.07 (C-9); 52.09 (C-5); 41.26 (C-3); 36.12 (C-2-But); 22.40 (COCH_3); 18.41 (C-3-But); 13.18 (C-4-But).

Thiophenyl-(methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat) (**30**)

C₂₆H₃₃NO₁₂S (583.17)

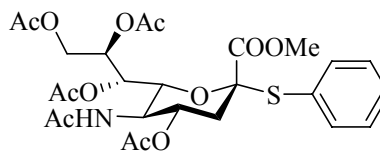
farbloser Feststoff, Smp.: 70 °C

R_f (EE) = 0.36

$[\alpha]_{546}^{20} = +21$ (*c* 0.5, CHCl₃)

Ausbeute: 628 mg (1.08 mmol, 63 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): *m/z* = 606.0 [M+Na]⁺, 622.0 [M+K]⁺



870 mg (1.71 mmol) **4** werden mit 600 mg TBA-HSO₄ in 10 mL EE gelöst und mit 10 mL 1M Na₂CO₃ versetzt. Es werden 880 μ L (8.45 mmol) Thiophenol zugegeben. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt. Nach 2 h erfolgt Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 10 mL EE und mehrmaligem Waschen der organischen Phase mit gesättigter NaCl-Lsg. und H₂O. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Laufmittel: 1.: Et₂O; 2.: EE) gereinigt. Weitere säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: DCM/MeOH = 15/1) ergibt das saubere Produkt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 7.64 (dd, 2H, H-o); 7.16 (dd, 2H, H-m); 7.07 (dddd, 1H, H-p); 5.66 (ddd, 1H, H-8); 5.51 (dd, 1H, H-7); 4.82 (ddd, 1H, H-4); 4.77 (dd, 1H, H-9a); 4.46 (dd, 1H, H-9b); 4.34 (ddd, 1H, H-5); 4.15 (d, 1H, NH); 3.94 (dd, 1H, H-6); 3.21 (s, 3H; COOCH₃); 2.98 (dd, 1H, H-3eq); 2.04 (dd, 1H, H-3ax); 1.96, 1.95, 1.79, 1.58, 1.56 (je s, 3H, COCH₃).

²J_{3ax,3eq} = 12.8; ³J_{3ax,4} = 12.0; ³J_{3eq,4} = 4.8; ³J_{4,5} = 10.4; ³J_{5,6} = 10.7; ³J_{5,NH} = 10.4; ³J_{6,7} = 2.3; ³J_{7,8} = 7.1; ³J_{8,9a} = 2.8; ³J_{8,9b} = 5.9; ²J_{9a,9b} = 12.5; ³J_{H-m,H-o} = 8.4; ³J_{H-m,H-p} = 8.0; ⁴J_{H-o,H-p} = 1.0 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 169.68 (C-1); 137.07 (C-ortho); 130.26 (C-meta); 129.58 (C-para); 75.83 (C-6); 71.19 (C-8); 70.19 (C-4); 68.29 (C-7); 62.83 (C-9); 52.60 (COOCH₃); 49.43 (C-5); 39.32 (C-3); 23.33, 21.29, 21.02, 20.91, 20.68 (je COCH₃).

Thioethyl-(methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate) (**31**)

C₂₂H₃₃NO₁₂S (535.56)

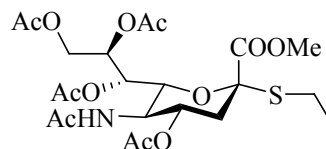
farbloser Feststoff, Smp.: 83 °C

R_f (EE) = 0.40

[α]_D²⁰ = +42 (c 0.1, CHCl₃)

Ausbeute: 383 mg (715 μ mol, 57 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 557.7 [M+Na]⁺, 573.7 [M+K]⁺



673 mg (1.26 mmol) **4** werden mit 450 mg TBA-HSO₄ in 7 mL EE gelöst und mit 7 mL 1M Na₂CO₃ versetzt. Es werden 390 μ L (5.29 mmol) Ethanthiol zugegeben. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt. Nach 1 h erfolgt Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 10 mL EE und mehrmaligem Waschen der organischen Phase mit gesättigter NaCl-Lsg. und H₂O. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (EE) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 5.81 (ddd, 1H, H-8); 5.49 (dd, 1H, H-7); 4.82 (ddd, 1H, H-4); 4.68 (dd, 1H, H-9a); 4.38 (ddd, 1H, H-5); 4.32 (dd, 1H, H-9b); 4.05 (d, 1H, NH); 3.84 (dd, 1H, H-6); 3.37 (s, 3H; COOCH₃); 2.99 (dddd, 1H, CH₂-a); 2.83 (dd, 1H, H-3eq); 2.70 (dddd, 1H, CH₂-b); 2.15 (s, 3H, COCH₃); 2.02 (dd, 1H, H-3ax); 1.90, 1.77, 1.59, 1.58 (je s, 3H, COCH₃); 1.12 (dd, 3H, CH₃).

²J_{3ax,3eq} = 12.7; ³J_{3ax,4} = 11.9; ³J_{3eq,4} = 4.6; ³J_{4,5} = 10.7; ³J_{5,6} = 10.7; ³J_{5,NH} = 10.7; ³J_{6,7} = 2.3; ³J_{7,8} = 8.1; ³J_{8,9a} = 2.8; ³J_{8,9b} = 5.6; ²J_{9a,9b} = 12.5; ³J_{CH3,CH2} = 7.4; ²J_{CH2-a,CH2-b} = 12.4 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 108.65 (C-2); 74.79 (C-6); 69.82 (C-4); 69.63 (C-8); 67.63 (C-7); 62.72 (C-9); 52.27 (COOCH₃); 49.19 (C-5); 38.71 (C-3); 23.57 (CH₂-SEt); 21.11, 20.58, 20.46, 20.40, 20.28 (je COCH₃); 10.11 (CH₃-SEt).

Thiophenyl-(methyl-5-*N*-butanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate) (**35**)

C₂₈H₃₇NO₁₂S (611.22)

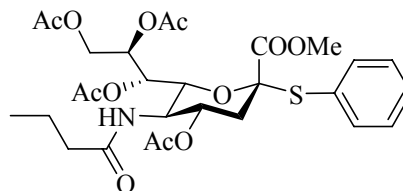
farbloser Sirup

R_f (EE) = 0.70

[α]₅₄₆²⁰ = +10 (*c* 0.5, CHCl₃)

Ausbeute: 176 mg (288 μ mol, 39 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): *m/z* = 634.4 [M+Na]⁺, 650.4 [M+K]⁺



430 mg (737 μ mol) **30** werden in 4 mL abs. MeOH gelöst und mit 105 μ L Methansulfonsäure versetzt und 44 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 5/3) verfolgt und das gebildete Amin durch Besprühen mit Ninhydrin-Lsg. detektiert. Die Lösung wird durch Zugabe von Triethylamin neutralisiert. Es werden weitere 0.4 mL Triethylamin zugegeben, die Lösung bei 0 °C mit 240 μ L (1.48 mmol) Buttersäureanhydrid versetzt und 1 h unter Eiskühlung gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 5/3) verfolgt. Die Acetylierung erfolgt nach AAV2. Es wird über Nacht bei RT gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt. Der Abbruch der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 1.5 mL MeOH bei 0 °C. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Es wird mit 1M HCl und Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: EE) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 7.64 (dd, 2H, H-o); 7.16 (dd, 2H, H-m); 7.07 (dddd, 1H, H-p); 5.66 (ddd, 1H, H-8); 5.51 (dd, 1H, H-7); 4.88 (ddd, 1H, H-4); 4.76 (dd, 1H, H-9a); 4.47 (dd, 1H, H-9b); 4.35 (ddd, 1H, H-5); 4.16 (d, 1H, NH); 4.00 (dd, 1H, H-6); 3.21 (s, 3H; COOCH₃); 2.99 (dd, 1H, H-3eq); 2.04 (dd, 1H, H-3ax); 1.96, 1.93, 1.78, 1.58 (je s, 3H, COCH₃); 1.91-1.82 (m, 1H, CH_aH_b-But); 1.74-1.67 (m, 1H, CH_aH_b-But); 1.63-1.51 (m, 1H, CH₂-But); 0.83 (dd, 3H, CH₃-But).

²J_{3ax,3eq} = 12.7; ³J_{3ax,4} = 11.7; ³J_{3eq,4} = 4.8; ³J_{4,5} = 10.4; ³J_{5,6} = 10.7; ³J_{5,NH} = 10.2; ³J_{6,7} = 2.0; ³J_{7,8} = 7.1; ³J_{8,9a} = 2.8; ³J_{8,9b} = 5.8; ²J_{9a,9b} = 12.5 Hz; ³J_{CH₂,CH₃} = 7.4; ³J_{H-m,H-o} = 8.4; ³J_{H-m,H-p} = 7.6; ⁴J_{H-o,H-p} = 1.0 Hz.

^{13}C -NMR (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 172.63 (C-1); 137.06 (C-ortho); 130.25 (C-meta); 129.58 (C-para); 75.86 (C-6); 71.22 (C-8); 70.12 (C-4); 68.38 (C-7); 62.85 (C-9); 52.62 (COOCH_3); 49.36 (C-5); 39.35 (C-3); 38.85 (C-2-But); 21.29, 21.04, 20.91, 20.75 (je COCH_3); 19.39 (C-3-But); 14.72 (C-4-But).

Thiophenyl-(methyl-5-*N*-propanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate) (**36**)

$\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{NO}_{12}\text{S}$ (597.63)

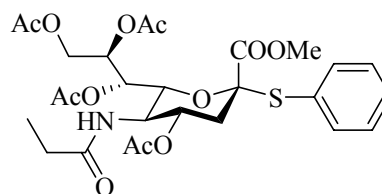
farbloser Sirup

R_f (PE/Aceton = 2/1) = 0.20

$[\alpha]_{546}^{20} = +13$ (c 0.5, CHCl_3)

Ausbeute: 176 mg (295 μmol , 34 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = m/z = 620.3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 636.3 $[\text{M}+\text{K}]^+$



500 mg (857 μmol) **30** werden in 5 mL abs. MeOH gelöst und mit 0.5 mL Methansulfonsäure versetzt und 20 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 5/3) verfolgt und das gebildete Amin durch Besprühen mit Ninhydrin-Lsg. detektiert. Die Lösung wird durch Zugabe von Triethylamin neutralisiert. Es werden weitere 2 mL Triethylamin zugegeben, die Lösung bei 0 °C mit 200 μL (1.55 mmol) Propionsäureanhydrid versetzt und 2 h unter Eiskühlung gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 5/3) verfolgt. Die Lösung wird eingengt. Die Acetylierung erfolgt nach AAV2. Es wird über Nacht bei RT gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt. Der Abbruch der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 1.5 mL MeOH bei 0 °C. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Es wird mit 1M HCl und Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: EE) gereinigt.

^1H -NMR (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 7.63 (dd, 2H, H-o); 7.16 (dd, 2H, H-m); 7.08 (dddd, 1H, H-p); 5.64 (ddd, 1H, H-8); 5.54 (dd, 1H, H-7); 4.90 (ddd, 1H, H-4); 4.75 (dd, 1H, H-9a); 4.59 (d, 1H, NH); 4.47 (dd, 1H, H-9b); 4.38 (ddd, 1H, H-5); 4.01 (dd, 1H, H-6); 3.24 (s, 3H;

COOCH₃); 2.97 (dd, 1H, H-3eq); 2.06 (dd, 1H, H-3ax); 1.97, 1.96 (je s, 3H, COCH₃); 1.94-1.80 (m, 2H, CH₂-Prop); 1.79, 1.61 (je s, 3H, COCH₃); 1.05 (dd, 3H, CH₃-Prop).

²J_{3ax,3eq} = 12.8; ³J_{3ax,4} = 11.8; ³J_{3eq,4} = 4.9; ³J_{4,5} = 10.3; ³J_{5,6} = 10.3; ³J_{5,NH} = 10.3; ³J_{6,7} = 2.0; ³J_{7,8} = 6.5; ³J_{8,9a} = 2.3; ³J_{8,9b} = 5.8; ²J_{9a,9b} = 12.3 Hz; ³J_{CH₂,CH₃} = 7.8; ³J_{H-m,H-o} = 8.4; ³J_{H-m,H-p} = 7.3; ⁴J_{H-o,H-p} = 1.3 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 137.07 (C-ortho); 130.27 (C-meta); 129.58 (C-para); 88.63 (C-2); 75.99 (C-6); 71.35 (C-8); 70.27 (C-4); 68.39 (C-7); 62.88 (C-9); 52.67 (COOCH₃); 49.40 (C-5); 39.29 (C-3); 30.09 (C-2-Prop); 21.32, 21.07, 20.93, 20.75 (je COCH₃); 10.17 (C-3-Prop).

Thiophenyl-(methyl-5-*N*-isobutanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate) (**37**)

C₂₈H₃₇NO₁₂S (611.66)

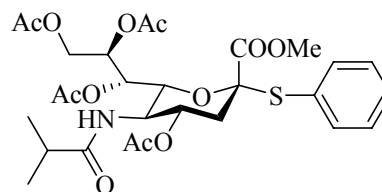
farbloser Sirup

R_f (EE) = 0.72

[α]₅₄₆²⁰ = +21 (c 0.5, CHCl₃)

Ausbeute: 401 mg (656 μ mol, 56 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 633.7 [M+Na]⁺, 649.6 [M+K]⁺



700 mg (1.18 mmol) **30** werden in 7 mL abs. MeOH gelöst und mit 180 μ L Methansulfonsäure versetzt und 44 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 5/3) verfolgt und das gebildete Amin durch Besprühen mit Ninhydrin-Lsg. detektiert. Die Lösung wird durch Zugabe von Triethylamin neutralisiert. Es werden weitere 0.7 mL Triethylamin zugegeben, die Lösung bei 0 °C mit 400 μ L (2.41 mmol) Isobuttersäureanhydrid versetzt und 1 h unter Eiskühlung gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 5/3) verfolgt. Die Lösung wird eingeeengt. Die Acetylierung erfolgt nach AAV2. Es wird über Nacht bei RT gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE)

verfolgt. Der Abbruch der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 2.5 mL MeOH bei 0 °C. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Es wird mit 1M HCl und Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: EE) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 7.64 (dd, 2H, H-o); 7.15 (dd, 2H, H-m); 7.06 (dddd, 1H, H-p); 5.65 (ddd, 1H, H-8); 5.50 (dd, 1H, H-7); 4.90 (ddd, 1H, H-4); 4.75 (dd, 1H, H-9a); 4.46 (dd, 1H, H-9b); 4.37 (ddd, 1H, H-5); 4.25 (d, 1H, NH); 4.01 (dd, 1H, H-6); 3.20 (s, 3H; COOCH₃); 2.97 (dd, 1H, H-3eq); 2.06 (dd, 1H, H-3ax); 1.95, 1.93 (je s, 3H, COCH₃); 1.92-1.81 (m, 1H, CH-But); 1.78, 1.57 (je s, 3H, COCH₃); 1.14 (d, 3H, CH₃a-But); 0.98 (d, 3H, CH₃b-But).

²J_{3ax,3eq} = 12.5; ³J_{3ax,4} = 11.7; ³J_{3eq,4} = 4.8; ³J_{4,5} = 10.4; ³J_{5,6} = 10.67 ³J_{5,NH} = 10.4; ³J_{6,7} = 2.0; ³J_{7,8} = 7.1; ³J_{8,9a} = 2.8; ³J_{8,9b} = 5.9; ²J_{9a,9b} = 12.5 Hz; ³J_{(CH,CH3a)But} = 6.9; ³J_{(CH,CH3b)But} = 6.9; ³J_{H-m,H-o} = 7.6; ³J_{H-m,H-p} = 7.6; ⁴J_{H-o,H-p} = 1.5 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 170.00 (C-1); 136.66 (C-ortho); 129.82 (C-para); 129.68 (C-meta); 100.27 (C-2); 75.52 (C-6); 70.88 (C-8); 69.67 (C-4); 67.98 (C-7); 62.46 (C-9); 52.18 (COOCH₃); 48.95 (C-5); 38.95 (C-3); 35.66 (CH-But); 20.84, 2.57, 20.46, 20.29 (je COCH₃); 19.60 (CH₃a-But); 19.13 (CH₃b-But).

Thiophenyl-(methyl-5-*N*-trifluoracetyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat) (**38**)

C₂₆H₃₀F₃NO₁₂S (637.58)

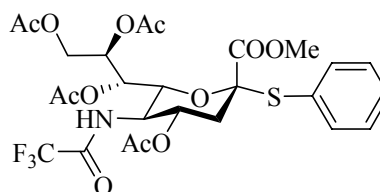
amorpher Feststoff

R_f (DCM/MeOH = 15/1) = 0.51

[α]₅₄₆²⁰ = +13 (c 1, CHCl₃)

Ausbeute: 330 mg (518 μ mol, 60 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 660.5 [M+Na]⁺, 676.5 [M+K]⁺



505 mg (866 μ mol) **30** werden in 5 mL abs. MeOH gelöst und mit 500 μ L Methansulfonsäure versetzt und 44 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch

(Laufmittel: DCM/MeOH = 5/3) verfolgt und das gebildete Amin durch Besprühen mit Ninhydrin-Lsg. detektiert. Die Lösung wird durch Zugabe von Triethylamin neutralisiert. Es werden weitere 0.7 mL Triethylamin zugegeben, die Lösung bei -20 °C mit 0.24 mL (1.73 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt und 1 h unter Eiskühlung gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 5/3) verfolgt. Die Reaktionslösung wird anschließend mit 25 mL Pyridin versetzt, auf 0 °C gekühlt und tropfenweise Essigsäureanhydrid zugegeben. Es wird über Nacht bei RT gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 15/1) verfolgt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Es wird mit 1M HCl und Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 15/1) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 7.59 (dd, 2H, H-o); 7.14 (dd, 2H, H-m); 7.06 (dddd, 1H, H-p); 6.23 (d, 1H, NH); 5.59 (ddd, 1H, H-8); 5.56 (dd, 1H, H-7); 4.94 (ddd, 1H, H-4); 4.68 (dd, 1H, H-9a); 4.45 (dd, 1H, H-9b); 4.28 (ddd, 1H, H-5); 4.11 (dd, 1H, H-6); 3.22 (s, 3H; COOCH₃); 2.96 (dd, 1H, H-3eq); 1.95 (dd, 1H, H-3ax); 1.91, 1.85, 1.75, 1.56 (je s, 3H, COCH₃).

²J_{3ax,3eq} = 13.0; ³J_{3ax,4} = 11.7; ³J_{3eq,4} = 4.9; ³J_{4,5} = 10.4; ³J_{5,6} = 10.7; ³J_{5,NH} = 10.2; ³J_{6,7} = 1.8; ³J_{7,8} = 6.9; ³J_{8,9a} = 2.3; ³J_{8,9b} = 5.1; ²J_{9a,9b} = 12.5 Hz; ³J_{H-m,H-o} = 7.9; ³J_{H-m,H-p} = 7.4; ⁴J_{H-o,H-p} = 1.3 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 136.65 (C-ortho); 130.00 (C-meta); 129.20 (C-para); 88.17 (C-2); 74.52 (C-6); 70.71 (C-8); 69.16 (C-4); 67.71 (C-7); 62.07 (C-9); 52.34 (COOCH₃); 50.24 (C-5); 38.66 (C-3); 20.77, 20.36, 20.25, 19.91 (je COCH₃).

Methyl-5-*N*-propanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat (**39**)

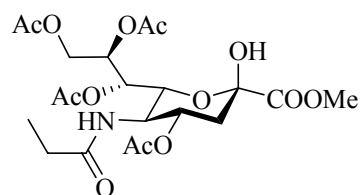
C₂₁H₃₁NO₁₃ (505.47)

farbloser, amorpher Feststoff

R_f (EE) = 0.63

$[\alpha]_D^{20} = -5.1$ (c 1, CHCl₃)

Ausbeute: 160 mg (317 μ mol, 65 %)



290 mg (485 μ mol) **36** werden in 10 mL Aceton gelöst und 0.6 mL Wasser zugegeben. Die Lösung wird mit 200 mg (1.12 mmol) NBS versetzt und eine halbe Stunde bei RT gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Die Lösung wird jeweils zweimal mit ges. NaHCO_3 -Lsg. und Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: PE/Aceton = 2/1 $\rightarrow$ 1/1) gereinigt

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 5.72 (dd, 1H, H-7); 5.62 (ddd, 1H, H-8); 5.32 (ddd, 1H, H-4); 5.27 (d, 1H, NH); 5.08-5.05 (m, 2H, H-9a/OH); 4.60 (ddd, 1H, H-5); 4.40 (dd, 1H, H-6); 4.25 (dd, 1H, H-9b); 3.32 (s, 3H, COOCH_3); 2.27-2.21 (m, 2H, H-3ax/H-3eq); 2.01-1.84 (m, 2H, CH_2 -Prop); 1.94, 1.88, 1.71, 1.62 (je s, 3H, COCH_3) 1.08 (dd, 3H, CH_3 -Prop).

$^3J_{3\text{ax},4} = 10.4$; $^3J_{3\text{eq},4} = 6.4$; $^3J_{4,5} = 10.4$; $^3J_{5,6} = 10.5$; $^3J_{5,\text{NH}} = 10.4$; $^3J_{6,7} = 2.4$; $^3J_{7,8} = 3.8$; $^3J_{8,9\text{a}} = 2.3$; $^3J_{8,9\text{b}} = 8.1$; $^2J_{9\text{a},9\text{b}} = 12.2$; $^3J_{(\text{CH}_2,\text{CH}_3)\text{Prop}} = 7.6$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 95.68 (C-2); 73.53 (C-8); 72.60 (C-6); 69.71 (C-4); 69.02 (C-7); 63.53 (C-9); 53.09 (COOCH_3); 49.68 (C-5); 37.12 (C-3); 30.01 (C-2-Prop); 21.06, 20.91, 20.71, 20.69 (je COCH_3); 10.07 (C-3-Prop).

Methyl-5-*N*-butanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate (**40**)

$\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{NO}_{13}$ (519.20)

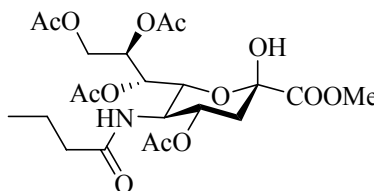
farbloser Feststoff

R_f (EE) = 0.70

$[\alpha]_{546}^{20} = -3$ (c 0.5, CHCl_3)

Ausbeute: 46 mg (89 μ mol, 54 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 542.2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$



100 mg (164 μ mol) **35** werden in 4 mL Aceton gelöst und 0.2 mL Wasser zugegeben. Die Lösung wird mit 75 mg (0.42 mmol) NBS versetzt und eine halbe Stunde bei RT gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Die Lösung wird jeweils zweimal mit ges. NaHCO₃-Lsg. und Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: EE) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 5.66 (dd, 1H, H-7); 5.61 (ddd, 1H, H-8); 5.32 (ddd, 1H, H-4); 5.03 (dd, 1H, H-9a); 4.97 (d, 1H, NH); 4.58 (ddd, 1H, H-5); 4.32 (dd, 1H, H-6); 4.24 (dd, 1H, H-9b); 3.29 (s, 3H; COOCH₃); 2.25-2.20 (m, 2H, H-3_{ax}/3_{eq}); 1.92, 1.87, 1.70, 1.63 (je s, 3H, COCH₃); 1.92-1.79 (m, 2H, CH₂a-But); 1.65-1.58 (m, 2H, CH₂b-But); 0.83 (dd, 3H, CH₃-But).

³J_{4,5} = 10.2; ³J_{5,6} = 10.6; ³J_{5,NH} = 10.2; ³J_{6,7} = 2.3; ³J_{7,8} = 4.3; ³J_{8,9a} = 2.0; ³J_{8,9b} = 7.9; ²J_{9a,9b} = 11.9 Hz; ³J_{CH₂,CH₃} = 7.6 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 95.72 (C-2); 73.41 (C-6); 72.53 (C-8); 69.81 (C-4); 69.00 (C-7); 63.72 (C-9); 53.24 (COOCH₃); 49.66 (C-5); 38.92 (C-3); 37.17 (C-2-But); 21.16, 21.04, 20.89, 20.83 (je COCH₃); 19.45 (C-3-But); 14.29 (CH₃-But).

Methyl-5-*N*-isobutanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat (**41**)

C₂₂H₃₃NO₁₃ (519.50)

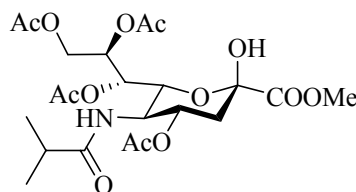
amorpher Feststoff

R_f (EE) = 0.67

$[\alpha]_{546}^{20} = -38$ (*c* 1, CHCl₃)

Ausbeute: 258 mg (497 μ mol, 78 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): *m/z* = 542.0 [M+Na]⁺



390 mg (638 μmol) **37** werden in 15 mL Aceton gelöst und 0.7 mL Wasser zugegeben. Die Lösung wird mit 317 mg (1.79 mmol) NBS versetzt, eine halbe Stunde bei RT gerührt und weitere 317 mg (1.79 mmol) NBS zugegeben. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Die Lösung wird jeweils zweimal mit ges. NaHCO_3 -Lsg. und Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: EE) gereinigt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 5.64 (dd, 1H, H-7); 5.59 (ddd, 1H, H-8); 5.34 (ddd, 1H, H-4); 5.03 (d, 1H, NH); 5.02 (dd, 1H, H-9a); 4.90 (d, 1H, OH); 4.57 (ddd, 1H, H-5); 4.33 (dd, 1H, H-6); 4.23 (dd, 1H, H-9b); 3.30 (s, 3H, COOCH_3); 2.26 (ddd, 1H, H-3_{ax}); 2.19 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.05-1.99 (m, 1H, CH-But); 1.92, 1.87, 1.70, 1.63 (je s, 3H, COCH_3); 1.17 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{a-But}$); 1.03 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{b-But}$).

$^2\text{J}_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.8$; $^3\text{J}_{3\text{ax},4} = 11.3$; $^3\text{J}_{3\text{ax},\text{OH}} = 1.5$; $^3\text{J}_{3\text{eq},4} = 5.3$; $^3\text{J}_{4,5} = 10.3$; $^3\text{J}_{5,6} = 10.5$; $^3\text{J}_{5,\text{NH}} = 10.3$; $^3\text{J}_{6,7} = 2.3$; $^3\text{J}_{7,8} = 4.0$; $^3\text{J}_{8,9\text{a}} = 2.3$; $^3\text{J}_{8,9\text{b}} = 8.0$; $^2\text{J}_{9\text{a},9\text{b}} = 12.3$; $^3\text{J}_{(\text{CH},\text{CH}_3\text{a})\text{But}} = 6.9$; $^3\text{J}_{(\text{CH},\text{CH}_3\text{b})\text{But}} = 6.9$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 95.33 (C-2); 73.00 (C-8); 72.15 (C-6); 69.32 (C-4); 68.54 (C-7); 63.31 (C-9); 52.81 (COOCH_3); 49.27 (C-5); 36.79 (C-3); 35.72 (CH-But); 20.71, 20.57, 20.42, 20.38 (je COCH_3); 19.69 ($\text{CH}_3\text{a-But}$); 19.18 ($\text{CH}_3\text{b-But}$).

Methyl-5-*N*-trifluoracetyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat (**42**)

$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{NO}_{13}$ (545.41)

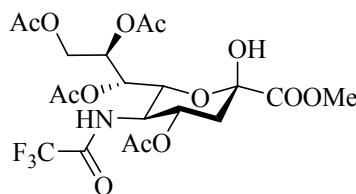
amorpher Feststoff

R_f (DCM/MeOH = 15/1) = 0.45

$[\alpha]_{546}^{20} = +2$ (c 1, CHCl_3)

Ausbeute: 172 mg (315 μmol , 63 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 568.3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 584.3 $[\text{M}+\text{K}]^+$



318 mg (499 μmol) **38** werden in 14 mL Aceton gelöst und 0.7 mL Wasser zugegeben. Die Lösung wird mit 250 mg (1.41 mmol) NBS versetzt, eine halbe Stunde bei RT gerührt und weitere 250 mg (1.41 mmol) NBS zugegeben. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 15/1) verfolgt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Die Lösung wird jeweils zweimal mit ges. NaHCO_3 -Lsg. und Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 15/1) gereinigt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 7.54 (d, 1H, NH); 5.80 (dd, 1H, H-7); 5.69-5.65 (m, 2H, H-8/OH); 5.39 (ddd, 1H, H-4); 5.10 (dd, 1H, H-9a); 4.68 (dd, 1H, H-6); 4.54 (ddd, 1H, H-5); 4.20 (dd, 1H, H-9b); 3.38 (s, 3H, COOCH_3); 2.26 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.17 (ddd, 1H, H-3_{ax}); 1.86, 1.83, 1.72, 1.57 (je s, 3H, COCH_3).

$^2\text{J}_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.7$; $^3\text{J}_{3\text{ax},4} = 12.9$; $^3\text{J}_{3\text{ax},\text{OH}} = 1.3$; $^3\text{J}_{3\text{eq},4} = 5.1$; $^3\text{J}_{4,5} = 10.4$; $^3\text{J}_{5,6} = 10.4$; $^3\text{J}_{5,\text{NH}} = 10.4$; $^3\text{J}_{6,7} = 2.5$; $^3\text{J}_{7,8} = 2.8$; $^3\text{J}_{8,9\text{a}} = 2.3$; $^3\text{J}_{8,9\text{b}} = 8.6$; $^2\text{J}_{9\text{a},9\text{b}} = 12.2$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 95.80 (C-2); 73.74 (C-8); 72.10 (C-6); 69.45 (C-4); 68.87 (C-7); 63.20 (C-9); 53.11 (COOCH_3); 50.73 (C-5); 37.12 (C-3); 20.79, 20.71, 20.50, 20.25 (je COCH_3).

Methyl-5-*N*-propanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2-chlor-3,5-didesoxy- β -**D**-glycero-**D**-galacto-2-nonulopyranosylonat (**43**)

$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{ClNO}_{12}$ (523.92)

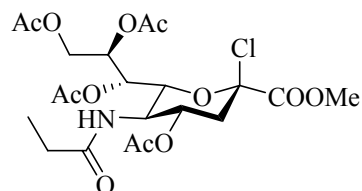
amorpher Feststoff

R_f (EE) = 0.60

$[\alpha]_{546}^{20} = +55$ (c 1, CHCl_3)

Ausbeute: 154 mg (294 μmol , 99 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 545.9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$



150 mg (297 μmol) **39** werden bei 0 °C in 35 mL AcCl gelöst und tropfenweise mit 0.6 mL MeOH versetzt. Es wird ca. 17 h bei RT und verschlossenem Reaktionsgefäß gerührt. Durch Entfernen des Lösungsmittels wird die Reaktion abgebrochen.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 5.58 (dd, 1H, H-7); 5.53 (ddd, 1H, H-8); 5.29 (ddd, 1H, H-4); 4.81 (dd, 1H, H-9a); 4.54 (d, 1H, NH); 4.48 (ddd, 1H, H-5); 4.28 (dd, 1H, H-9b); 4.25 (dd, 1H, H-6); 3.36 (s, 3H; COOCH_3); 2.73 (dd, 1H, H-3eq); 2.02 (dd, 1H, H-3ax); 1.92, 1.91 (je s, 3H, COCH_3); 1.90-1.76 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Prop}$); 1.75, 1.62 (je s, 3H, COCH_3); 1.07 (dd, 3H, $\text{CH}_3\text{-Prop}$).

$^2J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 14.0$; $^3J_{3\text{ax},4} = 10.0$; $^3J_{3\text{eq},4} = 4.5$; $^3J_{4,5} = 10.0$; $^3J_{5,6} = 10.0$; $^3J_{5,\text{NH}} = 10.0$; $^3J_{6,7} = 2.2$; $^3J_{7,8} = 6.3$; $^3J_{8,9\text{a}} = 2.5$; $^3J_{8,9\text{b}} = 6.0$; $^2J_{9\text{a},9\text{b}} = 12.6$ Hz; $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.7$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 97.75 (C-2); 74.80 (C-6); 71.08 (C-8); 68.66 (C-4); 67.24 (C-7); 62.60 (C-9); 53.18 (COOCH_3); 48.46 (C-5); 41.15 (C-3); 29.62 (C-2-Prop); 20.74, 20.54, 20.36, 20.26 (je COCH_3); 9.65 (C-3-Prop).

Methyl-5-*N*-butanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2-chlor-3,5-didesoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat (**44**)

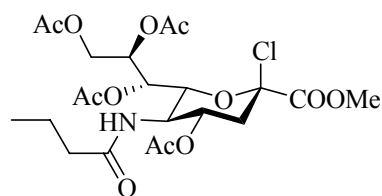
$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{ClNO}_{12}$ (537.94)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_{546}^{20} = +45$ (c 1, CHCl_3)

R_f (EE) = 0.63

Ausbeute: 260 mg (483 μmol , 100 %)



251 mg (484 μmol) **40** werden bei 0 °C in 65 mL AcCl gelöst und tropfenweise mit 1.2 mL MeOH versetzt. Es wird ca. 17 h bei RT und verschlossenem Reaktionsgefäß gerührt. Durch Entfernen des Lösungsmittels wird die Reaktion abgebrochen und das Produkt getrocknet.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.35-5.28 (m, 2H, H-4/H-7); 5.20 (d, 1H, NH); 5.06 (ddd, 1H, H-8); 4.31 (dd, 1H, H-9a); 4.25 (dd, 1H, H-6); 4.12 (ddd, 1H, H-5); 3.95 (dd, 1H,

H-9b); 3.77 (s, 3H, COOCH₃); 2.68 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.17 (dd, 1H, H-3_{ax}); 2.02, 1.97, 1.95, 1.93 (je s, 3H, COCH₃); 1.99-1.91 (m, 2H, CH₂a-But); 1.51-1.44 (m, 2H, CH₂b-But); 0.82 (dd, 3H, CH₃-But).

²J_{3ax,3eq} = 13.9; ³J_{3ax,4} = 11.2; ³J_{3eq,4} = 4.7; ³J_{4,5} = 10.0; ³J_{5,6} = 10.9; ³J_{5,NH} = 9.7; ³J_{6,7} = 1.8; ³J_{7,8} = 6.6; ³J_{8,9a} = 2.8; ³J_{8,9b} = 5.8; ²J_{9a,9b} = 12.4 Hz; ³J_{CH₂,CH₃} = 7.4 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 97.00 (C-2); 74.37 (C-6); 70.35 (C-8); 69.05 (C-4); 67.28 (C-7); 62.48 (C-9); 54.19 (COOCH₃); 48.97 (C-5); 41.07 (C-3); 39.00 (C-2-But); 21.34, 21.26, 21.17, 21.18 (je COCH₃); 19.18 (C-3-But); 14.10 (C-4-But).

Methyl-5-*N*-isobutanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2-chlor-3,5-didesoxy-β-**D**-glycero-**D**-galacto-2-nonulopyranosylonat (**45**)

C₂₂H₃₂ClNO₁₂ (537.94)

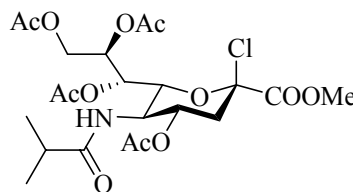
amorpher Feststoff

R_f (EE) = 0.65

[α]₅₄₆²⁰ = +8 (c 1, CHCl₃)

Ausbeute: 261 mg (485 μmol, 100 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 559.9 [M+Na]⁺



253 mg (487 μmol) **41** werden bei 0 °C in 30 mL AcCl gelöst und tropfenweise mit 0.6 mL MeOH versetzt. Es wird ca. 17 h bei RT und verschlossenem Reaktionsgefäß gerührt. Durch Entfernen des Lösungsmittels wird die Reaktion abgebrochen und das Produkt getrocknet.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 5.56-5.51 (m, 2H, H-7/H-8); 5.29 (ddd, 1H, H-4); 4.81 (dd, 1H, H-9a); 4.47 (ddd, 1H, H-5); 4.34 (d, 1H, NH); 4.28 (dd, 1H, H-9b); 4.23 (dd, 1H, H-6); 3.35 (s, 3H, COOCH₃); 2.72 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.01 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.96-1.91 (m, 1H, CH-But); 1.90, 1.89, 1.74, 1.60 (je s, 3H, COCH₃); 1.16 (d, 3H, CH₃a-But); 1.01 (d, 3H, CH₃b-But).

²J_{3ax,3eq} = 13.0; ³J_{3ax,4} = 11.2; ³J_{3eq,4} = 4.8; ³J_{4,5} = 10.7; ³J_{5,6} = 10.7; ³J_{5,NH} = 10.7; ³J_{6,7} = 2.0; ³J_{7,8} = 6.4; ³J_{8,9a} = 2.0; ³J_{8,9b} = 5.8; ²J_{9a,9b} = 12.5; ³J_{(CH,CH₃a)But} = 6.8; ³J_{(CH,CH₃b)But} = 7.1 Hz.

^{13}C -NMR (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 98.03 (C-2); 72.11 (C-6); 71.35 (C-8); 68.75 (C-4); 67.46 (C-7); 62.90 (C-9); 53.48 (COOCH_3); 48.57 (C-5); 41.47 (C-3); 35.90 (CH-But); 21.02, 20.83, 20.82, 20.68 (je COCH_3); 19.39 ($\text{CH}_3\text{a-But}$); 19.36 ($\text{CH}_3\text{b-But}$).

Methyl-5-*N*-trifluoroacetyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2-chlor-3,5-didesoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat (**46**)

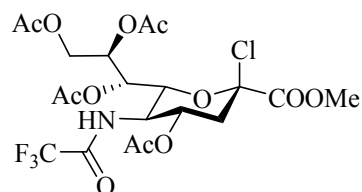
$\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{ClF}_3\text{NO}_{12}$ (586.86)

amorpher Feststoff

R_f (DCM/MeOH = 13/1) = 0.45

$[\alpha]_{546}^{20} = +37$ (c 1, CHCl_3)

Ausbeute: 169 mg (288 μmol , 97 %)



162 mg (297 μmol) **42** werden bei 0 °C in 35 mL AcCl gelöst und tropfenweise mit 0.6 mL MeOH versetzt. Es wird ca. 17 h bei RT und verschlossenem Reaktionsgefäß gerührt. Durch Entfernen des Lösungsmittels wird die Reaktion abgebrochen und das Produkt getrocknet.

^1H -NMR (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 6.06 (d, 1H, NH); 5.57 (dd, 1H, H-7); 5.49 (ddd, 1H, H-8); 5.29 (ddd, 1H, H-4); 4.71 (dd, 1H, H-9a); 4.31 (ddd, 1H, H-5); 4.26 (dd, 1H, H-6); 4.21 (dd, 1H, H-9b); 3.35 (s, 3H, COOCH_3); 2.66 (dd, 1H, H-3_{eq}); 1.89 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.86, 1.81, 1.72, 1.55 (je s, 3H, COCH_3).

$^2J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 14.1$; $^3J_{3\text{ax},4} = 11.3$; $^3J_{3\text{eq},4} = 5.0$; $^3J_{4,5} = 10.0$; $^3J_{5,6} = 10.8$; $^3J_{5,\text{NH}} = 10.0$; $^3J_{6,7} = 2.3$; $^3J_{7,8} = 6.5$; $^3J_{8,9\text{a}} = 2.5$; $^3J_{8,9\text{b}} = 5.8$; $^2J_{9\text{a},9\text{b}} = 12.8$ Hz.

^{13}C -NMR (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 73.74 (C-6); 70.70 (C-8); 67.91 (C-4); 66.95 (C-7); 62.20 (C-9); 53.25 (COOCH_3); 49.63 (C-5); 40.96 (C-3); 20.62, 20.26, 20.16, 19.83 (je COCH_3).

4-Nitrophenyl-(methyl-5-*N*-propanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate) (**47**)

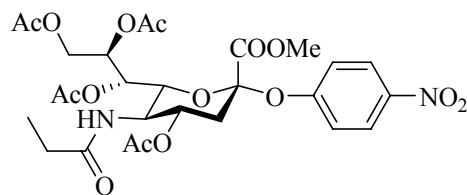
C₂₇H₃₄NO₁₅ (626.56)

amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +20$ (*c* 1, CHCl₃)

Ausbeute: 80.0 mg (128 μ mol, 42 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): *m/z* = 649.0 [M+Na]⁺; 665.0 [M+K]⁺



160 mg (305 μ mol) **43** werden mit 120 mg TBA-HSO₄ und 75 mg (539 μ mol) *p*NP-OH in 4 mL DCM in einem Falcon-Tube gelöst und 2 mL 1M NaOH zugegeben. Bei RT wird drei Stunden stark gerührt. Der Reaktionsabbruch erfolgt durch Ausschütteln mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel PE/Aceton = 2/1) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 8.09 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.04 (d, 2H, H-b_{arom}); 5.71 (ddd, 1H, H-8); 5.49 (dd, 1H, H-7); 4.94 (ddd, 1H, H-4); 4.67 (dd, 1H, H-6); 4.44 (ddd, 1H, H-5); 4.44 (dd, 1H, H-9a); 4.23 (dd, 1H, H-9b); 4.21 (d, 1H, NH); 3.09 (s, 3H, COOCH₃); 2.74 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.23 (dd, 1H, H-3_{ax}); 2.06, 1.86 (je s, 3H, COCH₃); 1.84-1.68 (m, 2H, CH₂-Prop); 1.77, 1.59 (je s, 3H, COCH₃); 1.03 (dd, 3H, CH₃-Prop).

²J_{3ax,3eq} = 13.0; ³J_{3ax,4} = 12.4; ³J_{3eq,4} = 4.6; ³J_{4,5} = 10.4; ³J_{5,6} = 10.7; ³J_{5,NH} = 9.5; ³J_{6,7} = 1.8; ³J_{7,8} = 8.6; ³J_{8,9a} = 2.3; ³J_{8,9b} = 5.6; ²J_{9a,9b} = 12.7 Hz; ³J_{CH₂,CH₃} = 7.4; ³J_{(Ha,Hb)_{arom}} = 9.2 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 126.23 (C-a_{arom}); 119.20 (C-b_{arom}); 100.26 (C-2); 74.85 (C-6); 69.87 (C-8); 68.73 (C-4); 67.73 (C-7); 62.87 (C-9); 53.10 (COOCH₃); 49.43 (C-5); 39.65 (C-3); 30.04 (C-2-Prop); 21.23, 20.86, 20.76, 20.61 (je COCH₃); 10.11 (CH₃-Prop).

4-Nitrophenyl-(methyl-5-*N*-butanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate) (**48**)

C₂₈H₃₆N₂O₁₅ (640.60)

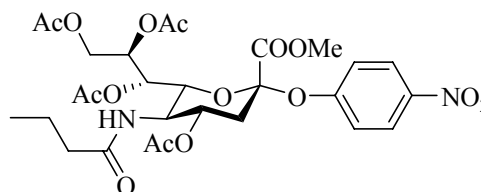
farbloser Feststoff, Smp.: 104 °C

R_f (EE) = 0.41

[α]₅₄₆²⁰ = +16 (*c* 0.5, CHCl₃)

Ausbeute: 177 mg (276 μ mol, 57 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): *m/z* = 663.3 [M+Na]⁺, 679.4 [M+K]⁺



260 mg (483 μ mol) **44** werden mit 200 mg TBA-HSO₄ und 105 mg (2.27 mmol) *p*NP-OH in 2.5 mL DCM in einem Falcon-Tube gelöst und 1.25 mL 1M NaOH zugegeben. Bei RT wird drei Stunden stark gerührt. Der Reaktionsabbruch erfolgt durch Ausschütteln mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel EE/PE = 10/1) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 8.09 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.05 (d, 2H, H-b_{arom}); 5.73 (ddd, 1H, H-8); 5.50 (dd, 1H, H-7); 4.97 (ddd, 1H, H-4); 4.72 (dd, 1H, H-6); 4.49-4.42 (m, 2H, H-5/H-9a); 4.24 (dd, 1H, H-9b); 4.20 (d, 1H, NH); 3.08 (s, 3H, COOCH₃); 2.72 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.23 (dd, 1H, H-3_{ax}); 2.07, 1.85, 1.77, 1.61 (je s, 3H, COCH₃); 1.90-1.49 (m, 4H, 2 x CH₂); 0.84 (dd, 3H, CH₃).

²J_{3ax,3eq} = 13.2; ³J_{3ax,4} = 12.7; ³J_{3eq,4} = 4.6; ³J_{4,5} = 10.9; ³J_{5,6} = 10.6; ³J_{6,7} = 2.0; ³J_{7,8} = 8.6; ³J_{8,9a} = 2.7; ³J_{8,9b} = 5.6; ²J_{9a,9b} = 12.5; ³J_{CH₂,CH₃} = 7.2; ³J_{(Ha,Hb)_{arom}} = 9.4 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 126.23 (C-a_{arom}); 119.20 (C-b_{arom}); 74.86 (C-6); 69.89 (C-8); 68.72 (C-4); 67.83 (C-7); 62.92 (C-9); 53.11 (COOCH₃); 49.37 (C-5); 39.69 (C-3); 38.79 (C-2-But); 21.24, 20.88, 20.76, 20.69 (je COCH₃); 19.40 (C-3-But); 14.24 (CH₃-But).

4-Nitrophenyl-(methyl-5-*N*-isobutanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -
D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate) (49)

C₂₈H₃₆N₂O₁₅ (640.59)

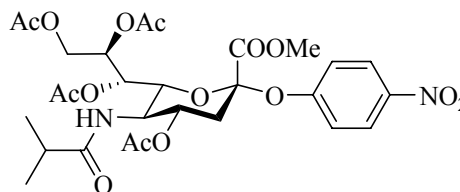
amorpher Feststoff

R_f (EE) = 0.64

[α]₅₄₆²⁰ = +16 (*c* 1, CHCl₃)

Ausbeute: 133 mg (208 μ mol, 44 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): *m/z* = 663.0 [M+Na]⁺



255 mg (474 μ mol) **45** werden mit 200 mg TBA-HSO₄ und 106 mg (762 μ mol) *p*NP-OH in 2.8 mL DCM in einem Falcon-Tube gelöst und 2 mL 1M NaOH zugegeben. Bei RT wird drei Stunden stark gerührt. Der Reaktionsabbruch erfolgt durch Ausschütteln mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: EE) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 8.01 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.04 (d, 2H, H-b_{arom}); 5.72 (ddd, 1H, H-8); 5.49 (dd, 1H, H-7); 4.98 (ddd, 1H, H-4); 4.72 (dd, 1H, H-6); 4.46 (ddd, 1H, H-5); 4.43 (dd, 1H, H-9a); 4.25 (d, 1H, NH); 4.23 (dd, 1H, H-9b); 3.08 (s, 3H, COOCH₃); 2.73 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.24 (dd, 1H, H-3_{ax}); 2.06 (s, 3H, COCH₃); 1.95-1.91 (m, 1H, CH-But); 1.85, 1.77, 1.60 (je s, 3H, COCH₃); 1.13 (d, 3H, CH₃a-But); 0.97 (d, 3H, CH₃b-But).

²J_{3ax,3eq} = 12.7; ³J_{3ax,4} = 12.7; ³J_{3eq,4} = 4.6; ³J_{4,5} = 10.2; ³J_{5,6} = 10.2; ³J_{5,NH} = 10.9; ³J_{6,7} = 2.0; ³J_{7,8} = 8.7; ³J_{8,9a} = 2.8; ³J_{8,9b} = 5.9; ²J_{9a,9b} = 12.5; ³J_{(CH,CH3a)But} = 6.9; ³J_{(CH,CH3b)But} = 6.9; ³J_{(Ha,Hb)arom} = 9.2 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 118.88 (C-a_{arom}); 115.37 (C-b_{arom}); 74.48 (C-6); 69.52 (C-8); 68.25 (C-4); 67.41 (C-7); 62.52 (C-9); 52.67 (COOCH₃); 48.95 (C-5); 39.26 (C-3); 38.79 (CH-But); 20.80, 20.41, 20.31, 20.23 (je COCH₃); 19.62 (CH₃a-But); 19.08 (CH₃b-But).

4-Nitrophenyl-(methyl-5-*N*-trifluoracetyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosylonate) (**50**)

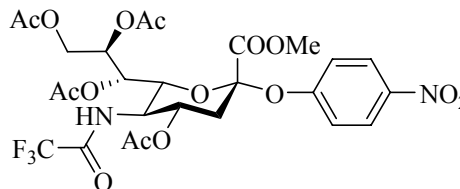
C₂₆H₂₉F₃N₂O₁₅ (670.57)

amorpher Feststoff

R_f (DCM/MeOH = 30/1) = 0.22

[α]₅₄₆²⁰ = +51 (*c* 1, CHCl₃)

Ausbeute: 82 mg (0.122 μ mol, 45 %)



160 mg (273 μ mol) **46** werden mit 97 mg TBA-HSO₄ und 54 mg (388 μ mol) *p*NP-OH in 1.5 mL DCM in einem Falcon-Tube gelöst und 1 mL 1M NaOH zugegeben. Bei RT wird drei Stunden stark gerührt. Der Reaktionsabbruch erfolgt durch Ausschütteln mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 30/1) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 8.07 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.01 (d, 2H, H-b_{arom}); 5.82 (d, 1H, NH); 5.66 (ddd, 1H, H-8); 5.52 (dd, 1H, H-7); 4.96 (ddd, 1H, H-4); 4.74 (dd, 1H, H-6); 4.35 (dd, 1H, H-9a); 4.31 (ddd, 1H, H-5); 4.17 (dd, 1H, H-9b); 3.08 (s, 3H, COOCH₃); 2.74 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.11 (dd, 1H, H-3_{ax}); 2.06 (s, 3H, COCH₃); 2.01; 1.76, 1.74, 1.55 (je s, 3H, COCH₃).

²J_{3ax,3eq} = 13.1; ³J_{3ax,4} = 12.8; ³J_{3eq,4} = 4.4; ³J_{4,5} = 9.5; ³J_{5,6} = 10.7; ³J_{5,NH} = 9.5; ³J_{6,7} = 2.0; ³J_{7,8} = 8.5; ³J_{8,9a} = 2.5; ³J_{8,9b} = 5.3; ²J_{9a,9b} = 12.6; ³J_{(Ha,Hb)arom} = 9.3 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 118.88 (C-a_{arom}); 115.22 (C-b_{arom}); 73.43 (C-6); 69.18 (C-8); 67.63 (C-4); 67.09 (C-7); 62.01 (C-9); 52.80 (COOCH₃); 50.20 (C-5); 39.06 (C-3); 20.72, 20.22, 20.11, 19.82 (je COCH₃).

4-Nitrophenyl-(methyl-5-*N*-propanoyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat) (**51**)

C₁₉H₂₆N₂O₁₁ (458.42)

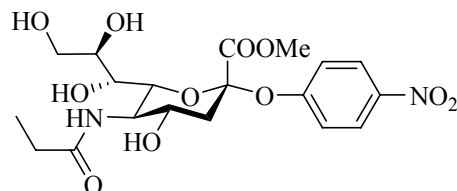
farbloser Feststoff, Smp.: 103 °C

R_f (EE/MeOH = 4/1) = 0.52

[α]₅₄₆²⁰ = +33 (*c* 1, MeOH)

Ausbeute: 40 mg (87 μ mol, 68 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): *m/z* = 481.3 [M+K]⁺; 497.0 [M+K]⁺



80.0 mg (128 μ mol) **47** werden in 15 mL abs. Methanol gelöst und nach AAV2 mit NaOMe versetzt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt und nach 2 h durch Neutralisation mit Ionentauscher Amberlite IR 120 H⁺ abgebrochen. Der Ionentauscher wird abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Laufmittel: EE/MeOH = 6/1) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.20 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.34 (d, 2H, H-b_{arom}); 4.17 (dd, 1H, H-6); 3.90 (dd, 1H, H-5); 3.83-3.74 (m, 3H, H-4/H-8/H-9a); 3.72 (s, 3H, COOCH₃); 3.62 (dd, 1H, H-9b); 3.51 (dd, 1H, H-7); 2.78 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.29 (ddd, 2H, CH₂-Prop); 2.04 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.15 (dd, 3H, CH₃).

²J_{3ax,3eq} = 12.7; ³J_{3ax,4} = 13.0; ³J_{3eq,4} = 4.3; ³J_{4,5} = 10.4; ³J_{5,6} = 10.4; ³J_{6,7} = 1.5; ³J_{7,8} = 8.9; ³J_{8,9b} = 5.9; ²J_{9a,9b} = 11.7; ³J_(CH₂,CH₃) = 7.6; ³J_{(Ha,Hb)_{arom}} = 9.4 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 126.71 (C-a_{arom}); 121.67 (C-b_{arom}); 102.34 (C-2); 76.70 (C-6); 72.33 (C-8); 70.56 (C-7); 68.23 (C-4); 65.54 (C-9); 53.91 (COOCH₃); 53.57 (C-5); 42.65 (C-3); 30.59 (C-2-Prop); 10.71 (CH₃-Prop).

4-Nitrophenyl-(methyl-5-*N*-butanoyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate) (**52**)

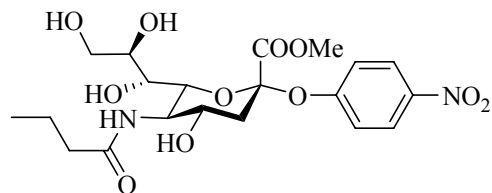
C₂₀H₂₈N₂O₁₁ (472.44)

farbloser Feststoff, Smp.: 95 °C

R_f (EE/MeOH = 6/1) = 0.35

[α]₅₄₆²⁰ = +60 (*c* 1, MeOH)

Ausbeute: 103 mg (218 μ mol, 82 %)



170 mg (265 μ mol) **48** werden in 15 mL abs MeOH gelöst und nach AAV2 mit NaOMe versetzt bis pH = 9 erreicht ist. DC Kontrolle (Laufmittel: EE/MeOH = 4/1) nach 1.5 Stunden. Abbruch der Reaktion erfolgt durch Neutralisation unter Zugabe von Ionentauscher Amberlite IR 120 (H⁺). Der Ionentauscher wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: EE/MeOH = 6/1) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.21 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.35 (d, 2H, H-b_{arom}); 4.17 (dd, 1H, H-6); 3.92 (dd, 1H, H-5); 3.84-3.77 (m, 3H, H-4/H-8/H-9a); 3.74 (s, 3H, COOCH₃); 3.63 (dd, 1H, H-9b); 3.54 (dd, 1H, H-7); 2.79 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.28-2.20 (m, 2H, CH₂-a-But); 2.05 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.72-1.62 (m, 2H, CH₂-b-But); 0.98 (dd, 3H, CH₃).

²J_{3ax,3eq} = 12.5; ³J_{3ax,4} = 12.2; ³J_{3eq,4} = 4.5; ³J_{4,5} = 10.4; ³J_{5,6} = 10.4; ³J_{6,7} = 1.3; ³J_{7,8} = 8.5; ³J_{8,9b} = 5.6; ²J_{9a,9b} = 11.5; ³J_{CH₂,CH₃} = 7.4; ³J_{(Ha,Hb)arom} = 9.2 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 125.18 (C-a_{arom}); 120.17 (C-b_{arom}); 75.19 (C-6); 70.81 (C-8); 69.12 (C-7); 66.70 (C-4); 64.07 (C-9); 52.38 (COOCH₃); 52.31 (C-5); 41.19 (C-3); 37.93 (C-2-But); 19.18 (C-3-But); 12.96 (CH₃-But).

4-Nitrophenyl-(methyl-5-*N*-isobutanoyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate) (**53**)

C₂₀H₂₈N₂O₁₁ (472.44)

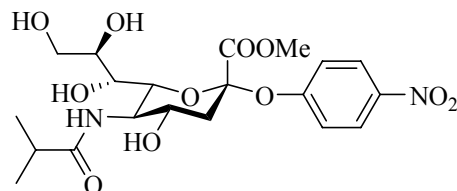
farbloser Feststoff, Smp.: 115 °C

R_f (EE/MeOH = 6/1) = 0.67

[α]₅₄₆²⁰ = +32 (*c* 1, MeOH)

Ausbeute: 56.3 mg (119 μ mol, 64 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): *m/z* = 495.2 [M+Na]⁺, 511.1 [M+K]⁺



118 mg (184 μ mol) **49** werden in 8 mL abs. Methanol gelöst und nach AAV2 mit NaOMe versetzt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt und nach 2 h durch Neutralisation mit Ionentauscher Amberlite IR 120 (H⁺) abgebrochen. Der Ionentauscher wird abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Laufmittel: EE/MeOH = 6/1) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.20 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.34 (d, 2H, H-b_{arom}); 4.16 (dd, 1H, H-6); 3.88 (dd, 1H, H-5); 3.83-3.76 (m, 3H, H-4/H-8/H-9a); 3.73 (s, 3H, COOCH₃); 3.62 (dd, 1H, H-9b); 3.49 (dd, 1H, H-7); 2.78 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.51 (h, 1H, CH-But); 2.04 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.15 (2xCH₃-But).

²J_{3ax,3eq} = 13.1; ³J_{3ax,4} = 11.8; ³J_{3eq,4} = 4.3; ³J_{4,5} = 10.3; ³J_{5,6} = 10.3; ³J_{6,7} = 1.3; ³J_{7,8} = 9.0; ³J_{8,9b} = 5.8; ²J_{9a,9b} = 10.5; ³J_{(CH,CH3)But} = 7.0; ³J_{(Ha,Hb)arom} = 9.3 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 126.27 (C-a_{arom}); 121.41 (C-b_{arom}); 102.01 (C-2); 76.36 (C-6); 71.96 (C-8); 70.27 (C-7); 67.78 (C-4); 65.19 (C-9); 53.49 (COOCH₃); 53.37 (C-5); 42.32 (C-3); 36.46 (CH-But); 20.09 (CH₃a-But); 19.68 (CH₃b-But).

4-Nitrophenyl-(methyl-5-*N*-trifluoracetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat) (**54**)

C₁₆H₂₂ N₂O₁₀ (498.36)

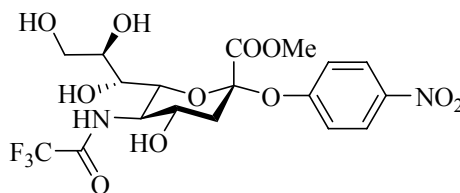
farbloser Feststoff, Smp.: 165 °C

R_f (EE) = 0.54

[α]₅₄₆²⁰ = +30 (*c* 1, MeOH)

Ausbeute: 39 mg (78 μ mol, 66 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): *m/z* = 521.2 [M+Na]⁺, 537.2 [M+K]⁺



80.0 mg (119 μ mol) **50** werden in 5 mL abs. Methanol gelöst und bis pH = 9 mit NaOMe versetzt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt und nach 2 h durch Neutralisation mit Ionentauscher Amberlite IR 120 (H⁺) abgebrochen. Der Ionentauscher wird abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Laufmittel: EE) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.19 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.35 (d, 2H, H-b_{arom}); 4.42 (dd, 1H, H-6); 4.12 (dd, 1H, H-5); 3.83-3.75 (m, 3H, H-4/H-8/H-9a); 3.73 (s, 3H, COOCH₃); 3.62 (dd, 1H, H-9b); 3.49 (dd, 1H, H-7); 2.78 (dd, 1H, H-3_{eq});); 2.09 (dd, 1H, H-3_{ax}).

²J_{3ax,3eq} = 12.8; ³J_{3ax,4} = 12.8; ³J_{3eq,4} = 4.5; ³J_{4,5} = 10.5; ³J_{5,6} = 10.5; ³J_{6,7} = 1.3; ³J_{7,8} = 9.0; ³J_{8,9b} = 5.3; ²J_{9a,9b} = 10.8; ³J_{(Ha,Hb)arom} = 9.3 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 126.27 (C-a_{arom}); 121.34 (C-b_{arom}); 99.95 (C-2); 75.29 (C-6); 72.24 (C-8); 70.11 (C-7); 67.67 (C-4); 65.08 (C-9); 53.73 (C-5); 53.49 (COOCH₃); 42.20 (C-3).

Thiophenyl-(methyl-5-*N*-benzyloxyacetyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-
 α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat) (**55**)

C₃₃H₃₉NO₁₃S (689.73)

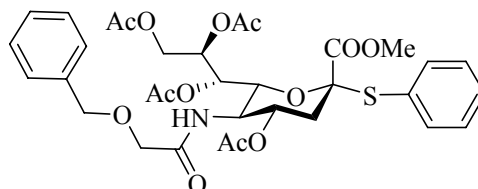
farbloser Sirup

R_f (EE) = 0.78

[α]₅₄₆²⁰ = +26 (*c* 1, CHCl₃)

Ausbeute: 420 mg (609 μ mol, 25 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): *m/z* = 612.0 [M+Na]⁺



1.45 g (2.49 mmol) **30** werden in 12 mL abs. MeOH gelöst und mit 340 μ L Methansulfonsäure versetzt und 24 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 5/3) verfolgt und das gebildete Amin durch Besprühen mit Ninhydrin-Lsg. detektiert. Die Lösung wird durch Zugabe von Triethylamin neutralisiert. Es werden weitere 1.0 mL Triethylamin zugegeben, die Lösung bei 0 °C mit 1.00 mL (3.95 mmol) Benzyloxyessigsäureanhydrid **56** versetzt und 1 h unter Eiskühlung gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 5/3) verfolgt. Die Lösung wird eingeeengt. Der Rückstand wird in 10 mL Essigsäureanhydrid gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit 10 mL abs. Pyridin versetzt. Es wird über Nacht bei RT gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt. Der Abbruch der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 1.5 mL MeOH bei 0 °C. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Toluol gelöst. Es wird mit 1M HCl und Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird zweimal säulenchromatographisch (Laufmittel: EE) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 7.64 (d, 2H, H-o (SPh)); 7.28-7.04 (m, 8H, H_{arom}); 6.28 (d, 1H, NH); 5.70 (dd, 1H, H-7); 5.66 (ddd, 1H, H-8); 5.09 (ddd, 1H, H-4); 4.72 (dd, 1H, H-9a); 4.76 (dd, 1H, H-9b); 4.40 (ddd, 1H, H-5); 4.24 (d, 1H, CH_{2a}-Bn); 4.13 (d, 1H, CH_{2b}-Bn); 4.06 (dd, 1H, H-6); 3.89 (d, 1H, CH_{2a}-Gc); 3.79 (d, 1H, CH_{2b}-Gc); 3.13 (s, 3H, COOCH₃); 3.06 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.07 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.94, 1.91, 1.75, 1.57 (je s, 3H, COCH₃).

$^2J_{3ax,3eq} = 12.7$; $^3J_{3ax,4} = 11.7$; $^3J_{3eq,4} = 4.6$; $^3J_{4,5} = 10.4$; $^3J_{5,6} = 10.7$; $^3J_{5,NH} = 10.2$; $^3J_{6,7} = 2.0$; $^3J_{7,8} = 7.1$; $^3J_{8,9a} = 2.3$; $^3J_{8,9b} = 5.3$; $^2J_{9a,9b} = 12.5$; $^2J_{CH_2-Bn} = 12.0$; $^2J_{CH_2-Gc} = 15.3$; $^3J_{H-m,H-o} = 8.4$; $^4J_{H-o,H-p} = 1.0$ Hz.

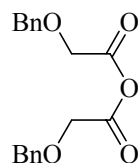
^{13}C -NMR (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 130.23, 129.54, 129.14, 128.82 (je C-arom); 75.70 (C-6); 73.58 (CH_2 -Bn); 70.90 (C-8); 70.02 (CH_2 -Gc); 69.93 (C-4); 68.55 (C-7); 62.69 (C-9); 52.61 ($COOCH_3$); 49.77 (C-5); 39.40 (C-3); 21.25, 21.06, 20.88, 20.69 (je $COCH_3$).

Benzyloxyessigsäureanhydrid (**56**)

$C_{18}H_{18}O_5$ (314.33)

farblose Flüssigkeit: $d^{20} = 1.24$

Ausbeute: 0.59 g (1.88 mmol, 58 %)

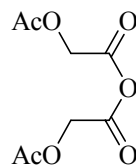


1.24 mL (6.50 mmol NaOH) 20%ige NaOH-Lösung und 208 mg (650 μ mol) TBA-Br gelöst in 5 mL DCM werden unter starkem Rühren in einem Falcon-Tube vorgelegt und bei $-10^\circ C$ über einen Zeitraum von fünfzehn Minuten 1.00 mL (6.44 mmol) Benzyloxyacetylchlorid gelöst in 10 mL DCM zugetropft. Die Lösung wird weitere 2 h bei $-10^\circ C$ gerührt und anschließend auf RT erwärmt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und die organische Phase jeweils zweimal mit $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser ausgeschüttelt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei geringer Temperatur im Vakuum entfernt.

1H -NMR (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 7.24-7.06 (m, 10H, H-arom); 4.25 (s, 4H, CH_2 -Bn); 3.73 (s, 4H, CH_2 -Ac).

^{13}C -NMR (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 166.33 (COO); 137.31 ($C_{arom}-CH_2$); 128.18 (C-ortho); 128.02 (C-meta); 127.86 (C-para); 73.03 (CH_2 -Bn); 67.05 (CH_2 -Ac).

Acetoxyessigsäureanhydrid in DCM (57)

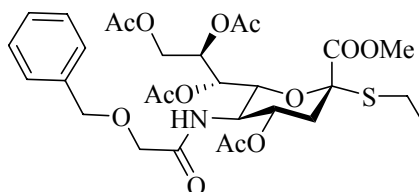
 $C_8H_{10}O_7$ (218.16)

1.24 mL (6.50 mmol NaOH) 20%ige NaOH-Lösung und 208 mg (645 μ mol) TBA-Br gelöst in 5 mL DCM werden unter starkem Rühren in einem Falcon-Tube vorgelegt und bei -10 °C über einen Zeitraum von fünfzehn Minuten 1.07 mL (6.44 mmol) Acetoxyacetylchlorid gelöst in 10 mL DCM zugetropft. Die Lösung wird weitere 2 h bei -10 °C. Die wässrige Phase wird abgetrennt und die organische Phase jeweils zweimal mit $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser ausgeschüttelt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei geringer Temperatur im Vakuum entfernt.

Thioethyl-(methyl-5-*N*-benzyloxyacetyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosylonot) (59)

 $C_{29}H_{39}NO_{13}S$ (641.68)

farbloser Sirup

 R_f (EE) = 0.74 $[\alpha]_{546}^{20} = +34$ (c 1, $CHCl_3$)Ausbeute: 109 mg (170 μ mol, 23 %)MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 663.8 $[M+Na]^+$, 679.8 $[M+K]^+$ 

400 mg (747 μ mol) **31** werden in 4 mL abs. MeOH gelöst und mit 105 μ L Methansulfonsäure versetzt und 44 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 5/3) verfolgt und das gebildete Amin durch Besprühen mit Ninhydrin-Lsg. detektiert. Die Lösung wird durch Zugabe von Triethylamin neutralisiert. Es werden weitere 0.4 mL Triethylamin zugegeben, die Lösung bei 0 °C mit 0.4 mL (1.48 mmol) Benzoxyessigsäureanhydrid **55** versetzt und 1 h unter Eiskühlung gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 5/3) verfolgt. Die Lösung wird

eingengt. Der Rückstand wird in 3.0 mL Essigsäureanhydrid gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit 3.0 mL abs. Pyridin versetzt. Es wird über Nacht bei RT gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt. Der Abbruch der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 1.5 mL MeOH bei 0 °C. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Toluol gelöst. Es wird mit 1M HCl und Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird zweimal säulenchromatographisch (Laufmittel: EE) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 7.23-7.05 (m, 5H, H_{arom}); 6.33 (d, 1H, NH); 5.81 (ddd, 1H, H-8); 5.69 (dd, 1H, H-7); 5.14 (ddd, 1H, H-4); 4.66 (dd, 1H, H-9a); 4.46 (ddd, 1H, H-5); 4.33 (dd, 1H, H-9b); 4.25 (d, 1H, CH₂a-Bn); 4.15 (d, 1H, CH₂b-Bn); 4.03 (dd, 1H, H-6); 3.90 (d, 1H, CH₂a-Gc); 3.77 (d, 1H, CH₂b-Gc); 3.30 (s, 3H, COOCH₃); 2.99 (dddd, 1H, CH₂a-SEt); 2.91 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.69 (dddd, 1H, CH₂b-SEt); 2.09 (s, 3H, COCH₃); 2.05 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.89, 1.74, 1.60 (je s, 3H, COCH₃); 1.11 (dd, 3H, CH₃-SEt).

²J_{3ax,3eq} = 12.8; ³J_{3ax,4} = 11.8; ³J_{3eq,4} = 4.8; ³J_{4,5} = 10.5; ³J_{5,6} = 10.8; ³J_{5,NH} = 10.3; ³J_{6,7} = 2.0; ³J_{7,8} = 8.3; ³J_{8,9a} = 2.8; ³J_{8,9b} = 5.5; ²J_{9a,9b} = 12.3; ²J_{CH2-Gc} = 15.1; ²J_{CH2-Bn} = 12.3; ²J_{CH2-SEt} = 12.5; ³J_{CH2,CH3-SEt} = 7.3 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 137.53 (C-arom); 128.74, 128.15, 128.09 (je CH-arom); 83.75 (C-2); 74.72 (C-6); 73.19 (CH₂-Bn); 69.64 (CH₂-Gc); 69.56 (C-8); 69.43 (C-4); 67.95 (C-7); 62.58 (C-9); 52.32 (COOCH₃); 49.49 (C-5); 38.97 (C-3); 23.62 (CH₂-SEt); 21.09, 20.62, 20.39, 20.32 (je COCH₃); 14.39 (CH₃-SEt).

Methyl-5-*N*-benzyloxyacetyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-β-**D**-glycero-**D**-galacto-2-nonulopyranosylonat (**60**)

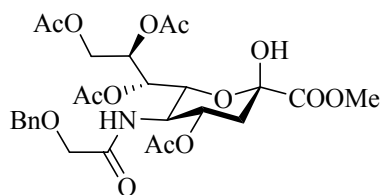
C₂₇H₃₅NO₁₄ (597.57)

amorpher Feststoff, Smp.: 61 °C

R_f (EE) = 0.63

[α]₅₄₆²⁰ = -45 (c 1, CHCl₃)

Ausbeute: 55.0 mg (108 μmol, 54 %)



118 mg (171 μmol) **55** werden in 4 mL Aceton gelöst und 0.2 mL Wasser zugegeben. Die Lösung wird mit 85 mg (0.48 mmol) NBS versetzt, eine halbe Stunde bei RT gerührt und weitere 70 mg (0.40 mmol) NBS zugegeben. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Die Lösung wird jeweils zweimal mit ges. NaHCO_3 -Lsg. und Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: EE) gereinigt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 7.27-7.08 (m, 5H, H_{arom}); 6.55 (d, 1H, NH); 5.69 (dd, 1H, H-7); 5.60 (ddd, 1H, H-8); 5.43 (ddd, 1H, H-4); 4.90 (dd, 1H, H-9a); 4.63 (ddd, 1H, H-5); 4.59 (d, 1H, OH); 4.30 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{a-Bn}$); 4.22 (dd, 1H, H-6); 4.19 (dd, 1H, H-9b); 4.15 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{b-Bn}$); 3.95 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{a-Gc}$); 3.82 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{b-Gc}$); 3.26 (s, 3H, COOCH_3); 2.28 (ddd, 1H, H-3_{ax}); 2.23 (dd, 1H, H-3_{eq}); 1.91, 1.78, 1.68, 1.63 (je s, 3H, COCH_3).

$^2\text{J}_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.0$; $^3\text{J}_{3\text{ax},4} = 10.7$; $^3\text{J}_{3\text{ax},\text{OH}} = 1.5$; $^3\text{J}_{3\text{eq},4} = 5.6$; $^3\text{J}_{4,5} = 10.7$; $^3\text{J}_{5,6} = 10.4$; $^3\text{J}_{5,\text{NH}} = 10.4$; $^3\text{J}_{6,7} = 2.3$; $^3\text{J}_{7,8} = 5.1$; $^3\text{J}_{8,9\text{a}} = 2.3$; $^3\text{J}_{8,9\text{b}} = 7.4$; $^2\text{J}_{9\text{a},9\text{b}} = 12.5$; $^2\text{J}_{\text{CH}_2\text{-Bn}} = 11.9$; $^2\text{J}_{\text{CH}_2\text{-Gc}} = 15.3$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 128.59, 128.44, 128.11 (je C-arom); 95.61 (C-2); 73.55 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$); 72.41 (C-8); 71.95 (C-6); 69.98 ($\text{CH}_2\text{-Gc}$); 69.59 (C-4); 68.90 (C-7); 63.55 (C-9); 53.09 (COOCH_3); 49.67 (C-5); 37.09 (C-3); 20.94, 20.88, 20.70, 20.65 (je COCH_3).

Methyl-5-*N*-benzyloxyacetyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2-chlor-3,5-didesoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat (**61**)

$\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{ClNO}_{13}$ (616.01)

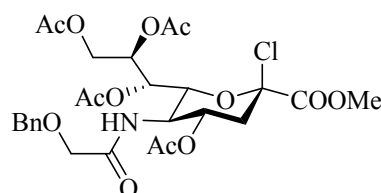
amorpher Feststoff

R_f (EE) = 0.65

$[\alpha]_{546}^{20} = -13$ (c 1, CHCl_3)

Ausbeute: 171 mg (278 μmol , 99 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 637.9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$



167 mg (280 μmol) **60** werden bei 0 °C in 30 mL AcCl gelöst und tropfenweise mit 0.6 mL MeOH versetzt. Es wird ca. 17 h bei RT und verschlossenem Reaktionsgefäß gerührt. Durch Entfernen des Lösungsmittels wird die Reaktion abgebrochen.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.27 (d, 2H, H-o); 7.19 (dd, 2H, H-m); 7.08 (dd, 1H, H-p); 6.39 (d, 1H, NH); 5.73 (dd, 1H, H-7); 5.54 (ddd, 1H, H-8); 5.41 (ddd, 1H, H-4); 4.80 (dd, 1H, H-9a); 4.57 (ddd, 1H, H-5); 4.29 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{a-Bn}$); 4.26 (dd, 1H, H-9b); 4.18 (dd, 1H, H-6); 4.17 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{b-Bn}$); 3.94 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{a-Gc}$); 3.79 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{b-Gc}$); 3.34 (s, 3H; COOCH_3); 2.76 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.04 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.93, 1.87, 1.71, 1.60 (je s, 3H, COCH_3).

$^2\text{J}_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.7$; $^3\text{J}_{3\text{ax},4} = 11.2$; $^3\text{J}_{3\text{eq},4} = 4.8$; $^3\text{J}_{4,5} = 10.7$; $^3\text{J}_{5,6} = 10.7$; $^3\text{J}_{5,\text{NH}} = 10.7$; $^3\text{J}_{6,7} = 2.5$; $^3\text{J}_{7,8} = 6.6$; $^3\text{J}_{8,9\text{a}} = 2.8$; $^3\text{J}_{8,9\text{b}} = 6.5$; $^2\text{J}_{9\text{a},9\text{b}} = 12.5$; $^2\text{J}_{\text{CH}_2\text{-Bn}} = 12.0$; $^2\text{J}_{\text{CH}_2\text{-Gc}} = 15.0$ $^3\text{J}_{\text{m,o}} = 7.4$; $^3\text{J}_{\text{m,p}} = 7.4$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 74.57 (C-6); 73.30 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$); 70.79 (C-8); 69.59 ($\text{CH}_2\text{-Gc}$); 68.51 (C-4); 67.50 (C-7); 62.54 (C-9); 53.12 (COOCH_3); 48.53 (C-5); 41.32 (C-3); 20.70, 20.62, 20.33, 20.24 (je COCH_3).

4-Nitrophenyl-(methyl-5-*N*-benzyloxyacetyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate) (**62**)

$\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{16}$ (718.66)

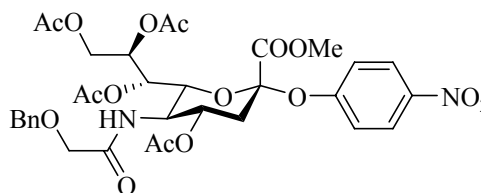
farbloser Feststoff, Smp.: 71 °C

R_f (EE) = 0.80

$[\alpha]_{546}^{20} = +21$ (c 0.5, CHCl_3)

Ausbeute: 91.0 mg (130 μmol , 49 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 740.7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$



160 mg (260 μmol) **61** werden mit 110 mg TBA- HSO_4 und 57 mg (0.41 mmol) *p*NP-OH in 1.5 mL DCM in einem Falcon-Tube gelöst und 1 mL 1M NaOH zugegeben. Bei RT wird drei Stunden stark gerührt. Der Reaktionsabbruch erfolgt durch Ausschütteln mit gesättigter

Natriumhydrogencarbonatlösung. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: EE/PE = 10/1) gereinigt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 8.08 (d, 2H, H- a_{pNP}); 7.22-7.08 (m, 5H, H-Bn); 7.06 (d, 2H, H- b_{pNP}); 6.40 (d, 1H, NH); 5.73 (ddd, 1H, H-8); 5.67 (dd, 1H, H-7); 5.17 (ddd, 1H, H-4); 4.74 (dd, 1H, H-6); 4.48 (ddd, 1H, H-5); 4.43 (dd, 1H, H-9a); 4.25 (dd, 1H, H-9b); 4.23 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{a-Bn}$); 4.13 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{b-Bn}$); 3.89 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{a-Gc}$); 3.77 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{b-Gc}$); 3.05 (s, 3H, COOCH_3); 2.83 (dd, 1H, H-3 $_{\text{eq}}$); 2.25 (dd, 1H, H-3 $_{\text{ax}}$); 2.00, 1.85, 1.74, 1.60 (je s, 3H, COCH_3).

$^2\text{J}_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.8$; $^3\text{J}_{3\text{ax},4} = 12.1$; $^3\text{J}_{3\text{eq},4} = 4.8$; $^3\text{J}_{4,5} = 10.3$; $^3\text{J}_{5,6} = 10.3$; $^3\text{J}_{5,\text{NH}} = 10.0$; $^3\text{J}_{6,7} = 1.8$; $^3\text{J}_{7,8} = 8.8$; $^3\text{J}_{8,9\text{a}} = 2.5$; $^3\text{J}_{8,9\text{b}} = 5.3$; $^2\text{J}_{9\text{a},9\text{b}} = 12.6$; $^2\text{J}_{\text{CH}_2\text{-Bn}} = 12.0$; $^2\text{J}_{\text{CH}_2\text{-Gc}} = 15.1$; $^3\text{J}_{(\text{Ha,Hb})\text{pNP}} = 9.3$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 128.79 (C-ortho $_{\text{Bn}}$); 128.10 (c-meta $_{\text{Bn}}$); 127.91 (C-para $_{\text{Bn}}$); 119.01 (C- a_{pNP}); 115.32 (C- b_{pNP}); 100.01 (C-2); 74.18 (C-6); 73.27 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$); 69.55 ($\text{CH}_2\text{-Gc}$); 69.19 (C-8); 68.20 (C-4); 67.67 (C-7); 62.39 (C-9); 52.68 (COOCH_3); 49.31 (C-5); 39.21 (C-3); 20.79, 20.46, 20.32, 20.23 (je COCH_3).

4-Nitrophenyl-(methyl-5-*N*-benzyloxyacetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat) (**63**)

$\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_{12}$ (550.51)

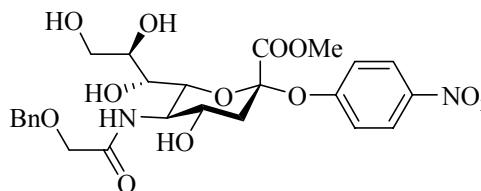
farbloser Feststoff, Smp.: 162 °C

R_f (EE) = 0.42

$[\alpha]_{546}^{20} = +37$ (c 1, MeOH)

Ausbeute: 23 mg (42 μmol , 43 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 572.7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 588.6 $[\text{M}+\text{K}]^+$



70 mg (97 μmol) **62** werden in 4 mL abs. Methanol gelöst und nach AAV2 mit NaOMe versetzt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt und

nach 2 h durch Neutralisation mit Ionentauscher Amberlite IR 120 H⁺ abgebrochen. Der Ionentauscher wird abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Laufmittel: EE/MeOH = 10/1) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.19 (d, 2H, H-a_{pNP}); 7.42-7.29 (m, 7H, H-b_{pNP}/H-Bn); 4.63 (d, 1H, CH_{2a}-Bn); 4.62 (d, 1H, CH_{2b}-Bn); 4.25 (dd, 1H, H-6); 4.02 (s, 2H, CH₂-Gc); 4.00 (dd, 1H, H-5); 4.90 (ddd, 1H, H-4); 3.83-3.77 (m, 2H, H-8/H-9a); 3.73 (s, 3H, COOCH₃); 3.63 (dd, 1H, H-9b); 3.55 (dd, 1H, H-7); 2.80 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.04 (dd, 1H, H-3_{ax}).

²J_{3ax,3eq} = 12.7; ³J_{3ax,4} = 12.0; ³J_{3eq,4} = 4.6; ³J_{4,5} = 10.1; ³J_{5,6} = 10.7; ³J_{6,7} = 1.5; ³J_{7,8} = 8.9; ³J_{8,9b} = 5.9; ²J_{9a,9b} = 11.4; ²J_{CH2-Bn} = 11.7; ³J_{(Ha,Hb)pNP} = 9.4 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 128.44 (C-ortho_{Bn}); 128.16 (c-meta_{Bn}); 127.99 (C-para_{Bn}); 125.15 (C-a_{pNP}); 120.36 (C-b_{pNP}); 100.94 (C-2); 74.69 (C-6); 73.29 (CH₂-Bn); 70.99 (C-8); 68.95 (C-7); 68.87 (CH₂-Gc); 66.43 (C-4); 63.95 (C-9); 52.43 (C-5); 52.19 (COOCH₃); 42.83 (C-3).

4-Nitrophenyl-(methyl-5-*N*-glycolyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat) (**64**)

C₁₈H₂₄N₂O₁₂ (460.39)

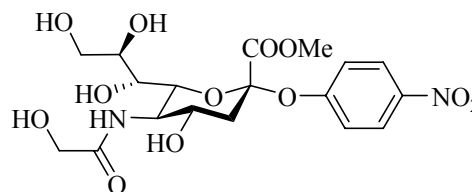
farbloser Feststoff, Smp.: 114 °C

R_f (EE/MeOH = 3/1) = 0.44

$[\alpha]_{546}^{20} = +46$ (c 1, MeOH)

Ausbeute: 28 mg (61 μ mol, 74 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 484.0 [M+Na]⁺, 499.9 [M+K]⁺



55 mg (82 μ mol) **69** werden in 5 mL abs. Methanol gelöst und nach AAV2 mit NaOMe versetzt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt und nach 2 h durch Neutralisation mit Ionentauscher Amberlite IR 120 H⁺ abgebrochen. Der Ionentauscher wird abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Das Lösungsmittel wird im

Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Laufmittel: EE/MeOH = 3/1) gereinigt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.20 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.35 (d, 2H, H-b_{arom}); 4.24 (dd, 1H, H-6); 4.05 (s, 2H, CH₂-Gc); 3.97 (dd, 1H, H-5); 3.90 (ddd, 1H, H-4); 3.82 (dd, 1H, H-9a); 3.78 (ddd, 1H, H-8); 3.73 (s, 3H, COOCH₃); 3.62 (dd, 1H, H-9b); 3.54 (dd, 1H, H-7); 2.81 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.05 (dd, 1H, H-3_{ax}).

$^2J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.0$; $^3J_{3\text{ax},4} = 11.5$; $^3J_{3\text{eq},4} = 4.6$; $^3J_{4,5} = 10.2$; $^3J_{5,6} = 10.2$; $^3J_{6,7} = 1.5$; $^3J_{7,8} = 9.2$; $^3J_{8,9\text{a}} = 2.8$; $^3J_{8,9\text{b}} = 5.3$; $^2J_{9\text{a},9\text{b}} = 11.2$; $^3J_{(\text{Ha},\text{Hb})\text{arom}} = 9.3$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 125.14 (C-a_{arom}); 120.33 (C-b_{arom}); 74.79 (C-6); 70.95 (C-8); 68.94 (C-7); 66.47 (C-4); 63.97 (CH₂-Gc); 61.51 (C-9); 52.42 (COOCH₃); 52.15 (C-5); 41.06 (C-3).

4-Aminophenyl-(methyl-5-*N*-benzyloxyacetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat) (**65**)

C₂₅H₃₂N₂O₁₀ (520.53)

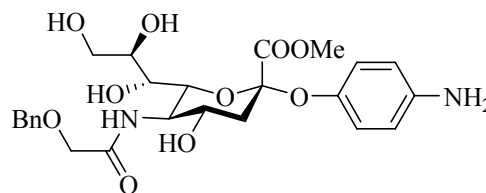
farbloser Sirup

R_f (EE/MeOH = 3/1) = 0.66

$[\alpha]_{546}^{20} = +31$ (*c* 1, MeOH)

Ausbeute: 8.7 mg (15 μmol , 46 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 542.8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$



20 mg (36 μmol) **63** werden in 15 mL MeOH gelöst und mit 0.5 mL Wasser versetzt. Es wird eine Spatelspitze Pd/C (10 %) zugegeben und 4 h unter H₂-Atmosphäre gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE/MeOH = 3/1) verfolgt. Die Reaktion wird durch Abfiltrieren des Katalysators beendet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: EE/MeOH = 3/1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 7.40-7.28 (m, 5H, H-Bn); 6.89 (d, 2H, H- a_{pAP}); 6.62 (d, 2H, H- b_{pAP}); 4.62 (d, 1H, CH $_2a$ -Bn); 4.59 (d, 1H, CH $_2b$ -Bn); 4.01 (s, 2H, CH $_2$ -Gc); 3.92-3.78 (m, 4H, H-4/H-5/ H-8/H-9a); 3.74 (dd, 1H, H-6); 3.71 (s, 3H, COOCH $_3$); 3.65 (dd, 1H, H-9b); 3.53 (dd, 1H, H-7); 2.82 (dd, 1H, H-3 $_{\text{eq}}$); 1.91 (dd, 1H, H-3 $_{\text{ax}}$).

$^2J_{3_{\text{ax}},3_{\text{eq}}} = 12.7$; $^3J_{3_{\text{ax}},4} = 11.9$; $^3J_{3_{\text{eq}},4} = 4.9$; $^3J_{5,6} = 10.4$; $^3J_{6,7} = 1.5$; $^3J_{7,8} = 8.7$; $^3J_{8,9b} = 5.3$; $^2J_{9a,9b} = 11.2$; $^2J_{\text{CH}_2\text{-Bn}} = 11.9$; $^3J_{(\text{Ha,Hb})\text{pAP}} = 8.9$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 128.06 (C-ortho $_{\text{Bn}}$); 127.77 (c-meta $_{\text{Bn}}$); 127.61 (C-para $_{\text{Bn}}$); 122.93 (C- a_{pNP}); 115.35 (C- b_{pNP}); 101.17 (C-2); 73.53 (C-6); 72.94 (CH $_2$ -Bn); 71.43 (C-8); 68.58 (C-7); 68.52 (CH $_2$ -Gc); 66.70 (C-4); 63.19 (C-9); 51.94 (C-5); 51.79 (COOCH $_3$); 40.36 (C-3).

Thiophenyl-(methyl-5-*N*-acetoxycetyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -
D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat) (**66**)

C $_{28}$ H $_{35}$ NO $_{14}$ S (641.64)

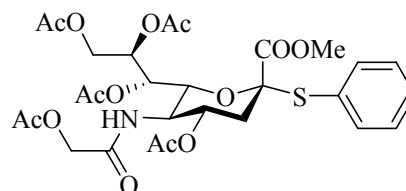
amorpher Feststoff

R $_f$ (EE) = 0.63

$[\alpha]_{546}^{20} = +13$ (c 0.1, CHCl $_3$)

Ausbeute: 211 mg (329 μmol , 38 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 664.1 [M+Na] $^+$, 680.0 [M+K] $^+$



500 mg (857 μmol) **30** werden in 4 mL abs. MeOH gelöst und mit 500 μL Methansulfonsäure versetzt und 24 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 5/3) verfolgt und das gebildete Amin durch Besprühen mit Ninhydrin-Lsg. detektiert. Die Lösung wird durch Zugabe von Triethylamin neutralisiert. Es werden weitere 0.4 mL Triethylamin zugegeben, die Lösung bei 0 °C mit einem Überschuß **57** versetzt und 1 h unter Eiskühlung gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 5/3) verfolgt. Die Lösung wird eingengt. Der Rückstand wird in 4 mL Essigsäureanhydrid gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit 4 mL abs. Pyridin versetzt. Es wird über Nacht bei RT gerührt und die Reaktion

dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt. Der Abbruch der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 2.5 mL MeOH bei 0 °C. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Es wird mit 1M HCl und Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: EE) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 7.62 (dd, 2H, H-o); 7.14 (dd, 2H, H-m); 7.06 (dddd, 1H, H-p); 5.65 (ddd, 1H, H-8); 5.58 (dd, 1H, H-7); 5.39 (d, 1H, NH); 5.12 (ddd, 1H, H-4); 4.73 (dd, 1H, H-9a); 4.47 (dd, 1H, H-9b); 4.47 (d, 1H, CH₂a-Gc); 4.31 (ddd, 1H, H-5); 4.15 (d, 1H, CH₂b-Gc); 4.11 (dd, 1H, H-6); 3.14 (s, 3H, COOCH₃); 2.98 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.04 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.93, 1.92, 1.79, 1.73, 1.69 (je s, 3H, COCH₃).

²J_{3ax,3eq} = 12.7; ³J_{3ax,4} = 12.0; ³J_{3eq,4} = 3.6; ³J_{4,5} = 10.9; ³J_{5,6} = 10.7; ³J_{5,NH} = 9.9; ³J_{6,7} = 2.0; ³J_{7,8} = 7.1; ³J_{8,9a} = 2.5; ³J_{8,9b} = 5.3; ²J_{9a,9b} = 12.5; ²J_{CH2-Gc} = 15.0; ³J_{H-m,H-o} = 8.1; ³J_{H-m,H-p} = 7.4 Hz; ⁴J_{H-o,H-p} = 1.3 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 130.16, 129.46, 128.59 (je C-arom); 88.53 (C-2); 75.59 (C-6); 70.96 (C-8); 69.21 (C-4); 68.41 (C-7); 63.16 (CH₂-Gc); 62.49 (C-9); 52.55 (COOCH₃); 50.14 (C-5); 39.24 (C-3); 21.15, 20.94, 20.80, 20.70, 20.39 (je COCH₃).

Methyl-5-*N*-acetoxyacetyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat (**67**)

C₂₂H₃₁NO₁₅ (549.48)

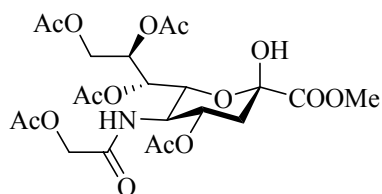
farbloser Feststoff, Smp.: 58 °C

$[\alpha]_{546}^{20}$ = -20 (c 1, CHCl₃)

R_f (EE) = 0.57

Ausbeute: 111 mg (202 μ mol, 65 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 571.9 [M+Na]⁺



200 mg (312 μ mol) **66** werden in 8 mL Aceton gelöst und 0.4 mL Wasser zugegeben. Die Lösung wird mit 163 mg (916 μ mol) NBS versetzt, eine halbe Stunde bei RT gerührt und weitere 100 mg (562 μ mol) NBS zugegeben. Die Reaktion wird dünnschicht-

chromatographisch (Laufmittel: EE) verfolgt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Die Lösung wird jeweils zweimal mit gesättigter NaHCO₃-Lsg. und Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: EE) gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 5.83 (d, 1H, NH); 5.64 (dd, 1H, H-7); 5.59 (ddd, 1H, H-8); 5.45 (ddd, 1H, H-4); 4.96 (dd, 1H, H-9a); 4.90 (d, 1H, OH); 4.56 (ddd, 1H, H-5); 4.53 (d, 1H, CH₂a-Gc); 4.29 (dd, 1H, H-6); 4.23 (d, 1H, CH₂b-Gc); 4.20 (dd, 1H, H-9b); 3.29 (s, 3H, COOCH₃); 2.26 (ddd, 1H, H-3_{ax}); 2.15 (dd, 1H, H-3_{eq}); 1.90, 1.84, 1.79, 1.75, 1.69 (je s, 3H, COCH₃).

²J_{3ax,3eq} = 12.7; ³J_{3ax,4} = 11.7; ³J_{3ax,OH} = 2.0; ³J_{3eq,4} = 5.1; ³J_{4,5} = 10.4; ³J_{5,6} = 10.4; ³J_{5,NH} = 9.9; ³J_{6,7} = 2.0; ³J_{7,8} = 4.8; ³J_{8,9a} = 2.0; ³J_{8,9b} = 7.6; ²J_{9a,9b} = 12.2; ²J_{CH₂-Gc} = 15.0 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 95.01 (C-2); 72.13 (C-8); 71.46 (C-6); 68.44 (C-4); 68.24 (C-7); 62.95 (C-9); 62.65 (CH₂-Gc); 52.53 (COOCH₃); 49.68 (C-5); 36.50 (C-3); 20.39, 20.32, 20.23, 20.09, 19.88 (je COCH₃).

Methyl-5-*N*-acetoxycetyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2-chlor-3,5-didesoxy-β-*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosylonat (**68**)

C₂₂H₃₀ClNO₁₄ (567.92)

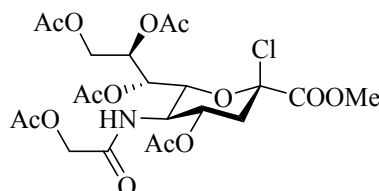
amorpher Feststoff

[α]₅₄₆²⁰ = -41 (c 1, CHCl₃)

R_f (EE) = 0.65

Ausbeute: 102 mg (180 μmol, 95 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 589.9 [M+Na]⁺



104 mg (189 μmol) **67** werden bei 0 °C in 30 mL AcCl gelöst und tropfenweise mit 0.6 mL MeOH versetzt. Es wird ca. 17 h bei RT und verschlossenem Reaktionsgefäß gerührt. Durch Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird die Reaktion abgebrochen und das Produkt getrocknet.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 5.60 (dd, 1H, H-7); 5.53 (ddd, 1H, H-8); 5.38 (ddd, 1H, H-4); 5.24 (d, 1H, NH); 4.79 (dd, 1H, H-9a); 4.48 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{a-Gc}$); 4.45 (ddd, 1H, H-5); 4.26 (dd, 1H, H-9b); 4.21 (dd, 1H, H-6); 4.16 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{b-Gc}$); 3.34 (s, 3H, COOCH_3); 2.64 (dd, 1H, H-3_{eq}); 1.97 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.91, 1.88, 1.78, 1.76, 1.74 (je s, 3H, COCH_3).

$^2\text{J}_{3\text{ax},3\text{eq}} = 14.0$; $^3\text{J}_{3\text{ax},4} = 11.2$; $^3\text{J}_{3\text{eq},4} = 4.8$; $^3\text{J}_{4,5} = 10.4$; $^3\text{J}_{5,6} = 10.7$; $^3\text{J}_{5,\text{NH}} = 10.4$; $^3\text{J}_{6,7} = 2.3$; $^3\text{J}_{7,8} = 6.4$; $^3\text{J}_{8,9\text{a}} = 2.8$; $^3\text{J}_{8,9\text{b}} = 6.1$; $^2\text{J}_{9\text{a},9\text{b}} = 12.5$; $^2\text{J}_{\text{CH}_2\text{-Gc}} = 14.8$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 74.92 (C-6); 71.15 (C-8); 68.07 (C-4); 67.56 (C-7); 63.16 (C-9); 62.73 ($\text{CH}_2\text{-Gc}$); 53.46 (COOCH_3); 49.30 (C-5); 41.48 (C-3); 21.02, 20.90, 20.68, 20.67, 20.43 (je COCH_3).

4-Nitrophenyl-(methyl-5-*N*-acetoxycetyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-
 α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylon) (**69**)

$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{17}$ (670.57)

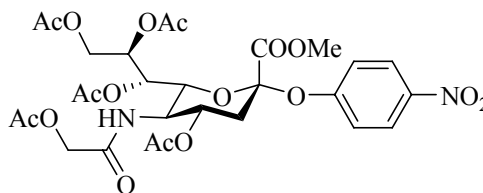
farbloser Sirup

R_f (EE) = 0.62

$[\alpha]_{546}^{20} = +21$ (c 1, CHCl_3)

Ausbeute: 61 mg (91 μmol , 47 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 693.0$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 709.0 $[\text{M}+\text{K}]^+$



92.0 mg (0.192 mmol) **68** werden mit 69 mg TBA- HSO_4 und 38.0 mg (0.273 mmol) *p*NP-OH in 1.0 mL DCM in einem Falcon-Tube gelöst und 0.7 mL 1M NaOH zugegeben. Bei RT wird drei Stunden stark gerührt. Der Reaktionsabbruch erfolgt durch Ausschütteln mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Laufmittel: EE) gereinigt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 8.09 (d, 2H, H-a_{arom}); 7.04 (d, 2H, H-b_{arom}); 5.72 (ddd, 1H, H-8); 5.55 (dd, 1H, H-7); 5.37 (d, 1H, NH); 5.24 (ddd, 1H, H-4); 4.84 (dd, 1H, H-6); 4.42 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{a-Gc}$); 4.42 (dd, 1H, H-9a); 4.34 (ddd, 1H, H-5); 4.24 (dd, 1H, H-9b); 4.11 (d, 1H,

CH₂b-Gc); 3.04 (s, 3H, COOCH₃); 2.75 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.22 (dd, 1H, H-3_{ax}); 2.02, 1.83, 1.79, 1.78, 1.69 (je s, 3H, COCH₃).

²J_{3ax,3eq} = 13.0; ³J_{3ax,4} = 12.5; ³J_{3eq,4} = 4.6; ³J_{4,5} = 10.7; ³J_{5,6} = 10.7; ³J_{5,NH} = 10.2; ³J_{6,7} = 1.8; ³J_{7,8} = 8.6; ³J_{8,9a} = 3.0; ³J_{8,9b} = 5.3; ²J_{9a,9b} = 12.5; ²J_{CH₂-Gc} = 14.7; ³J_{(Ha,Hb)arom} = 9.4 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 125.79 (C-a_{arom}); 118.85 (C-b_{arom}); 74.07 (C-6); 69.24 (C-8); 67.63 (C-7); 67.40 (C-4); 62.83 (CH₂-Gc); 62.21 (C-9); 52.70 (COOCH₃); 49.96 (C-5); 39.33 (C-3); 20.78, 20.45, 20.35, 20.03 (je COCH₃).

Methyl-(5-acetamido-9-*O*-butanoyl-3,5-didesoxy- α -D-galacto-D-glycero-2-nonulopyranosylsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-6)- α -D-glucopyranosid (**71**)

C₂₈H₄₇NO₂₀ (717.67)

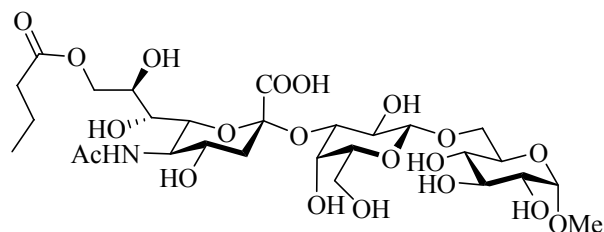
farbloser Feststoff, Smp.: 112 °C

[α]₅₄₆²⁰ = +11 (*c* 1, H₂O)

R_f (BuOH/AcOH/H₂O = 5/2/2) = 0.19

Ausbeute: 14 mg (20 μ mol, 78 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): *m/z* = 740.2 [M+Na]⁺



13 mg (25 μ mol) **29** werden mit 13 mg (35 μ mol) **18** in 1 mL Puffer (Tris-HCl, 100 mM, pH = 7.5) gelöst und nach AAV4 über Nacht bei 23 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1.5 mL Ethanol wird die Reaktion beendet. Die Lösung wird 30 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen. Dieser wird lyophilisiert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt an Biogel P2 (Laufmittel: H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 4.80 (d, 1H, H-1); 4.49 (d, 1H, H-1'); 4.39 (dd, 1H, H-9''a); 4.25 (dd, 1H, H-9''b); 4.18 (dd, 1H, H-6a); 4.09 (dd, 1H, H-3'); 4.05 (ddd, 1H, H-8''); 3.94-3.63 (m, 11H, H-3/H-4'/H-4''/H-5/H-5'/H-5''/H-6b/H-6'a/H-6'b/H-6''/H-7''); 3.60-3.55 (m, 2H, H-2/H-2''); 3.52 (dd, 1H, H-4); 3.42 (s, 3H, OCH₃); 2.76 (dd, 1H, H-3''eq);

2.41 (dd, 2H, CH₂(2)-But); 2.03 (s, 3H, COCH₃); 1.79 (dd, 1H, H-3''ax); 1.69 (sext, 2H, CH₂(3)-But); 0.92 (dd, 3H, CH₃(4)-But).

³J_{1,2} = 3.6; ³J_{1',2'} = 8.1; ³J_{2',3'} = 9.9; ³J_{3,4} = 9.4; ³J_{3',4'} = 3.1; ²J_{3'',ax,3''eq} = 12.5; ³J_{3'',ax,4''} = 12.2; ³J_{3'',eq,4''} = 4.6; ³J_{4,5} = 9.4; ³J_{5,6a} = 2.0; ²J_{6a,6b} = 11.4; ³J_{7'',8''} = 5.6; ³J_{8'',9'',a} = 2.3; ³J_{8'',9'',b} = 5.6; ²J_{9'',a,9'',b} = 11.7; ³J_{CH₂,CH₂} = 7.4; ³J_{CH₂,CH₃} = 7.6 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm] = 103.41 (C-1'); 100.09 (C-2''); 99.76 (C-1); 76.18 (C-3'); 75.32 (C-7''); 73.25 (C-5'); 73.01 (C-6''); 71.52 (C-5); 70.97, 69.78, 69.78 (C-2/C-2'/C-8''); 69.51 (C-4); 68.67 (C-3); 68.60 (C-6); 68.37 (C-4''); 67.80 (C-4'); 65.70 (C-9''); 61.38 (C-6'); 55.64 (OCH₃); 52.04 (C-5''); 40.16 (C-3''); 36.11 (C-2-But); 22.39 (COCH₃); 18.73 (C-3-But); 13.21 (C-4-But).

Methyl-(5-*N*-propanoyl-3,5-didesoxy- α -D-galacto-D-glycero-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-6)- α -D-glucopyranosid (**72**)

C₂₅H₄₃NO₁₉ (661.60)

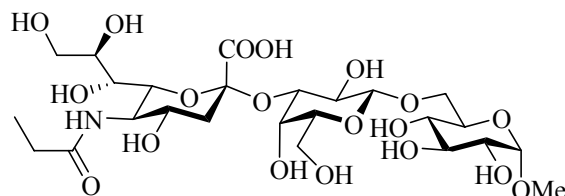
farbloser Feststoff, Smp.: 103 °C

[α]₅₄₆²⁰: +16 (*c* 1, D₂O)

R_f (BuOH/AcOH/H₂O = 5/2/2) = 0.12

Ausbeute: 7.4 mg (11 μ mol, 32 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): *m/z* = 684.1 [M+Na]⁺



11 mg (25 μ mol) **23** werden mit 13 mg (35 μ mol) **18** in 1 mL Puffer (Tris-HCl, 100 mM, pH = 7.5) gelöst und nach AAV4 inkubiert. Durch Zugabe von 1.5 mL Ethanol wird die Reaktion beendet. Die Lösung wird 30 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen. Dieser wird lyophilisiert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt an Biogel P2 (Laufmittel: H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 4.82 (d, 1H, H-1); 4.52 (d, 1H, H-1'); 4.20 (dd, 1H, H-6a); 4.12 (dd, 1H, H-3'); 3.97-3.53 (m, 17H, H-2/H-2'/H-3/H-4/H-4'/H-4''/H-5/H-5'/H-

5''/H-6b/H-6'a/H-6'b/H-6''/H-7''/H-8''/H-9''a/H-9''b); 3.45 (s, 3H, OCH₃); 2.79 (dd, 1H, H-3''eq); 2.32 (ddd, 2H, CH₂-Prop); 1.82 (dd, 1H, H-3''ax); 1.13 (dd, 3H, CH₃-Prop).

³J_{1,2} = 3.8; ³J_{1',2'} = 8.0; ³J_{2',3'} = 11.8; ³J_{3',4'} = 3.3; ³J_{3'',ax,4''} = 12.1; ²J_{3'',ax,3''eq} = 12.3; ³J_{3''eq,4''} = 4.5; ³J_{5,6a} = 2.0; ²J_{6a,6b} = 9.8; ³J_{CH₂,CH₃} = 7.8 Hz.

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm] = 103.38 (C-1'); 99.75 (C-1); 76.16 (C-3'); 75.28 (C-7''); 73.24 (C-5'); 73.24 (C-6''); 73.12 (C-5); 71.48, 70.93, 70.63 (C-2/C-2'/C-8''); 69.52, 69.45 (C-4/C-3); 68.55 (C-6); 68.43 (C-4''); 67.85 (C-4'); 62.89 (C-9''); 61.34 (C-6'); 55.62 (OCH₃); 51.88 (C-5''); 40.13 (C-3''); 29.59 (CH₂-Prop); 9.85 (CH₃-Prop).

Methyl-(5-*N*-glycolyl-3,5-didesoxy- α -D-galacto-D-glycero-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-6)- α -D-glucopyranosid (**75**)

C₂₄H₄₁NO₂₀ (663.58)

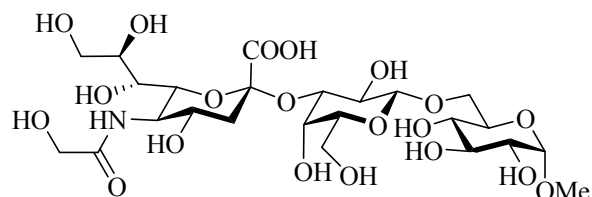
farbloser Feststoff, Smp.: 139 °C

R_f (BuOH/AcOH/H₂O = 5/2/2) = 0.13

[α]₅₄₆²⁰ = +31 (c 1, H₂O)

Ausbeute: 10 mg (15 μ mol, 60 %)

MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 686.4 [M+Na]⁺



11 mg (25 μ mol) **26** werden mit 13 mg (35 μ mol) **18** in 1 mL Puffer (Tris-HCl, 100 mM, pH = 7.5) gelöst und nach AAV4 inkubiert. Durch Zugabe von 1.5 mL Ethanol wird die Reaktion beendet. Die Lösung wird 30 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen. Dieser wird lyophilisiert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt an Biogel P2 (Laufmittel: H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 4.74 (d, 1H, H-1); 4.44 (d, 1H, H-1'); 4.12 (dd, 1H, H-6a); 4.07-3.44 (m, 18H, H-2/H-2'/H-3/H-3'/H-4/H-4'/H-4''/H-5/H-5'/H-5''/H-6b/H-6'a/H-6'b/H-6''/H-7''/H-8''/H-9''a/H-9''b); 3.36 (s, 3H, OCH₃); 2.72 (dd, 1H, H-3''eq); 1.74 (dd, 1H, H-3''ax).

$^3J_{1,2} = 3.8$; $^3J_{1',2'} = 7.9$; $^3J_{3'',ax,4''} = 12.1$; $^2J_{3'',ax,3''eq} = 12.5$; $^3J_{3''eq,4''} = 4.6$; $^3J_{5,6a} = 1.8$; $^2J_{6a,6b} = 11.4$ Hz.

^{13}C -NMR (101 MHz, D_2O): δ [ppm] = 103.41 (C-1'); 100.16 (C-2''); 99.77 (C-1); 76.19 (C-3'); 75.32 (C-7''); 73.27 (C-5'); 72.96 (C-6''); 72.42 (C-5); 71.51, 70.96, 69.55 (C-2/C-2'/C-8''); 69.50 (C-4); 68.58 (C-6); 68.45 (C-3); 68.34 (C-4''); 67.86 (C-4'); 62.89 (C-9''); 61.38 ($\text{CH}_2\text{-Gc}$); 61.37 (C-6'); 55.65 (OCH_3); 51.76 (C-5''); 40.18 (C-3'').

11 Sicherheitshinweise

4-(Dimethylamino)-pyridin [T]	R 25-36/38	S 37-45
Aceton [F, Xi]	R 11-36-66-67	S 9-16-26
Acetonitril [F, T]	R 11-23/24/25	S 16-27-45
Acetoxyacetylchlorid [C]	R 14-34-36/37	S 23-26-27-36/37/39-45
Acetylchlorid [F, C]	R 11-14-34	S 9-16-26-45
Ammoniaklösung 32 % [C, N]	R 34-50	S 26-36/37/39-45-61
Benzol [F, T]	R 45-11-48/23/24/25	S 53-45
Benzyloxyacetylchlorid [C]	R 34-37	S 26-36/37/39-45
Buttersäureanhydrid [C]	R 34	S 26-36/37/39-45
Chloroform [Xn]	R 22-38-40-48/10/22	S 36/37
Dichlormethan [Xn]	R 40	S 23.2-24/25-36/37
Dimethylsulfoxid [Xi]	R 36/38	S 26
Essigsäure [C]	R 10-35	S 23.2-26-45
Essigsäureanhydrid [C]	R 10-34	S 26-45
Ethanol [F]	R 11	S 7-16
Ethanthiol [F, Xn, N]	R 11-20-50/53	S 16-25-60-61
Ethylacetat [F, Xn]	R 11-36-66-67	S 16-26-33
Kaliumcarbonat [Xi]	R 36/37/38	S 22-26
Kupfersulfatpentahydrat [Xn,N]	R 22-36/38-50/53	S 22-60-61
Methanol[F, T]	R 11-23/24/25-39	S 7-16-36/37-45
Methansulfonsäure [C]	R 34	S 26-36-45
<i>N</i> -Acetylneuraminsäure		S 22-24/25
Natriumazid [T+, N]	R 28-32-50/53	S 28.1-45-60-61
Natriumcyanoborhydrid [F, C]	R 15-32-34	S 26-36/37/39-43-45
Natriumhydroxid [C]	R 45	S 26-37/39-45
Natriummethanolat [F, C]	R 11-14-34	S 8-26-43.6-45
<i>N</i> -Bromsuccinimid [Xn]	R 22-36/37/38	S 26-36
n-Butanol [Xn]	R 10-20	S 16
Ninhydrinlösung [F, Xi]	R 11-36-67	S 7-16-23.3-24-26-51
Petrolether 50-70 [F, Xn]	R 11-52/53-65	S 9-16-23.2-24-33-62
Pivalinsäurechlorid [F, C]	R 11-34-36/37	S 16-26-36/37/39-45
<i>p</i> -Nitrophenol [Xn]	R 20/21/22-33	S 28.1

Sicherheitshinweise

Propionsäureanhydrid [C]	R 34	S 26-45
<i>p</i> -Toluolsulfonsäure-Monohydrat [Xi]	R 36-37-38	S 27-37
Pyridin [F, Xn]	R 11-20/21/22	S 26-28.1
Salzsäure [C]	R 34-37	S 26-36/37/39-45
Schwefelsäure [C]	R 35	S-26-30-45
Tetrabutylammoniumbromid [Xi]	R 36/37/38	S 26-36
Tetrabutylammoniumhydrogensulfat [Xn]	R 22	
Thiophenol [T+]	R 10-24/25-26-36/38	S 26-28.1-36/37-45
Toluol [F, Xn]	R 11-20	S 16-25-29-33
Triethylamin [C, F]	R 11-20/21/22-35	S 3-16-26-29-36/37/39-45
Triflathanhydrid [C]	R 22-35	S 26-30-36/37/39-45
Trifluoressigsäure [C]	R 20-35-52/53	S 9-26-27-28.1-45-61
Trifluoressigsäureanhydrid [C]	R 14-20-35-52/53	S 9-26-36/37/39-45-61
Trimethylorthobutyrat [F, Xi]	R 11-36/38	S 9-16
Trimethylsilyltriflat [C]	R 10-34-37	S 26-36/37/39-45
Triphenylmethylchlorid [C]	R 34	S 26-36/37/39-45
Vinylacetat [F]	R 11	S 16-23.2-29-33

12 Literatur

- [1] L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg Berlin Oxford **1996**.
- [2] T. K. Lindhorst, *Chemie in Unserer Zeit* **2000**, 34, 38-52.
- [3] N. Sharon, H. Lis, *Mol. Cell. Biochem.* **1982**, 42, 167-187.
- [4] E. Klenk, *Z. Physiol. Chem.* **1941**, 268, 50-58.
- [5] R. Schauer, *Glycoconjugate J.* **2001**, 17, 485-499.
- [6] P. A. van der Merwe, P. R. Crocker, M. Vinson, A. N. Barclay, R. Schauer, S. Kelm, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 9273-9280.
- [7] E. C. M. Brinkman-van der Linden, A. Varki, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 8625-8632.
- [8] J. Jancik, R. Schauer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1974**, 355, 395-400.
- [9] J. Jancik, R. Schauer, H. J. Streicher, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1975**, 356, 1329-1331.
- [10] R. Schauer, *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, 426, 132-141.
- [11] F. Malisan, R. Testi, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1585, 179-187.
- [12] M. Schwarzkopf, K.-P. Knobloch, E. Rohde, S. Hinderlich, N. Wiechens, L. Lucka, I. Horak, W. Reutter, R. Horstkorte, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 5267-5270.
- [13] G. Uhlenbruck, J. Schmitt, *Naturwissenschaften* **1965**, 52, 163.
- [14] H.-H. Chou, T. Hayakawa, S. Diaz, M. Krings, E. Indriati, M. Leakey, S. Paabo, Y. Satta, N. Takahata, A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 11736-11741.
- [15] Y. N. Malykh, R. Schauer, L. Shaw, *Biochimie* **2001**, 83, 623-634.
- [16] C. Chagas, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1909**, 1, 159-218.
- [17] S. Schenkman, M. S. Jiang, G. W. Hart, V. Nussenzweig, *Cell* **1991**, 65, 1117-1125.
- [18] S. Tomlinson, J. Raper, *Parasitol. Today* **1998**, 14, 354-359.
- [19] M. F. Amaya, A. G. Watts, I. Damager, A. Wehenkel, T. Nguyen, A. Buschiazzi, G. Paris, A. C. Frasch, S. G. Withers, P. M. Alzari, *Structure (Cambridge, MA, U. S.)* **2004**, 12, 775-784.
- [20] A. Buschiazzi, M. F. Amaya, M. L. Cremona, A. C. Frasch, P. M. Alzari, *Mol. Cell* **2002**, 10, 757-768.
- [21] L. E. Smith, D. Eichinger, *Glycobiology* **1997**, 7, 445-451.
- [22] T. A. Pitcovsky, J. Mucci, P. Alvarez, M. S. Leguizamon, O. Burrone, P. M. Alzari, O. Campetella, *Infect. Immun.* **2001**, 69, 1869-1875.
- [23] A. Buschiazzi, G. A. Tavares, O. Campetella, S. Spinelli, M. L. Cremona, G. Paris, M. F. Amaya, A. C. Frasch, P. M. Alzari, *EMBO J.* **2000**, 19, 16-24.

-
- [24] F. Vandekerckhove, S. Schenkman, L. Pontes de Carvalho, S. Tomlinson, M. Kiso, M. Yoshida, A. Hasegawa, V. Nussenzweig, *Glycobiology* **1992**, 2, 541-548.
- [25] J. A. Harrison, K. P. R. Kartha, W. B. Turnbull, S. L. Scheuerl, J. H. Naismith, S. Schenkman, R. A. Field, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 141-144.
- [26] T. Haselhorst, J. C. Wilson, A. Liakatos, M. J. Kiefel, J. C. Dyason, M. von Itzstein, *Glycobiology* **2004**, 14, 895-907.
- [27] A. G. Watts, I. Damager, M. L. Amaya, A. Buschiazzi, P. Alzari, A. C. Frasch, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7532-7533.
- [28] J. Yang, S. Schenkman, B. A. Horenstein, *Biochemistry* **2000**, 39, 5902-5910.
- [29] A. R. Todeschini, W. B. Dias, M. F. Girard, J.-M. Wieruszeski, L. Mendonca-Previato, J. O. Previato, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 5323-5328.
- [30] D. Schmidt, B. Sauerbrei, J. Thiem, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 8518-8526.
- [31] P. Meindl, H. Tuppy, *Monatsh. Chem.* **1969**, 100, 1295-1306.
- [32] P. Meindl, G. Bodo, P. Palese, J. Schulman, H. Tuppy, *Virology* **1974**, 58, 457-463.
- [33] G. Laver, *Future Virology* **2006**, 1, 577-586.
- [34] R. Agusti, G. Paris, L. Ratier, A. C. C. Frasch, R. M. de Lederkremer, *Glycobiology* **2004**, 14, 659-670.
- [35] J. O. Previato, A. F. Andrade, M. C. Pessolani, L. Mendonca-Previato, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1985**, 16, 85-96.
- [36] K. Okamoto, T. Goto, *Tetrahedron* **1990**, 46, 5835-5857.
- [37] W. Koenigs, E. Knorr, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1901**, 34, 957-981.
- [38] G.-J. Boons, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4539-4565.
- [39] G. Pazynina, A. Tuzikov, A. Chinarev, P. Obukhova, N. Bovin, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 8011-8013.
- [40] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron* **1987**, 43, 5909-5918.
- [41] L. O. Kononov, D. A. Volodin, G. Magnusson, *Russ. Chem. Bull. (Izvest. Akad. Nauk, Ser. Khim.)* **2003**, 52, 1434-1441.
- [42] N. Baggett, B. J. Marsden, *Carbohydr. Res.* **1982**, 110, 11-18.
- [43] B. Helferich, W. M. Müller, *Chem. Ber.* **1971**, 104, 671-673.
- [44] B. Helferich, W. M. Müller, *Chem. Ber.* **1973**, 106, 941-943.
- [45] P. Meindl, H. Tuppy, *Monatsh. Chem.* **1965**, 96, 802-815.
- [46] H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* **1984**, 125, 47-64.
- [47] J. M. Haberman, D. Y. Gin, *Org. Lett.* **2001**, 3, 1665-1668.
- [48] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5229-5232.

-
- [49] K. G. I. Nilsson, *Carbohydr. Res.* **1987**, *167*, 95-103.
 - [50] K. Wallenfels, R. Weil, *Enzymes*, 3rd Ed. **1972**, *7*, 617-663.
 - [51] M. Moracci, A. Trincone, B. Cobucci-Ponzano, G. Perugino, M. Ciaramella, M. Rossi, *Extremophiles* **2001**, *5*, 145-152.
 - [52] G. Legler, *Carbohydr. Res.* **1993**, *250*, vii-xx.
 - [53] M. L. E. Bergh, P. Koppen, D. H. van den Eijnden, *Carbohydr. Res.* **1981**, *94*, 225-229.
 - [54] S. Khurana, N. K. Ganguly, M. Khullar, D. Panigrahi, B. N. Walia, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1097*, 171-176.
 - [55] L. F. Leloir, *Science* **1971**, *172*, 1299-1303.
 - [56] B. Evers, P. Mischnick, J. Thiem, *Carbohydr. Res.* **1994**, *262*, 335-341.
 - [57] Y. Ichikawa, J. L. C. Liu, G. J. Shen, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6300-6302.
 - [58] Y. Ichikawa, G. J. Shen, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4698-4700.
 - [59] S. Singh, M. Scigelova, M. L. Hallberg, O. W. Howarth, D. H. G. Crout, S. Schenkman, *Chem. Commun. (Cambridge)* **2000**, 1013-1014.
 - [60] B. Neubacher, D. Schmidt, P. Ziegelmueller, J. Thiem, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1551-1556.
 - [61] M. L. Cremona, A. C. Frasch, *persönliche Mitteilung* **2002**.
 - [62] L. Kröger, A. Scudlo, J. Thiem, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1217-1227.
 - [63] B. Neubacher, S. Scheid, S. Kelm, A. C. Frasch, B. Meyer, J. Thiem, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 896-899.
 - [64] A. Betz, U. Ashery, M. Rickmann, I. Augustin, E. Neher, T. C. Sudhof, J. Rettig, N. Brose, *Neuron* **1998**, *21*, 123-136.
 - [65] I. Augustin, C. Rosenmund, T. C. Sudhof, N. Brose, *Nature* **1999**, *400*, 457-461.
 - [66] P. R. Maycox, E. Link, A. Reetz, S. A. Morris, R. Jahn, *J. Cell Biol.* **1992**, *118*, 1379-1388.
 - [67] K. Takei, O. Mundigl, L. Daniell, P. De Camilli, *J. Cell Biol.* **1996**, *133*, 1237-1250.
 - [68] R. Bauerfeind, T. Galli, P. De Camilli, *J. Neurocyt.* **1996**, *25*, 701-715.
 - [69] W. J. Betz, F. Mao, G. S. Bewick, *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 363-375.
 - [70] T. A. Ryan, H. Reuter, B. Wendland, F. E. Schweizer, R. W. Tsien, S. J. Smith, *Neuron* **1993**, *11*, 713-724.
 - [71] R. B. O'Gorman, M. Dunaway, K. S. Matthews, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 10100-10106.

-
- [72] R. B. O'Gorman, J. M. Rosenberg, O. B. Kallai, R. E. Dickerson, K. Itakura, A. D. Riggs, K. S. Matthews, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 10107-10114.
 - [73] C. A. Royer, A. E. Chakerian, K. S. Matthews, *Biochemistry* **1990**, 29, 4959-4966.
 - [74] M. Lewin, N. Carlesso, C.-H. Tung, X.-W. Tang, D. Cory, D. T. Scadden, R. Weissleder, *Nat. Biotech.* **2000**, 18, 410-414.
 - [75] R. Weissleder, A. Moore, U. Mahmood, R. Bhorade, H. Benveniste, E. A. Chiocca, J. P. Basilion, *Nat. Med.* **2000**, 6, 351-354.
 - [76] L. Josephson, C.-H. Tung, A. Moore, R. Weissleder, *Bioconjug. Chem.* **1999**, 10, 186-191.
 - [77] L. Josephson, J. M. Perez, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3204-3206.
 - [78] J. M. Perez, L. Josephson, T. O'Loughlin, D. Hogemann, R. Weissleder, *Nat. Biotech.* **2002**, 20, 816-820.
 - [79] T. F. Cruz, J. W. Gurd, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, 675, 201-208.
 - [80] R. R. Schmidt, W. Kinzy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, 50, 21-123.
 - [81] R. R. Schmidt, K.-H. Jung in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, (Eds.): B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay, (Wiley-VCH, Weinheim), **2000**, 1, 5-59.
 - [82] R. R. Schmidt, J. Michel, M. Roos, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1343-1357.
 - [83] R. R. Schmidt, A. Toepfer, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 3353-3356.
 - [84] R. R. Schmidt, B. Wegmann, K.-H. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 1991, 121-124.
 - [85] G. Zemplén, E. Pacsu, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1929**, 62B, 1613-1614.
 - [86] J. Rothermel, H. Faillard, *Carbohydr. Res.* **1990**, 196, 29-40.
 - [87] R. Kuhn, P. Lutz, D. L. MacDonald, *Chem. Ber.* **1966**, 99, 611-617.
 - [88] A. Vetere, S. Paoletti, *FEBS Lett.* **1996**, 399, 203-206.
 - [89] P. Scudder, J. P. Doom, M. Chuenkova, I. D. Manger, M. E. Pereira, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 9886-9891.
 - [90] D. Schmidt, *Dissertation*, Universität Hamburg (Hamburg), **2000**.
 - [91] B. Neubacher, *Dissertation*, Universität Hamburg (Hamburg), **2005**.
 - [92] H. Ogura, K. Furuhashi, S. Sato, K. Anazawa, M. Itoh, Y. Shitori, *Carbohydr. Res.* **1987**, 167, 77-86.
 - [93] W. Gielen, *Z. Physiol. Chem.* **1967**, 348, 329-333.
 - [94] R. Schneider, C. C. Freyhardt, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1655-1661.
 - [95] K. C. Nicolaou, S. P. Seitz, D. P. Papahatjis, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 2430-2434.
 - [96] B. G. M. G. Rocío Meza, *Int. J. Quant. Chem.* **2005**, 104, 29-37.

-
- [97] S. Cao, S. J. Meunier, F. O. Andersson, M. Letellier, R. Roy, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5, 2303-2312.
 - [98] H. Paulsen, H. Tietz, *Angew. Chem.* **1982**, 94, 934-935.
 - [99] H. Paulsen, H. Tietz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 927-928.
 - [100] M. Kiso, H. Ishida, H. Ito, *Carbohydrates in Chemistry and Biology* **2000**, 1, 345-365.
 - [101] H. W. Johnson, D. E. Bublitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 753-754.
 - [102] L. Horner, E. H. Winkelmann, *Angew. Chem.* **1959**, 71, 349-365.
 - [103] S. Prytulla, J. Lauterwein, M. Klessinger, J. Thiem, *Carbohydr. Res.* **1991**, 215, 345-349.
 - [104] A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1989**, 190, 317-322.
 - [105] T. Sugata, R. Higuchi, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 2613-2614.
 - [106] J. M. Wallace, Jr., J. E. Copenhaver, *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, 63, 699-700.
 - [107] R. Mestres, C. Palomo, *Synthesis* **1981**, 218-220.
 - [108] G. P. Liesen, C. N. Sukenik, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 455-457.
 - [109] A. W. van der Haar, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1928**, 47, 321-328.
 - [110] D. Plusquellec, F. Roulleau, M. Lefevre, E. Brown, *Tetrahedron* **1988**, 44, 2471-2476.
 - [111] R. F. Hudson, G. E. Moss, *J. Chem. Soc.* **1962**, 5157-5163.
 - [112] M. Saytzeff, *J. Prakt. Chem.* **1873**, 6, 128-135.
 - [113] G. Carturan, G. Facchin, G. Cocco, G. Navazio, G. Gubitosa, *J. Catal.* **1983**, 82, 56-65.
 - [114] K. Mukkanti, Y. V. Subba Rao, B. M. Choudary, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 251-252.
 - [115] A. Vasella, C. Witzig, J.-L. Chiara, M. Martin-Lomas, *Helv. Chim. Acta* **1991**, 74, 2073-2077.
 - [116] P. T. Nyffeler, C. H. Liang, K. M. Koeller, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10773-10778.
 - [117] P. B. Alper, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6029-6032.
 - [118] J. C. Wilson, D. I. Angus, M. von Itzstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4214-4217.
 - [119] M. J. Knapp, J. P. Klinman, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 3113-3121.
 - [120] M. H. Glickman, J. S. Wiseman, J. P. Klinman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 793-794.
 - [121] C. C. Hwang, C. B. Grissom, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 795-796.
 - [122] J. Basran, M. J. Sutcliffe, N. S. Scrutton, *Biochemistry* **1999**, 38, 3218-3222.

- [123] A. J. Brown, *J. Chem. Soc., Trans.* **1892**, 369-385.
- [124] V. Henri, *C. R. Hebd. Acad. Sci. Paris* **1902**, 135, 916-919.
- [125] L. Michaelis, M. L. Menten, *Biochem. Z.* **1913**, 49, 333-369.
- [126] H. Lineweaver, D. Burk, W. E. Deming, *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, 56, 225-230.

Lebenslauf

Andreas Schroven

geboren am 07.05.1977 in Barßel

Schulbildung:

Aug. 1984 – Juni 1988 Marienschule Barßel (Grundschule)

Aug. 1988 – Juli 1990 Orientierungsstufe Barßel

Sept. 1990 – Juli 1998 Albertus-Magnus-Gymnasium Friesoythe

Abschluss: Abitur

Wehrdienst:

Okt. 1998 – Juli 1999 Marinefernmeldeabschn. 1 / Grp. 11

Studium:

seit Oktober 1999 Studium der Chemie an der Universität Hamburg

Dez. 2001 Diplom-Vorprüfung

Aug. 2004 Diplomprüfung

Sept. 2004 – Feb. 2005 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Thiem

Titel: „*Synthese regioselektiv acylierter und kettenverkürzter Sialoside*“

seit März 2005 Promotion am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Thiem

Titel: „*Aufbau und Untersuchung modifizierter Neuraminsäureendonoren zur regio- und stereoselektiven Sialylierung durch Trans-Sialidase (Trypanosoma cruzi)*“

Tätigkeiten:

April 2003 – Sept. 2004 Studentische Hilfskraft im Anorganisch-Chemischen Grundpraktikum für Studierende der Chemie an der Universität Hamburg.

Sept. 2004 – Feb. 2005 Studentische Hilfskraft zur Betreuung der NMR-Geräte im Institut für Organische Chemie.

seit März. 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Organisch-Chemischen Grundpraktikum an der Universität Hamburg.

Publikationen

Zeitschriftenbeiträge:

"Trans-Sialidase from Trypanosoma cruzi for regio- and stereoselective synthesis of N-acyl modified sialylated oligosaccharides and measurement of transfer rates", A. Schroven, S. Meinke, P. Ziegelmeier, J. Thiem, *Chem. Eur. J.* **2007**. (DOI: 10.1002/chem.200700439)

Vorträge/Posterpräsentation:

Vortrag auf dem 4th German-Polish Workshop on Modern Aspects in Organic Synthesis, Bioorganic Chemistry and Natural Product Research in Hamburg, Deutschland, Juni 2006: *"Trans-Sialidase for Convenient Syntheses of Sialylated Oligosaccharides"*

Vortrag auf dem XXIIIrd International Carbohydrate Symposium in Whistler, Canada, Juli 2006: *"Trans-Sialidase for Convenient Syntheses of Sialylated Oligosaccharides"*

Posterpräsentation auf dem 14th European Carbohydrate Symposium in Lübeck, Deutschland, September 2007: *"Regio- and stereoselective synthesis of N-Acyl modified sialylated oligosaccharides with Trypanosoma cruzi Trans-Sialidase and measurement of transfer rates and activity"*

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation “*Aufbau und Untersuchung modifizierter Neuraminsäuredonoren zur regio- und stereoselektiven Sialylierung durch Trans-Sialidase (Trypanosoma cruzi)*“ selbständig angefertigt und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Hamburg, im August 2007

An dieser Stelle möchte ich danken:

- Christine für die gemeinsamen Jahre und viele schöne Erinnerungen.
- Meinen Eltern für ihre verlässliche Unterstützung. Vor allem wenn es mal finanziell eng wurde.
- Anna für ihre Unterstützung und wirklich viele NMR-Messungen.
- Björn für die Einführung in die Neuraminsäurechemie.
- Agnes für den ersten Rührlisch und für ihr offenes Ohr bei allen möglichen Problemen.
- Dem AK Vill, bestehend aus Sven Gerber und Matze Wulf, die sicher einige Stunden Fluchen über Chemie die nicht funktioniert und allem was noch so dazugehört geduldig über sich haben ergehen lassen.
- Janna dafür, dass sie immer nur kurze Zeit eingeschnappt war.
- Sebastian aus 315 und Sebastian aus 318 für die zahlreichen fachlichen und nichtfachlichen Gespräche.
- Kirsten und Lilia für viele gute Tipps und engagierte Hilfe.
- Dem „Steinekoher“ Nils Pagels für die vielen Kommentare meine Chemie und mein Ölpumpenvakuum betreffend.
- Andreas Funck für den wöchentlichen Männer-DVD-Abend, der erst durch Frauen und schließlich durch Kinder unterwandert wurde.
- Dem harten Kern des Wintersemesters 1999/2000 für viele Feten und Kiezabende.
- Allen OC-F-Praktikanten und allen die meine Musik geduldig ertragen und sich nicht beschwert haben.