

Chemoenzymatische Synthese sialylierter Oligosaccharidstrukturen durch Transglycosylierung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dirk Schmidt

aus Hamburg

Hamburg 2000

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Thiem

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Paulsen

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 22.12.2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1997 bis Dezember 2000 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. J. Thiem am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

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

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Synthese von sialylierten Oligosaccharidstrukturen.....	2
1.2	Der Einsatz von polymeren Phasen in der Oligosaccharidsynthese.....	7
2	Zielsetzung	10
3	Synthese sialylierter Glycokonjugate	12
3.1	Eignung von Sialidasen als Sialyltransferenzyme.....	12
3.2	Strukturaufklärung durch NMR.....	14
3.3	Synthese der Akzeptorverbindungen.....	16
3.4	Sialidase-katalysierte Synthese sialylierter Glycokonjugate.....	23
3.5	Trans-Sialidase-katalysierte Synthese sialylierter Glycokonjugate.....	47
3.6	Chemische Blocksynthese mit enzymatisch erzeugten Building-Blocks.....	57
4	Synthese sialylierter Glycokonjugate durch Kombination mit polymerunterstützter Flüssigphasensynthese	63
4.1	Eigenschaften von Polyethylenglycol.....	63
4.2	Prinzip der polymerunterstützten Flüssigphasensynthese	63
4.3	Synthese polymergebundener Akzeptorstrukturen.....	65
4.4	Synthese sialylierter Glycokonjugate auf der Basis von Polyethylen- glycolmonomethylether.....	71
4.5	Abspaltung vom Polymer.....	79
5	Zusammenfassung	82
5	Summary	84
6	Experimenteller Teil	86
7	Literatur	140

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
Bn	Benzyl
BSA	Rinderserumalbumin
CP	<i>Clostridium perfringens</i>
CTP	Cytidintriphosphat
DBU	Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNAse	Desoxyribonuclease
DOX	Dioxyxylyl
Fuc	Fucose
Gal	D-Galactose
GalNac	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GDP	Guanosindiphosphat
Glc	D-Glucose
GlcNac	<i>N</i> -Acetylglucosamin
HPLC	High performance liquid chromatography
Lac	Lactose
LSTa	Sialyl-Lacto- <i>N</i> -tetraose
LSTc	Sialyl-Lacto- <i>N</i> -neotetraose
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption spectroscopy, time of flight
Man	Mannose
Me	Methyl
MPEG	Polyethylenglycolmonomethylether
MU	Methylumbelliferyl
NDV	Newcastle disease virus
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
PEG	Polyethylenglycol
PEO	Polyethylenoxid
<i>p</i> Np	<i>para</i> -Nitrophenol
POE	Polyoxyethylen
POX	Polyoxiran

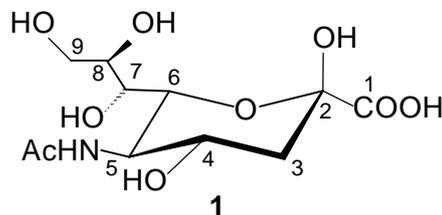
RER	Rauhes endoplasmatisches Retikulum
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Ser	Serin
ST	<i>Salmonella typhimurium</i>
T-Antigen	Thomsen-Friedenreich-Antigen
T _N -Antigen	Thomsen-nouveau-Antigen
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TC	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TfOH	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
TMS	Trimethylsilyl
TsOH	Toluolsulfonsäure
UDP	Uridindiphosphat
VC	<i>Vibrio cholerae</i>

1 Einleitung

Eine besondere Rolle bei der molekularen Erkennung in biologischen Systemen spielen die Sialinsäuren, die meist in terminaler Position biologisch relevanter Oligosaccharide gefunden werden.

Die Sialinsäuren sind eine Familie von carboxylierten Neun-Kohlenstoff-Zuckern. Unter diesem Oberbegriff werden alle natürlichen und synthetischen Derivate der 5-Amino-3,5-didesoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-2-nonulosonsäure zusammengefaßt. Aufgrund unterschiedlicher Substitution an C-4, C-5, C-7, C-8 und C-9 wurden bisher 39 verschiedene Spezies von Sialinsäuren in der Natur gefunden.¹ Die am weitesten verbreitete Sialinsäure ist die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) (**1**).

Neuraminsäure ist ein höherer Ketozucker, dessen chemische Eigenschaften von der Carboxyfunktion an C-1, der Carbonylfunktion an C-2, einer Aminogruppe an C-5 und dem desoxygenierten C-3 bestimmt werden. In der freien Aminoform ist die Neuraminsäure allerdings nicht stabil, da sofort Cyclisierung zu einer Schiffischen Base erfolgt. In der Natur treten daher ausschließlich die stabilen *N*-Acylderivate auf, deren wichtigster Vertreter die *N*-Acetylneuraminsäure (**1**) ist.



Sialinsäuren finden sich hauptsächlich in Viren, Mikroorganismen wie Bakterien und Protozoen, in einer Reihe höherer Tiere, auf den Zellmembranen sowie in den Körperflüssigkeiten von Säugetieren. Gewöhnlich besetzen Sialinsäuren die terminalen, nichtreduzierenden Positionen komplexer Oligosaccharide auf der äußeren und inneren Membranoberfläche. Meist sind sie hierbei α -glycosidisch an Galactose (Gal), *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc), *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) oder weitere Sialinsäuremoleküle gebunden. Verknüpfungen zu anderen Sialinsäuremolekülen erfolgen im allgemeinen über $\alpha(2-8)$ -Bindungen. In den meisten Heterooligosacchariden sind Neu5Ac-Einheiten $\alpha(2-3)$ - oder $\alpha(2-6)$ - mit Gal, GlcNAc oder GalNAc verknüpft.¹

In ihrer exponierten Position sind die Sialinsäuren somit die ersten Moleküle, die auf andere Zellen oder Verbindungen treffen. Diese Eigenschaft ist für das Verständnis ihrer biologischen Rolle besonders wichtig

Die zelltypspezifische Expression von Glycosyltransferasen, insbesondere der Sialyltransferasen führt zu definierten Sialylierungsmustern von Oligosacchariden, die als Schlüsseldeterminanten beim Aufbau von Zellen angesehen werden. So wurden unterschiedliche Glycosylierungsmuster bei der Entwicklung von Zellen, ihrer Aktivierung, dem Zellalterungsprozeß und ihrer Onkogenese beobachtet.

Die wichtige Rolle, die Oligosaccharide bei der interzellulären Signalübertragung und bei der Zelladhäsion spielen, haben zu einem erheblich gesteigerten Interesse an Methoden zum Aufbau dieser Verbindungsklasse geführt. Man versteht jetzt, daß diese komplexen Moleküle in Form von Glycoprotein- und Glycolipidkonjugaten detaillierte Strukturinformationen enthalten und vielfältige biologische Ereignisse wie Entzündung,²⁻⁶ Immunantwort⁷ und Metastasenbildung⁸ vermitteln. Desweiteren können an der Oberfläche von Zellen befindliche Kohlenhydrate als biologische Marker für verschiedene Tumore fungieren.⁹⁻¹¹

Um die biologischen und pathologischen Funktionen der Zelloberflächen-Oligosaccharide zu untersuchen, ist eine effiziente Methodik zu ihrer Darstellung und der Darstellung von Derivaten dieser Verbindungen notwendig.

1.1 Synthese von sialylierten Oligosaccharidstrukturen

Die stereoselektive Synthese glycosidischer Verknüpfungen ist nach wie vor die größte Herausforderung bei der Synthese eines komplexen Glycokonjugats. Durch zahlreiche Verbesserungen der Glycosidsynthesen hat sich eine Vielzahl von Methoden zur glycosidischen Verknüpfung durchgesetzt. Besonders die Halogenid-, die Trichloracetimidat- und die Thioglycosid-Methode gehören zu den Standardmethoden,¹²⁻¹⁴ da sie unter relativ milden Bedingungen gute Ausbeuten und hohe Stereoselektivitäten zeigen. Allerdings handelt es sich bei der klassisch-chemischen Glycosidsynthese nach wie vor um einen präparativ aufwendigen Prozeß, der viele intermediäre Schützungs- und Entschützungs-schritte sowie die damit verbundenen chromatographischen Reinigungsschritte notwendig macht.

Ein weiteres Problem liegt in der teilweise nur eingeschränkten Übertragbarkeit von für bestimmte Kohlenhydrate effizienten Glycosylierungsreaktionen auf alle Kohlenhydratklassen.

Als Folge davon ist die Entwicklung neuer biologisch aktiver Glycokonjugate ein komplexes Unterfangen. Und selbst wenn eine vielversprechende Verbindung identifiziert ist, bleibt die zur Wirkungssteigerung erforderliche Optimierung eine schwierige und zeitaufwendige Aufgabe. Die Synthese von Oligosaccharidbibliotheken mit kombinatorischen Methoden bietet eine geeignete Lösung für diese Probleme. Anders als Peptid- und Nucleotidbibliotheken sind Oligosaccharidbibliotheken jedoch nicht einfach zugänglich. Die Synthese einer solchen Bibliothek wird durch das Problem der Konfiguration am anomeren Zentrum und die Vielzahl der chemisch fast äquivalenten Hydroxygruppen erschwert. Traditionell würde man sich dieser Gruppen in einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie annehmen. Alternativ dazu haben Hindsgaul *et al.* gezeigt, daß nach dem Zufallsprinzip verlaufende Glycosylierungen zur Herstellung kleiner Bibliotheken aus Di- und Trisacchariden genutzt werden können.^{15,16}

Im Gegensatz zu Oligosaccharidsynthesen der klassischen Hexopyranosen, für die es inzwischen zahlreiche Routinemethoden gibt, sind Sialylierungen nach wie vor problematisch. Die Schwierigkeiten bei der Sialylierung können auf die besonderen Eigenschaften des Neuraminsäure-Moleküls zurückgeführt werden.

Zum einen erschwert die stark elektronenziehende Carboxyfunktion an C-2 die Bildung von Oxocarbeniumionen, die als Zwischenstufen bei fast allen gängigen Glycosylierungsreaktionen durchlaufen werden. Desweiteren verhindert das Fehlen eines Substituenten an C-3 mögliche stereodirigierende und unterstützende Effekte einer der glycosidischen Bindung benachbarten funktionellen Gruppe. Die Summe dieser Faktoren erschwert die stereoselektive Sialylierung mit klassisch-chemischen Methoden und erleichtert die häufig beobachtete Eliminierung zum 2,3-Dehydroderivat.

Ein alternativer Zugang zur Darstellung von Oligosaccharidstrukturen liegt in der Verwendung biosynthetischer Methoden. Die enzymatische Synthese besticht durch ihre Möglichkeiten, stereo- und regioselektive Reaktionen von ungeschützten Kohlenhydraten unter milden Bedingungen in wäßrigen Medien durchführen zu können. Generell sind drei Methoden möglich

- der Einsatz von Glycosyltransferasen des Leloir-Pathways.
- der Einsatz von Non-Leloir-Pathway Glycosyltransferasen.
- der Einsatz von Glycosidasen.

Vor allem der Einsatz von Glycosyltransferasen in der enzymatischen Oligosaccharidsynthese wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht.

Ausgehend von den zumeist Nucleosiddiphosphat-aktivierten Monosacchariden knüpfen die Transferasen hochspezifisch glycosidische Bindungen. Die Darstellung der Glycosyldonoren erfolgt im Falle der Glucose, Galactose, Mannose und N-Acetylglucosamin über die 1-Phosphate, die mit den entsprechenden GDP- bzw. UDP-Pyrophosphorylasen in UDP-Glc, UDP-Gal, GDP-Man und UDP-GlcNAc überführt werden. Abweichend davon wird die N-Acetylneuraminsäure als Nucleosidmonophosphat aktiviert. Aus Neu5Ac (**1**) und Cytidintriphosphat (CTP, **2**) entsteht unter Katalyse der CMP-Acylneuraminat-Synthase (EC 2.7.7.43) Cytidin-5'-monophospho-N-acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac, **3**) (Abb. 1), welches als einziges natürliches Sialylglycosid β -konfiguriert ist.

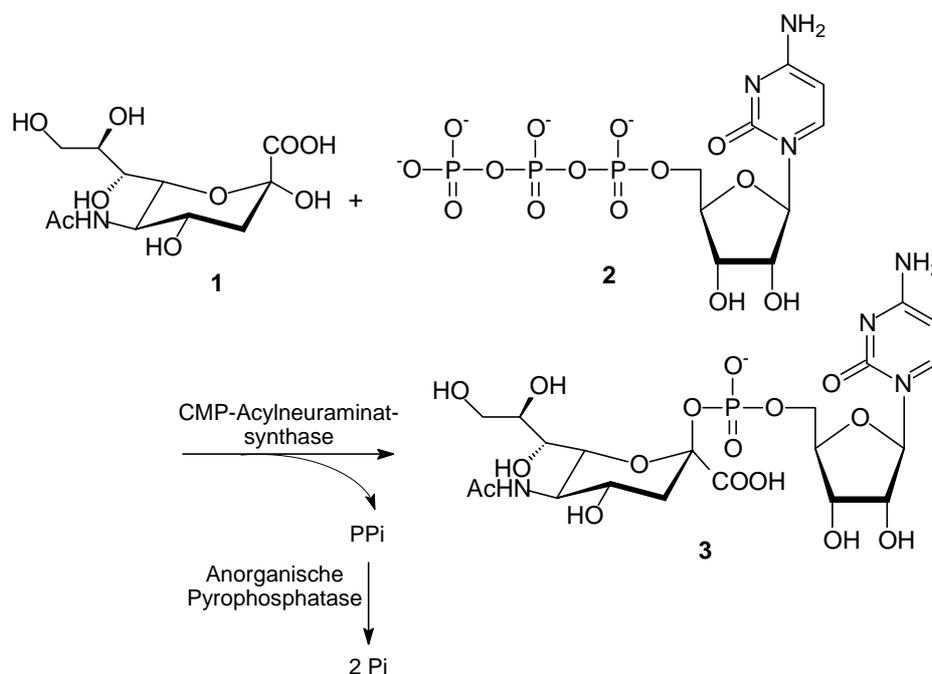


Abb. 1

Glycosyltransferasen tolerieren in einem engen Rahmen Modifizierungen der Akzeptorstruktur, so daß sie auch bei der Synthese unnatürlicher Oligosaccharidstrukturen verwendet werden können.

Über erste Synthesen im präparativen Maßstab wurde 1986 berichtet.¹⁷ Mit Sialyltransferase aus Rindercolostrum konnte das Trisaccharid Neu5Ac α (2-6)Gal β (1-4)GlcNAc dargestellt werden.

Häufig dominiert allerdings die sehr hohe Akzeptorspezifität der Transferasen, so daß das Spektrum synthetisierbarer Strukturen recht eingeschränkt bleibt. Auch die Notwendigkeit teurer Zucker-Nukleotide als Glycosyldonoren sowie die teilweise sehr begrenzte Stabilität .

Neben den nun seit Jahren als Synthesetools etablierten Glycosyltransferasen hat sich mit dem Einsatz von Glycosidasen in der Synthese ein neues Feld in der enzymatisch-katalysierten Glycosylierung erschlossen.

Diese in der Natur weit verbreiteten Enzyme spalten *in vivo* O-glycosidische Bindungen, sind unter geeigneten Bedingungen aber auch in der Lage glycosidische Bindungen zu knüpfen.

In tierischen Zellen sind die Glycosidasen im Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER) und im Golgi-Komplex zu finden. Hier sind sie im sogenannten Trimming-Prozeß zusammen mit den Glycosyltransferasen an der Biosynthese von Glycoproteinen und Glycolipiden beteiligt.¹⁸

Generell unterscheidet man die sogenannten Exoglycosidasen, die glycosidische Bindungen am nichtreduzierenden Ende von Oligosacchariden spalten, und die Endoglycosidasen, die interne glycosidische Bindungen einer Oligosaccharidkette spalten.

In der enzymatischen Synthese werden zumeist Exoglycosidasen eingesetzt, die *in vivo* die Hydrolyse glycosidischer Bindungen entweder unter Retention oder Inversion der anomeren Konfiguration katalysieren. Der Mechanismus dieser enzym-katalysierten Hydrolyse ähnelt der säurekatalysierten chemischen Hydrolyse von Glycosiden. In beiden Fällen existiert ein Oxoniumion oder ein Oxoniumion-artiger Übergangszustand. In den meisten Fällen ist es

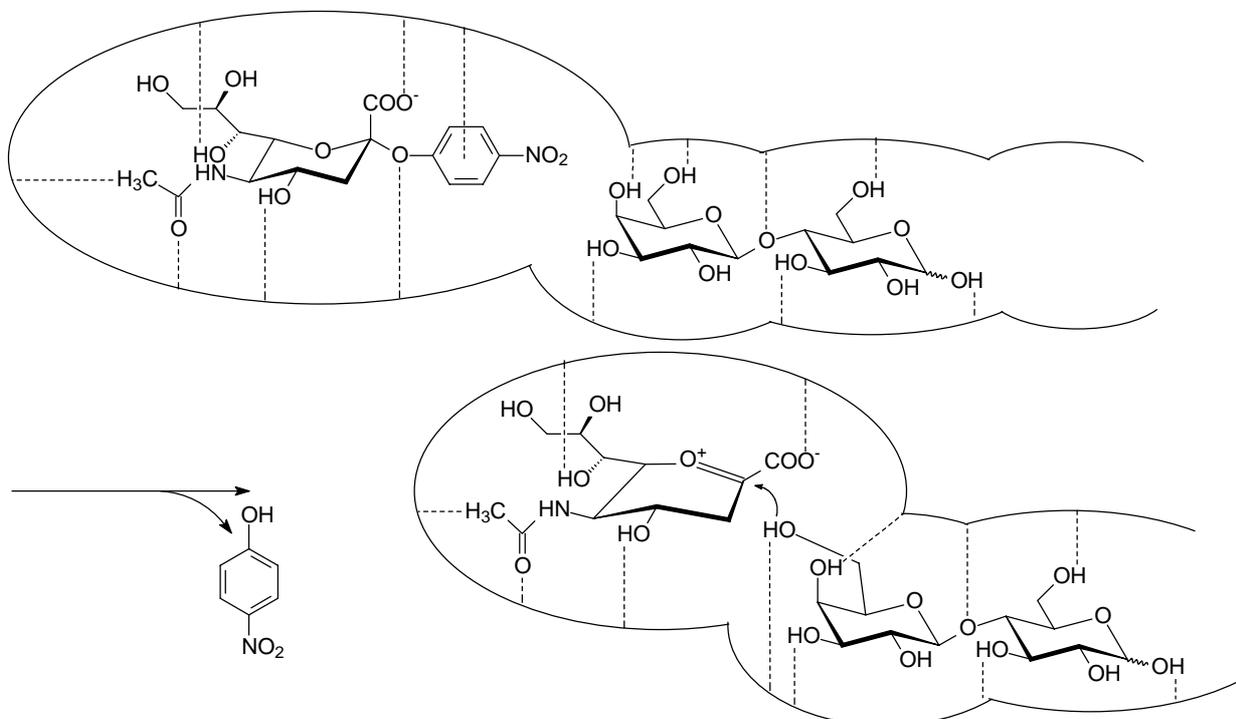


Abb. 2

jedoch nicht eindeutig, ob ein Oxocarbeniumion als stabilisiertes Ionenpaar oder ein Glycosylester existiert (Abb. 2).¹⁹⁻²¹

Glycosidasen können auf zwei verschiedene Arten zur Glycosidsynthese herangezogen werden. Zum einen durch den thermodynamischen Ansatz, der auch als reverse Hydrolyse bezeichnet wird: Da im thermodynamischen Gleichgewicht die Hydrolyse bevorzugt ist, muß das Gleichgewicht durch geeignete Reaktionsbedingungen wie hohe Substratkonzentrationen, hohe Temperaturen oder Zugabe organischer Lösungsmittel in Richtung Kondensation und somit Produktbildung verschoben werden (Abb. 3).²²⁻²⁵

Bei der kinetisch-kontrollierten Synthese, der sog. Transglycosylierung werden aktivierte Glycosyldonoren wie *p*-Nitrophenylglycoside, Glycosylfluoride oder Oligosaccharide verwendet. Die bei der Glycosidase-katalysierten Hydrolyse entstehenden Intermediate werden durch nukleophile Akzeptormoleküle abgefangen (Abb. 3). Viele Akzeptorstrukturen binden bevorzugt gegenüber Wasser in der Akzeptor-Site des Enzymes und erleichtern so die Transglycosylierung gegenüber der Hydrolyse des Substrats. Durch Anwendung dieses Verfahrens können in der Reaktionsmischung Oligosaccharide erzeugt werden, deren Konzentrationen weitaus größer als in der normalen Gleichgewichtsverteilung sind.²⁶⁻³¹

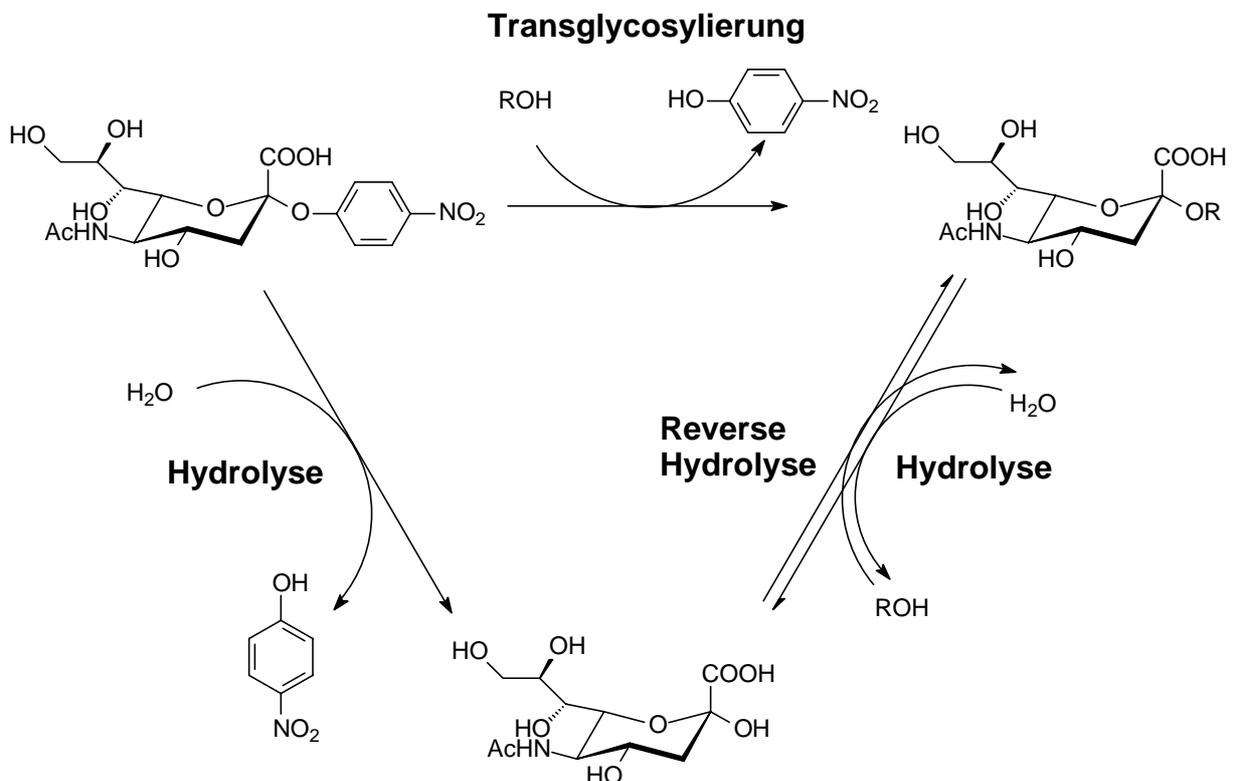


Abb. 3

Verglichen mit den Glycosyltransferasen werden mit Glycosidasen im allgemeinen geringere Ausbeuten erhalten: Im Fall der reversen Hydrolyse bis etwa 10%, bei der Transglycosylierung in Einzelfällen bis zu 70%.^{30,32-34} Einige Glycosidasen besitzen keine absolute Regioselektivität, was zur Bildung von häufig nur schwer trennbaren Regioisomergemischen führt. Versuche, die Regioselektivität durch gezielte Variation der Akzeptorstrukturen zu beeinflussen, führten nur teilweise zum Erfolg und schränken die den Glycosidasen sonst so typische Akzeptorvielfalt deutlich ein.²³

1.2 Der Einsatz von polymeren Phasen in der Oligosaccharidsynthese

Von den drei Hauptgruppen der Biooligomere, den Oligopeptiden, den Oligonukleotiden und den Oligosacchariden, sind die Oligosaccharide am weitaus schwierigsten zu synthetisieren. Da biologisch relevante Oligosaccharide meist nicht in ausreichenden Mengen aus natürlichen Ressourcen isoliert werden können, ist es notwendig, effiziente synthetische Methoden zu ihrer Darstellung zu entwickeln. Aufgrund der besonderen Struktur der Kohlenhydrate ist eine effiziente Synthese häufig nur unter präparativ aufwendigen Bedingungen durchzuführen, was im wesentlichen auf drei Faktoren zurückzuführen ist:

- die jeweiligen Monosaccharide, aus denen komplexe Oligosaccharidstrukturen aufgebaut werden sollen, enthalten verschiedene Hydroxylgruppen unterschiedlicher Reaktivität
- glycosidische Verknüpfungen müssen stereospezifisch am anomeren Kohlenstoff durchgeführt werden
- glycosidische Verknüpfungen geben säurelabile Vollacetale

Häufig verlaufen die zum Aufbau komplexer Oligosaccharide notwendigen klassisch-chemischen oder enzymatischen Glycosylierungsschritte nicht quantitativ und werden von Nebenreaktionen begleitet, die zur Bildung unerwünschter Nebenprodukte führen. Daraus resultiert die Notwendigkeit aufwendiger Reinigungsschritte, meist durch Chromatographie, nach jedem synthetischen Schritt. Obwohl diese klassische Herangehensweise in der Vergangenheit bei der Synthese einer Vielzahl biologisch relevanter Oligosaccharide sehr erfolgreich war, ist es naheliegend, daß intensiv nach alternativen Verfahren gesucht wird, die den nach jedem synthetischen Schritt notwendigen chromatographische Reinigungsschritt umgehen.

Während die Synthese von Peptiden und Oligonukleotiden bereits vor Jahrzehnten aufgrund standardisierter Reaktionsprotokolle automatisiert wurde, gibt es nach wie vor keine generell

anwendbaren synthetischen Verfahren zur Synthese komplexer Oligosaccharide. Die Herstellung strukturell definierter Oligopeptide³⁵ und -nucleotide³⁶ hat insbesondere von der Durchführbarkeit der Synthesen an polymeren Trägern profitiert. In den meisten Fällen lassen sich Peptid- und Oligonucleotidsynthesen in automatisch arbeitenden Syntheseanlagen (Synthesizern) durchführen, was den schnellen Aufbau der Zielverbindungen ermöglicht.

Der Hauptvorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß Zwischenprodukte durch einfaches Filtrieren von Nebenprodukten, überschüssigen Reagenzien und deren Abbauprodukten abgetrennt werden können und aufwendige chromatographische Reinigungsschritte so vermieden werden. Desweiteren können die Reaktionen unmittelbar nach vollständiger Umsetzung abgebrochen werden und schnell aufgearbeitet werden, so daß Produkte nicht unnötig lange eventuell destruktiven Reaktionsbedingungen ausgesetzt sind. Es ist daher nachvollziehbar, daß diese Methodik auch für die Synthese von Oligosacchariden untersucht wurde.

Um die sehr arbeitsaufwendige Synthese von Kohlenhydraten in Lösung zu umgehen, sind bereits in den 70er Jahren beträchtliche Anstrengungen zur Entwicklung von Strategien und Reaktionssequenzen für Festphasensynthesen unternommen worden.³⁷ Eine der ersten Festphasensynthesen wurde von Schuerch auf der Basis von Koenigs-Knorr-Bedingungen durchgeführt, wobei der Akzeptor an einem organischen Polymer immobilisiert war.³⁸ Allerdings traten bei den meisten Methoden eine Reihe von Schwierigkeiten auf wie unvollständige Reaktionen, verminderte anomere Spezifität sowie verminderte Reaktionsraten und entsprechend geringere Ausbeuten im Vergleich mit den Reaktionen in Lösung.

Es konnte trotz allem gezeigt werden, daß sich einige Methoden für Glycosylierungen in Lösung auch für Synthesen an polymeren Trägern eignen, und tatsächlich wurden bereits verschiedene biologisch wichtige Oligosaccharide durch Festphasensynthesen hergestellt.

Eine wesentliche Einschränkung der Synthese auf einer festen Phase ist dabei die Schwierigkeit, die Reaktionsprodukte und -Zwischenstufen zu charakterisieren. Die Produkte müssen hierzu in den meisten Fällen vom Harz abgespalten werden, um den Syntheseprozess mit klassischen spektroskopischen Methoden (z. B. NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie) verfolgen zu können. Die Abspaltung der hergestellten Verbindungen für die Analyse ist zeitaufwendig, teuer und bei vielstufigen Synthesen zudem verschwenderisch. Eine vollständige Charakterisierung der harzgebundenen Produkte würde daher große Vorteile bieten.

In der näheren Vergangenheit wurden eine Reihe von Festphasen-basierenden Strategien zur Glykokonjugatsynthese beschrieben.^{39,40} Auch über die Kombination von Festphasen-synthese und enzymatischer Synthese wurde berichtet.⁴¹

Die Festphasensynthese von Oligopeptiden und Oligonukleotiden kann aufgrund des hohen Molekulargewichts der festen Phase im Vergleich zur synthetisierten Substanz nur Produkte im mikromolaren Bereich liefern. Um kurze Sequenzen in größeren Mengen zu synthetisieren, wurde die sogenannte polymerunterstützte Flüssigphasensynthese entwickelt. Als Polymer wird hierbei Polyethylenglykol- ω -monomethylether (MPEG) verwendet. Die Methode basiert auf der Löslichkeit von MPEG in den meisten Lösungsmitteln mit Ausnahme von Ethern. Das polymergebundene Material, welches unter Reaktionsbedingungen löslich ist, wird im Laufe der Aufarbeitung ausgefällt. Da hierbei alle anderen Komponenten der Reaktionsmischung in Lösung bleiben, können sie von dem MPEG-gebundenen Produkt durch einfache Filtration abgetrennt werden. Unter diesen Bedingungen verlaufen die Reaktionen schneller, quantitativer und leichter kontrollierbar als Reaktionen, deren Edukte auf unlöslichen Matrices immobilisiert sind.

2 Zielsetzung

Glykokonjugate spielen in zahlreichen biologischen Prozessen eine zentrale Rolle. Angesichts eines wachsenden Bedarfs an größeren Mengen komplexer Oligosaccharide ist es von großem Interesse, effektive Methoden zu ihrer Darstellung zu entwickeln. Biochemische Untersuchungen und in zunehmendem Maße auch medizinische Anwendungen erfordern die regio- und stereoselektive interglycosidische Verknüpfung von Kohlenhydratbausteinen. Obwohl die klassischen Methoden zur Glycosylierung auf diesem Gebiet ein hohes Niveau erreicht haben, ist die Synthese einer definierten Heterooligosaccharidstruktur mit korrekter Reihenfolge, Verknüpfung, Konfiguration und Verzweigung ihrer Bausteine eine synthetische Herausforderung. Meist sind hierfür zahlreiche Schritte zur Aktivierung und zur Einführung und Entfernung von Schutzgruppen erforderlich.

Die Natur hat in vielen biologischen Systemen gezeigt, wie durch den Einsatz von Enzymen komplexe Verbindungen auf effiziente Weise synthetisiert werden können. Es ist naheliegend, die *in vivo* für den Aufbau von Oligosaccharidstrukturen verantwortlichen Transferasen auch *in vitro* einzusetzen. Dieser Ansatz wird jedoch durch die eingeschränkte Verfügbarkeit der Transferasen und ihre synthetisch anspruchsvollen Donorsubstrate begrenzt. Die synthetische Anwendung von Glycosidasen ist in diesem Fall wesentlich unkomplizierter. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit soll daher das Synthesepotential der Sialidasen aus *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium* und Newcastle Disease Virus sowie der Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* zur Darstellung sialylierter Oligosaccharidstrukturen nach dem Prinzip der Transglycosylierung untersucht werden. Um der Vielfalt der biologisch relevanten und medizinisch interessanten Sialylglykokonjugaten gerecht zu werden, soll die Etablierung von Syntheseverfahren, die eine regioselektive Darstellung dieser Strukturen erlauben, im Vordergrund stehen.

Dabei soll es in erster Linie darauf ankommen, die Syntheseverfahren so weit zu optimieren, daß eine hohe Regioselektivität erzielt wird. Sollte dies nicht möglich sein, so ist nach Methoden zu suchen, die diese Regioselektivität eventuell in einem der Transsialylierung nachgeschalteten Schritt erreicht.

Desweiteren soll untersucht werden, inwieweit sich enzymatische Methoden mit klassisch-chemischen Methoden unter dem Gesichtspunkt der Blocksynthese kombinieren lassen. Erste vielversprechende Ansätze dazu wurden in den letzten Jahren in der Literatur beschrieben.

Vieles spricht dafür, die noch vorhandene Kluft zwischen der klassisch-chemischen und der chemoenzymatischen Synthese zu überbrücken.

Schließlich ist zu untersuchen, ob sich die seit einigen Jahren etablierte polymerunterstützte Flüssigphasensynthese zum Aufbau biologisch relevanter Glycokonjugate und ihrer Derivate mit chemoenzymatischen Glycosylierungsmethoden, insbesondere der Sialidase-katalysierten Transglycosylierung eignet. Ein Fokus soll hier auf die experimentelle Einfachheit der Gesamtsynthese, die Minimierung von Schützungs- und Entschützungsritten sowie die weitgehende Reduktion chromatographischer Reinigungsschritte von Zwischenprodukten gesetzt werden.

3 Synthese sialylierter Glycokonjugate

Variationen im Glycosylierungsmuster von Zelloberflächenglycokonjugaten werden mit der Zelldifferenzierung und Zelladhäsion im Entzündungsprozeß, mit malignen Zelltransformationen und der Pathogenese verschiedener Krankheiten in Verbindung gebracht und sind daher attraktive Zielstrukturen für die Diagnose und Behandlung dieser Prozesse.^{6,42-45} Sehr häufig werden sialylierte Glycokonjugate als die entscheidenden Zielstrukturen identifiziert. *N*-Acetylneuraminsäure ist hierbei meist in $\alpha(2-3)$ - oder $\alpha(2-6)$ -Position mit Galactose, *N*-Acetylgalactosamin und *N*-Acetylglucosamin verknüpft, teilweise auch in $\alpha(2-8)$ -Position mit einer weiteren *N*-Acetylneuraminsäure-Einheit.

Um Struktur-Reaktivitäts-Beziehungen zu erstellen, ist es daher notwendig, effiziente und stereoselektive Synthesen zur Verfügung zu haben, die einen Zugang zu diesen Verbindungen erlauben, da sich die Isolierung dieser Verbindungen aus natürlichen Quellen als aufwendig herausgestellt hat und im übrigen keinen Zugang zu nicht-natürlichen Derivaten bietet.

3.1 Eignung von Sialidasen als Sialyltransferenzyme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl von Sialidasen auf ihr Transglycosylierungspotential untersucht. Hierbei zeigte sich, daß die Sialidasen aus *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium* und Newcastle Disease Virus die vielversprechendsten Transferpotentiale bei gleichzeitig guter kommerzieller Verfügbarkeit aufweisen. Die kommerzielle Verfügbarkeit der Sialidasen spielt bei den Überlegungen zur Entwicklung einer effizienten Sialylierungsmethode eine nicht zu unterschätzende Rolle, da bei dem Einsatz der Sialidase als Transferenzym Aktivitätsmengen im Bereich von 0.1 bis zu 10 Units notwendig sind im Gegensatz zu ihrer Verwendung als Hydrolase, wo häufig schon Mengen im Milli-Unit-Bereich genügen, um ein sialyliertes Glycokonjugat vollständig zu desialylieren.

Eine Möglichkeit, teure oder schwer zugängliche Enzyme mehrmals zu verwenden, besteht in der Immobilisierung von Enzymen. Versuche zur Immobilisierung der Sialidasen wurden im Rahmen früherer Arbeiten durchgeführt.^{46,47} Bei Langzeituntersuchungen zur Stabilität immobilisierter Sialidasen zeigte sich aber, daß diese nur über einen begrenzten Zeitraum ihre Aktivität behalten. Bereits nach 4-6 Wochen ist in den überwiegenden Fällen ein deutlicher Aktivitätsverlust von 10-30% zu verzeichnen. Nach einigen Monaten ist die Aktivität dann auf 5-30% der Anfangsaktivität gesunken. Diese Angaben beziehen sich hierbei nur auf die Lagerfähigkeit der Enzyme. Im Falle der mehrfachen Verwendung der Immobilisate sinkt die

Aktivität sogar deutlich schneller.⁴⁸ Es erschien daher sinnvoll, mit den oben genannten kommerziell erhältlichen Sialidasen in homogener Lösung zu arbeiten. Die Enzyme werden zur Beendigung der Reaktion thermisch inaktiviert und abzentrifugiert bzw. chromatographisch abgetrennt.

Bei der Untersuchung der Enzyme auf ihre Eignung als Transglycosylierungskatalysatoren spielt neben der eigentlichen Transferaktivität die Regioselektivität des Sialyltransfers eine wichtige Rolle. Wünschenswert sind Sialidasen, die nicht nur hohe Transferraten erzielen, sondern außerdem *N*-Acetylneuraminsäure (**1**) regioselektiv auf Glycosylakzeptoren übertragen. Es ist bekannt, daß Sialidasen *in vivo* stark differierende Hydrolyseraten gegenüber unterschiedlich verknüpften *N*-Acetylneuraminsäure-Einheiten zeigen.^{1,49} In Tabelle 1 ist die Substratspezifität einiger Sialidasen in bezug auf die Hydrolyse aufgeführt.

Quelle der Sialidase	pH Optimum	Neu5Ac α (2-3) Gal β (1-4)Glc	Neu5Ac α (2-6) Gal β (1-4)Glc	Neu5Ac α (2-8) Neu5Ac α (2-3) Gal β (1-4)Glc
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	4.4-5.5	100	167	53
<i>Vibrio cholerae</i>	5.0-6.5	100	53	31
<i>Clostridium perfringens</i>	5.5-7.2	100	44	44
<i>Salmonella typhimurium</i>	5.0-7.0	100	0.4	n. best.
Newcastle Disease Virus	5.0-6.0	100	0.2	78

Tab. 1 Substratspezifität kommerziell erhältlicher Sialidasen¹

So zeigt die Sialidase aus *Arthrobacter ureafaciens* eine ausgeprägte Regioselektivität für α (2–6)-Sialyllactose, die Sialidasen aus *Vibrio cholerae* und *Clostridium perfringens* hydrolysieren geringfügig besser α (2–3)-verknüpfte gegenüber α (2–6)-verknüpfter Sialyllactose, während die Sialidasen aus *Salmonella typhimurium* und Newcastle Disease Virus α (2–3)-Sialyllactose deutlich bevorzugt hydrolysieren.

Bei Einsatz der Sialidasen unter Transglycosylierungsbedingungen, die in bestimmten Parametern wie Substratkonzentration, Art und pH-Wert des eingesetzten Puffers von den Hydrolysebedingungen abweichen, zeigen sich allerdings deutliche Abweichungen in ihrer Regioselektivität. So zeigen einige Enzyme ein nur geringes Transferpotential, wie z. B. die oben angeführte Sialidase aus *Arthrobacter ureafaciens*, die sich, obwohl kommerziell gut zugänglich, nicht oder nur eingeschränkt synthetisch nutzen läßt. Mit ihr wurden in Testversuchen nur Ausbeuten von 0-5% erzielt.

Ebenso wurden auch im Fall der anderen vier genannten Sialidasen deutliche Unterschiede im Transsialylierungsverhalten beobachtet, insbesondere hinsichtlich der Regioselektivität, mit der Akzeptorstrukturen sialyliert werden.

3.2 Strukturaufklärung durch NMR

Seit der Einführung der hochaufgelösten NMR-Spektroskopie hat sich dieses Verfahren als die Standardmethode zur Aufklärung der Primärstruktur von komplexen Glycokonjugaten bewährt. Insbesondere die Möglichkeit, ^1H - als auch ^{13}C -NMR-Spektren von underivatisierten Verbindungen in wäßrigen Lösungen zu messen, erlaubt ein hohes Maß an Flexibilität bei der Analyse enzymatisch synthetisierter Strukturen.

Für die Interpretation von ^1H -NMR-Spektren der underivatisierten Glycoprotein-N- und O-Glycane in D_2O wurde das „Structural-Reporter-Group“-Konzept entwickelt.^{50,51} Dieses Konzept nutzt den Umstand aus, daß bestimmte Protonen eine charakteristische Verschiebung außerhalb der Region hoher Signaldichte zwischen δ 3.4 und 4.0 ppm besitzen. Anhand der Verschiebung sowie der Kopplungs-konstanten läßt sich meist unzweideutig die Primärstruktur ermitteln. Die wichtigsten Reporter-Groups für die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen sind

- die anomeren H-1-Atome: Ihre chemische Verschiebung und die dazugehörige Kopplungskonstante zum H-2-Proton erlaubt Rückschlüsse über die Art der Monosaccharideinheit sowie über den Typ und die Konfiguration der glycosidischen Verknüpfung.
- die axialen und äquatorialen H-3-Atome der N-Acetylneuraminsäure ($\text{H-3}_{\text{ax,eq}}$): Ihre chemischen Verschiebungen erlauben die Identifizierung des Typs und der Konfiguration der glycosidischen Verknüpfung.
- die H-3- und H-4-Atome der Galactose: Ihre chemische Verschiebung ist in einigen Fällen charakteristisch für die Art und Konfiguration der glycosidischen Verknüpfung zwischen Galactose und dem Substituenten.
- *N*-Acetylglycosamin- CH_3 -Protonen: Anhand ihrer chemischen Verschiebung lassen sich Strukturunterschiede im Molekül detektieren.

Da es bei den nachfolgend beschriebenen Transsialylierungen teilweise zur Bildung von Regioisomerenmischungen kommt, die durch chromatographische Methoden nur unzureichend getrennt werden können, ist es um so wichtiger eine analytische Methode zur Verfügung zu haben, die eine unkomplizierte Aufklärung der Regioisomerenverhältnisse erlaubt. Hier

bieten sich in erster Linie die bereits erwähnten axialen und äquatorialen H-3-Protonen der *N*-Acetylneuraminsäure an, die sich auch in einer Mischung aus $\alpha(2-3)$ - und $\alpha(2-6)$ -Regioisomeren unproblematisch identifizieren lassen. Für $\alpha(2-3)$ -sialylierte Strukturen wird für H-3_{ax} im allgemeinen eine Verschiebung von 1.80 ± 0.01 ppm, für H-3_{eq} von 2.76 ± 0.01 ppm beobachtet. Bei einer $\alpha(2-6)$ -Verknüpfung beträgt die charakteristische Verschiebung für H-3_{ax} 1.72 ± 0.01 ppm, für H-3_{eq} 2.67 ± 0.01 ppm.

Die ¹³C-NMR-Spektroskopie, die zumeist unter ¹H-entkoppelten Bedingungen durchgeführt wird, liefert durch eine breite Streuung der chemischen Verschiebung eine extrem hohe Auflösung. Dies ist auf den Einfluß der benachbarten Dipole und/oder elektrischen Ladungen auf die C-Kerne zurückzuführen. Die ¹³C-Resonanzen sind daher ausgesprochen empfindlich gegenüber Änderungen in der Substitution, der Konformation oder der Wechselwirkung mit anderen Verbindungen.

Während die Art und Konfiguration der glycosidischen Verknüpfung der *N*-Acetylneuraminsäure am besten über das ¹H-NMR-Spektrum identifiziert werden, erfolgt die Identifizierung der Verknüpfung am Akzeptorsaccharid am sinnvollsten über das ¹³C-NMR-Spektrum. Im allgemeinen wird hier bei einer Glycosylierung eine Tieffeldverschiebung des substituierten C-Atoms um 3-10 ppm beobachtet.

Bei der Sialylierung eines β -galactosidischen Akzeptoren bedeutet dies z.B. eine Verschiebung der C-3-Resonanz eines unsubstituierten β -Galactosids von $\delta \sim 73$ ppm auf $\delta \sim 76$ ppm bei einer $\alpha(2-3)$ -Sialylierung. Im Falle der $\alpha(2-6)$ -Sialylierung verschiebt sich die C-6-Resonanz von $\delta \sim 61$ ppm auf $\delta \sim 64$ ppm.

Bei der β -Galactosylierung werden noch ausgeprägtere Tieffeldverschiebungen beobachtet. Für eine $\beta(1-4)$ -Galactosylierung, wie sie bei einer Reaktion mit *Bacillus circulans* β -Galactosidase zu erwarten ist, wird eine Tieffeldverschiebung um ca. 8 ppm von $\delta \sim 70$ ppm bei Galactosiden und Glucosiden auf $\delta \sim 78$ ppm festgestellt.

Bei $\beta(1-3)$ -Galactosylierungen, wie sie durch Rinderhoden β -Galactosidase katalysiert werden, beträgt die charakteristische Verschiebung ca. 9-10 ppm. Hier wird der C-3-Peak von $\delta \sim 73$ ppm auf $\delta \sim 82-83$ ppm verschoben.

Durch Kombination von ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie läßt sich somit ein Oligosaccharid anhand weniger charakteristischer Verschiebungen meist eindeutig charakterisieren.

Kann die Struktur eines Glycokonjugats durch eindimensionale Spektren nicht aufgeklärt werden, bietet sich die Anwendung zweidimensionaler Techniken an.

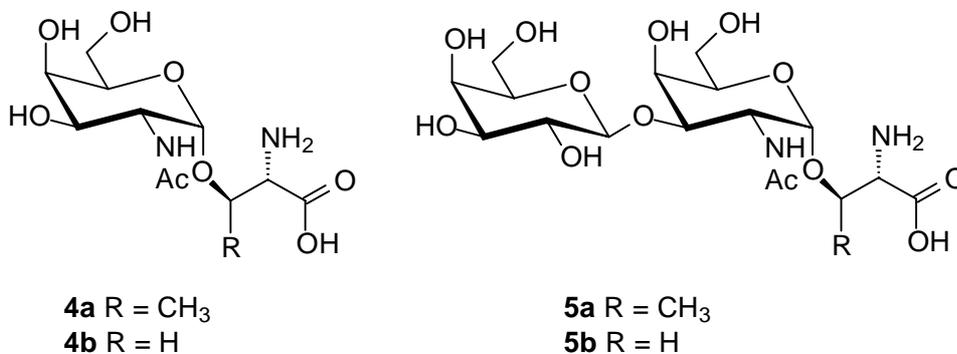
Die Messung von $^1\text{H}, ^1\text{H}$ - und $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ - COSY-Spektren erlaubt die Zuordnung von Protonen bzw. ^{13}C -Kernen durch Korrelation direkt miteinander koppelnder Kerne.

Anhand einer TOCSY-Messung lassen sich Korrelationen zwischen Protonen mit einem gemeinsamen Spinsystem erstellen. Man erkennt so die Signale der Protonen einer Monosaccharideinheit innerhalb eines Oligosaccharids. Ebenso können durch TOCSY-Korrelationen Informationen über Art und Verknüpfung der *N*-Acetylneuraminsäure gewonnen werden. Durch Korrelation des H-6-Protons mit dem H-3_{ax}-Proton lassen sich $\alpha(2-3)$ - (δ 3.63 \pm 0.011 ppm) und $\alpha(2-6)$ -Verknüpfungen (δ 3.70 \pm 0.017 ppm) von Neu5Ac differenzieren, wie anhand von Verbindungen des Typs Neu5Ac $\alpha(2-3/6)$ Gal $\beta(1-O)$ R und Neu5Ac $\alpha(2-3/6)$ GalNAc $\beta(1-O)$ R gezeigt werden konnte.⁵²

Ebenso haben sich bei der Strukturaufklärung HMBC-Experimente, die die Ermittlung von Long-Range-Kopplungen zwischen ^{13}C - und ^1H -Kernen ermöglichen, und HMQC-Experimente, bei denen ^{13}C -Resonanzen mit den direkt gebundenen Protonen korreliert werden, bewährt.

3.3 Synthese der Akzeptorverbindungen

Unvollständige Glycanseitenketten von Mucinen wie T_N-Antigen (GalNAc α -O-Thr/Ser **4a/b**) und T-Antigen [Gal $\beta(1-3)$ GalNAc α -O-Thr/Ser **5a/b**] sind als tumorassoziierte Zelloberflächenstrukturen beschrieben worden.⁵³⁻⁵⁶



Ein sialyliertes Epitop des T-Antigens [Neu5Ac α (2-3)Gal β (1-3)GalNAc] ist in GM₁-Glycolipiden, menschlichen Erythrozyten⁵⁷ und in einem Knochenmark-Makrophagenlektin⁵⁸ als terminaler Glycanteil nachgewiesen worden. T_N- und Sialyl-T_N-Epitope wurden auf dem Envelope-Glycoprotein gp120 des HI-Virus entdeckt.⁵⁹ Die Darstellung der oben genannten und analoger Oligosaccharid-Strukturen ist für immunologische Untersuchungen und für die Entwicklung von Impfstoffen gegen tumorassoziierte Antigene von besonderem Interesse.⁶⁰⁻⁶²

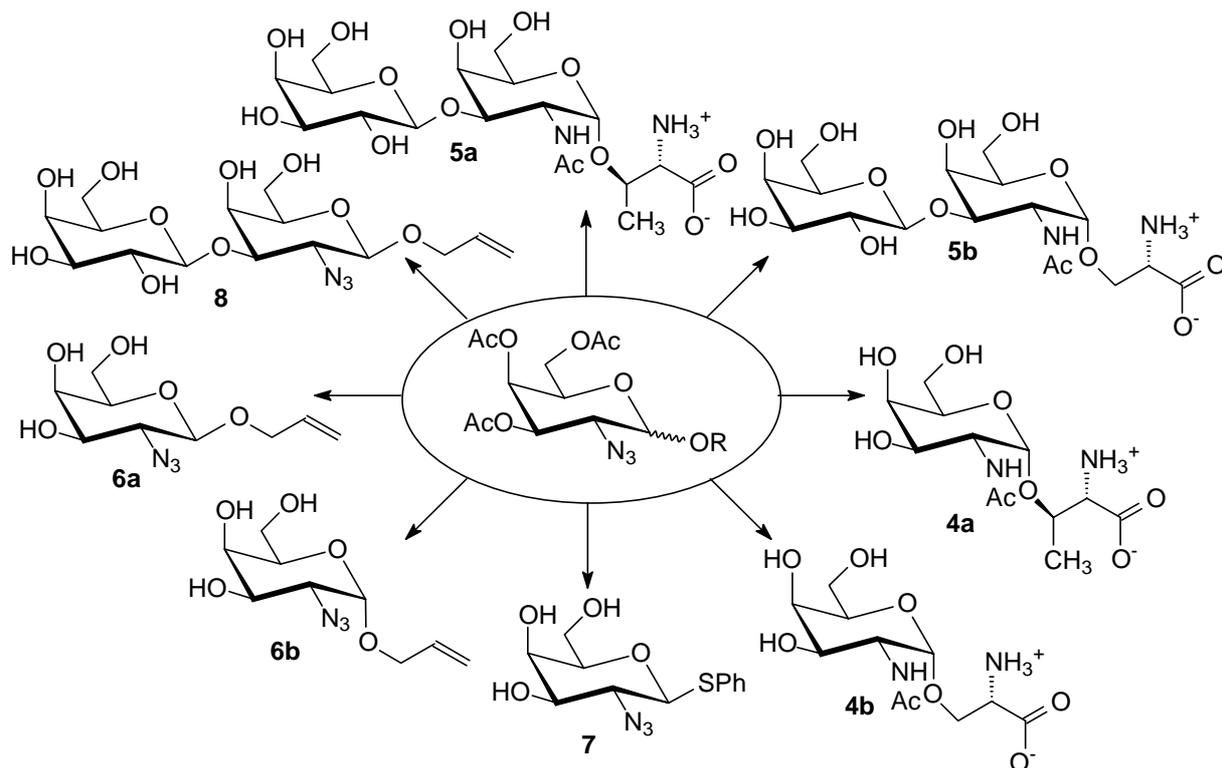
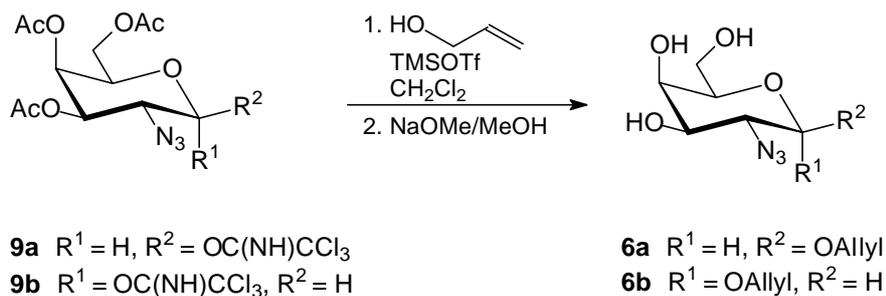
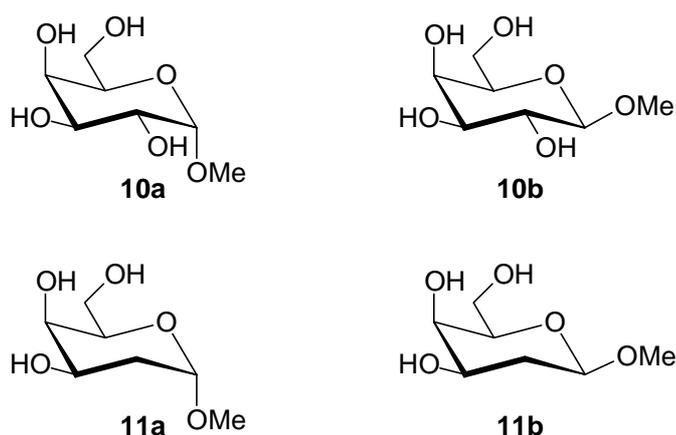


Abb. 5

Ausgangspunkt für alle Verbindungen dieses Typs sind 2-Azidogalactoside (Abb. 5), die aufgrund ihrer deutlich besseren Reaktions- und Löslichkeitseigenschaften wesentlich geeigneter für Derivatisierungen sind als die entsprechenden *N*-Acetylgalactosaminide. 2-Azidogalactoside sind präparativ relativ leicht zugänglich durch die Azidonitratisierung von 3,4,6-Tri-*O*-Acetylgalactal nach Lemieux *et al.*⁶³ Über das Trichloracetimidat⁶⁴ gelangt man zum 2-Azidogalactosylthreoninester bzw. zum entsprechenden Serinester.²⁹ Diese werden nach Paulsen *et al.*⁶⁵ reduziert und in die *N*-Acetylverbindungen überführt. Nach Entschützung erhält man **4a,b**.

**Abb. 6**

Bei der Darstellung von Trichloracetimidat **9a** nach der gängigen Synthesevorschrift fällt neben der eigentlichen Zielverbindung als Nebenprodukt auch das α -Anomer **9b** in etwa 20% an, was chromatographisch problemlos abgetrennt werden kann. Aus beiden Trichloracetimidaten werden die jeweiligen Allyl-2-azidogalactoside **6a** und **b** synthetisiert.⁶⁶ Diese sollen zum einen einer Untersuchung der Transglycosylierungseigenschaften anomerer Verbindungen dienen. So ist beschrieben worden, daß Glycoside mit unterschiedlicher Konfiguration sowohl hinsichtlich der Regioselektivität als auch der Ausbeute zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Glycosidase-katalysierten Transglycosylierung führen.⁶⁷ Zum anderen sollen **6a** und **b** und davon abgeleitete Strukturen als Building Blocks für biologisch interessante Strukturen verwendet werden. Die Azidogruppe erlaubt ein weites Spektrum an Möglichkeiten zur Derivatisierung und besitzt eine wesentlich bessere Reaktivität im Vergleich zu analogen *N*-Acetylgalactosaminderivaten. Die Allylschutzgruppe ist ebenfalls flexibel und kann unter schonenden Bedingungen abgespalten werden.



Desweiteren sollen im Rahmen der oben genannten Untersuchung der Transfereigenschaften von Sialidasen die Galactoside **10a** und **b** sowie die 2-Desoxygalactoside **11a** und **b** untersucht werden. Erstere sind kommerziell erhältlich, letztere können nach literaturbekannten Methoden synthetisiert werden.⁶⁸ **10a** und **b** wurden im Rahmen einer

Regioselektivität sowie ihr einfaches Handling eignen sich einige β -Galactosidasen hervorragend zur stereospezifischen und regioselektiven Synthese β -galactosylierter Strukturen.

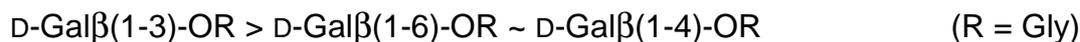
Es sollen daher einige der oben beschriebenen Produkte regioselektiv galactosyliert werden. Hierbei kamen die β -Galactosidasen aus *Bacillus circulans* und aus Rinderhoden zum Einsatz.

Für die β -Galactosidase aus *Bacillus circulans* wird eine Hydrolyse β -galactosidischer Verknüpfungen in folgender kinetischer Präferenz beobachtet:



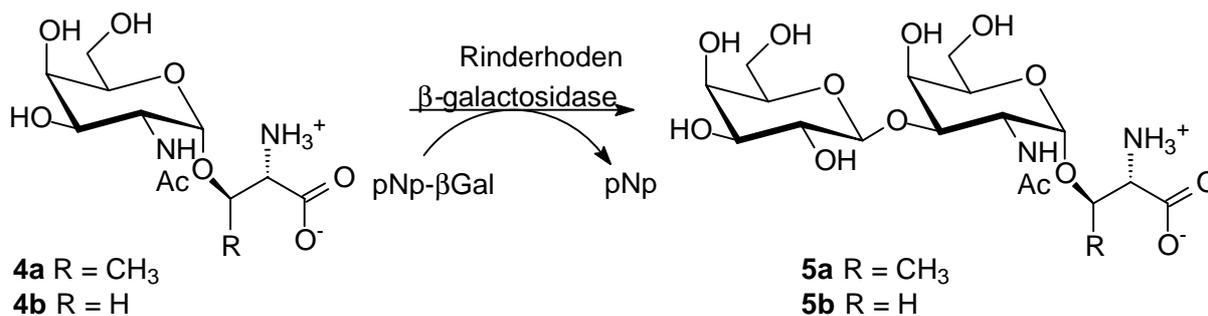
Dies ist aus chemischer Sicht insofern bemerkenswert, weil die 4-OH-Funktion als die chemisch reaktionsträgste Position in einer Vielzahl von Hexopyranosen gilt.

β -Galactosidase aus Rinderhoden zeigt bei der Hydrolyse eine leichte Präferenz für $\beta(1-3)$ -galactosylierte Verbindungen:



Allerdings konnte gezeigt werden, daß die β -Galactosidase aus Rinderhoden unter Transglycosylierungsbedingungen eine deutliche Präferenz für die Bildung $\beta(1-3)$ -galactosidischer Verknüpfungen besitzt, die zur weitgehend regioselektiven Synthese genutzt werden kann. Diese Ergebnisse zeigen, daß, wie bereits im Falle verschiedener Sialidasen anfangs erwähnt, Glycosidasen mit einem bestimmten kinetischen Hydrolyseprofil bei dem Einsatz unter Transglycosylierungsbedingungen deutlich unterschiedliche Regioselektivitäten zeigen. Gründe für dieses Verhalten sind bisher unbekannt, da die wesentlichen Unterschiede bei einer Transglycosylierung gegenüber einer Glycosidase-induzierten Hydrolyse in der Konzentration der Donor- und Akzeptorsubstrate liegen.

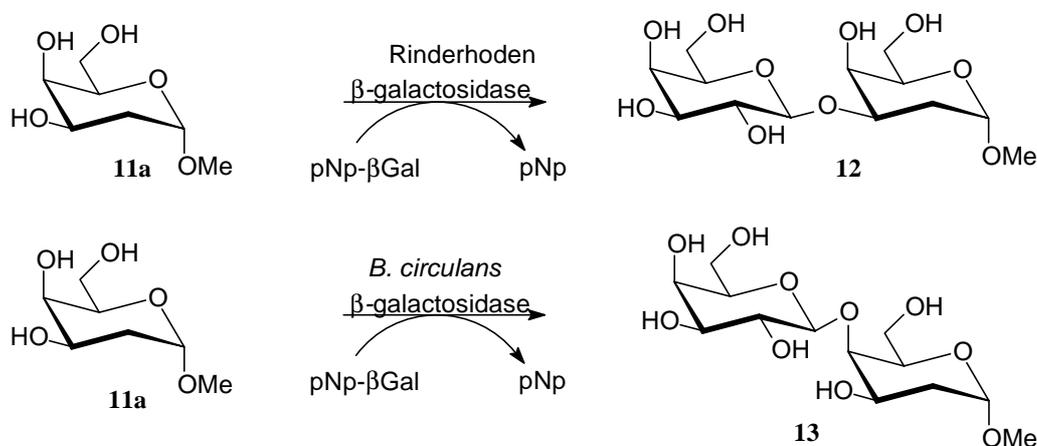
Zur Darstellung des T-Antigens werden Verbindungen **4a** und **b** mit *p*Np- β -Gal und β -Galactosidase aus Rinderhoden nach Gambert *et al.*²⁹ inkubiert. Das Threoninderivat **5a** wird hierbei in 28%, das Serinderivat **5b** in 25% Ausbeute erhalten.


Abb. 7

In beiden Fällen wurde keine Bildung von $\beta(1-4)$ - oder $\beta(1-6)$ -verknüpften Isomeren beobachtet. Da es sich bei dem verwendeten Enzym um einen Rohextrakt handelt, ist u.a. Fremdaktivität von β -Hexosaminidasen zu beobachten. Dies schränkt das Einsatzspektrum der Enzympräparation in einem gewissen Maße ein. Allerdings sind die meisten biologisch relevanten Epitope, die eine *N*-Acetylglucosamin- und *N*-Acetylgalactosamin-Einheit besitzen α -glycosidisch verknüpft. Da der Rohextrakt keine α -Hexosaminidase-Aktivität aufweist, sind diese Strukturen vor enzymatischer Hydrolyse geschützt.

Eine weitere Aufreinigung des Rohextrakts würde daher nur Sinn machen, wenn tatsächlich mit terminal β -substituierten *N*-Acetylglucosaminen gearbeitet wird.

2-Desoxyzucker werden in zahlreichen biologisch aktiven Naturstoffen vorgefunden, so unter anderem in Calicheamycin, Daunomycin, Mithramycin und Compactin. Es ist daher von Interesse zu untersuchen, wie sich diese Moleküle unter Transsilylierungsbedingungen verhalten und ob sich das Fehlen der 2-Desoxygruppe auch in einem gewissen Abstand vom aktiven Zentrum der Sialidase bemerkbar macht. Ausgehend von 2-Desoxygalactosid **11a** wird


Abb. 8

zunächst die $\beta(1-3)$ -galactosylierte Verbindungen in 21% (**12**) sowie das $\beta(1-4)$ -Isomer in 36% (**13**) Ausbeute regioselektiv synthetisiert.³¹

Für die Regioselektivität der Reaktion scheint sich das Fehlen der 2-OH-Funktion nicht bemerkbar zu machen, da in beiden Fällen ausschließlich die gewünschten $\beta(1-3)$ - und $\beta(1-4)$ -Isomere gefunden werden. Allerdings fiel die Ausbeute gegenüber vergleichbaren Reaktionen im Fall der $\beta(1-3)$ -Galactosylierung von **11a** ab. Eine mögliche Ursache könnte eine verminderte Bindung des Akzeptors im aktiven Zentrum aufgrund der relativ hydrophoben Molekülunterseite sein.

Inwieweit die Regioselektivität der Transsialylierung durch die Stereochemie des Aglycons beeinflusst wird, soll anhand der Verbindungen **8** und **14** untersucht werden. Diese Verbindungen sind aufgrund ihrer chemisch leicht variierbaren Substituenten, der Azidogruppe und der Allylgruppe, für organisch-chemische Blocksyntheseschritte interessant. Katalysiert mit β -Galactosidase aus Rinderhoden wurden **8** und **14** in guten bis befriedigenden Ausbeuten (**8**: 24%, **14**: 21%) synthetisiert.

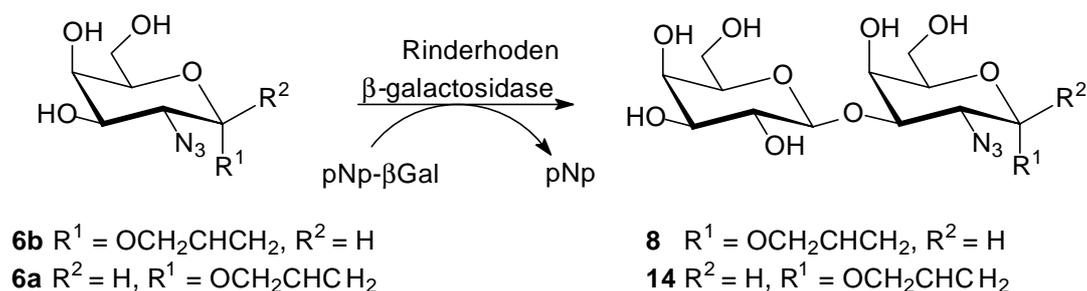


Abb. 9

Ebenfalls als Building Blocks kommen die 2-Azidoglucoside **15** und **16** in Frage. Das 2-Azidothioglucosid (**7**) kann durch kupferkatalysierten Diazotransfer^{69,75} und anschließende Überführung in das OH-freie Thioglycosid nach Standardmethoden erhalten werden. Verbindung **7** konnte in befriedigender Ausbeute von 19% zum Disaccharid **15** $\beta(1-3)$ -galactosyliert werden. Entsprechend wurde in 24% Lactosamin-Precursor **16** synthetisiert.

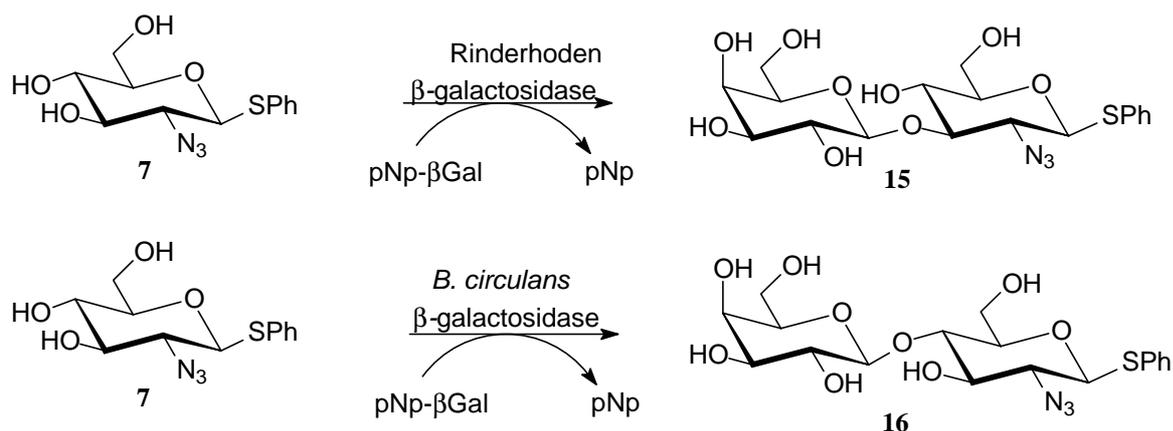
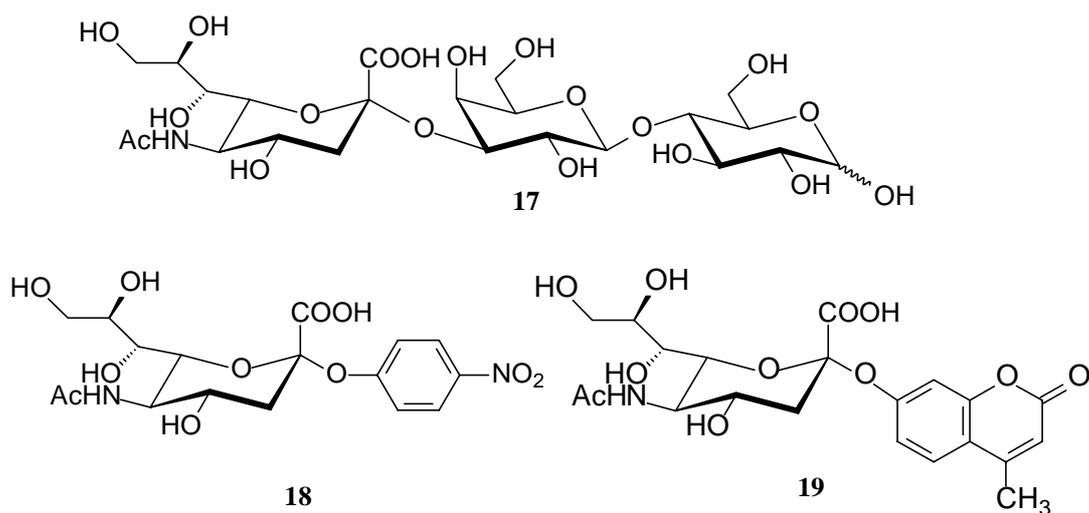


Abb. 10

3.4 Sialidase-katalysierte Synthese sialylierter Glycokonjugate

Als *N*-Acetylneuraminsäure-Donor kommen eine Reihe von Verbindungen in Frage. Am naheliegendsten scheint hierzu die Wahl eines natürlichen Substrats der Sialidasen, eines Sialyloligosaccharids wie z. B. der Sialyllactose (**17**). Allerdings sind die meisten kommerziell erhältlichen Sialyloligosaccharide extrem teuer (1 mg DM 255, SIGMA-Aldrich, Deutschland), was ihre Eignung als potentielle Donorsubstrate in einer präparativen Sialylierung stark einschränkt.



Ein weiterer Nachteil in der Verwendung eines Sialyloligosaccharids liegt in der notwendigen Aufreinigung der Produktmischung im Anschluß an die Sialylierung. Da die Sialidase-katalysierte Transsialylierung selten mehr als 30% Ausbeute liefert, befindet sich in der

Produktmischung neben dem eigentlichen Produkt und dem hydrolysierten Aglycon des Sialyldonors (im Fall von Sialyllactose ist dies Lactose) ein hoher Anteil an nicht umgesetzten Akzeptor. Um diesen zurückzugewinnen, sind meist relativ aufwendige chromatographische Verfahren notwendig. Eine weitere Verunreinigung des Gemischs durch das Donoraglycon erschwert diese Rückgewinnung häufig beträchtlich. Es erscheint daher sinnvoll Sialyldonoren zu verwenden, die neben einer guten Spaltbarkeit durch die Sialidase auch eine einfache Aufreinigung des Produktgemischs ermöglichen. Weiterhin wünschenswert ist ein Aglycon, das es erlaubt den Fortgang der Reaktion mit einfachen Methoden zu verfolgen. Eine dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung ist aufgrund des wässrigen Reaktionsmediums relativ zeitaufwendig. Alternative Verfahren wie die Photometrie oder HPLC mit UV- oder Fluoreszenzdetektion erlauben eine deutlich schnellere Bestimmung des Reaktionsverlaufs. Dieser Faktor ist eine bei der Glycosidase-katalysierten Transglycosylierung nicht zu unterschätzende Größe, da das Maximum der Produktbildung und der Beginn der Hydrolyse des Produkts häufig in einem engen Zeitfenster von wenigen Minuten liegen.

In früheren Arbeiten wurde eine Reihe möglicher Sialyldonorsubstrate untersucht.⁴⁷ Hierbei zeigte sich, daß das häufig zur Aktivitätsbestimmung herangezogene *p*-Nitrophenyl-*N*-acetylneuraminsäureglycosid (*p*Np-Neu5Ac, **18**) am besten zur Sialidase-katalysierten Transglycosylierung eignet. Ein im Rahmen dieser Arbeit neu untersuchter Sialyldonor, das Methylumbelliferyl-*N*-acetylneuraminsäureglycosid (MU-Neu5Ac, **19**), welches bevorzugt als nicht-natürlicher Donor für die Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* eingesetzt wird (s. Kap. 3.4), zeigte mit Modellakzeptoren eine dem *p*Np-Neu5Ac (**18**) vergleichbare Transferaktivität. Da das *p*Np-Neu5Ac (**18**) präparativ leichter zugänglich ist,⁷⁶ wurde dieses bevorzugt eingesetzt.

Ein weiterer Vorteil des *p*Np-Neu5Ac (**18**) liegt in der intensiven Gelbfärbung des bei der Transglycosylierung bzw. Hydrolyse freigesetzten *p*-Nitrophenols. So läßt sich bereits durch optische Begutachtung des Inkubationsansatzes eine erste Einschätzung des Transglycosylierungsverlaufs vornehmen. Durch Einsatz eines Photometers kann eine quantitative Bestimmung des freigesetzten *p*-Nitrophenols durchgeführt werden, und damit eine exakte Aussage über die noch im Inkubationsassay befindliche Menge von nicht umgesetztem *p*Np-Neu5Ac erfolgen. Alternativ kann auch eine Bestimmung des *p*Np-Neu5Ac durchgeführt werden, allerdings ist die Bestimmung des *p*-Nitrophenolats wesentlich empfindlicher und

daher für genaue Aussagen über den Reaktionsverlauf besser geeignet. Die photometrische Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten erfolgte anhand etablierter Methoden.^{77,78}

Wie in früheren Arbeiten bereits gezeigt wurde, besitzen die Sialidasen aus *Vibrio cholerae* und *Clostridium perfringens* unter Transglycosylierungsbedingungen eine ausgeprägte Regioselektivität für die $\alpha(2-6)$ -Sialylierung. So konnten Sauerbrei *et al.* zeigen, daß durch Immobilisierung und gezielte Variation der Inkubationsbedingungen deutliche Unterschiede in der Regioselektivität der Sialidase-katalysierten Transsialylierung auftreten.^{28,46} Ajisaka *et al.* synthetisierten unter Verwendung der Sialidasen aus *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens* und Newcastle Disease Virus regioselektiv sialylierte Lewis^X- und Lewis^A-Precursorstrukturen.⁷⁹

In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Regioselektivität der Transglycosylierungsreaktion von *Vibrio cholerae* und *Clostridium perfringens* Sialidase bei relativ niedrigen Inkubationstemperaturen von 20-25°C noch nicht sehr ausgeprägt ist.^{46,47} Bei den meisten Akzeptorstrukturen wurde hier eine regioselektive Präferenz von 3:1 bis 5:1 der $\alpha(2-6)$ - gegenüber den $\alpha(2-3)$ -Sialylierungen beobachtet. Erst bei höheren Temperaturen verschiebt sich das Verhältnis deutlich zugunsten der $\alpha(2-6)$ -sialylierten Isomere, teilweise allerdings auf Kosten der Gesamtausbeute.

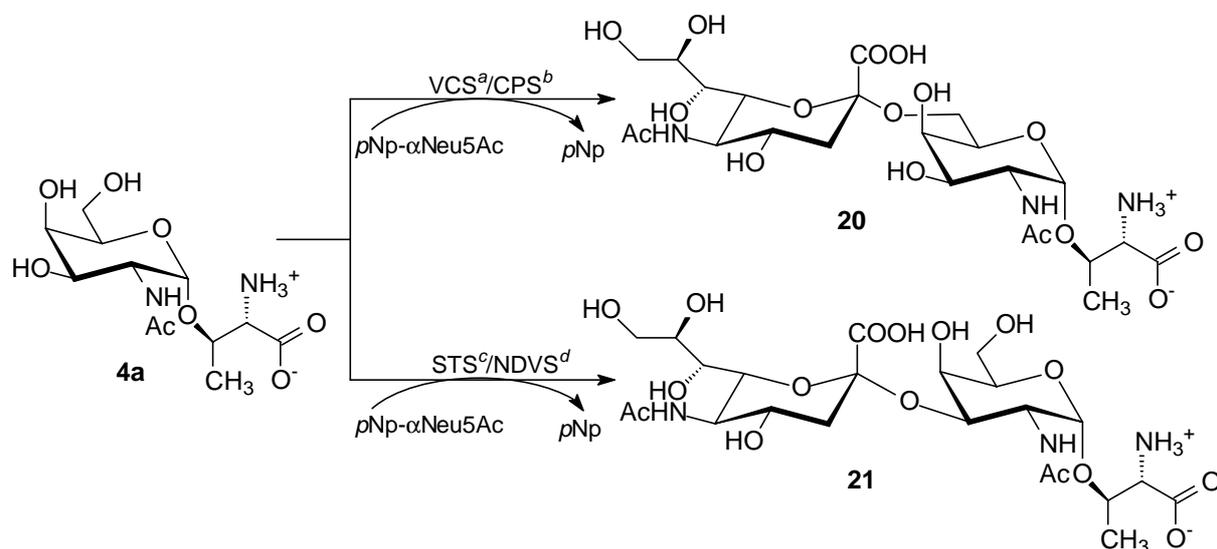
Salmonella typhimurium Sialidase ist die erste bekannte Sialidase mit einer ausgeprägten Regioselektivität für die $\alpha(2-3)$ -Verknüpfung. Das synthetische Potential dieser Sialidase wurde bereits angedeutet.⁸⁰

Der Verlauf der Transsialylierungsreaktion wurde routinemäßig per HPLC und Dünnschichtchromatographie verfolgt.

Um die Aggregation der Enzyme im Inkubationsverlauf – insbesondere bei längeren Inkubationen – soweit wie möglich zu unterbinden, wurde den Enzymstandardlösungen Rinderserumalbumin (BSA) zugesetzt. Hierbei ist es außerordentlich wichtig, extrem reines BSA zu verwenden, da BSA meist mit Glycoproteinfragmenten verunreinigt vorliegt.

Ausgehend von Verbindung **4a**, dem T_N-Antigen-Epitop, wurde durch Transsialylierung mit den Sialidasen aus *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium* und Newcastle Disease Virus die sialylierten Derivate **20** in 16% (*V. cholerae*) bzw. 10% (*C. perfringens*) und **21** in 15% (*S. typhimurium*) bzw. 10% (Newcastle Disease Virus) erhalten. In allen Beispielen konnten die Zielstrukturen regioisomerenrein erhalten werden. Dies konnte durch HPLC-Messung aus der Produktmischung heraus und NMR-Auswertung der

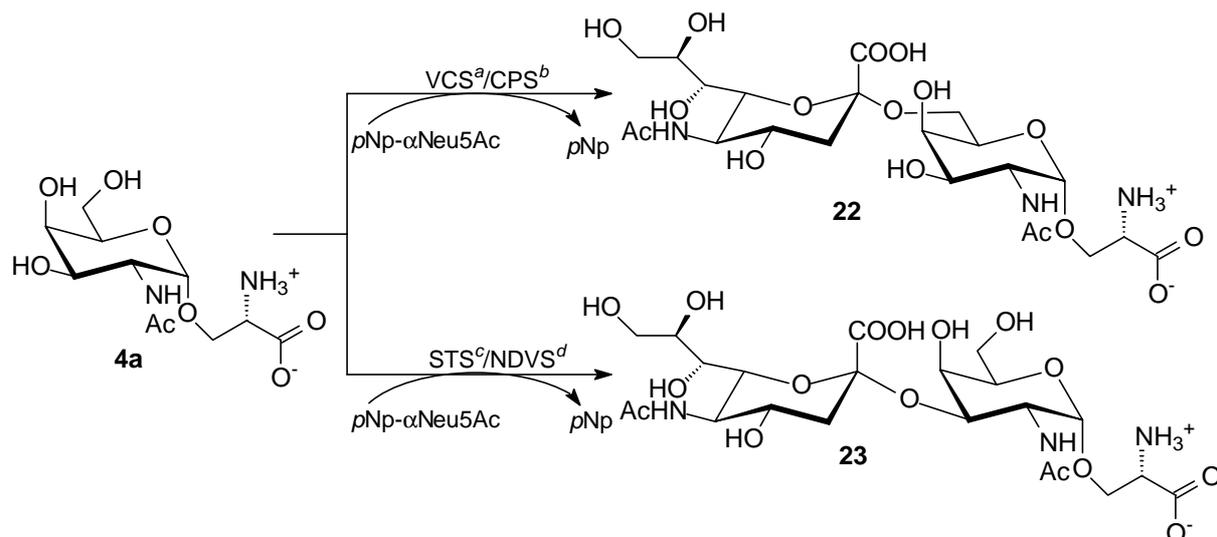
isolierten Produkte bestätigt werden. Allerdings zeigte sich bei einer engmaschigen HPLC-Messung, daß teilweise im Reaktionsverlauf durchaus in nicht unbeträchtlicher Menge auch die jeweils unerwünschten Regioisomere entstehen.



Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			α(2-6)	α(2-3)
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	20	16	>99	<1
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	20	10	>99	<1
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	21	15	<1	>99
Newcastle Disease Virus ^d	21	10	<1	>99

Abb. 11

Im Fall des sich nur im Aminosäurerest unterscheidenden Akzeptors **4b** wurden bei geringfügig niedrigeren Ausbeuten ähnliche Tendenzen festgestellt wie im Fall des Threonin-Derivats (**4a**). Befriedigenden Ausbeuten für die Sialidasen aus *Vibrio cholerae* und *Salmonella typhimurium* stehen wiederum etwas niedrigere Ausbeuten bei Einsatz der Neuraminidasen aus *Clostridium perfringens* und Newcastle Disease Virus gegenüber bei gleichzeitig deutlich längeren Inkubationszeiten der *Clostridium perfringens* Sialidase verglichen mit den übrigen Sialidasen (Abb. 12). Während erstere zwischen 16 und 28h Inkubationszeit benötigen, muß für letztere die Mischung teilweise bis zu 48h inkubiert werden, um eine signifikante Produktbildung zu detektieren. In diesen Fällen muß periodisch Enzymaktivität zugeführt werden, da die zur Transsialylierung notwendige Enzymmenge sich durch thermische Inaktivierung kontinuierlich verringert.



Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			$\alpha(2-6)$	$\alpha(2-3)$
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	22	13	>99	<1
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	22	9	>99	<1
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	23	12	<1	>99
Newcastle Disease Virus ^d	23	5*	<1	>99

*wurde per HPLC bestimmt und nicht isoliert

Abb. 12

Deutlich bessere Ausbeuten konnten mit dem sterisch wenig anspruchsvollen Akzeptor **11a** erhalten werden. Mit Ausbeuten von bis zu 26% im Falle der $\alpha(2-6)$ -Sialylierung bzw. 22% für $\alpha(2-3)$ -Sialylierung konnten für diese Art der Glycosylierung gute Transferraten erreicht werden. Im Falle der *Salmonella typhimurium* Sialidase-katalysierten Reaktion wurde allerdings auch zu 8% das $\alpha(2-6)$ -Isomer gebildet. Daran wird deutlich, wie eng beieinander die Regioselektivitäten der Sialidasen im Falle der Transglycosylierung liegen. Eine mögliche Erklärung für die verstärkte Bildung des regioisomeren Nebenprodukts könnte in einer verminderten Bindung des Akzeptors im aktiven Zentrum aufgrund der relativ hydrophoben Molekülunterseite begründet sein.

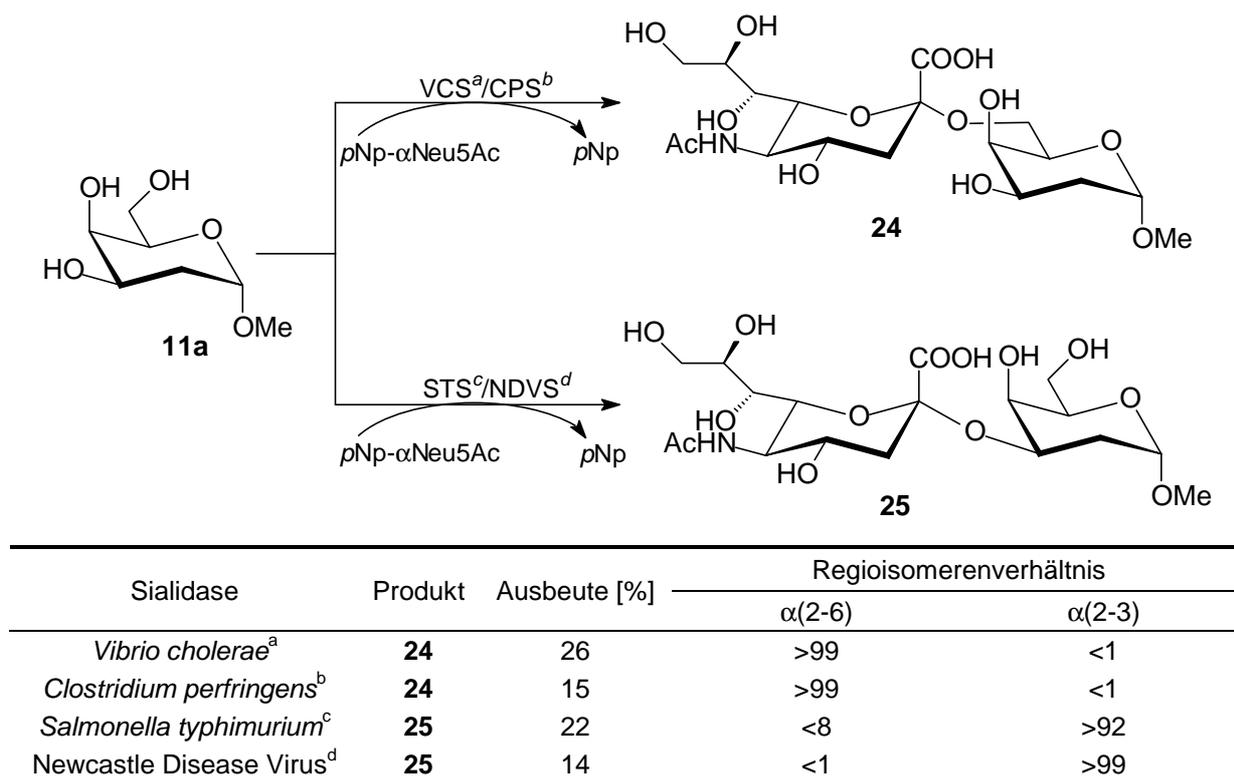


Abb. 13

Für das β -anomere 2-Desoxygalactosid **11b** ließen sich vergleichbar hohe Transferraten von bis zu 21% erzielen. Wiederum konnten bei den Transsialylierungen mit *Vibrio cholerae* und *Salmonella typhimurium* Sialidase deutlich höhere Ausbeuten erzielt werden. Die Ausbeute für **26** lag um ein Drittel höher, für das α -Anomer **27** war sie sogar um zwei Drittel höher.

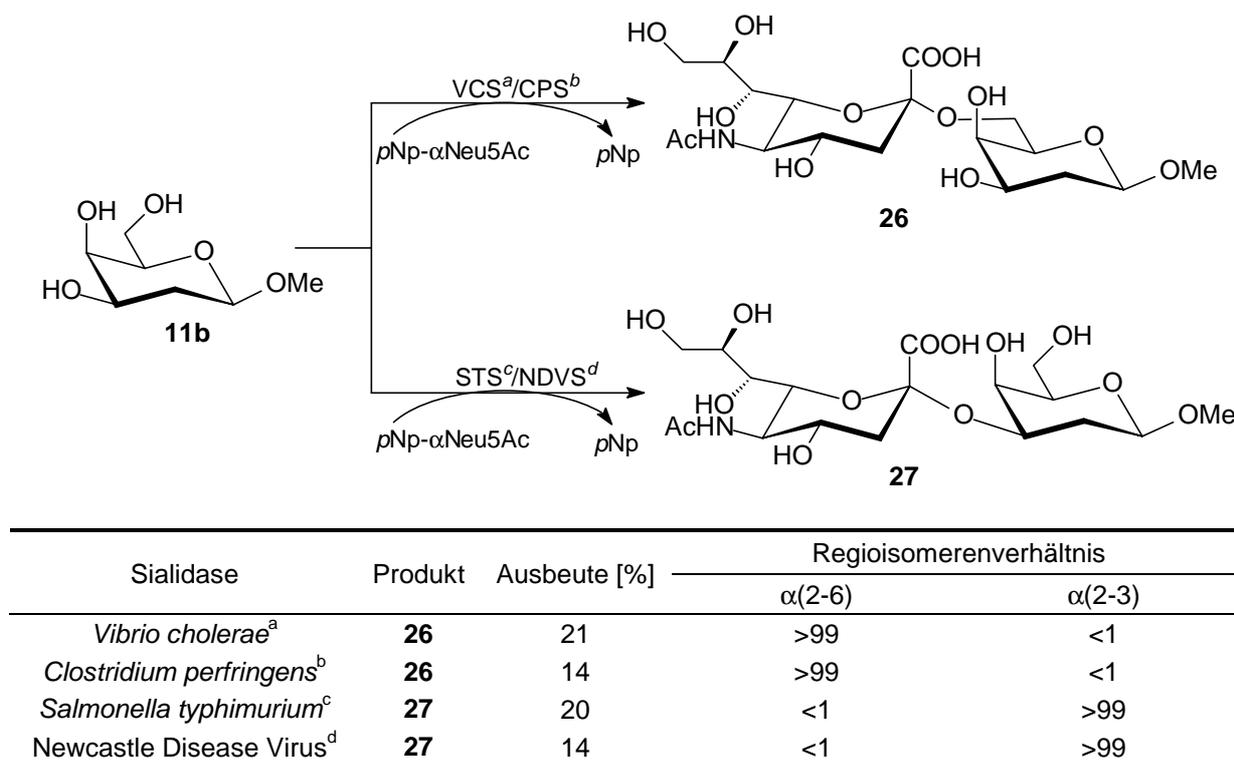
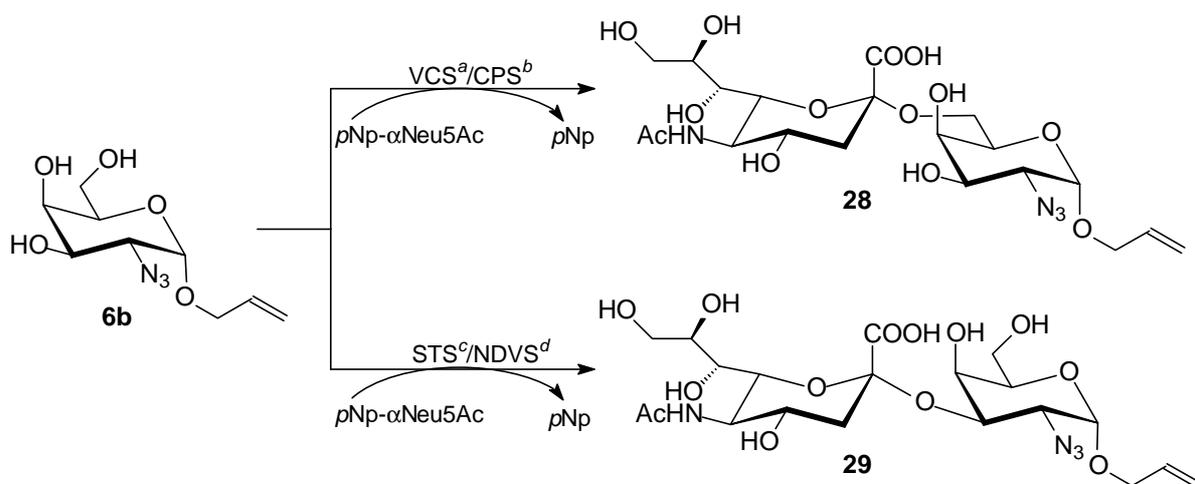


Abb. 14

Als weitaus schwieriger erwies sich die Transsialylierung der 2-Azidogalactoside **6b** (Abb. 15) und **6a** (Abb. 16). Verbindung **6b** konnte mit *Vibrio cholerae* Sialidase nur in 8% zu **28** $\alpha(2-6)$ -sialyliert werden. Mit *Clostridium perfringens* Sialidase konnten nach 120h Inkubation nur Spuren von **28** nachgewiesen werden, ebenso im Fall der Newcastle Disease Virus Sialidase, wo ebenfalls selbst nach 120h Inkubationszeit kein nennenswerter Umsatz stattgefunden hatte. Mit Sialidase aus *Salmonella typhimurium* wurde eine Ausbeute von 12% für **29** erzielt. In beiden Fällen, in denen ein Umsatz erzielt werden konnte, fällt auf, daß die Regioisomerenverhältnisse deutlich zuungunsten der gewünschten Produkte liegen. Hier konnte auch durch Variation der Inkubationszeit und -temperatur oder durch Änderung der Konzentration bzw. des Verhältnisses von Donor und Akzeptor keine Verschiebung in Richtung des gewünschten Regioisomers erreicht werden.

Eine mögliche Ursache könnte auch hier, wie im Falle der Transsialylierung von **11a**, eine relativ hydrophobe Molekülunterseite sein, der zu einer schwächeren Bindung und damit einer kürzeren Verweildauer im aktiven Zentrum führt.



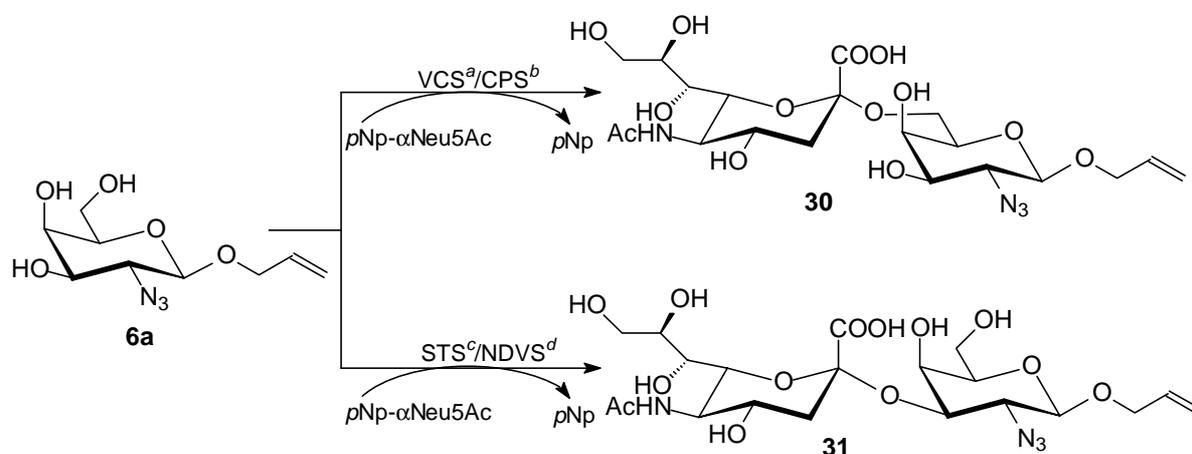
Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			$\alpha(2-6)$	$\alpha(2-3)$
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	28	8	74	26
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	29	12	15	85
Newcastle Disease Virus ^d	-	-	-	-

Abb. 15

Im Fall des β -Anomers **6a** wurde ein deutlich verminderter Umsatz bei gleichzeitig mäßiger Regioselektivität beobachtet. Hier konnte wiederum nur mit den Sialidasen aus *Vibrio cholerae* und *Salmonella typhimurium* ein nennenswerter Umsatz von 10-11% erzielt werden.

Clostridium perfringens und Newcastle Disease Virus Sialidase zeigten auch nach verlängerten Inkubationszeiten fast ausschließlich Hydrolyseprodukte.

Allerdings ist zu betonen, daß es sich bei **6a** und **6b** um keine Inhibitoren der Sialidase handelt, da - im Rahmen der Meßgenauigkeit - die gleiche Menge *p*Np-Neu5Ac pro Stunde hydrolysiert wurde wie im Fall erfolgreich umgesetzter Substrate. Dies konnte in einer Inhibitionsstudie bestätigt werden, die zeigte daß der Zusatz von **6a** und **6b** zur Inkubationslösung unerheblich für die Hydrolyserate war. Bei einem Blindversuch, bei dem der Pufferlösung kein Enzym zugesetzt wurde, wurde hingegen eine fast vollständige Unterbindung der Hydrolyse von *p*Np-Neu5Ac beobachtet, so daß daraus geschlossen werden kann, daß die enzyminduzierte Hydrolyse des Donors für die Freisetzung des *p*-Nitrophenols verantwortlich ist. Es ist hingegen bekannt, daß *p*-Nitrophenol selber ein schwacher Inhibitor der Sialidase ist und bei seiner Freisetzung im Reaktionsverlauf eine sogenannte Feedbackinhibition bewirkt. Dies hat allerdings keine große Auswirkung auf den Reaktionsverlauf, wie im Fall der β -Galactosidasen gezeigt werden konnte. Die Verwendung von Donoren mit einem nicht inhibierenden Aglycon wie z.B. Sialyllactose bringen keine deutliche Verbesserung der Transferaktivität.



Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			$\alpha(2-6)$	$\alpha(2-3)$
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	30	10	80	20
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	31	11	9	91
Newcastle Disease Virus ^d	-	-	-	-

Abb. 16

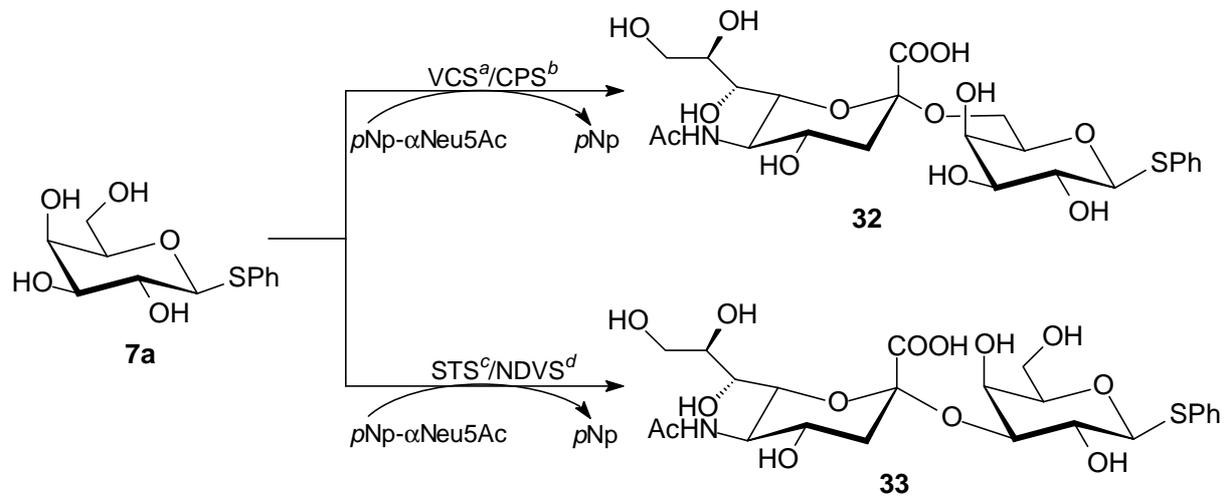
Die Verbindungen **7** und **7a** sind aus zwei Gesichtspunkten für eine enzymatische Synthese interessant: Zum einen sind sie Bausteine in einer Reihe biologisch-aktiver Verbindungen.

Zum anderen besteht durch die Wahl des Thiophenyl-Aglycons die Möglichkeit, die Galactosyl- bzw. 2-Azidoglucose-Einheit in einem ersten Schritt stereo- und regioselektiv zu sialylieren. Dieser unter klassischen Bedingungen häufig recht komplizierte Schritt kann somit beim Aufbau einer Oligosaccharidstruktur getrennt erledigt werden. Daher muß weder auf die hohe Substratspezifität einer im Fall der linearen Synthese evtl. verwendeten Sialyltransferase Rücksicht genommen werden, noch stellen sich die teilweise extrem schwierigen Trennprobleme der häufig nicht hundertprozentig stereoselektiv verlaufenden klassisch-chemischen Sialylierungsmethoden ein. Die Disaccharidbausteine **32** - **35** können statt dessen in einer Blocksynthese im letzten Schritt durch klassische Glycosylierungsmethoden in eine Akzeptorstruktur eingebaut werden (s. Kap. 3.6).

Ausgehend vom Thiogalactosid **7a** konnten unter den bekannten Bedingungen in bis zu 16% Ausbeute die $\alpha(2-6)$ -Verbindung **32** und in 14% das $\alpha(2-3)$ -Derivat **33** synthetisiert werden. Eine gewisse Einschränkung der Methode liegt in der begrenzten Stabilität der verwendeten Thioglycoside. Unter den verwendeten Inkubationsbedingungen konnte der Zerfall von Akzeptor oder Produkt zu den freien Zuckern weitgehend in Grenzen gehalten werden. Für die Inkubation mit Newcastle Disease Virus Sialidase erschien es jedoch notwendig die Inkubationstemperatur von normalerweise 37°C auf 30°C zu senken, was die Ausbeute im Vergleich mit anderen Akzeptoren aber nicht deutlich verschlechtert hat. Nur im Fall der für *Clostridium perfringens* Sialidase notorisch längeren Inkubationszeiten wurden bei der Reaktionsverfolgung in der HPLC und nach der anschließenden Aufreinigung im NMR etwa 10% des freien Zuckers detektiert. Da die Ausbeuten hier ohnehin bedeutend niedriger sind als im Fall der *Vibrio cholerae* Sialidase, ist dies aber von untergeordneter Bedeutung.

Bedeutsamer hingegen ist die nur eingeschränkte Lagerfähigkeit aller sialylierten Thioglycoside. Bereits nach zwei Wochen Lagerung bei -15°C waren Zerfallsprodukte erkennbar, nach 6 Wochen hatten sich bereits bis zu 20% der Produkte zersetzt. Dieser Befund überrascht, da die Produkte immerhin Inkubationen von bis zu 20h bei bis zu 30°C im leicht sauren Puffermedium weitgehend schadlos überstanden hatten. Inwieweit evtl. noch vorhandene Wasserspuren zusammen mit der Carboxyfunktion der Neuraminsäure hierfür verantwortlich sind oder ob die Verbindungen selber instabil sind, war nicht eindeutig zu klären. Eine Schwierigkeit bei der Aufreinigung der sialylierten Produkte besteht darin, noch vorhandene Wasserspuren vollständig zu entfernen. Ungeschützte sialylierte Verbindungen tendieren dazu, eine sirupartige Konsistenz anzunehmen und sind zudem teilweise hygroskopisch. Für eine längere Lagerung der so synthetisierten Strukturen empfiehlt es sich

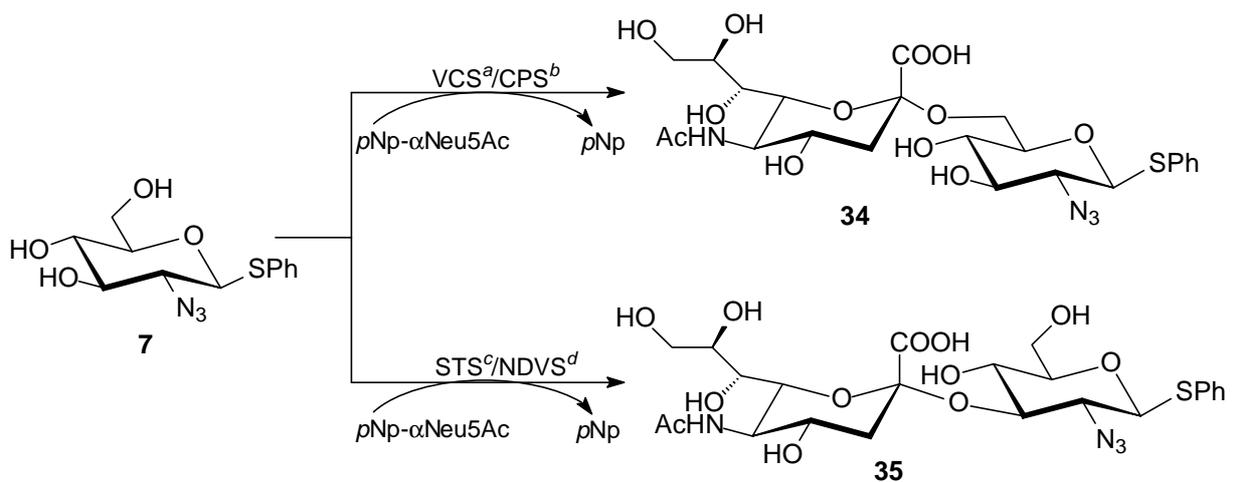
daher, diese in die geschützte Form (acetylierte, benzylierte oder benzoylierte Form) zu überführen.



Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			$\alpha(2-6)$	$\alpha(2-3)$
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	32	16	>99	<1
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	32	12	>99	<1
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	33	14	<1	>99
Newcastle Disease Virus ^d	33	14	<1	>99

Abb. 17

Auch im Fall des Akzeptors **7** konnte eine im Rahmen der Methode zufriedenstellende Ausbeute erzielt werden. Das $\alpha(2-6)$ -sialylierte Glucosaminderivat **34** konnte ebenso in bis zu 12% Ausbeute erhalten werden wie die $\alpha(2-3)$ -sialylierte Variante **35**. Auch hier wurde eine nur begrenzte Stabilität der Produkte beobachtet.

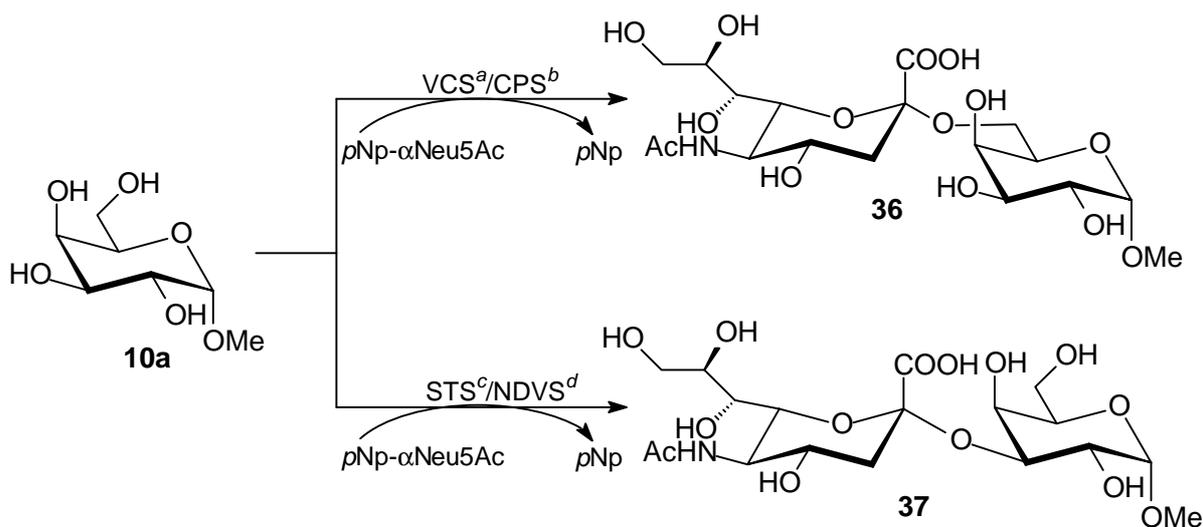


Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			$\alpha(2-6)$	$\alpha(2-3)$
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	34	12	>99	<1
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	34	10	>99	<1
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	35	12	<1	>99
Newcastle Disease Virus ^d	35	9	<1	>99

Abb. 18

Verbindungen **36** und **37** wurden bereits teilweise in früheren Arbeiten durch Sialidase katalysierte Transglycosylierung synthetisiert.^{46,47} Die für **36-39** beschriebenen Ergebnisse und Ausbeuten sind teilweise in Bezug auf Regioselektivität und Ausbeute aktualisiert, bzw. um Resultate für die Transsialylierung mit *Salmonella typhimurium* und Newcastle Disease Virus Sialidase ergänzt. Hierbei zeigt sich, wie sehr im besonderen auch die Regioselektivität der Reaktion von den Inkubationsparametern beeinflusst wird. So wurden im Fall der *Vibrio cholerae* Sialidase bei einer Inkubationstemperatur von 25°C noch bis zu 15% des $\alpha(2-3)$ -sialylierten Galactosids gebildet, bei 30°C hingegen wurde ausschließlich das $\alpha(2-6)$ -Produkt isoliert.

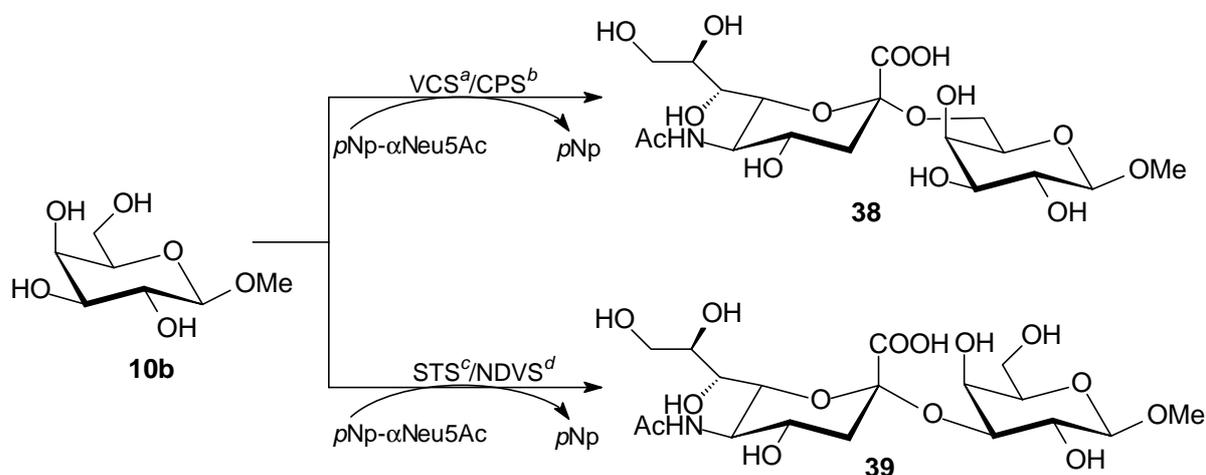
Ebenso ergab die Analyse der Transferaktivität der einzelnen Sialidasen, daß mit *Clostridium perfringens* Sialidase deutlich niedrigere Ausbeuten im Vergleich mit den drei anderen Sialidasen erzielt werden, deren Ausbeuten zwischen 16-18% liegen. Auffällig ist wieder die geringfügige Bildung des $\alpha(2-6)$ -Regioisomers im Fall der *Salmonella typhimurium* Sialidase.



Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			$\alpha(2-6)$	$\alpha(2-3)$
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	36	18	>99	<1
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	36	10	>99	<1
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	37	16	5	95
Newcastle Disease Virus ^d	37	17	<1	>99

Abb. 19

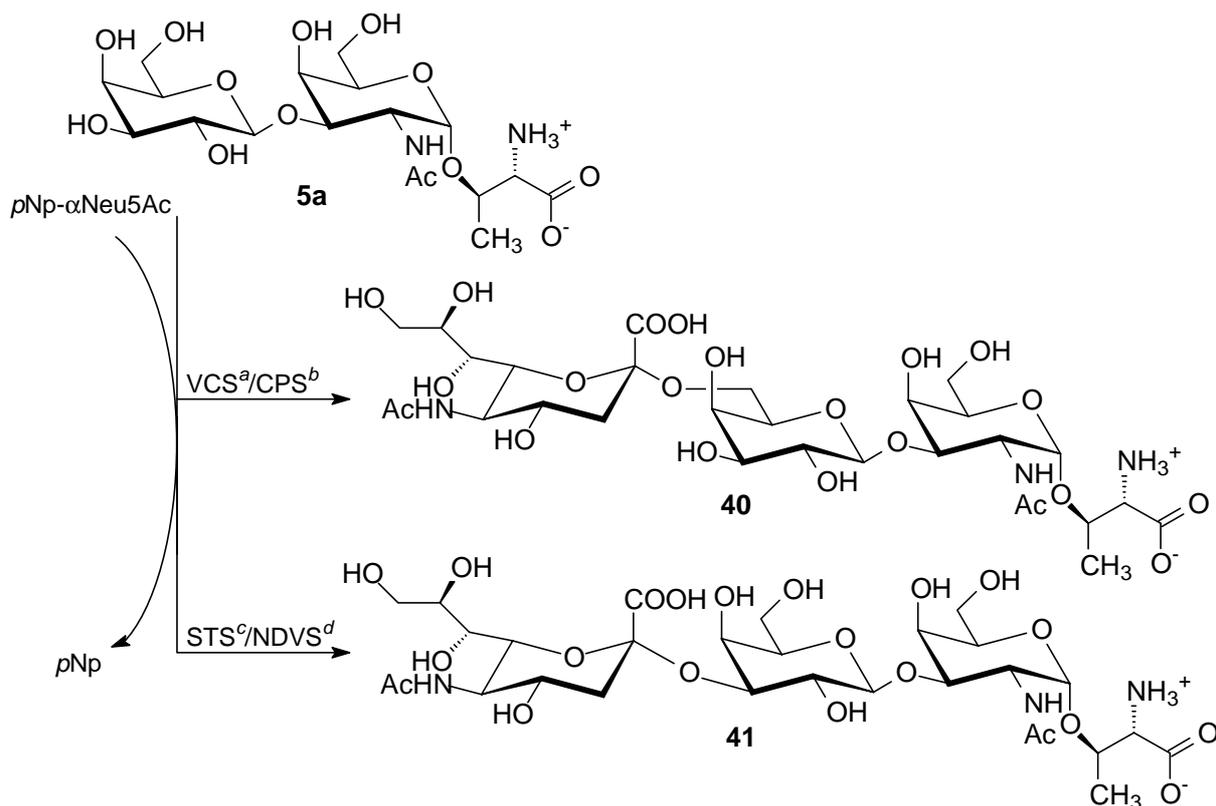
Die für das α -Galactosid (**10a**) gegebenen Interpretationen können weitgehend auf das Methyl- β -galactosid **10b** übertragen werden. Ausbeuten von bis zu 16% für das $\alpha(2-6)$ -verknüpfte Disaccharid (**38**), bzw. 18% für das $\alpha(2-3)$ -verknüpfte Analogon (**39**) sind zufriedenstellende Resultate bei gleichzeitig hoher Regioselektivität.



Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			$\alpha(2-6)$	$\alpha(2-3)$
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	38	16	>99	<1
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	38	10	>99	<1
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	39	15	<1	>99
Newcastle Disease Virus ^d	39	18	<1	>99

Abb. 20

Bei der Darstellung der sialylierten T-Antigenstrukturen **40** und **41** wurden mit Ausnahme der *Clostridium perfringens* Sialidase-katalysierten Reaktion vergleichbare Ausbeuten von 10-12% erzielt. Dies liegt zwar deutlich unter den Werten, die für die Sialylierung des T_N-Antigen-Epitops erreicht werden konnten, aber angesichts der unter klassisch-chemischen Bedingungen teilweise notwendigen aufwendigen Schutzgruppenstrategien und begrenzten Stereoselektivität, speziell im Fall der Sialylierung, erscheint die Sialidase-katalysierte Transglycosylierung hier als interessante Alternative.



Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			α(2-6)	α(2-3)
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	40	12	>99	<1
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	40	4*	>99	<1
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	41	11	7	93
Newcastle Disease Virus ^d	41	10	<1	>99

*wurde per HPLC bestimmt und nicht isoliert

Abb. 21

Allerdings sind auch im Fall der Sialidase-katalysierten Transglycosylierung einige Fallstricke zu beachten. Bei Einsatz der *Salmonella typhimurium* Sialidase wird eine nicht unerhebliche Bildung der regioisomeren Verbindung **40** beobachtet. Die Bildung dieses präparativ zwar wertvollen Nebenprodukts erschwert die anschließende Aufarbeitung beträchtlich. Zwar kann die Bildung von **40** durch gezielte Variation der Inkubationsbedingungen, z. B. durch Erhöhung der Inkubationstemperatur, Variation des verwendeten Puffers (und damit des pH-Werts) oder Variation der Donor-Akzeptor-Relation unterbunden werden, aber bei Optimierungsversuchen konnte so in keinem Fall auch nur annähernd die unter Standardbedingungen erhaltene Ausbeute erzielt werden. In der Regel lagen die Ausbeuten hier bei 4-8%.

Soll daher eine sialylierte Verbindung regioisomerenrein in größeren Mengen erhalten werden, so sind verschiedene Parameter in Betracht zu ziehen.

- Ist die Sialidase kommerziell erhältlich?
- Zeigt die Sialidase unter Inkubationsbedingungen eine ausgeprägte Regioselektivität?
- Kann der bei der Inkubation nicht umgesetzte Akzeptor einfach zurückgewonnen werden?

Falls nur einige der Parameter erfüllt sind, ist eine Abwägung vorzunehmen, was bei einer präparativen oder semipräparativen Synthese insgesamt den geringstmöglichen Aufwand bedeutet.

- Sollen niedrigere Ausbeuten in Kauf genommen werden, wenn die Umsetzung dafür regiospezifisch verläuft?
- Oder soll versucht werden, die Gesamtausbeute zu maximieren und die Produkte durch geeignete Methoden nach der Inkubation voneinander zu trennen?

Um dies abzuwägen, müssen die möglichen Verfahren zur Trennung von Regioisomeren gemischen verglichen werden.

Zunächst gibt es die Möglichkeit, die regioisomeren Produkte chromatographisch zu trennen. Über die klassische Aufreinigungsmethode, Biogel P2, ist dies nicht möglich, da es sich hierbei nur um eine Trennung nach dem Prinzip der Size-Exclusion handelt. Über HPLC-Methoden ist eine Trennung unter Verwendung von Aminosäulen im analytischen bis semipräparativen Maßstab durchaus möglich, aber bei größeren Mengen aufgrund des doch sehr ähnlichen chromatographischen Verhaltens schwierig. Eine Basislinientrennung ist hier nur in Einzelfällen zu erzielen. Generell gilt: Je größer das Oligosaccharid, umso schwieriger die Trennung von Isomeren. Eine weitere Möglichkeit liegt in der regioselektiven Derivatisierung eines der Regioisomeren. Die hier wohl am besten geeignete Methode ist die selektive Lactonbildung von $\alpha(2-3)$ -sialylierten Verbindungen. Hierbei handelt es sich eigentlich um eine Nebenreaktion, die häufig bei ungeschützten $\alpha(2-3)$ -sialylierten Sacchariden unter sauren oder basischen Bedingungen stattfindet.^{81,82}

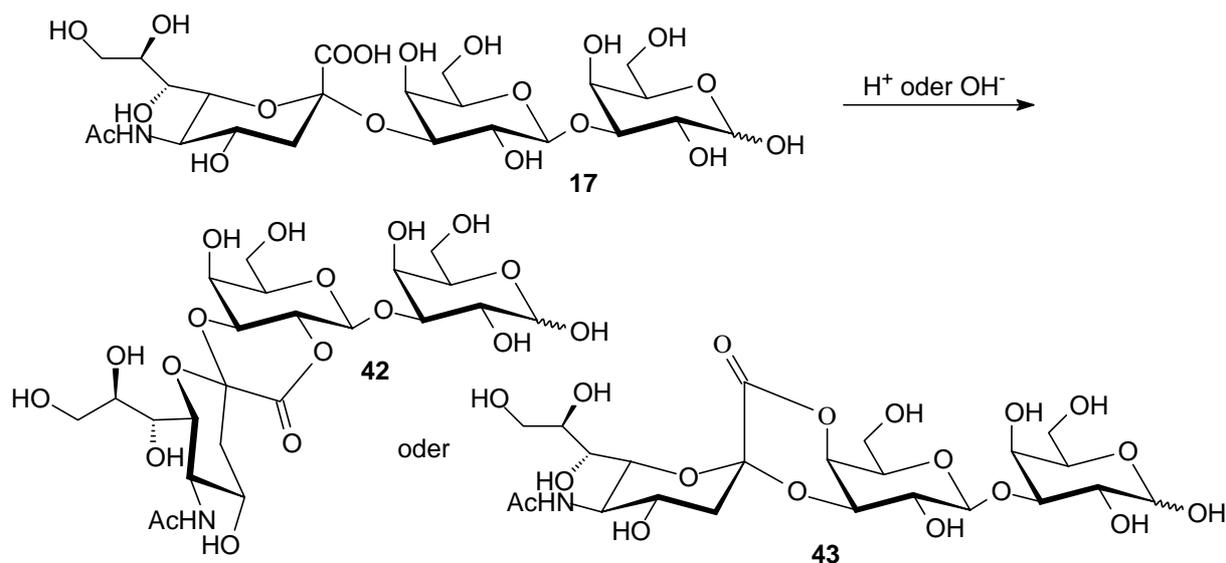


Abb. 22

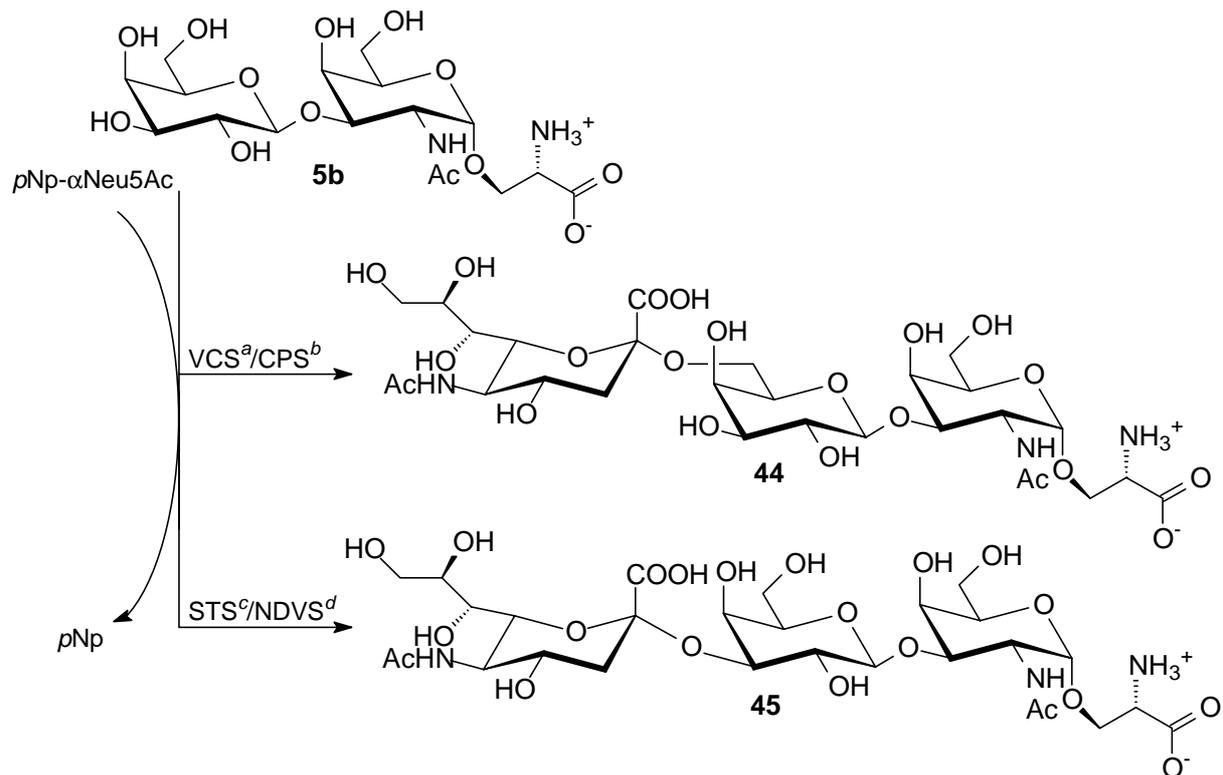
Es besteht daher die Möglichkeit, aus Regioisomerenmischungen das $\alpha(2-3)$ -Derivat in ein neutrales Zwischenprodukt umzuwandeln, das auf einem Anionenaustauscherharz im Gegensatz zur nicht-lactonisierten Verbindung nicht gebunden wird. Allerdings eignet sich diese Methode erst bei relativ großen Mengen regioisomerer Sialyloligosaccharide.

Eine Methode, die sich auch in kleinem Maßstab gut durchführen läßt, wurde unter anderem von Hedbys bei der β -Galactosidase-katalysierten Synthese von Galactooligosacchariden beschrieben.⁸³ Um ausgehend von einem Regioisomerenmisch ein der Regiosomere rein zu erhalten, wird die Mischung mit einer Glycosidase mit ausgeprägter Regioselektivität für die Bindungsart des unerwünschten Regioisomers in verdünnter Lösung inkubiert und so das unerwünschte Regioisomer selektiv hydrolysiert.

Im vorliegenden Fall wird nach der Denaturierung der *Salmonella typhimurium* Sialidase die Reaktionsmischung mit Pufferlösung verdünnt und anschließend kurz mit *Arthrobacter ureafaciens* Sialidase inkubiert. Das unerwünschte $\alpha(2-6)$ -Isomer wurde so selektiv innerhalb einer Minute hydrolysiert. Da die kinetische Auflösung der jeweiligen Regiosomere nicht sehr ausgeprägt ist, muß darauf geachtet werden, die Inkubation sofort nach Abschluß der Hydrolyse des $\alpha(2-6)$ -Regioisomers zu beenden. Im Gegensatz zur üblichen Vorgehensweise wird die Inkubationsmischung mit dem doppelten Volumen Ethanol versetzt und erst dann thermisch inaktiviert.

Die jeweiligen Serinderivate des T-Antigens (44, 45) konnten nur in erheblich geringerem Maße sialyliert werden. So werden sowohl das $\alpha(2-6)$ - (44) als auch $\alpha(2-3)$ -Derivat (45) in jeweils 10% synthetisiert, wobei im Fall der *Salmonella typhimurium* Sialidase das

regioisomere Nebenprodukt berücksichtigt wurde. Eine Ursache für dieses ungewöhnliche Verhalten konnte nicht ermittelt werden. Der nur geringe strukturelle Unterschied, der sich dazu noch relativ weit vom aktiven Zentrum des Enzyms befindet, scheint keine Erklärung zu bieten. Zu vermuten bleibt nur eine Verunreinigung des T-Antigen-Serin-Derivats (**5b**), für die allerdings nach umfangreicher Analytik keine Bestätigung gefunden werden konnte.



Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			$\alpha(2-6)$	$\alpha(2-3)$
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	44	10	>99	<1
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	44	-	>99	<1
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	45	11	10	90
Newcastle Disease Virus ^d	45	8	<1	>99

Abb. 23

Der Trend des andersartigen Verhaltens der *Clostridium perfringens* Sialidase und weitgehenden Konformität der übrigen drei Sialidasen setzt sich auch bei der Sialylierung des Disaccharids **12** fort. Ausbeuten von 10-14% bei allerdings verminderter Regioselektivität sind im Rahmen der bisher beobachteten Ergebnisse. Auffällig ist hier die zum ersten Mal beobachtete verminderte Regioselektivität der Transsialylierung mit *Vibrio cholerae* Sialidase. So wurde in geringfügigem Umfang (5%) auch das $\alpha(2-3)$ -Regioisomer gebildet. Ebenfalls ungewöhnlich ist, daß *Clostridium perfringens* Sialidase **12** nicht als Substrat

akzeptierte und dementsprechend keine Umsetzung erfolgte. Dies erstaunt auch insoweit, als daß das nicht-galactosylierte 2-Desoxygalactosid (**11a**) ein relativ guter Akzeptor für dieses Enzym war. So kann nur spekuliert werden, daß der relativ hydrophobe Teil des 2-Desoxygalactosids einen negativen Einfluß auf das Assoziationsverhalten in der Bindungstasche des Enzyms hat.

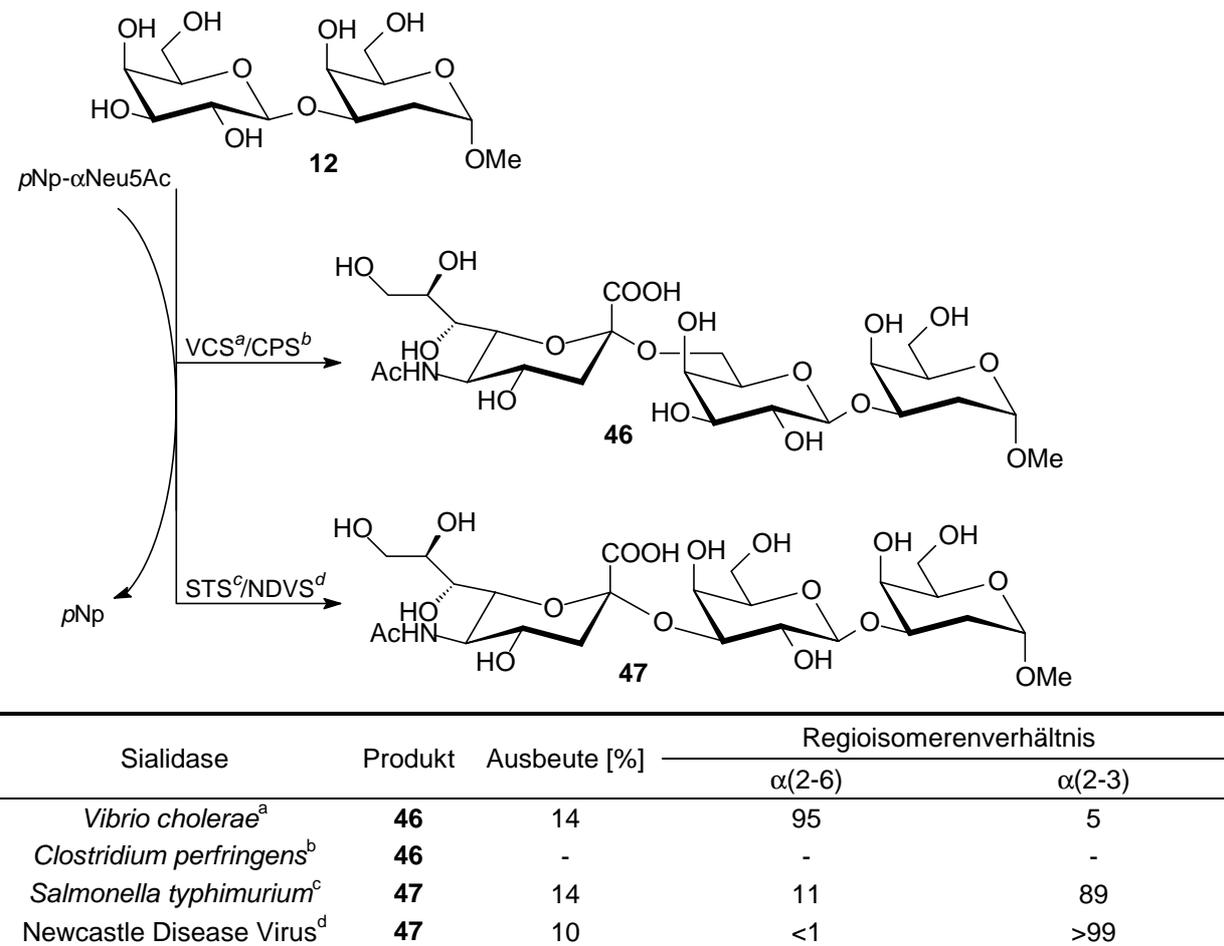
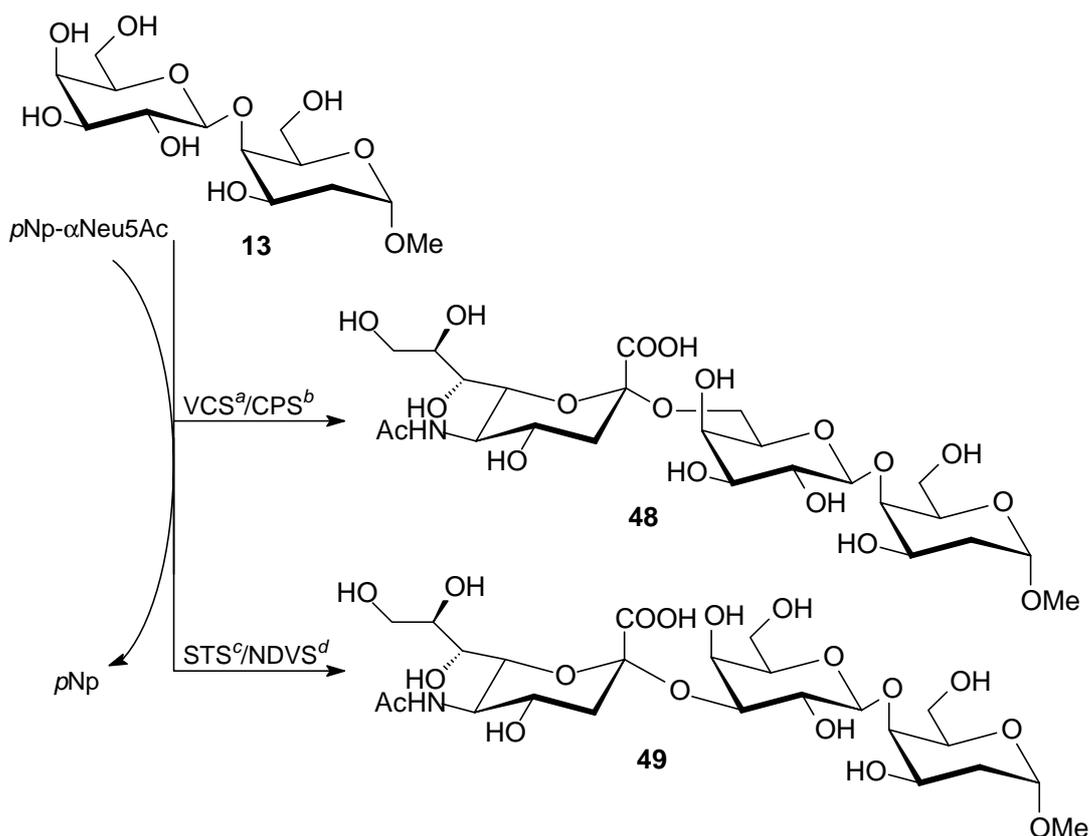


Abb. 24

Das $\beta(1-4)$ -galactosylierte Galactosid **13** war gleichermaßen ein schlechtes Akzeptorsubstrat für die *Clostridium perfringens* Sialidase und konnte daher nur in geringem Maße umgesetzt (5%) umgesetzt werden. Für die übrigen Sialidasen wurden befriedigende Ausbeuten von 15% (bzw. 13% nach Abzug des regioisomeren Nebenprodukts) im Fall der *Vibrio cholerae* Sialidase und 8-10% bei der $\alpha(2-3)$ -Sialylierung durch *Salmonella typhimurium* und Newcastle Disease Virus Sialidase erhalten. Als Trend scheint sich abzuzeichnen, daß die 2-Desoxyfunktion des Akzeptors einen durchaus beträchtlichen Einfluß auf die Regioselektivität der Transferreaktion besitzt. Mit Ausnahme der Newcastle Disease Virus Sialidase konnte in keinem Fall das regioisomerenreine Produkt erhalten werden. Erst durch eine enzymatische Nachbehandlung war dies möglich.

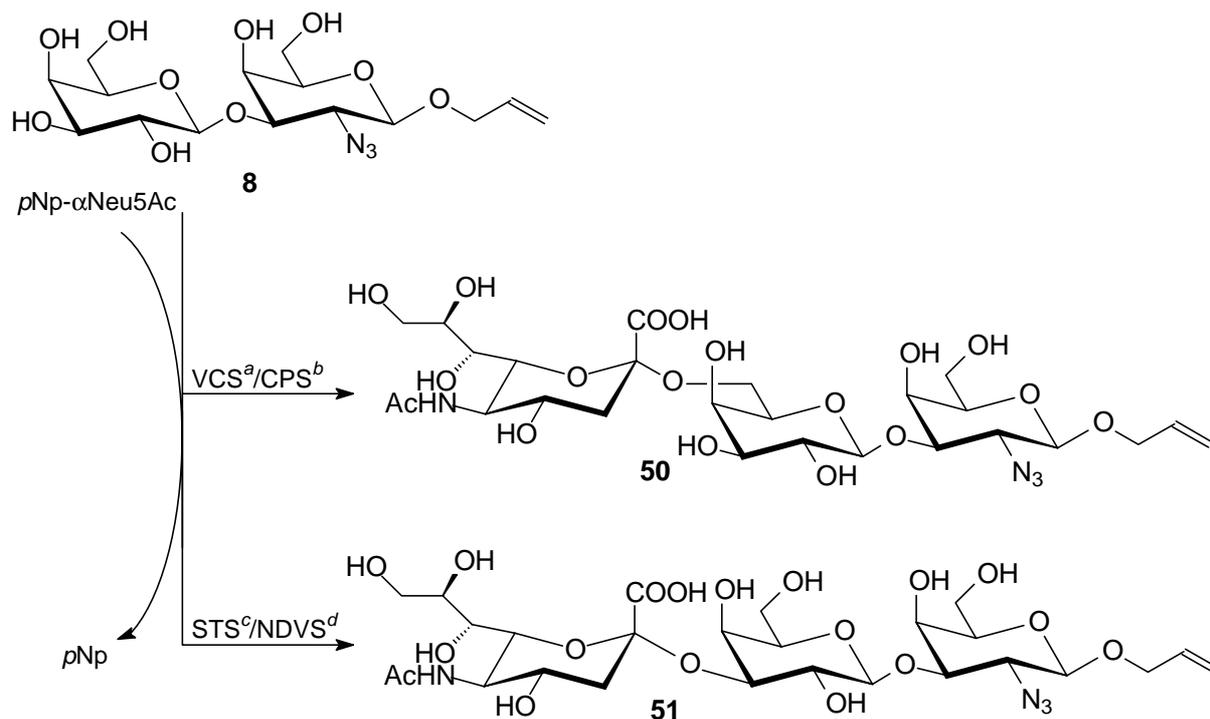


Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			$\alpha(2-6)$	$\alpha(2-3)$
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	48	15	90	10
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	48	5*	>99	<1
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	49	10	14	86
Newcastle Disease Virus ^d	49	8	<1	>99

*wurde per HPLC bestimmt und nicht isoliert

Abb. 25

Geringfügig bessere Ausbeuten konnten bei der Transsialylierung des T-Antigen-Precursors **8** erzielt werden. Ausbeuten von bis zu 12% für das $\alpha(2-6)$ -sialylierte Derivat und 11% für die $\alpha(2-3)$ -sialylierte Verbindung bei leicht verminderter Regioselektivität im Fall der *Salmonella typhimurium* Sialidase und deutlich verminderter Transferaktivität der *Clostridium perfringens* Sialidase liegen im Rahmen der bisherigen Beobachtungen.



Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			$\alpha(2-6)$	$\alpha(2-3)$
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	50	12	>99	<1
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	50	7	>99	<1
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	51	11	12	88
Newcastle Disease Virus ^d	51	11	<1	>99

Abb. 26

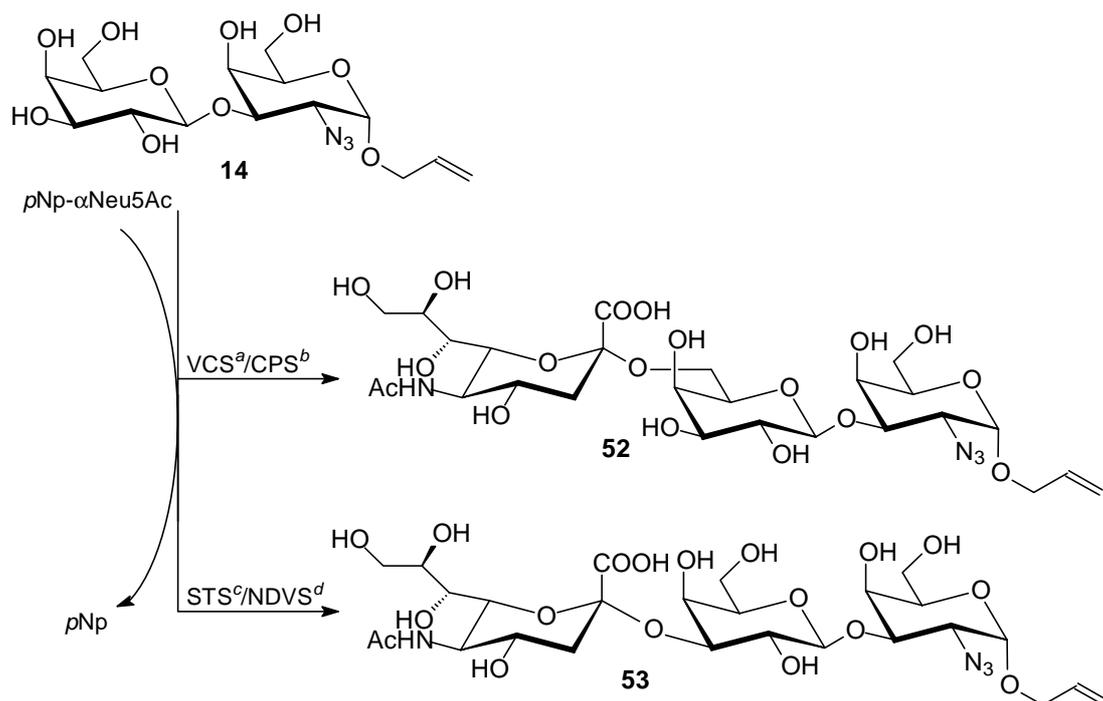
Bei der Betrachtung der bisherigen Ergebnisse der Sialylierung erkennt man neben der diskutierten verminderten Transferrate der *Clostridium perfringens* Sialidase auch eine eingeschränkte regioselektive Präferenz bei Anwendung der Sialidase aus *Salmonella typhimurium*. Als mögliche Ursache für diesen Effekt kommt eine im Vergleich zu einem Monosaccharidakzeptor weniger flexible Anbindung des Akzeptors in die Bindungstasche des Enzyms in Frage. Da der Disaccharidakzeptor deutlich mehr Andockstellen für ein Multi-Point-Attachment besitzt, wird es in der Bindungstasche relativ starr gebunden, so daß sich die bei der Hydrolyse einstellende kinetische Präferenz deutlicher ausbilden kann. Im Falle der *Clostridium perfringens* Sialidase und $\alpha(2-3)$ - und $\alpha(2-6)$ -Sialyllactose als Substrat stellt sich eine hydrolytische Präferenz von 1 : 0.44 zugunsten des $\alpha(2-6)$ -Derivats ein (s. Kap. 3.1, Tab. 1).

Gegen diese Annahme spricht allerdings das Verhalten der Sialidasen aus *Vibrio cholerae* und *Salmonella typhimurium* im Fall einiger Monosaccharide, bei denen unter

Transglycosylierungsbedingungen ebenfalls Regioisomergemische gebildet wurden (s. oben).

Hier könnte evtl. das Gegenteil der Fall sein: Dadurch, daß es sich bei diesen Akzeptoren um eher schlecht in die Bindungstasche der Sialidasen passende Substrate handelt, wird eine nur sehr begrenzte Fixierung in der Bindungstasche erreicht. Die somit recht beweglichen Akzeptoren können daher im Moment der Glycosylierung unterschiedliche Konformationen im aktiven Zentrum einnehmen.

Bei der Sialylierung von **14** werden ähnlich gute Ausbeuten wie für die Sialylierung des anomeren T-Antigen-Precursor **8** erzielt. In diesem Fall wurden sogar alle Produkte regioisomerenrein synthetisiert. Da der einzige Unterschied zwischen **8** und **14** in der Stereochemie der anomeren Allylfunktion liegt, ist zu vermuten, daß dieser strukturelle Unterschied, obwohl relativ weit vom aktiven Zentrum entfernt, einen Einfluß auf die Regioselektivität der Transglycosylierungsreaktion von *Salmonella typhimurium* Sialidase besitzt.



Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			α(2-6)	α(2-3)
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	52	10	>99	<1
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	52	4*	>99	<1
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	53	11	<1	>99
Newcastle Disease Virus ^d	53	10	<1	>99

*wurde per HPLC bestimmt und nicht isoliert

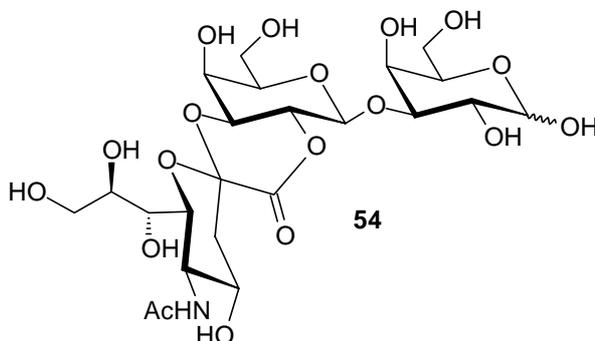
Abb. 27

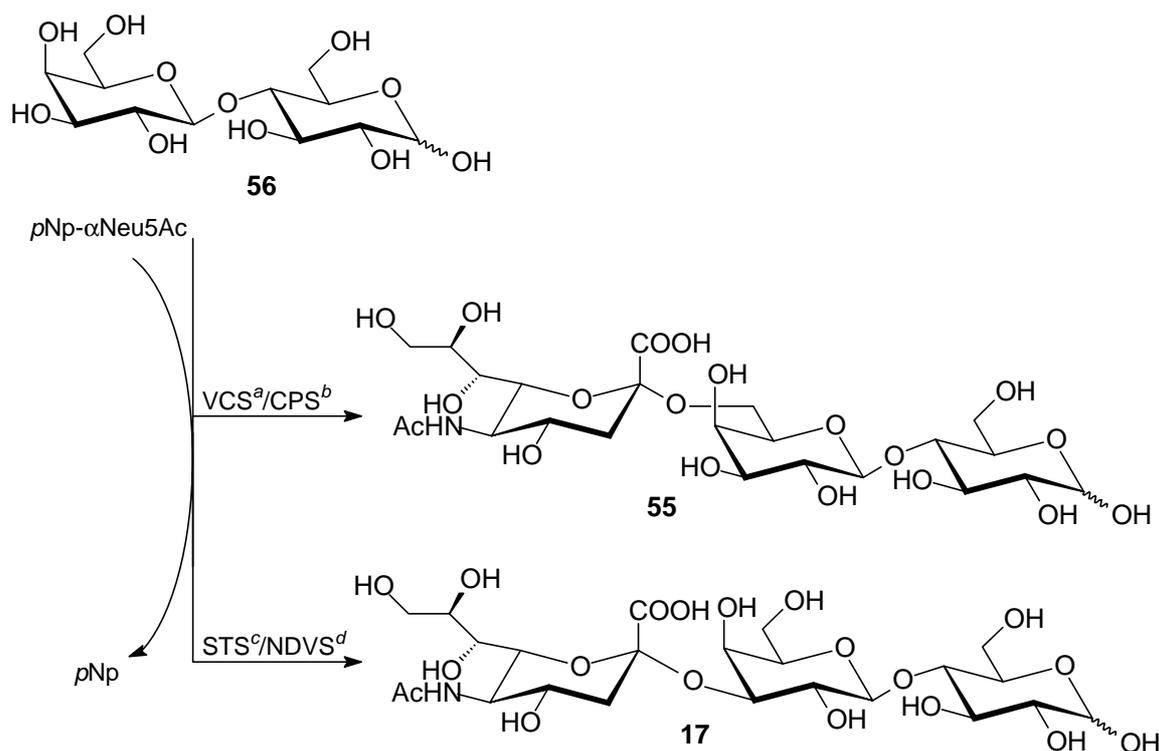
Hierbei zeigt sich erneut, daß es außerordentlich schwierig ist, die Transferrate und Regioselektivität einer Transglycosylierung anhand eines Strukturvergleichs abzuschätzen. Selbst minimale Unterschiede in der Struktur von Akzeptoren können zu substantiellen Unterschieden im Ergebnis der Transglycosylierung führen.

Das am häufigsten vorkommende sialylierte Trisaccharid ist die Sialyllactose [Neu5Ac α (2-3/6)Gal β (1-4)Glc, **17**, **55**], die mengenmäßig der wichtigste sialylierte Bestandteil der Humanmilch ist. Aufgrund der immunisierenden Eigenschaften dieses Trisaccharids wird es in Japan kommerziell erhältlichen Milchpulvern zur Säuglingsernährung zugesetzt. Die Sialidase-katalysierte Darstellung wurde bereits mehrfach beschrieben.^{28,79} Die nachfolgend präsentierten Ergebnisse sollen daher der Vollständigkeit halber erwähnt werden, um zu zeigen welche Ausbeuten unter den vorgestellten Inkubationsbedingungen erzielt werden.

Durch *Vibrio cholerae* Sialidase-Katalyse konnte eine Transsialylierungsrate von 12% bzw. mit *Clostridium perfringens* Sialidase von 9% bei gleichzeitig absoluter Regioselektivität erzielt werden (Abb. 28). Auch mit den Sialidasen aus *Salmonella typhimurium* und Newcastle Disease Virus konnten selektiv das α (2-3)-Regioisomer (**17**) in 14 bzw. 11% synthetisiert werden.

Nach der Aufarbeitung wurde in geringer Menge der Inkubationsansätze mit *Salmonella typhimurium* und Newcastle Disease Virus wurde in geringer Menge das Lacton **54** gebildet welches allerdings durch relativ einfach wieder hydrolysiert werden konnte.

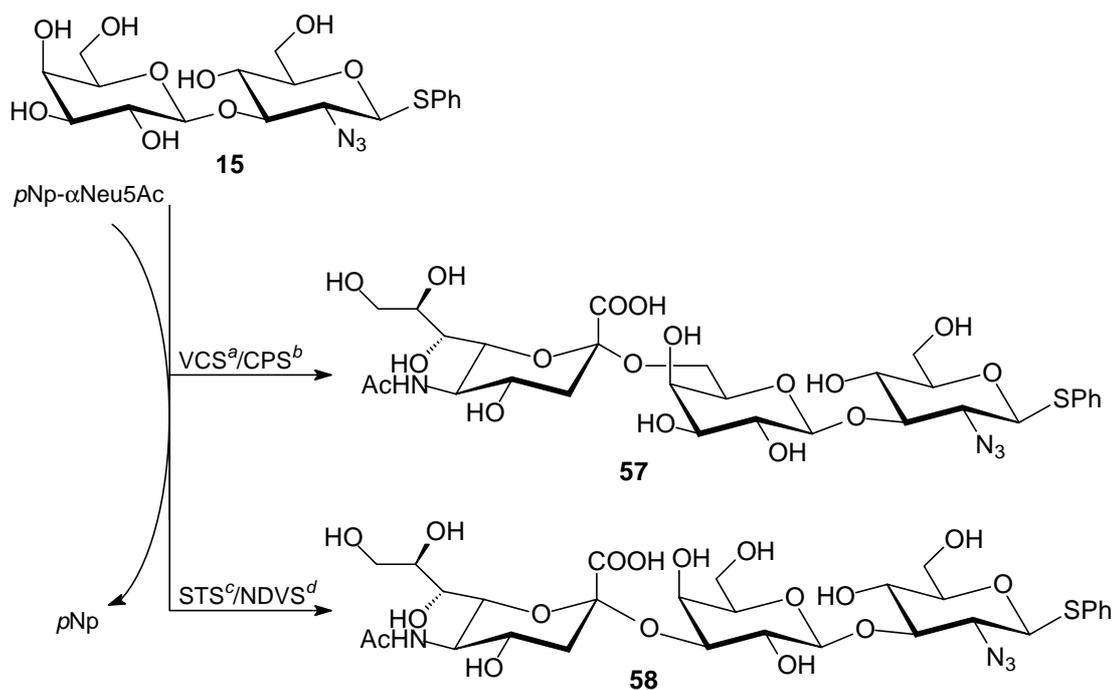




Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			α(2-6)	α(2-3)
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	55	12	>99	<1
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	55	9	>99	<1
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	17	14	<1	>99
Newcastle Disease Virus ^d	17	11	<1	>99

Abb. 28

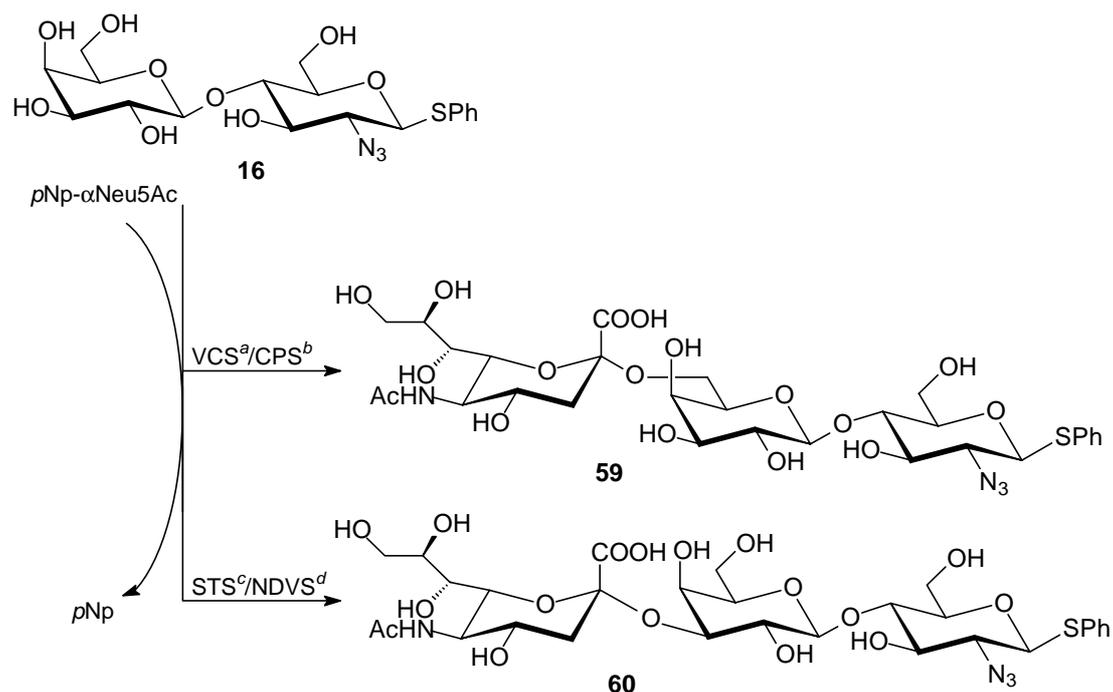
Bei der Transsialylierung der Lactosamin-Precursorstruktur **16** zeigte diese im Vergleich zu der Isolactosamin-Variante **15** geringfügig bessere Ausbeuten bei gleichzeitig absoluter Regioselektivität. Da der einzige Unterschied zu **8** im Allylaglycon besteht, wird wiederum deutlich, daß bereits geringfügige und weit vom aktiven Zentrum entfernte Unterschiede in der Struktur zu einer Änderung des Glycosylierungsverhaltens führen können. Da es sich sowohl beim Allylrest als auch beim Thiophenylglycon um relativ hydrophobe Reste handelt, könnte man annehmen, daß die Unterschiede in erster Linie in den sterischen Eigenschaften liegen.



Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			$\alpha(2-6)$	$\alpha(2-3)$
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	57	11	>99	<1
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	57	5*	>99	<1
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	58	10	<1	>99
Newcastle Disease Virus ^d	58	12	<1	>99

*wurde per HPLC bestimmt und nicht isoliert

Abb. 29



Sialidase	Produkt	Ausbeute [%]	Regioisomerenverhältnis	
			α(2-6)	α(2-3)
<i>Vibrio cholerae</i> ^a	59	13	>99	<1
<i>Clostridium perfringens</i> ^b	59	8	>99	<1
<i>Salmonella typhimurium</i> ^c	60	12	<1	>99
Newcastle Disease Virus ^d	60	12	<1	>99

Abb. 30

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Sialidase-katalysierte Darstellung sialylierter Oligosaccharidstrukturen eine sinnvolle Alternative zu etablierten Synthesemethoden mittels Sialyltransferasen oder klassisch-chemischen Methoden darstellt. Die insgesamt eher niedrigen Ausbeuten sind mit dem relativ geringen experimentellem Aufwand, der absoluten Stereoselektivität, einer guten bis sehr guten Regioselektivität und einer breiten Akzeptorspezifität zu vergleichen.

Bei der Transsialylierung von Disaccharidakzeptoren wird speziell im Fall der *Clostridium perfringens* Sialidase eine deutliche Verminderung der Transferaktivität beobachtet. Ebenso ist bei der Darstellung terminal sialylierter Trisaccharide katalysiert durch *Salmonella typhimurium* Sialidase eine verminderte Regioselektivität zu beobachten, die zwischen 5-15% der regioisomeren α(2-6)-Verbindung liefert.

Diese beiden Effekte sind insofern bedauerlich, als es sich bei den Sialidasen aus *Salmonella typhimurium* und *Clostridium perfringens* um die kommerziell am günstigsten verfügbaren

Sialidasen handelt. Bei einer synthetischen Anwendung der Sialidasen ist daher immer der Kostenaspekt in Betracht zu ziehen. Es konnte gezeigt werden, daß durch eine posttransglycolytische enzymatische Hydrolyse unerwünschte Regioisomere gezielt hydrolysiert werden können. Bei einer Reaktion in größerem Maßstab bietet sich auch eine gezielte Derivatisierung eines Regioisomeren aus einem Gemisch an, was die nicht-destruktive Abtrennung des häufig ebenfalls interessanten regioisomeren Nebenprodukts erlaubt.

3.5 Trans-Sialidase-katalysierte Synthese sialylierter Glycokonjugate

Trypanosoma cruzi ist der Überträger von Chaga's Disease (American Trypanosomiasis), einer Krankheit, die hauptsächlich in Südamerika, in leicht abgewandelter Form auch in Afrika vorkommt. Im iberamerikanischen Raum sind zur Zeit schätzungsweise 16-18 Millionen Menschen infiziert. Der Parasit *Trypanosoma cruzi* ist nicht in der Lage *N*-Acetylneuraminsäure⁸⁴ selbst zu synthetisieren. Stattdessen überträgt er durch Einsatz einer Trans-Sialidase, die es auf seiner Oberfläche exprimiert, die *N*-Acetylneuraminsäure exogener Zelloberflächen-Sialoglycokonjugate auf eigene Mucin-artige Akzeptoren auf der Parasitenoberfläche.

Diese Übertragung erfolgt nur von terminal $\alpha(2-3)\text{Neu5AcGal}\beta$ -substituierten Glycokonjugaten des Wirtes auf entsprechende terminal β -galactosylierte Strukturen auf der Parasitenoberfläche.

Es wurde postuliert, daß die Sialylierung der Parasitenoberfläche katalysiert durch *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase für das erfolgreiche Andocken des Parasiten an die Zellmembran und das Eindringen in die Wirtszelle notwendig ist. Allerdings ist dieser Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine weitere Funktion der Selbstsialylierung könnte der Schutz gegen Lysis durch den sogenannten Complement Pathway sein.⁸⁵

Diese Fähigkeit des regiospezifischen *N*-Acetylneuraminsäure-Transfers kann synthetisch zur Darstellung von zahlreichen biologisch relevanten $\text{Neu5Ac}\alpha(2-3)\text{Gal}\beta$ -R-Motiven genutzt werden, die bisher sowohl klassisch-chemisch als auch enzymatisch nur äußerst schwierig zugänglich waren. Parodi *et al.*⁸⁶ haben sogar herausgefunden, daß auch Maltose- $[\text{Glc}\alpha(1-4)\text{Glc}]$ oder Cellobiose-Strukturen $[\text{Glc}\beta(1-4)\text{Glc}]$ durch das Enzym sialyliert werden, allerdings in wesentlich geringerem Umfang als Lactose $[\text{Gal}\beta(1-4)\text{Glc}]$. Die Spezifität des Enzyms ist daher, ähnlich den entsprechenden Transferasen, nicht so limitiert.

In der Praxis hat dies zur Folge, daß, *N*-Acetylneuraminsäure, allerdings in einer geringeren Transferrate, auch auf andere Kohlenhydratmotive übertragen werden kann, wenn eine terminale β -Gal-Einheit nicht verfügbar ist.

Die Art der Verknüpfung des β -Galactosylrestes scheint hingegen eine geringere Rolle zu spielen. Allerdings lässt sich bei der Sialylierung eine leichte Bevorzugung von $\beta(1-4)$ - und $\beta(1-6)$ -Verknüpfungen gegenüber $\beta(1-3)$ beobachten. Ein L-Fucose-Rest (L-Fuc) am oder in der Nähe des terminalen β -Gal hingegen beeinträchtigt die Trans-Sialidase-Aktivität beträchtlich.⁸⁷ Mit wachsendem Abstand der L-Fuc-Einheit vom terminalen β -Gal nimmt dieser Effekt ab.

Existieren in einem Akzeptormolekül zwei oder mehr potentielle Sialylierungsstellen, so wird nach Einbau der ersten Neu5Ac-Einheit der Eintritt einer weiteren Einheit unterbunden.⁸⁸

In Abwesenheit eines geeigneten Kohlenhydrat-Akzeptors überträgt *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase Neu5Ac irreversibel auf Wasser. In diesem Falle fungiert die Trans-Sialidase als reine Glycohydrolase vergleichbar mit den bekannten viralen und bakteriellen Sialidasen.⁸⁹

Eine Sequenzierung der Gene der *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase zeigt, daß das Enzym doch zur Sialidase-Superfamilie gehört,⁹⁰ deren wesentliches gemeinsames Merkmal die Hydrolasen-Eigenschaft ist, obwohl es sich von anderen Sialidasen durch seine Akzeptorspezifität unterscheidet.

Insgesamt zeigt Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* den Sialyltransferasen vergleichbare Eigenschaften des selektiven *N*-Acetylneuraminsäure-Transfers, ohne daß komplexe Zuckernucleotid-Donoren eingesetzt werden müssen, bei einer hohen Variabilität des Aglycons an der terminalen β -Galactosyleinheit.⁹¹

Nachdem die Trans-Sialidase durch Pereira *et al.* und Nussenzweig *et al.*^{92,93} in synthetisch nutzbarem Maßstab zugänglich gemacht worden war, wurde eine Reihe von synthetischen Untersuchungen mit diesem Enzym unternommen.

Vandekerckhove *et al.* und Scudder *et al.* untersuchten die Akzeptor-Substratspezifität der *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase mit verschiedenen underivatisierten Di- bis Pentasacchariden^{87,89} und stellten unter standardisierten Bedingungen eine breite Streuung der Spezifität fest. Die höchste Transferrate wurde mit dem Paraglobosid-Precursor Gal $\beta(1-4)$ GlcNAc $\beta(1-3)$ Gal $\beta(1-4)$ Glc erzielt. Fucose- und Gluconsäure-substituierte Oligosaccharide wurden hingegen nicht sialyliert.

Paulson *et al.* konnten durch Sialyltransferase-induzierte *in situ*-Generierung eines Trans-Sialidase-Donors einen GM₄-Precursor in 65% synthetisieren.⁹⁴ Lee *et al.* demonstrierten, daß *T. cruzi* Trans-Sialidase auch in der Glycerinyl-Seitenkette modifizierte Neu5Ac-Donoren erkennt und überträgt⁹⁵ und synthetisierten eine Reihe von bi- und triantennären Oligosaccharidstrukturen.⁹⁶ Vetere *et al.* stellten in Kombination mit verschiedenen Glycosidasen eine Reihe von Trisacchariden in Ausbeuten von 30-80% her.⁹⁷⁻⁹⁹ Lubineau *et al.* konnten mit an Concanavalin A-Sepharose immobilisierter Trans-Sialidase verschiedene Disaccharide in 50-60% Ausbeute gewinnen.¹⁰⁰

Verwendet wurde das Enzym bei den ersten publizierten Synthesen noch als Rohextrakt aus mit *T. cruzi* infizierten Zellkulturen.^{101,102} Inzwischen wurde das Enzym kloniert und in *E. coli* exprimiert.¹⁰³ Das aus diesem Klon isolierte Enzym wurde auch in den folgenden Synthesen eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgt nach einer modifizierten¹⁰⁴ Literaturmethode.¹⁰³

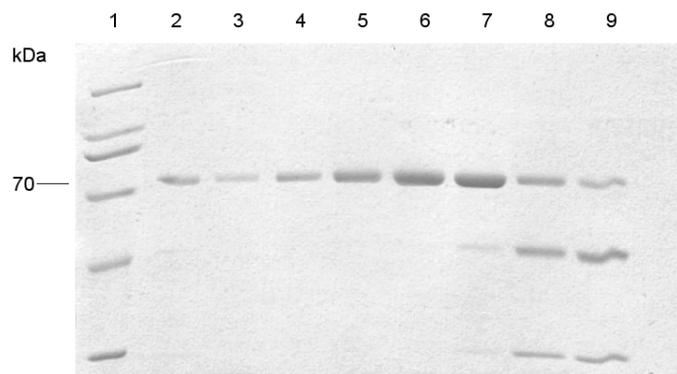


Abb. 30a SDS-PAGE der affinitätsgereinigten Trans-Sialidase. Reihe 1: Molekulargewichtsmarker, Reihe 2-6 Eluat nach Mono-Q-Säule ohne Verunreinigung, Reihe 7-9: Eluat mit Nebenprodukten. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt.

Die in *E. coli* rekombinant exprimierte Trans-Sialidase wird als Fusionsprotein mit einem Histidin-Hexamer gewonnen. Die Zellen werden dazu zunächst in LB-Medium unter Zusatz von Ampicilin angezüchtet. Nach Lyse der Bakterien mit Lysozym und Ultraschallbehandlung wird DNase zugesetzt, um die Viskosität zu reduzieren. Die entstandene Suspension wird zentrifugiert und der Überstand abgetrennt. Die Aufreinigung erfolgt sequentiell per Metallaffinitätschromatographie über Ni-NTA und Ionenaustauschchromatographie über eine Mono Q-Säule. Das so gewonnene Enzym wird gegen TrisHCl dialysiert

Die Ausbeute an rekombinanter Trans-Sialidase beträgt 1 mg pro Liter Bakterienkultur. Das Enzym wurde über SDS-PAGE identifiziert, wo es als scharfe Bande bei 70kDa erscheint (Abb. 30a). Im Gegensatz zu in der Literatur beschriebenen Beobachtungen¹⁰⁵ ist das Enzym aber ausgesprochen instabil. Am zweckmäßigsten hat sich die Lagerung bei 4°C in verdünntem Inkubationspuffer unter Zusatz von BSA erwiesen. Eine solche Präparation besaß nach 4 Wochen noch 50% der ursprünglichen Aktivität. Zumeist wurden die Assays nach Möglichkeit innerhalb von zwei Wochen nach Aufreinigung des Enzyms durchgeführt, um einen möglichst geringen Aktivitätsverlust sicherzustellen.

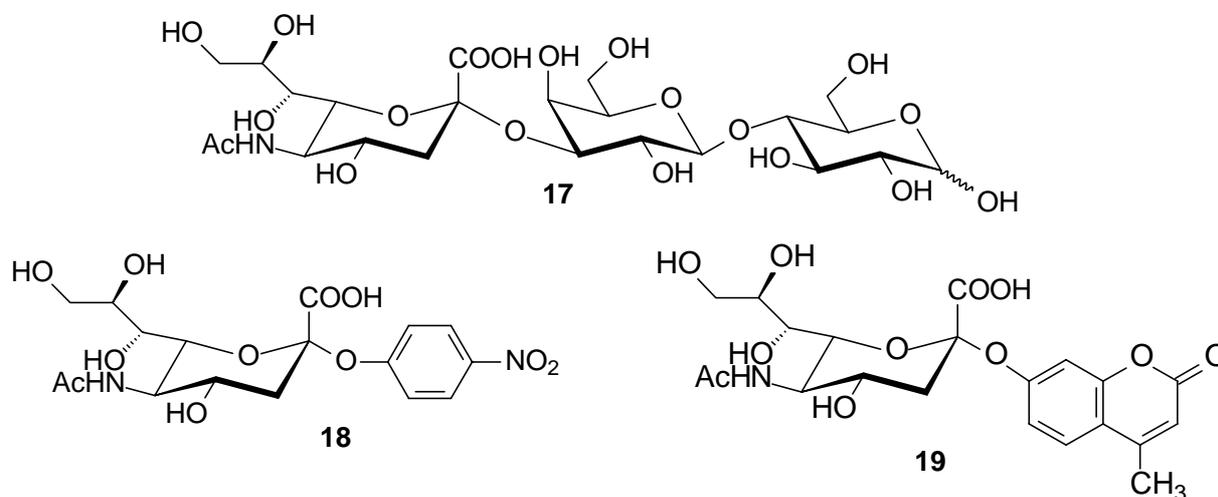
Die Aktivitätsbestimmung erfolgte, anders als nach der etablierten Standardmethode durch Szintillationsmessung der Sialylierung von ¹⁴C-markierter Lactose⁸⁹, aus Gründen der experimentellen Durchführbarkeit durch Messung des Sialyltransfers auf *p*-Nitrophenyllactose [*p*-Np-Galβ(1-4)Glc].

Die Reaktion wurde per HPLC nach der oben beschriebenen Methode verfolgt. Im Gegensatz zu den durch Sialidase katalysierten Synthesen, die bis zu 96h dauerten, waren die Reaktionen mit *T. cruzi* Trans-Sialidase meist innerhalb weniger Stunden beendet. Auch wenn es sich bei der Sialidase um ein Transferenzym handelt, so ist doch die Inkubationszeit bzw. der Fortlauf der Transsialylierung von besonderer Bedeutung für die Ausbeute der Reaktion. Zum einen ist die Transsialylierung ein reversibler Prozeß. Benutzt man daher ein terminal sialyliertes Oligosaccharid als Sialyldonor, so kann bei zunehmender Freisetzung des Donoraglycons auch die Resialylierung des freien Aglycons stattfinden. Dies läßt sich allerdings durch Einsatz von Sialyldonoren umgehen, die aufgrund ihrer Struktur als Akzeptorsubstrat ungeeignet sind. Desweiteren besitzt die Trans-Sialidase, anders als eine Sialyltransferase, auch ein Hydrolasepotential. Produkte können somit, wenn auch in wesentlich geringerem Umfang als bei einer Sialidase, hydrolysiert werden. Dieser Effekt ist allerdings bei Anwesenheit geeigneter Akzeptoren meist von untergeordneter Bedeutung.

Als mögliche Donoren kommen zunächst die natürlichen Substrate der Trans-Sialidase, Glycoside mit einem terminalen Neu5Acα(2-3)Galβ-Motiv, in Frage. Hier wird am häufigsten α(2-3)-Sialyllactose (**17**), als Donor verwendet, da diese bisher die höchste Transferrate aller untersuchten kommerziell verfügbaren Sialoside zeigt. Zwar ist α(2-3)-Sialyllactose das derzeit preiswerteste kommerziell erhältliche Sialyloligosaccharid, allerdings ist der Preis der Sialyllactose nach wie vor noch so hoch, daß an einen Einsatz im präparativen Maßstab nicht zu denken ist. Zwar wurden in der Literatur Verfahren beschrieben, α(2-3)-Sialyllactose im Multigramm-Maßstab aus Rindercolostrum zu

isolieren¹⁰⁶ oder sie bei einer Trans-Sialidase-Synthese *in situ* durch Einsatz von Sialyltransferase zu generieren. Ein genereller Nachteil der Verwendung von Sialyllactose (**17**) als Donor ist aber die bereits erwähnte Reversibilität des Sialyltransfers. Ein weiteres Manko liegt in der erschwerten Aufreinigung, da neben dem eigentlichen Produkt auch freie Lactose, nicht umgesetzte Sialyllactose und freie *N*-Acetylneuraminsäure in der Mischung vorliegen.

Alternativ wurden daher auch Sialylstrukturen mit nicht-natürlichen hydrophoben Aglyconen wie das bereits oben beschriebene *p*-Np-Neu5Ac (**18**) oder das 4-Methylumbelliferyl(MU)-glycosid der *N*-Acetylneuraminsäure (**19**) untersucht.



Hierbei hat sich MU-Neu5Ac als der am besten geeignete Donor für synthetische Anwendungen der *T. cruzi* Trans-Sialidase herausgestellt.¹⁰⁷ Bei MU-Neu5Ac handelt es sich um ein Sialosid, das seit längerem zur Aktivitätsbestimmung von Sialidasen verwendet wird. Der MU-Rest zeichnet sich durch seine gute Fluoreszenz- und UV-Detektierbarkeit aus, läßt sich gut von den hydrophilen Sialylierungsprodukten abtrennen und ist ferner in freier Form kein Substrat für die Trans-Sialidase. *p*-Np-Neu5Ac zeigte in Vergleichsversuchen eine wesentlich niedrigere Transferrate als MU-Neu5Ac. Allerdings wurde gezeigt, daß die Transferrate von mehreren Faktoren, unter anderem von der Akzeptorkonzentration und der Inkubationstemperatur, deutlich beeinflußt wird.⁸⁹

Die Darstellung von MU-Neu5Ac erfolgt weitgehend nach einem literaturbekannten Verfahren.⁷⁶

Bei der Synthese sialylierter Oligosaccharidstrukturen ist man, wie bereits erwähnt, im wesentlichen auf die Synthese von Strukturen mit dem Motiv Neu5Ac α (2–3)Gal β –OR

beschränkt, obwohl von Ausnahmen der Akzeptorspezifität berichtet wurde. Zur Untersuchung der Transferaktivität sollen daher nur Akzeptorstrukturen mit einer terminalen Galß-Einheit herangezogen werden.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Assays mit Sialidasen müssen die Inkubationen mit Trans-Sialidase nicht unter stark konzentrierten Bedingungen stattfinden. Üblich sind Konzentrationen im Bereich von 20 $\mu\text{mol/ml}$. Die Inkubation erfolgt standardmäßig in Cacodylat-HCl-Puffer bei 37°C, einem pH-Wert von 6.9 und einem leichten Überschuß des Donors (1.1 Äquivalente). Die Aufarbeitung verläuft analog den für Sialidasen beschriebenen Methoden.

Unter diesen Inkubationsbedingungen konnte das T-Antigen-Epitop **5a** mit *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase so in einer Ausbeute von 22% regioselektiv in $\alpha(2-3)$ -Position sialyliert werden. Diese Ausbeute liegt deutlich unter den in der Literatur für ähnliche Disaccharide veröffentlichten Werten (s. oben).

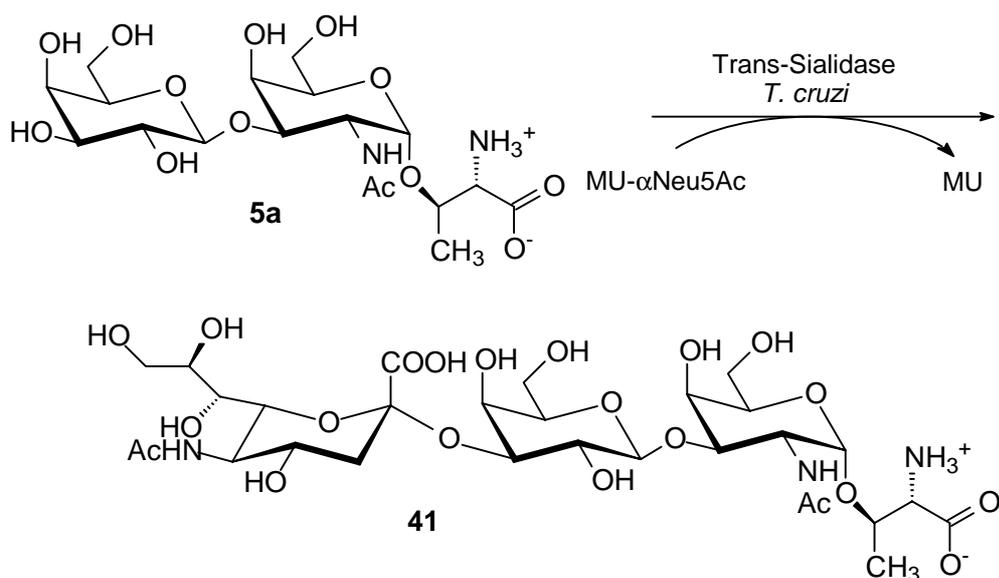


Abb. 31

Das entsprechende Serinderivat (**5b**) wurde in 20% sialyliert. Versuche, **5b** mit Fmoc-geschützter Aminofunktion und Benzylester-geschützter Carboxyfunktion zu sialylieren, führten neben einer nur sehr eingeschränkten Löslichkeit zu keiner Produktbildung. Es ist daher auszuschließen, daß die begrenzte Sialylierungsrate auf eine hydrophobe Wechselwirkung in der Akzeptor-Bindungstasche zurückzuführen ist. Dies überrascht nicht unbedingt, da nachgewiesen wurde, daß das aktive Zentrum des Enzyms weitgehend homolog zu dem der Sialidasen ist.^{107,108}

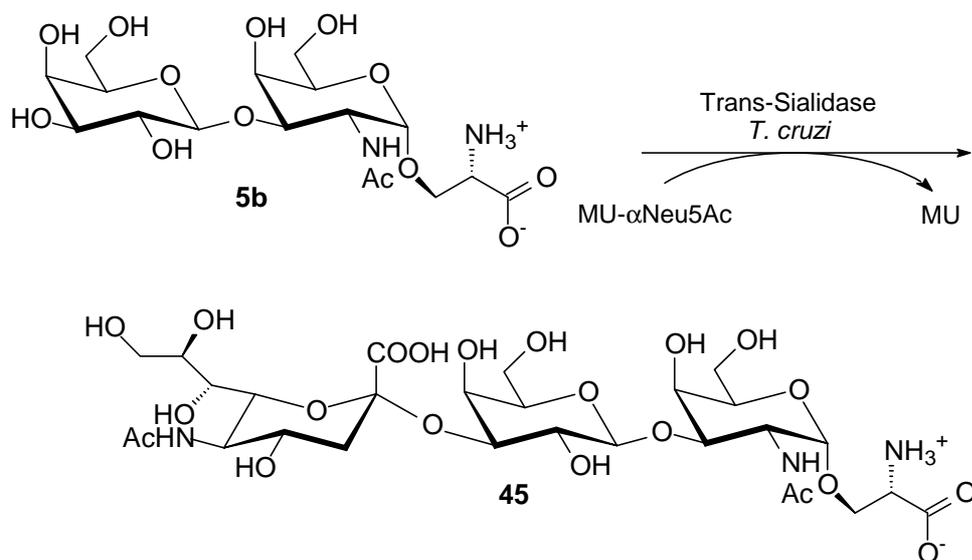


Abb. 32

Die Sialylierung von **12** ergab mit 16% ebenfalls eine eher unbefriedigende Ausbeute, die in der Größenordnung liegt, die auch mit den Sialidasen erreicht werden konnte (s. o.). Nachteilig scheint sich hier auch die 2-Desoxyfunktion der subterminalen Galactosyleinheit des Akzeptors bemerkbar zu machen.

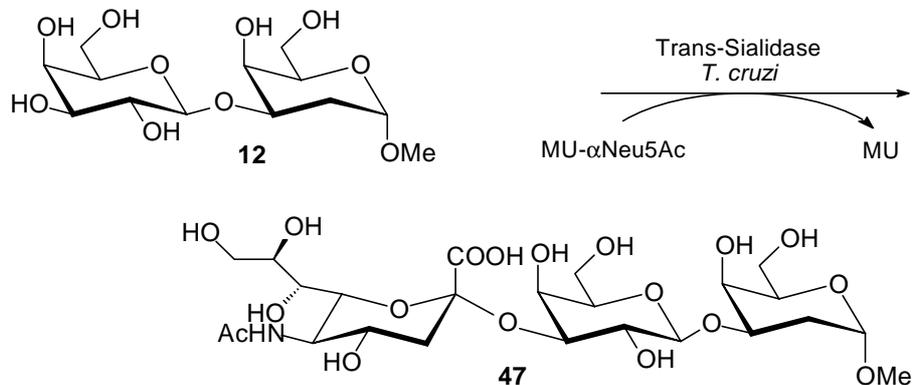
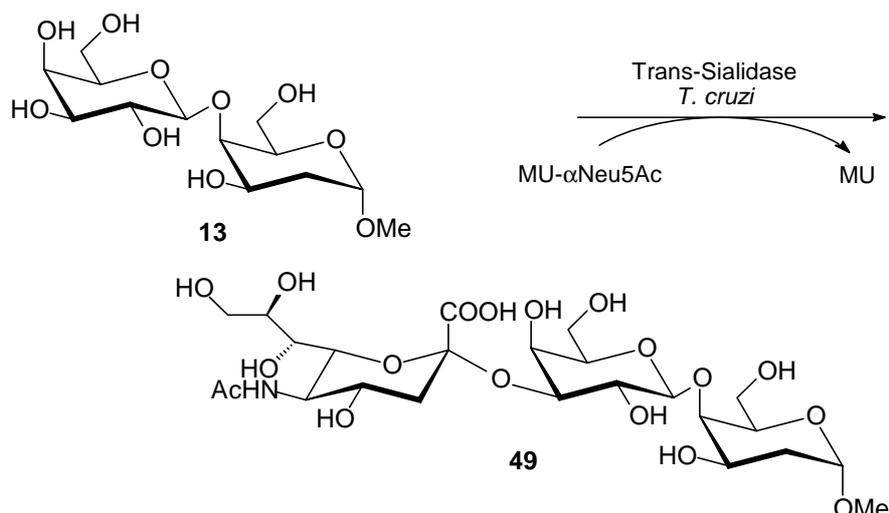
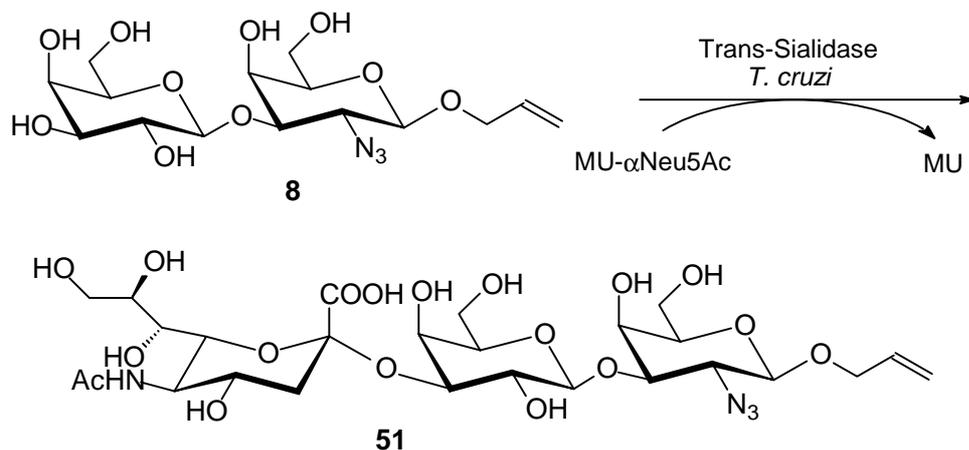


Abb. 33

In etwas höherer Ausbeute verläuft die Sialylierung des $\beta(1-4)$ -verknüpften 2-Desoxygalactosids **13** mit einer Ausbeute von 23%. Hier scheint sich eine Beobachtung von Vandekerckhove *et al.* zu bestätigen, daß $\beta(1-4)$ -verknüpfte Galactosyleinheiten geringfügig besser sialyliert werden als $\beta(1-3)$ -Galactoside.⁸⁷

**Abb. 34**

Für den $\beta(1-3)$ -verknüpften Baustein **8** liegt die Ausbeute für die Transsialylierung bei recht guten 28%. Der Azidobaustein scheint in diesem Fall das Ergebnis der Sialylierung nicht negativ zu beeinflussen, obwohl er im Vergleich mit einer *N*-Acetyl- oder Hydroxyfunktion als eher hydrophob einzustufen ist. Dies könnte darauf hindeuten, daß der Substituent an C-2 eher eine sterische Fixierung des Akzeptors in der Bindungstasche bewirkt, als daß eine konkrete Wechselwirkung mit der Seitenfunktion einer Aminosäure stattfindet, ein Effekt, der insbesondere bei den Transferasen beobachtet wird und deren hohe Akzeptorspezifität erklärt.

**Abb. 36**

Betrachtet man die in der Literatur veröffentlichten Akzeptorstudien, so fällt auf, daß praktisch ausschließlich freie Zucker auf ihre Eignung als Akzeptoren untersucht wurden.^{87,89}

Eventuell könnte die Struktur der Aglycone, auch wenn diese weit vom aktiven Zentrum entfernt sind, einen Einfluß auf die Transferraten haben. Daher wurde auch freie Lactose (**61**)

als Akzeptor untersucht. Die Erkennung durch die Trans-Sialidase und damit die gute Assoziation in der Bindungstasche ist somit gewährleistet.

Der Trans-Sialidase-katalysierte Sialyltransfer liegt hier mit 49% deutlich über den bisher erreichten Ergebnissen. Zum einen ist dies auf die gute Eignung der Lactose selber als Akzeptormolekül zurückzuführen. Desweiteren scheint auch das Nichtvorhandensein eines anomeren Substituenten einen positiven Einfluß auf die Sialylierung zu besitzen.

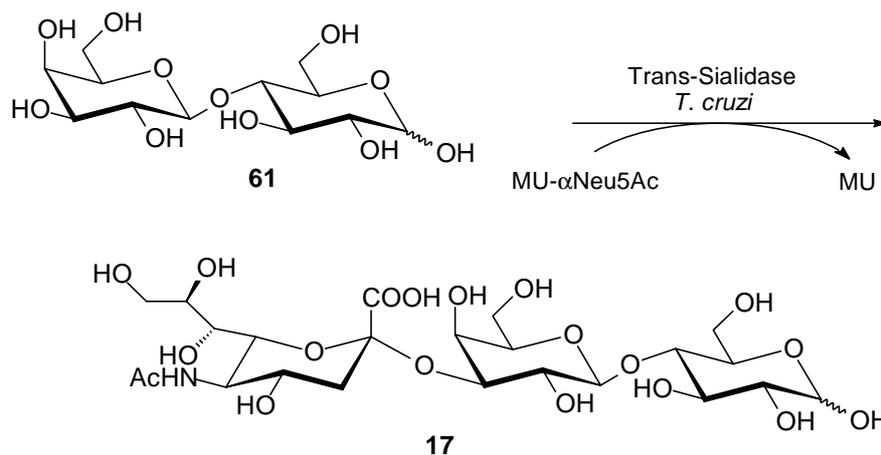
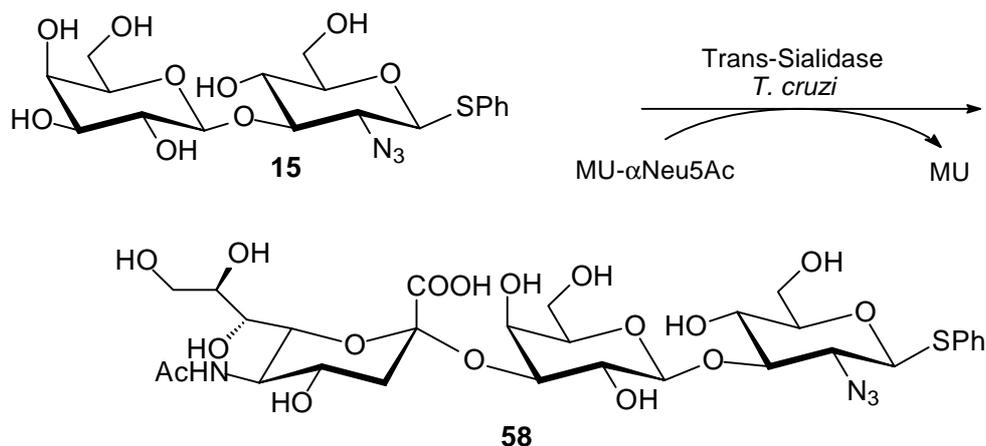


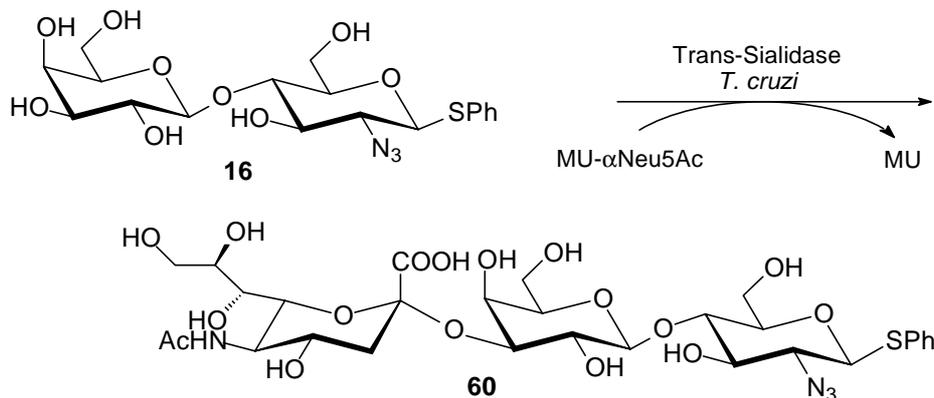
Abb. 37

Ein Nachteil bei dieser Art der Synthese ist die Bildung von Anomerengemischen entsprechend der natürlichen Mutarotation, was sowohl die Bestimmung der Regioisomerenverhältnisse im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum als auch eine erste quantitative Schätzung des Gesamtumsatzes per HPLC erschwert. Im HPLC-Spektrum können so bis zu vier Produktpeaks entstehen (zwei anomere Produkte sowie die entsprechenden Regioisomere), die aufgrund ihres chromatographischen Laufverhaltens nicht Basislinien-getrennt eluieren. Des Weiteren kommt, daß durch die begrenzte Empfindlichkeit des UV-Detektors ein zusätzlicher Fehler bei der Messung von vier Peaks entsteht, da das Grundrauschen so doppelt berücksichtigt wird, eine Fehlerquelle die sich insbesondere bei Peaks an der Grenze der Detektierbarkeit bemerkbar macht.

Ausgehend von Thioglycosid **15** konnte das Trisaccharid **58** in einer guten Ausbeute von 26% isoliert werden, trotz des relativ hydrophoben Thiophenylrestes.

**Abb. 37a**

Der Lactosamin-Precursor **16** konnte als $\beta(1-4)$ -verknüpfte Struktur mit 32% Ausbeute wiederum in höherer Ausbeute, verglichen mit dem $\beta(1-3)$ -Analogon **58**, zum Trisaccharid **60** umgesetzt werden.

**Abb. 38**

Insgesamt erscheinen die mit der *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase erzielten Transferraten verglichen mit in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen deutlich niedriger. Eine Ursache kann in der Verwendung von am reduzierenden Ende substituierten Akzeptorstrukturen liegen. Eine weitere Möglichkeit liegt in den Eigenschaften des Enzyms. Es ist nicht auszuschließen, daß es sich bei dem vorliegenden Klon um eine Variante handelt, die eine geringere Aktivität pro mg Protein besitzt. In jedem Fall konnten sowohl mit dem oben beschriebenen Aktivitätsassay als auch mit einem Assay, der den Standardassays entspricht,¹⁰³ nur etwa ein Zehntel der Aktivität pro mg Protein gegenüber den Literaturangaben erreicht werden.^{103,105}

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit der Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* eine Reihe von Akzeptorsubstraten mit terminaler Gal β -Struktur in guten Ausbeuten regioselektiv in $\alpha(2-3)$ -Position sialyliert werden können. Zwar ist man durch die Beschränkung auf β -galactosidische Akzeptoren mit diesem Motiv in der Auswahl möglicher Substrate sehr festgelegt. Andererseits ist dieses das in der Natur am häufigsten anzutreffende sialylierte Motiv auf Zelloberflächenstrukturen. Eine effiziente Synthesemethode für dieses Strukturmotiv ist daher von großem Interesse.

Die Trans-Sialidase vereint die absolute Stereo- und Regioselektivität der Sialyltransferasen mit einem den Sialidasen entsprechenden Handling. Neben dem Gal β -Motiv spielen weitere vicinale Glycosyleinheiten eine gewisse Rolle für die Transferrate der Trans-Sialidase, allerdings kann immer noch von einer breitgefächerten Akzeptor-Substratspezifität gesprochen werden.

3.6 Chemische Blocksynthese mit enzymatisch erzeugten Building-Blocks

Betrachtet man die in der Literatur veröffentlichten Synthesen biologisch oder medizinisch relevanter Oligosaccharide, so fällt auf, daß die Mehrheit dieser Synthesen entweder rein klassisch-chemisch oder rein enzymatisch durchgeführt werden.

Angesichts der teilweise noch verbreiteten Schwierigkeiten bei der Synthese definierter Oligosaccharidstrukturen mit einem spezifischen Substitutionsmuster und definierter Regio- und Stereochemie liegt es nahe, alle zur Verfügung stehenden Verfahren auf ihre Eignung zu prüfen und das jeweils beste auszuwählen. Bei einer solchen Auswahl spielen neben der erwähnten Stereo- und Regioselektivität der Glycosylierungsmethode auch die Transfereffizienz und damit die Ausbeute der Reaktion, die Reinheit der gewünschten Verbindung bzw. die Reinigung von unerwünschten Regio- und Stereoisomeren oder anderen Nebenprodukten, der Zeit- und Arbeitsaufwand einer Gesamtreaktion sowie damit verbundenen Kosten eine fundamentale Rolle.

Vergleicht man nun die bekannten klassisch-chemischen mit den enzymatischen Syntheseverfahren, so wird deutlich, daß bisher keine Glycosylierungsmethode existiert, die sich generell für jede Art des Glycosyltransfers eignet.

Glycosaminstrukturen lassen sich zum Beispiel mit klassischen Methoden inzwischen in ausgezeichneten Ausbeuten bei guter bis sehr guter stereochemischer Kontrolle übertragen. Im Fall von Glucosylierungen und Galactosylierungen, speziell im Fall der

β -Galactosylierungen, sind sich klassisch-chemische und enzymatische Verfahren hinsichtlich Stereoselektivität und Transfereffizienz weitgehend ebenbürtig. Bei der Synthese sialylierter Strukturen hingegen sind enzymatische Verfahren den klassischen insbesondere hinsichtlich Stereochemie und präparativem Aufwand deutlich überlegen.

Diese Beispiele zeigen, daß im Zuge einer effizienten Syntheseplanung erst bei der Einbeziehung aller zur Verfügung stehenden Glycosylierungsverfahren ein Maximum an synthetischer Effizienz gewährleistet ist.

Insbesondere die Blocksynthesemethodik eignet sich hervorragend für eine Kombination sowohl klassisch-chemischer als auch enzymatischer Verfahren. Der in den letzten Jahren zunehmende Einsatz solcher gemischt chemischen und chemoenzymatischen Synthesen komplexer Glycokonjugate demonstriert die Effizienz dieser Strategie.¹⁰⁹⁻¹¹²

Im folgenden sollen zwei biologisch relevante Oligosaccharide durch klassische Blocksynthese aus enzymatischen dargestellten Building-Blocks synthetisiert werden. Hierbei kommen einige der in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Strukturen als Building-Blocks zum Einsatz.

Bei allen gezeigten Strukturen handelt es sich um Verbindungen, die bereits mehrfach auf unterschiedlichsten Wegen synthetisiert wurden sowohl durch klassische Verfahrenswege, die unter anderem auf der Thioglycosid- oder Trichloracetimidat-Methode basieren, als auch auf biochemische Wege durch den Einsatz der entsprechenden Glycosyltransferasen oder Glycosidasen. Die gezeigten enzymatischen Synthesen leisten, nimmt man die erreichten Gesamtausbeuten zum Maßstab, keine Verbesserung der etablierten Methoden und sind daher in erster Linie als Proof of Principle der Kombination enzymatischer mit klassisch-chemischen Methoden zu verstehen. Allerdings kann in einigen Fällen der experimentelle Aufwand durch Reduktion der Syntheseschritte, im wesentlichen durch eine Reduzierung von Schutzgruppenvariationen und die damit verbundene Vermeidung von chromatographischen Reinigungsschritten, vereinfacht werden.

Die Verbindungen **62** und **63** werden als Sialyl-Lacto-*N*-tetraose (LSTa, **62**) und Sialyl-Lacto-*N*-neotetraose (LSTc, **63**) bezeichnet und spielen als Hauptbestandteile der Humanmilch eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen bakterielle und virale Infektionen des Gastrointestinaltrakts von Kleinkindern.¹¹³ So wird vermutet, daß sie z. B. die bakterielle Adhäsion an der Epithel-Oberfläche inhibieren, eine der ersten Stufen des Infektionsprozesses. Die Humanmilcholigosaccharide werden daher als lösliche Rezeptor-Analoga der Epithel-Zelloberflächen angesehen.¹¹⁴

daß hierbei zum Teil die TBDPS-Gruppe abgespalten wird. Die vollständige Abspaltung der TBDPS-Gruppe erfolgte mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan. Nach der anschließenden Acetylierung der Aminofunktion und der freien 6'-OH-Funktion erhält man (ausgehend von **68**) Zielstruktur **69** in 70%.

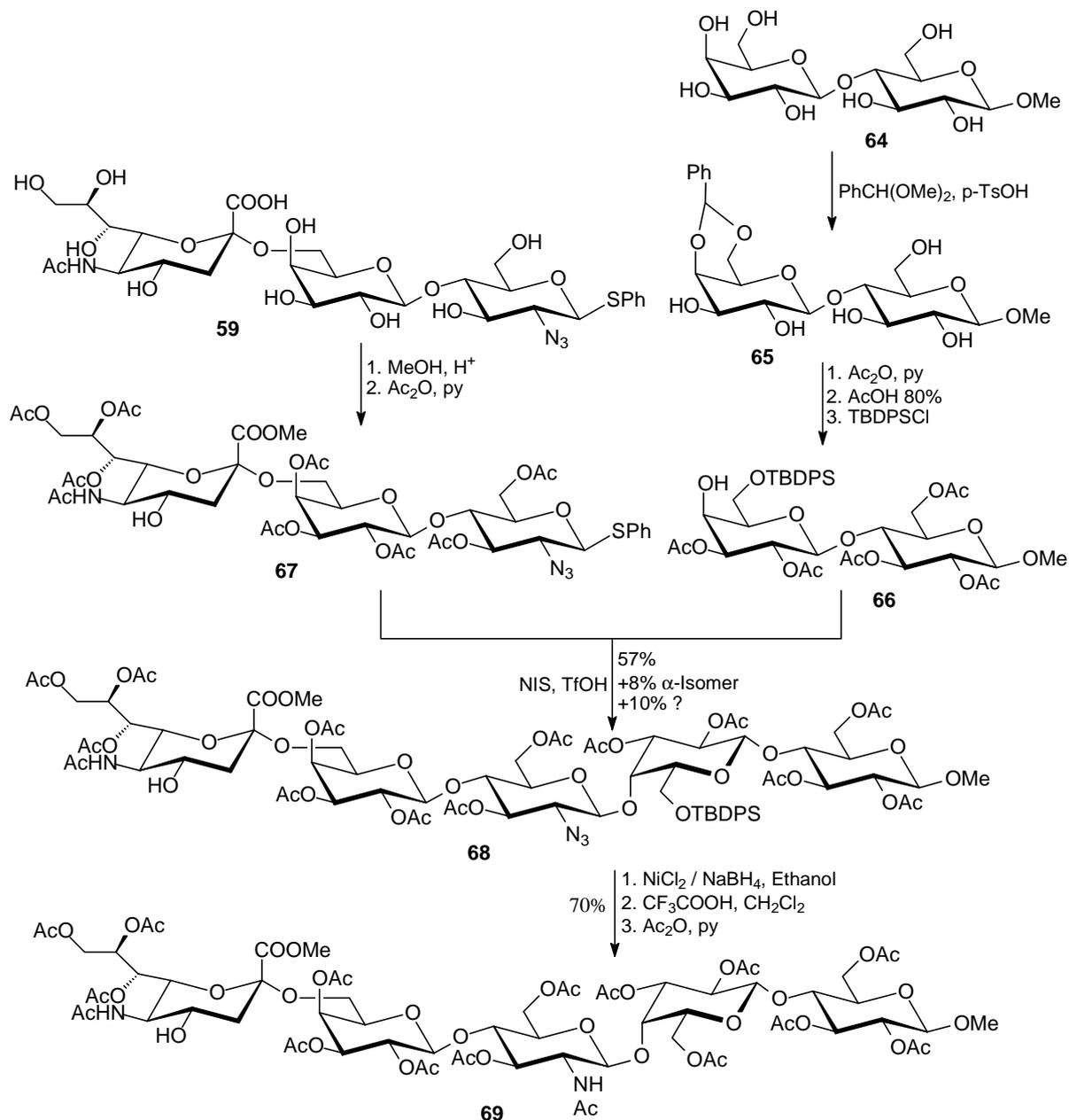


Abb. 39

69 zeigte im $^1\text{H-NMR}$ ein für eine β -glycosidische Verknüpfung charakteristisches Dublett der GlcNAc-Einheit bei δ 5.12 ppm mit $J_{1',2'} = 8.2$ Hz und eine Tieffeldverschiebung der C-4'-Protons um 0.15 ppm auf δ 4.14 ppm gegenüber der 4'-OH-freien Verbindung.

Die Darstellung der Sialyllacto-*N*-neotetraose **74** erfolgt analog aus Baustein **72** mit Lactosid **71**. In diesem Falle wird das 3',4'-ungeschützte Lactosid eingesetzt. Da die Hydroxyfunktion

an C-4' im allgemeinen wesentlich reaktionsträger ist als die C-3'-Hydroxygruppe, war die Blockierung der 4'-OH-Funktion nicht notwendig. Die Darstellung von Baustein **71** erfolgte wiederum nach Standardmethoden.¹¹⁹ Zunächst wurde durch Umsetzung mit 2,2-Dimethoxypropan und *p*-TsOH in DMF/Aceton die 3',4'-Position Isopropyliden-geschützt. Nach Peracetylierung mit Ac₂O und Pyridin und anschließender Entschützung der 3',4'-OH-Funktion mit 80%iger Essigsäure bei 80°C erhielt man den Building Block **71**.

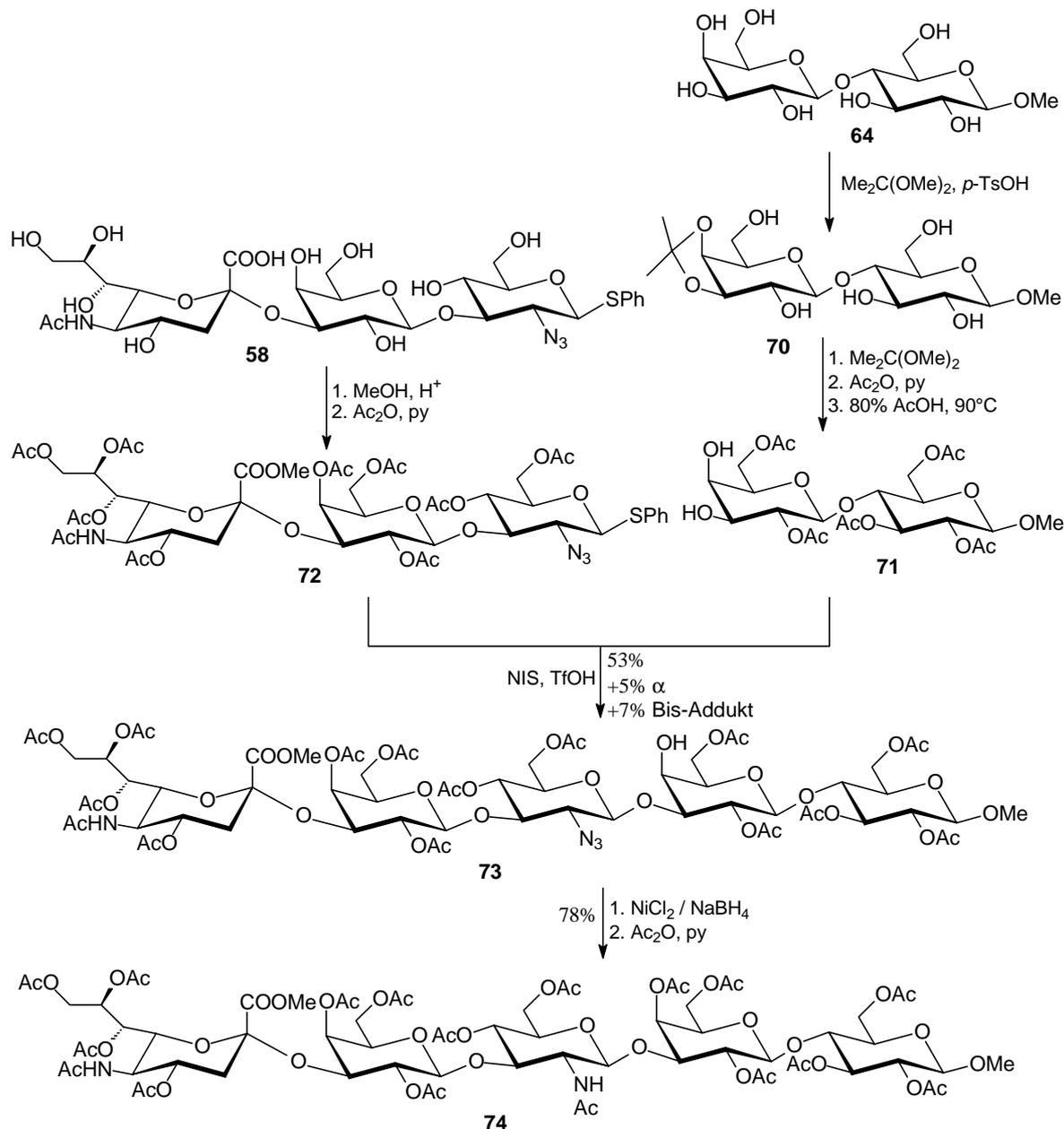


Abb. 40

Die Umsetzung von **72** mit **71** unter NIS-TfOH-Katalyse führte zu dem gewünschten Produkt **73** in guten 53% Ausbeute. In etwa 5% bildete sich auch das α-Glycosid, sowie in ca. 7% das

bis-glycosylierte Addukt. Beide Nebenprodukte konnten aber chromatographisch abgetrennt werden. Die Überführung in die peracetylierte Form **74** erfolgte analog zu **69** mit „Nickelborid“ und Acetanhydrid/Pyridin, so daß man **74** in 78% über diese beiden Schritte erhielt.

Die Identität von **74** konnte anhand des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums nachgewiesen werden. H-1" zeigte bei δ 4.96 ppm ein für β -Glycoside charakteristisches Dublett mit $J_{1",2"} = 8.0$ Hz, bei δ 5.37 konnte das stark entschirmte H'-4-Proton als Dublett mit $J_{3',4'} = 2.9$ Hz identifiziert werden.

4 Synthese sialylierter Glykokonjugate durch Kombination mit polymerunterstützter Flüssigphasensynthese

4.1 Eigenschaften von Polyethylenglycol

Polyethylenglycol (PEG), das wie Polyethylenoxid (PEO), Polyoxyethylen (POE) und Polyoxiran (POX) den gleichen Typ lineares Polymer beschreibt, welches aus der Polymerisation von Ethylenoxid entsteht, besitzt laut Konvention ein Molekulargewicht kleiner als 20.000. PEO beschreibt Polymere mit höheren Molekulargewichten, während POE und POX Polymere mit einer breiten Verteilung von Molekulargewichten kennzeichnen. Diese Unterteilung wird in erster Linie durch die physikalischen Eigenschaften der Polymere bedingt. PEGs mit einem Molekulargewicht von 2.000 - 20.000 sind kristallin, kleinere PEGs sind bei Raumtemperatur flüssig. PEGs mit $M > 20.000$ besitzen niedrige Beladungskapazitäten. Am erfolgreichsten konnte bei der polymerunterstützten Flüssigphasensynthese bisher mit PEG mit einem Molekulargewicht von 5000 erzielt, welches auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Es ist zu beachten, daß die Polymere polydispers sind, also eine Molekulargewichtsverteilung besitzen, die aber bei den kommerziell erhältlichen PEGs relativ eng ist.

Klassischerweise wird in der polymerunterstützten Flüssigphasensynthese monomethoxyverethertes PEG (MPEG) eingesetzt, welches auf der einen Seite von einer Methoxygruppe terminiert ist und auf der anderen Seite eine freie Hydroxygruppe aufweist; MPEG ist somit monofunktional.

4.2 Prinzip der polymerunterstützten Flüssigphasensynthese

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von erfolgreichen Anwendungen der Flüssigphasensynthese unter Einsatz von Polyethylenglycolmonomethylether (MPEG) als polymerer Unterstützung beschrieben. Als Quasi-Schutzgruppe zeigt dieses Polymer eine Löslichkeit in einer Vielfalt organischer Lösungsmittel und Wasser. Unlöslich ist MPEG hingegen in Hexan, Diethylether und *tert*-Butylmethylether, die daher zur Ausfällung von MPEG verwendet werden können. Auch das Abkühlen von Polymerlösungen in Methanol und Ethanol liefert kristallines MPEG, das aufgrund seiner helikalen Struktur eine große Neigung zur Kristallisation besitzt. Solange daher das Polymer-Backbone im Laufe einer Flüssigphasensynthese unverändert bleibt, kann nach jedem Reaktionsschritt eine Reinigung durch Kristallisation durchgeführt werden. Die große Löslichkeit des Polymers erlaubt nicht

nur das Arbeiten unter in homogener Lösung bei einer Reihe von Reaktionsbedingungen, sondern die Löslichkeitseigenschaften erlauben auch die spektroskopische Überwachung der Reaktionen, ohne daß das Produkt vom Polymer abgespalten werden muß. Dies bedeutet eine nicht zu unterschätzende Vereinfachung gegenüber herkömmlichen Festphasensynthesen, bei denen entweder aufwendige Analysemethoden entwickelt werden müssen (z. B. Magic Angle Spinning NMR) oder ein Teil des Produktes zur Reaktionskontrolle abgespalten und damit zerstört werden muß. Die Charakterisierung MPEG-gebundener Moleküle ist zumeist unproblematisch, da das Polymer bei Anwendung spektroskopischer oder chemischer Analysemethoden praktisch nicht stört. Desweiteren besitzt das MPEG eine im $^1\text{H-NMR}$ separat detektierbare Methoxygruppe bei $\delta = 3.38$ ppm (in CDCl_3) (PEG-Backbone $\delta = 3.65$ - 3.45 ppm) bzw. bei $\delta = 4.36$ ppm (in D_2O) (PEG-Backbone $\delta = 4.80$ - 4.50 ppm), die als interner Standard bei der Reaktionsüberwachung eingesetzt werden kann.

Bei der Synthese von Oligosacchariden wird MPEG an das erste Glied der Oligosaccharidkette über einen Linker gebunden, der nach der kompletten Synthese ein einfaches Abspalten des Polymers ermöglicht (Abb. 41). MPEG kann nicht direkt an das Kohlenhydrat gebunden werden, da es in anomerer Position zu labil, in allen anderen Positionen hingegen zu stabil wäre und dort nach Abschluß der Synthese nicht abgespalten werden könnte.

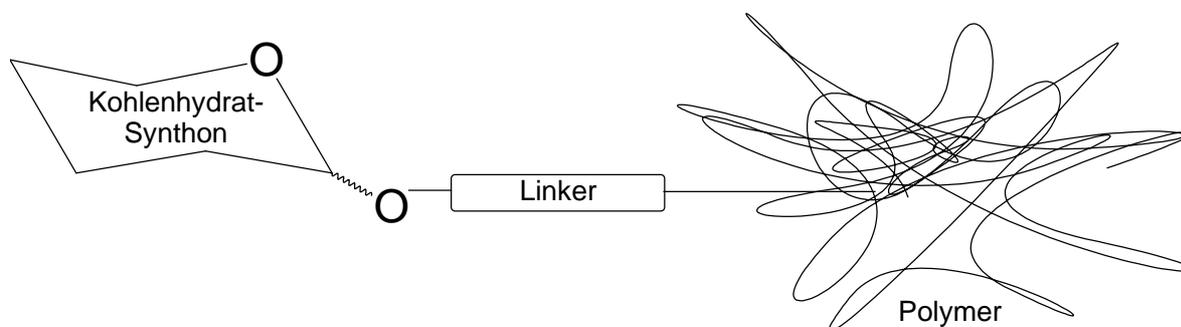


Abb. 41

Daher muß ein Linker eingeführt werden, der die chemischen und physikochemischen Eigenschaften des Polymer-Kohlenhydrat-Assoziats nicht verändert. In der Vergangenheit wurde hier häufig ein Bernsteinsäurediester als Linker eingesetzt.¹²⁰ Diese bringt basenlabile Esterverknüpfung einige Nachteile mit sich. So kann im Fall einer klassischen Synthese nicht mit temporären Esterschutzgruppen gearbeitet werden, die im Laufe der Synthesesequenz entfernt werden müssen. Desweiteren neigen Acylgruppen unter sauren Bedingungen zur Umlagerung. Im Fall der enzymatischen Synthese ist ebenfalls zu berücksichtigen, daß Ester

speziell im wässrigen Milieu verhältnismäßig leicht auch unter sauren Bedingungen abgespalten werden können. Auch werden häufig im Laufe der Aufarbeitung enzymatischer Assays oder bei der Analyse basische Medien eingesetzt (z.B. basische Ionentauscher oder mit Aminogruppen-funktionalisierte Säulenmaterialien).

Diese Nachteile können durch Einsatz eines α,α' -Dioxyxylyldiethers (DOX) umgangen werden, der eine deutlich höhere Stabilität als ein Bernsteinsäurediester besitzt.¹²¹ Der DOX-Linker ermöglicht es, eine MPEG-Molekül mit jeder Hydroxyfunktion eines Kohlenhydrats zu verknüpfen, einschließlich der anomeren Funktion, die als Ester aufgrund ihrer Labilität nicht zugänglich war. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt entweder durch Hydrogenolyse oder Scandium(III)trifluormethansulfonat-katalysierte Acetolyse, wobei, je nach Spaltungsbedingungen, entweder das 1-OH-freie Oligosaccharid oder das an 1-OH-Position mit einem Benzylanalogon-geschützte Oligosaccharid erhalten wird.

Die Synthese des MPEG-DOX-Konjugats erfolgt durch Williamson-Ether-Synthese, die selektiv das monosubstituierte Derivat **77** erzeugt, das durch Hydrolyse in den polymersubstituierten Benzylalkohol **78** überführt wird (Abb. 42).¹²¹

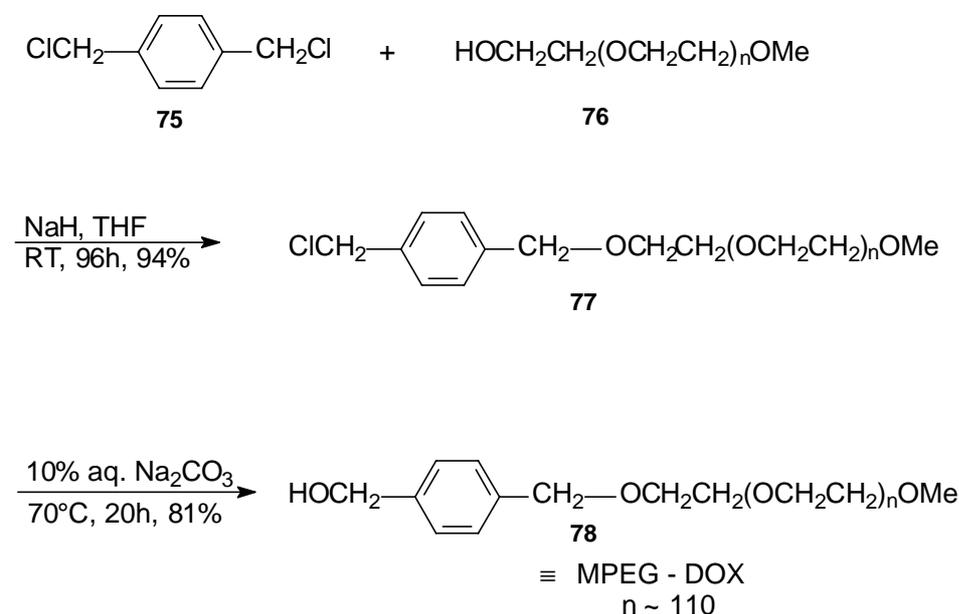


Abb. 42

4.3 Synthese polymergebundener Akzeptorstrukturen

Die Synthese der polymergebundenen Akzeptorstrukturen erfolgt unter Einsatz klassisch-chemischer Verfahren. Die Anwendung enzymatischer Methoden in diesem ersten Schritt würde die Synthese zwar noch eleganter erscheinen lassen, aber es hat sich gezeigt, daß der

primäre Kopplungsschritt an das Polymer effizienter unter klassischen Bedingungen durchgeführt wird. Hierbei kamen unterschiedliche Verfahren zum Einsatz.

Verbindung **81** wurde nach dem Trichloracetimidat-Verfahren in guter Ausbeute von 84% nach Entschützung mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) synthetisiert.¹²² Durch Verwendung eines doppelten Überschusses des Galactosyldonors kann die Reaktion in Richtung einer hohen Ausbeute verschoben werden. Dieser Aspekt ist bei der Kopplung der ersten Kohlenhydrateinheit besonders wichtig. Durch eine hohe Belegung der freien Hydroxygruppen mit den Zuckereinheiten wird sichergestellt, daß diese abgesättigt werden und im weiteren Verlauf des Oligosaccharidaufbaus nicht als potentielle Glycosylierungsstellen zur Verfügung stehen. Normalerweise wird diese Problematik in der Festphasensynthese durch das sogenannte Capping gelöst. Hierbei werden nicht vollständig abreagierte Hydroxygruppen der DOX-Funktion durch Acetylierung, Methylierung o. ä. abgesättigt. Es zeigte sich allerdings, daß bei der für diesen Fall am besten geeigneten Methode, der Methylierung mit Methyljodid, die Bindung zwischen MPEG und DOX teilweise gespalten wird. Da die folgenden Assays aber gezeigt haben, daß eine enzymatische Glycosylierung der DOX-Hydroxyfunktion nicht oder nur in Spuren vorkommt, wurde auf ein Capping verzichtet.

Bereits bei der Durchführung dieser Synthese können die makromolekularen Eigenschaften des Polymers ausgenutzt werden. Die Aufarbeitung des galactosylierten polymergebundenen

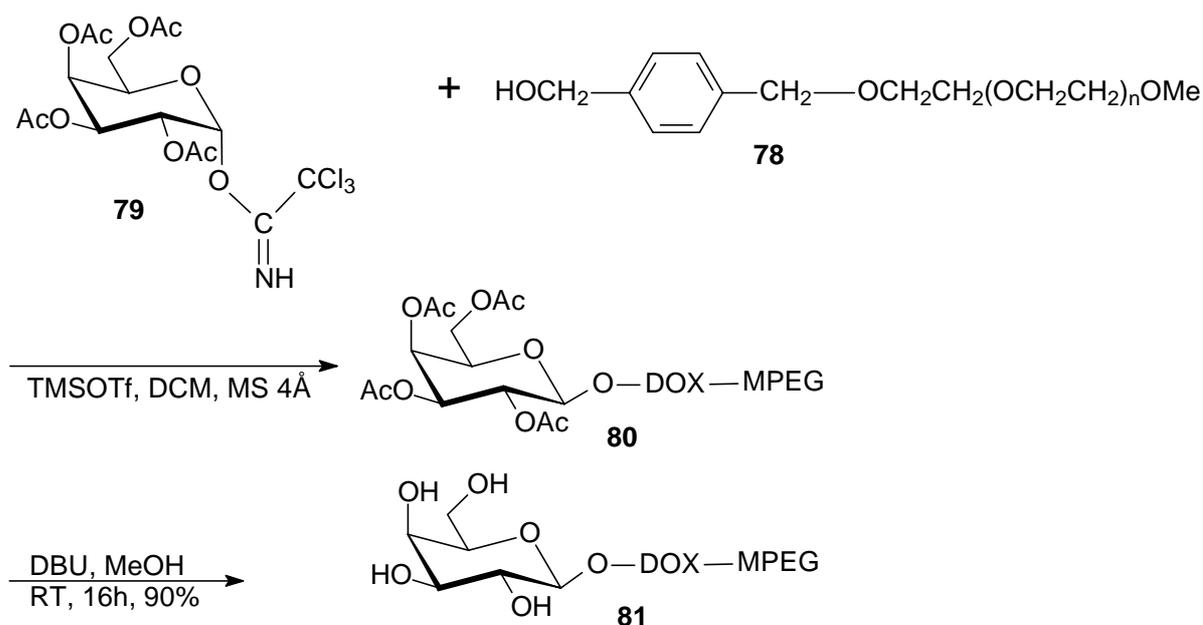


Abb. 43

Produkts **81** erfolgte durch Ausfällung mit *tert*-Butylmethylether und anschließende Zentrifugation.

Die Darstellung des polymergebunden *N*-Acetylglucosamins **90** erwies sich aus mehreren Gründen als bedeutend problematischer. Zum einen neigen 2-*N*-Acylamido-substituierte Glycosyldonoren dazu, sich unter Bildung einer Oxazolinringstruktur zu stabilisieren.¹²³ Diese Oxazoline sind zwar durchaus in der Lage, ebenfalls als Glycosyldonoren zu fungieren, allerdings konnten weitgehend quantitative Umsetzungen nur mit primären aliphatischen hydroxyfunktionalisierten Verbindungen erhalten werden. Etablierte Methoden zur Darstellung von β -Glycosiden des *N*-Acetylglucosamin aus den 1-*O*-Acetaten führten hier nicht zum Erfolg. Die Eisen(III)chlorid-katalysierte Reaktion¹²⁴ ist ungeeignet, da multivalente Kationen einerseits in der Lage sind MPEG zu komplexieren, was zu einem deutlich verschlechterten Verhalten bei der Ausfällung des Polymers führt. Andererseits wurde eine teilweise Spaltung des Polymers an der Benzylfunktion beobachtet. Beispiele für eine Spaltung von Benzylfunktionen durch FeCl_3 wurden bereits beschrieben.¹²⁵⁻¹²⁷ Erstaunlicherweise wurde auch bei der TMSOTf-katalysierten Glycosylierung neben dem erwarteten Produkt (**90**) ein großer Anteil an Spaltprodukten beobachtet. Hierbei handelte es sich neben nicht umgesetztem MPEG-DOX-OH um MPEG-DOX-OAc und glycosyliertes MPEG. Außerdem kann aus der Mutterlauge ebenfalls das Oxazolin **85** isoliert werden.

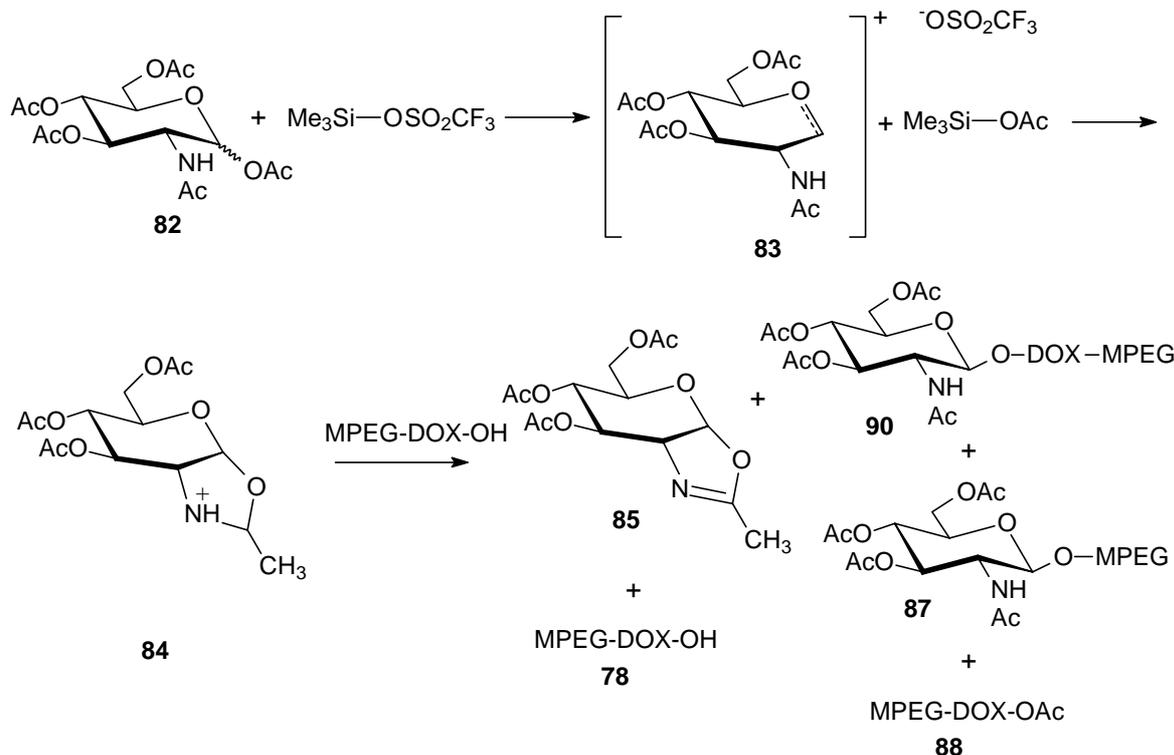


Abb. 44

Der nachgewiesene acetylierte Benzylalkohol spricht dafür, daß sich im Laufe der Umsetzung intermediär Trimethylsilylacetat gebildet hat, welches wiederum als Acetylierungsmittel mit dem polymergebundenem Benzylalkohol zu **88** reagiert. Da selektiv das β -Glycosid entsteht, ist anzunehmen, daß intermediär ein Oxazoliniumion (**84**) entsteht, welches teilweise als Glycosyldonor reagiert und teilweise durch Protonenabspaltung zum wesentlich stabileren Oxazolin abreagiert.

Statt dessen wurde die Glycosylierung mit dem entsprechenden Chlorid unter Silbertriflat-Katalyse durchgeführt. Auch hier konnte erst nach umfangreicher Optimierung Verbindung **90** in 89% erhalten werden.^{122,128} So war ein fünffacher Überschuß des Donors und vierfacher Überschuß an Silbertriflat notwendig, um die Oxazolinbildung weitgehend zurückzudrängen.

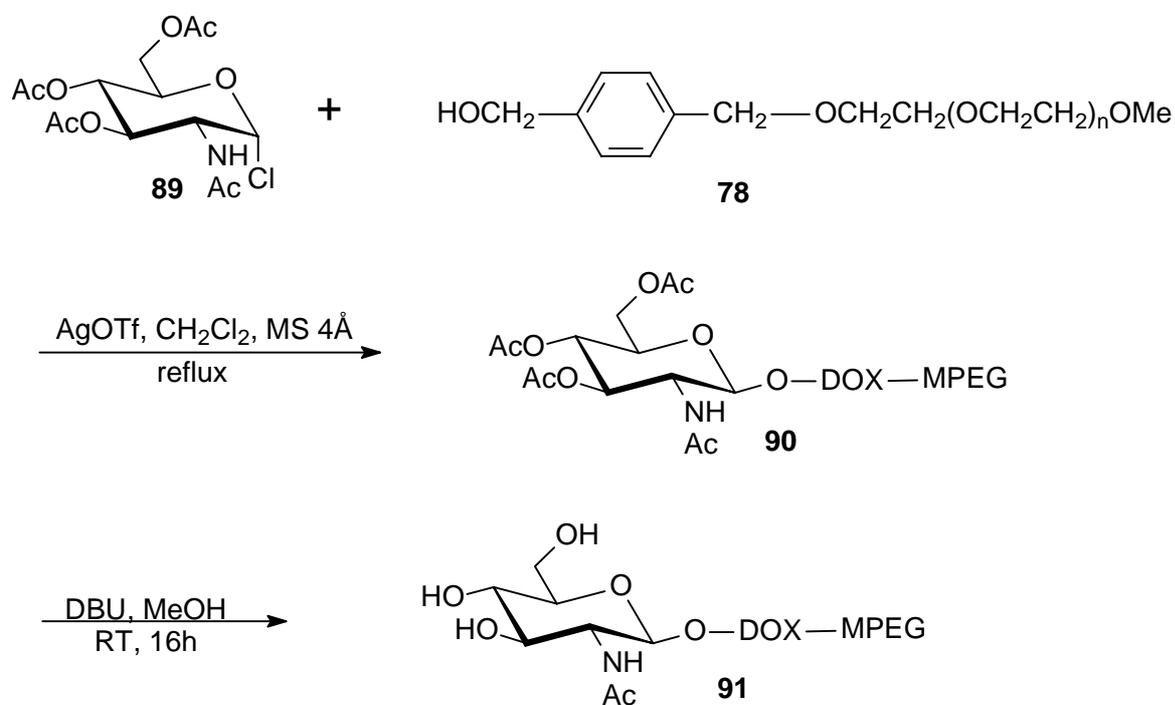
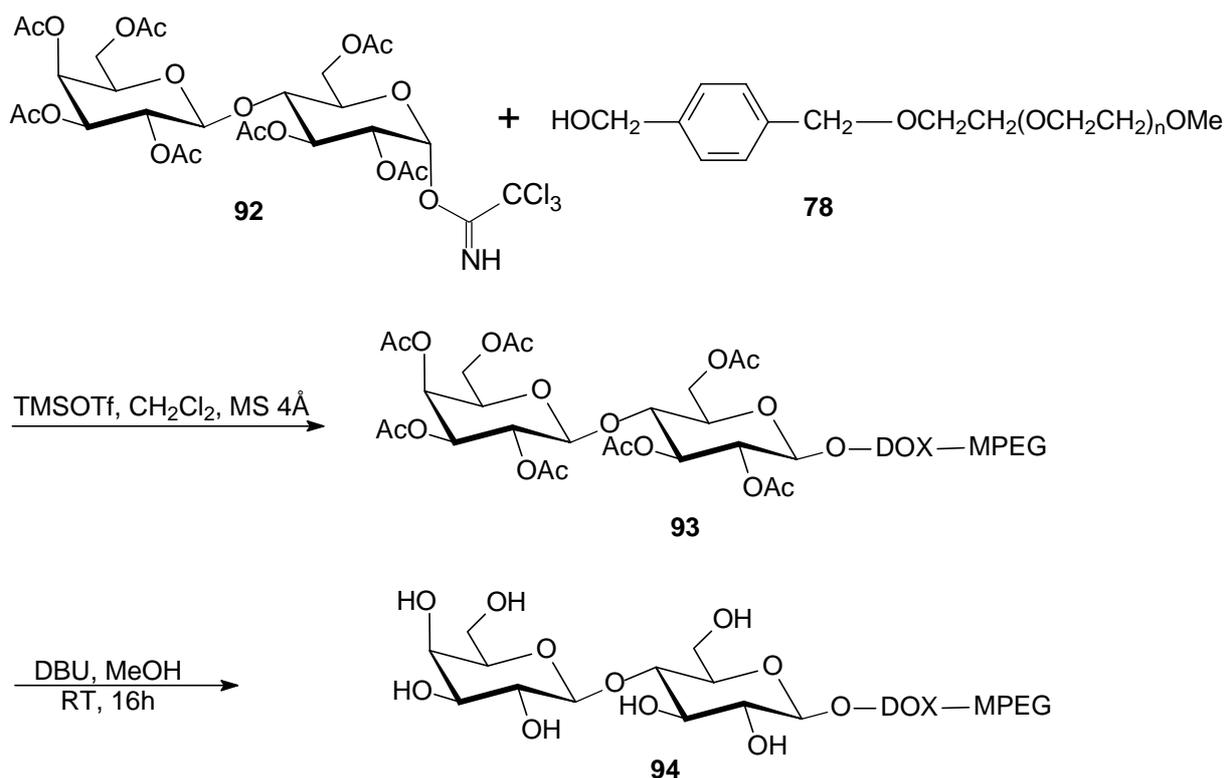
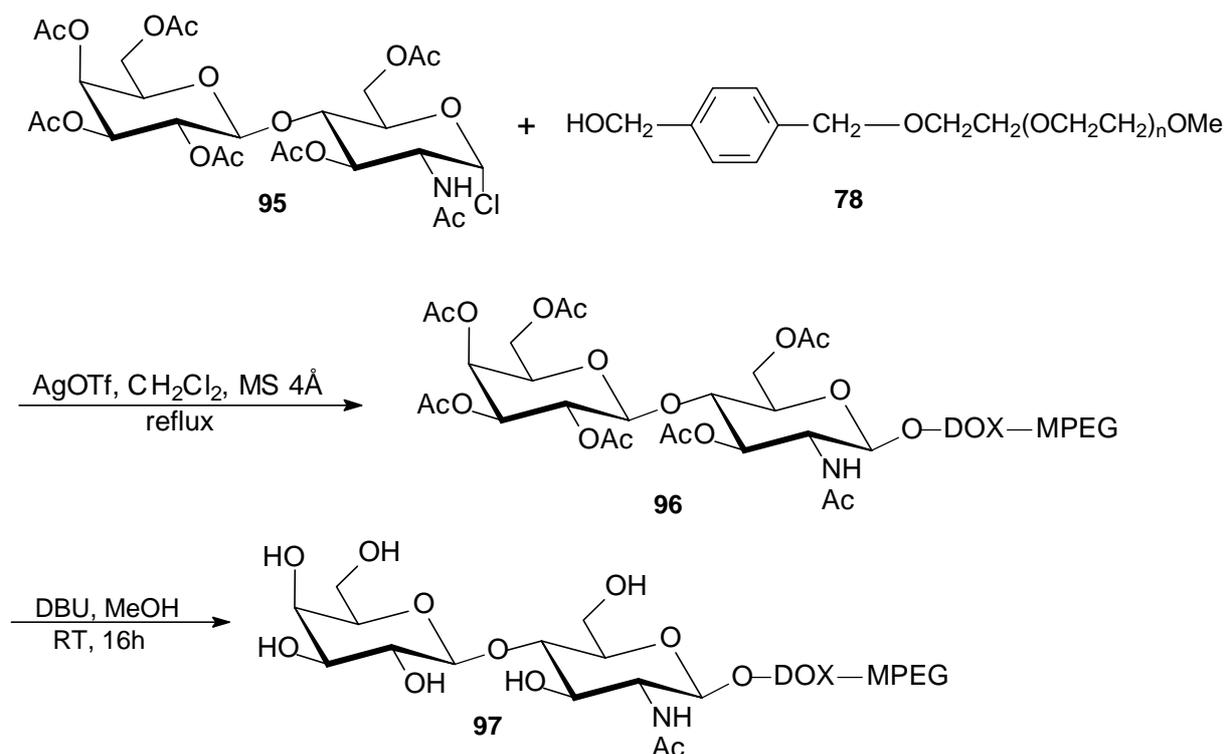


Abb. 45

Die Darstellung des Lactose-konjugierten Polymers wurde unter Standardbedingungen in Dichlormethan mit TMSOTf unter Argon durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte wiederum durch Ausfällung mit *tert*-Butylmethylether und anschließende Entschützung mit DBU in Methanol und lieferte stereoselektiv **94** in 76%.¹²²


Abb. 46

Mit den aus der Darstellung von **91** gewonnenen Erfahrungen konnte Lactosaminderivat **97** in guter Ausbeute (81% nach Entschützung) dargestellt werden.¹²² Auch hier konnte aus der Mutterlauge fast die komplette Differenz an nicht umgesetztem Donor als Oxazolin (15%) zurückgewonnen werden.


Abb. 47

Die Aufarbeitung der enzymatischen Transglycosylierungen erfolgt standardmäßig nach dem gleichen in Abb. 48 illustrierten Muster:

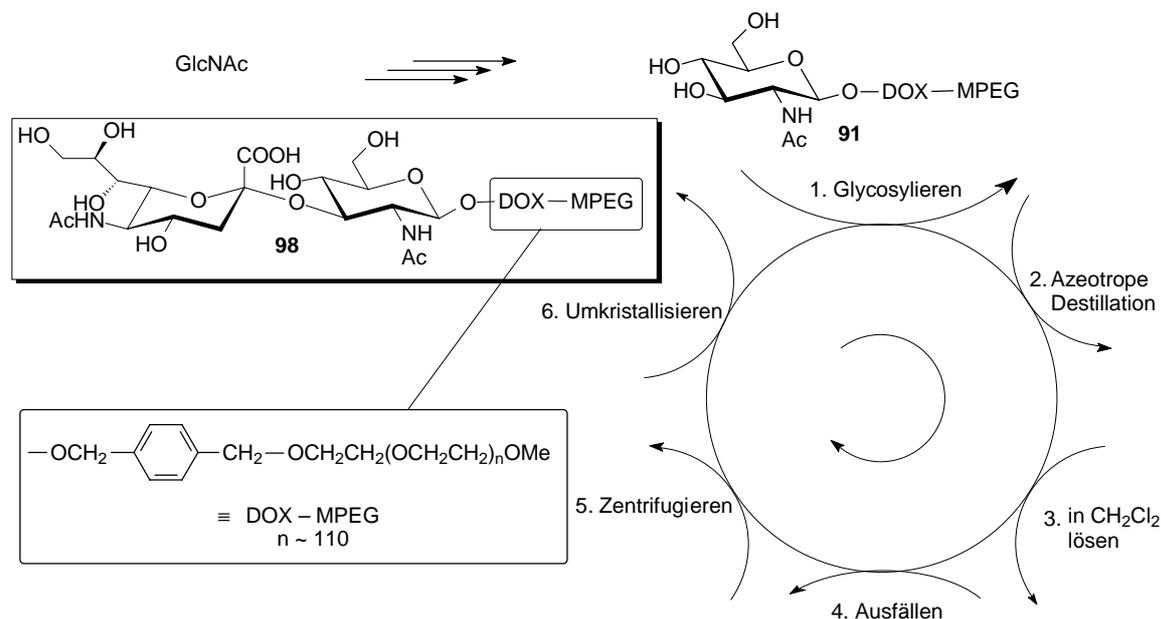


Abb. 48

Das polymergebundene Akzeptorglycosid wird im Hauptschritt der Reaktion unter weitgehend identischen Bedingungen wie bei einem nicht polymergebundenem Akzeptor umgesetzt. Diese Reaktion findet in homogener Lösung in dem üblicherweise verwendeten wäßrigen Puffermedium statt. Im nächsten Schritt wird nach Abbruch der Inkubation das Wasser durch azeotrope Destillation entfernt. Die vollständige Entfernung des Wassers ist in diesem Zusammenhang extrem wichtig, da feuchtes MPEG schwierig und teilweise nur unvollständig auszufällen ist. Obwohl MPEG stark hygroskopisch ist, kann adsorbiertes Wasser durch azeotrope Destillation mit Toluol oder durch Lyophilisierung fast vollständig entfernt werden. Die Reaktionsmischung wird im folgenden in Dichlormethan gelöst. Unlösliche Bestandteile wie anorganische Salze des Puffermediums oder hydrolysiertes, nicht transferiertes Glycosyldonor können in einem Zwischenschritt abfiltriert werden. Aus dem Filtrat kann durch einen Überschuss an *tert*-Butylmethylether das Polymer-Produktkonjugat ausgefällt werden. Ebenfalls denkbar ist die Ausfällung mit Diethylether. Jedoch hat sich die Ausfällung mit *tert*-Butylmethylether bewährt, da dieses einen wesentlich höheren Siede- und Flammpunkt besitzt und damit sicherer in der Handhabung ist.

Im folgenden wird das feinkristalline Polymer entweder zentrifugiert und vom Überstand abdekantiert oder filtriert. Eine Filtration des Produkts sollte entweder unter Überdruck oder

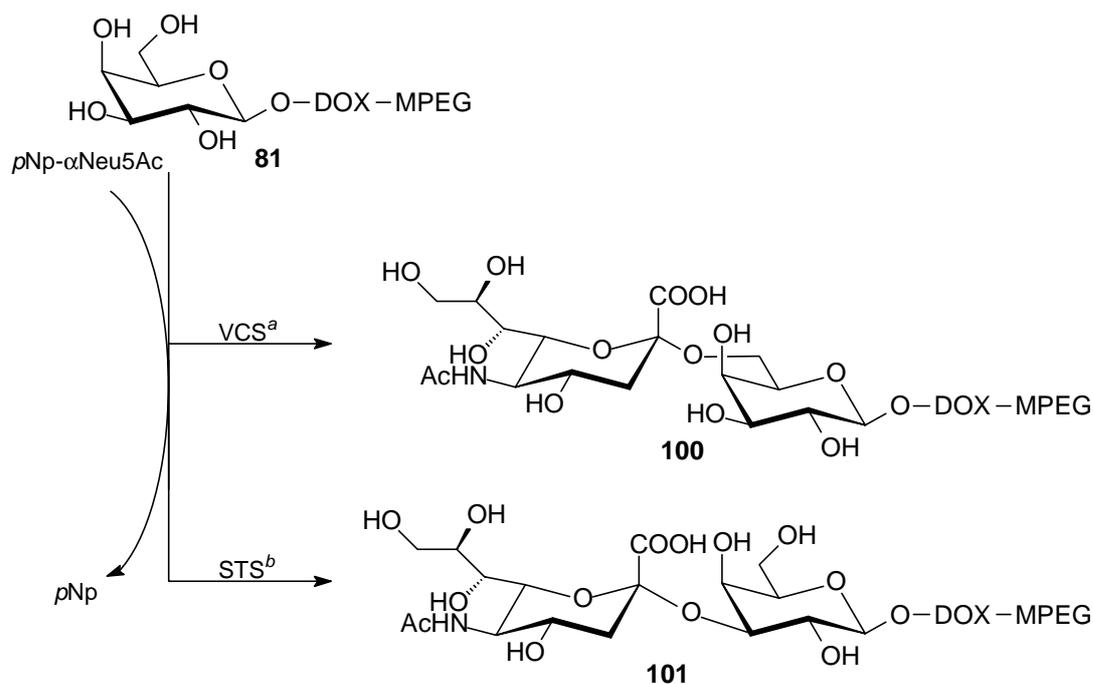
unter Stickstoffatmosphäre erfolgen, um die neuerliche Adsorption von Wasser weitgehend zu unterbinden. Als praktischer erwies sich allerdings die Zentrifugation. Das so erhaltene polymergebundene Produkt ist in den meisten Fällen hinreichend sauber, um es ohne weitere Aufreinigung in einem nachfolgenden Kopplungsschritt einzusetzen. Vor der Abspaltung des gewünschten Endprodukts vom Polymer empfiehlt es sich, das Produkt aus kaltem Ethanol umzukristallisieren.

Die Beladungsdichte der oben beschriebenen polymergebundenen Akzeptorstrukturen betrug in allen Fällen ca. 0.2 mmol Akzeptor pro 1 g Polymer, da jeweils eine nahezu quantitative Umsetzung stattgefunden hatte. Die Beladungsdichte läßt sich mit Hilfe des Integrationsverhältnisses der $^1\text{H-NMR}$ -Signale der MPEG-gebundenen Methoxygruppe und eines charakteristischen Zuckerprotons, meist des H-1-Protons, ermitteln. Bei einem Verhältnis von Methoxysignal zu H-1 von 3:1 hat demnach eine hundertprozentige Beladung stattgefunden.

4.4 Synthese sialylierter Glycokonjugate auf der Basis von Polyethylen-glycolmonomethylether

Nach diesem Prinzip werden die oben beschriebenen Akzeptorsubstrate unter Einsatz der Sialidasen aus *Vibrio cholerae* und *Salmonella typhimurium* sialyliert. Diese Enzyme haben sich aufgrund ihres guten Handlings und ihrer guten regioselektiven Eigenschaften bei gleichzeitig guter Verfügbarkeit bewährt.

Das *N*-Acetylglucosamin-MPEG-Konjugat **91** konnte so in 17% regioselektiv $\alpha(2-6)$ -sialyliert und in 24% $\alpha(2-3)$ -sialyliert werden. Die Ausbeute von 24% im Fall der Transsialylierung mit *Salmonella typhimurium* Sialidase konnte allerdings nur nach dreimaliger Wiederholung der Reaktion erreicht werden. So wurden nach der ersten Inkubation 13% Umsatz, nach der zweiten 21% und nach der dritten Umsetzung schließlich 24% erzielt.

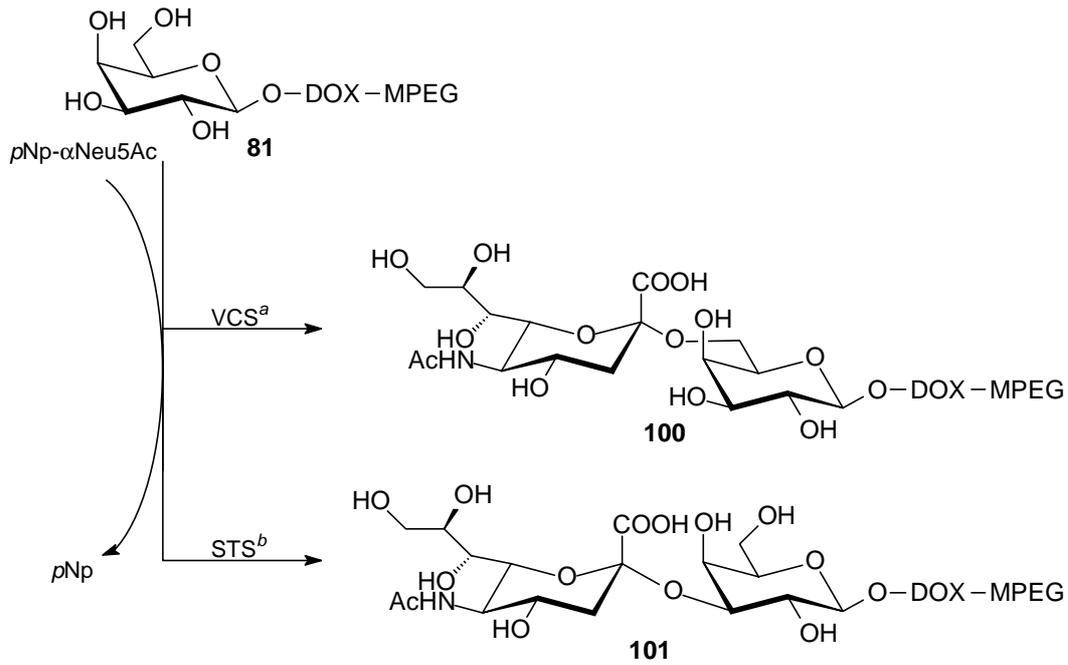


^a*Vibrio cholerae* Sialidase, ^b*Salmonella typhimurium* Sialidase

Abb. 50

Diese Beobachtung ist ein Indiz dafür, daß das polymergebundene Produkt ein wesentlich schlechteres Substrat für die Sialidase als das *p*-Nitrophenyl-Glycosid ist. Da die Aufarbeitung relativ schnell ist, bietet sich ein wiederholtes Inkubieren des nicht vollständig umgesetzten Substrats an. Leider konnte nur in diesem einen Fall ein bedeutend höherer Umsatz erzielt werden. Steigerungen der Ausbeute von 1-4% in den anderen Fällen rechtfertigten keine erneuten Inkubationszyklen. Es erscheint daher auch für ein Upscaling sinnvoller, die gleiche Reaktion in mehreren kleinen Batches durchzuführen.

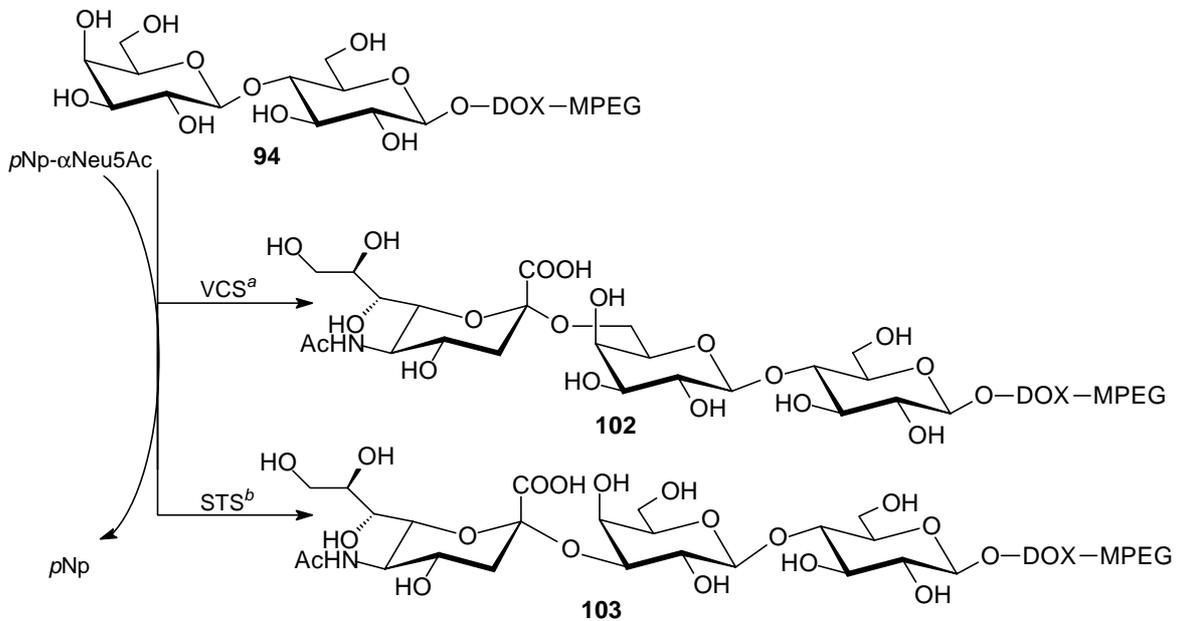
Galactosyliertes MPEG (81) konnte regioselektiv in 15% $\alpha(2-6)$ -sialyliert werden (100). Die $\alpha(2-3)$ -Sialylierung erfolgte in 16% (101), ebenfalls ohne Bildung regioisomerer Nebenprodukte. Diese Ausbeuten entsprechen erfreulicherweise weitgehend den Transferraten, die mit den freien Akzeptoren erreicht werden können bei gleichzeitig exzellenter Regioselektivität. Dieses Ergebnis unterstreicht, daß durch die Reaktion in homogener Phase auch weitgehend die gleichen kinetischen Parameter gelten wie bei einer nicht-polymerunterstützten Synthese.



^a*Vibrio cholerae* Sialidase, ^b*Salmonella typhimurium* Sialidase

Abb. 50

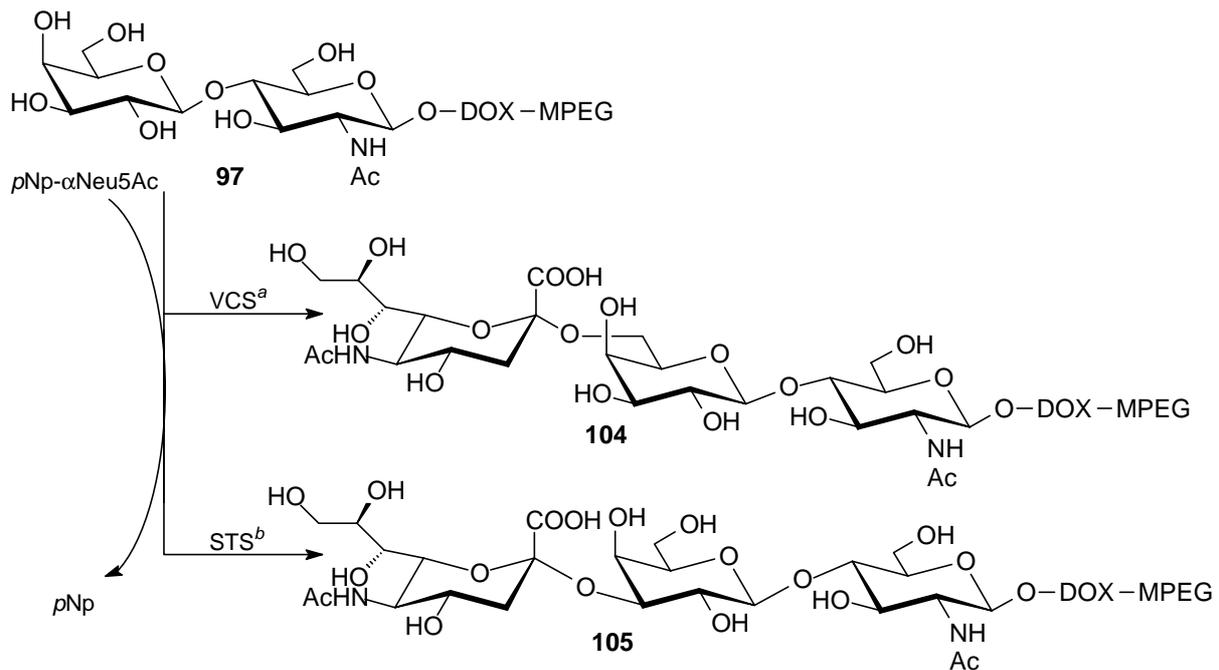
Auch im Fall des Lactosyl-DOX-MPEG **94** konnte für die *Vibrio cholerae* Sialidase katalysierte $\alpha(2-6)$ -Sialylierung eine vergleichbar gute Ausbeute von 16% beobachtet werden. Eine $\alpha(2-3)$ -Sialylierung konnte durch *Salmonella typhimurium* Sialidase-Katalyse in 15% erreicht werden.



^a*Vibrio cholerae* Sialidase, ^b*Salmonella typhimurium* Sialidase

Abb. 51

Bei der Transsialylierung des Lactosamin-Derivats **97** mit *Vibrio cholerae* Sialidase wurde eine etwas niedrigere Ausbeute von 12% erzielt, was in erster Linie darauf zurückzuführen war, daß sich hier im Laufe der Reaktion das $\alpha(2-3)$ -Regioisomer bildete. Die Inkubation wurde daher etwas früher abgebrochen. Mit *Salmonella typhimurium* Sialidase konnte das $\alpha(2-3)$ -Sialylactosamin-Derivat hingegen in befriedigenden 14% regioselektiv synthetisiert werden.



^a*Vibrio cholerae* Sialidase, ^b*Salmonella typhimurium* Sialidase

Abb. 52

Eine alternative Darstellungsmethode von Verbindung **104** und **105** führte über die On-Resin-Transgalactosylierung von *N*-Acetylglucosaminyl-DOX-MPEG **91** mit β -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. Hierbei wurde Konjugat **97** mit einer Ausbeute von 19% synthetisiert, was eine etwas niedrigere Ausbeute verglichen mit einem nicht polymergebundenen GlcNAc-Akzeptor bedeutet. Allerdings vereinfacht sich die Aufarbeitung der Reaktion durch Einsatz der polymerunterstützten Flüssigphasensynthese beträchtlich. Während im Fall des nichtkonjugierten Akzeptors die Aufarbeitung entweder durch Größenausschlußchromatographie oder durch Derivatisierung (z.B. Acetylierung) mit anschließender flashchromatographischer Aufreinigung erfolgt, kann das polymergebundene Produkt durch Ausfällung und anschließende Filtration noch am selben Tag aufgearbeitet und über Nacht in einer neuen Reaktion eingesetzt werden. Speziell beim Upscaling von Reaktionen bietet dieses Verfahren deutliche Vorteile, da der chromatographische Trennaufwand bei größeren

Maßstäben entsprechend wächst (hohes Säulen- bzw. Trennmittelvolumen, hoher Eluensbedarf, lange Trennzeiten).

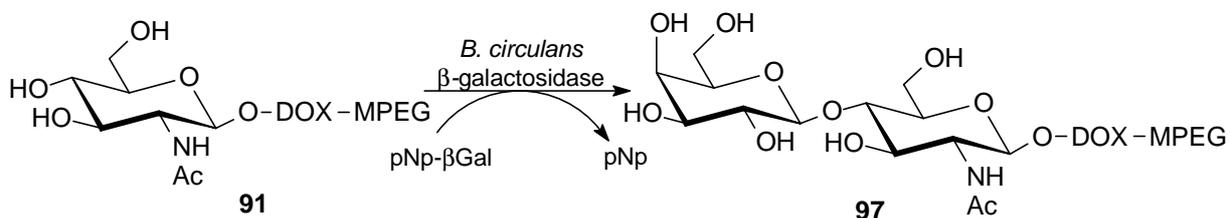


Abb. 53

Die anschließende Sialylierung von **97** erfolgte naturgemäß in gleichen Ausbeuten wie oben beschrieben, wobei zu erwähnen ist, daß die Ausbeuten bei einer Wiederholung der Reaktion immer in einem Bereich $\pm 2\%$ schwanken. Diese Bandbreite, die verglichen mit einer klassischen organisch-chemischen Reaktion mit 70-95% Ausbeute nicht sehr ins Gewicht fällt, kann bei den für Transsialylierung typischen Ausbeuten von 10-20% durchaus einen Unterschied in der Absolutausbeute von $\pm 10\%$ bedeuten. Das Problem liegt darin, daß der Zeitpunkt, an dem die Inkubation zweckmäßig abgebrochen wird, auch mit den exaktesten analytischen Methoden nicht immer genau bestimmt werden kann.

Die $\beta(1-3)$ -verknüpfte Lactosamin-analoge Verbindung konnte mit β -Galactosidase aus Rinderhoden in guten 23% dargestellt werden.

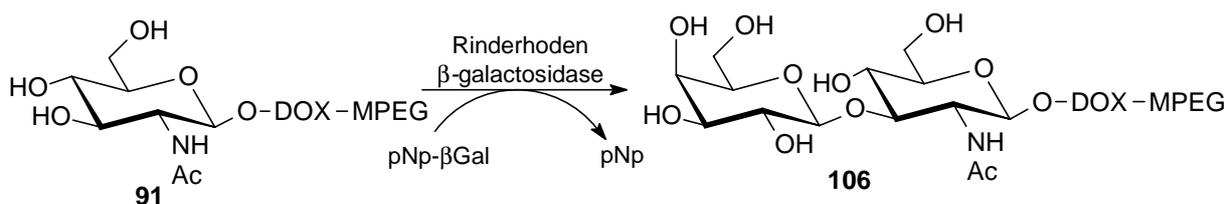
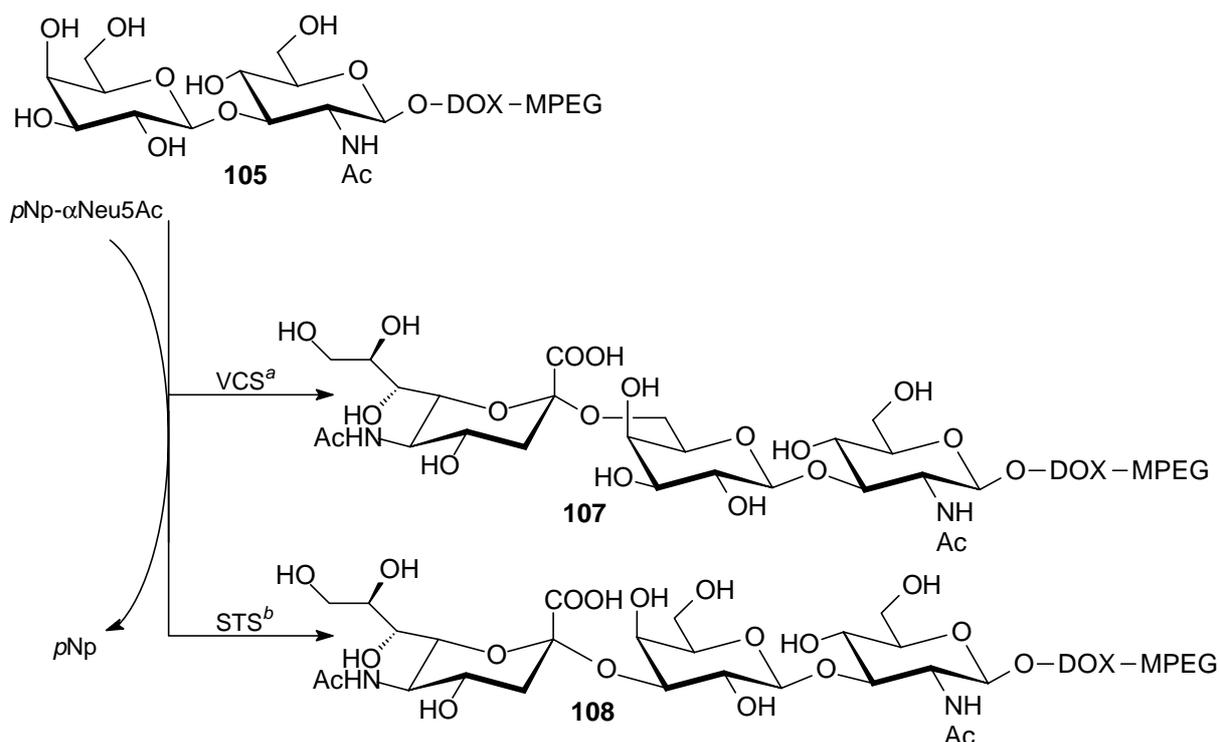


Abb. 54

Die sich anschließende Sialylierung verlief allerdings in geringfügig schlechteren Ausbeuten von 10% für die $\alpha(2-6)$ -Sialylierung bzw. 8% im Fall der $\alpha(2-3)$ -Sialylierung.



^a*Vibrio cholerae* Sialidase, ^b*Salmonella typhimurium* Sialidase

Abb. 55

Die regioisomeren Transferraten konnten wie in Kapitel 3.2 beschrieben durch Anwendung des Structural-Reporter-Group-Konzepts⁵¹ bestimmt werden. Auch im Fall der polymergebundenen Produkte lagen die zur Bestimmung der Regioselektivität der Reaktion besonders wichtigen axialen H-3-Protonen der Neu5Ac-Einheit außerhalb des Gebiets hoher Signaldichte. Auch ¹³C-Spektren, und hier besonders die Kohlenstoffkerne, die charakteristisch für die glycosidischen Verknüpfungen sind, konnten ohne Probleme analysiert werden. Generell konnte eine geringfügige Verbreiterung der Signale beobachtet werden, die in erster Linie auf die etwas verminderte Molekülbeweglichkeit in Lösung zurückzuführen ist und durch Messung der NMR-Spektren bei 30°C ausgeglichen werden kann. Allerdings konnten auch anhand der bei Raumtemperatur aufgenommenen Spektren die charakteristischen Kopplungskonstanten bestimmt werden, so daß der Einfachheit halber darauf verzichtet werden konnte.

Der wohl wichtigste Grund, daß bis heute keine generell anwendbare Methode zur Festphasensynthese eines beliebigen Heterooligosaccharids existiert, liegt in der mangelnden Verfügbarkeit synthetischer Glycosylierungsmethoden, bei denen Ausbeuten von wenigstens 99% bei gleichzeitiger absoluter Stereo- und Regiospezifität erzielt werden können. Das hat zur Folge, daß bei einer nicht vollständigen Umsetzung auf dem Resin neben dem Produkt auch nicht umgesetztes Edukt vorliegt, welches im nächsten Glycosylierungsschritt als

alternativer Akzeptor fungieren kann. Zum anderen erhält man bei der Abspaltung des Produkts vom Resin ein Produkt-Edukt-Gemisch. Dies würde Sinn und Zweck der Polymerphasensynthese in Frage stellen, da man so am Ende der Umsetzung wiederum einen aufwendigen chromatographischen Reinigungsschritt durchführen muß. Außerdem können im Fall einer mehrstufigen Reaktion bereits so komplexe Produktgemische entstehen, daß eine effektive Reinigung nur unter unvertretbar hohem Aufwand möglich ist.

Für enzymatische Oligosaccharid-Synthesen auf fester oder löslicher Phase bietet sich für diese Problemstellung eine relativ einfache Lösung an:

Bisher wurde die besondere Eigenschaft der Glycosidasen verwendet, um unter bestimmten Inkubationsbedingungen einen Glycosyltransfer zu katalysieren. Nutzt man aber die eigentlichen Fähigkeiten der *exo*-Glycosidasen, spezifische terminale Glycosyleinheiten stereoselektiv zu hydrolysieren, wobei interne Glycosyleinheiten intakt bleiben, so läßt sich dies zum gezielten hydrolytischen Abbau von nicht vollständig umgesetzten Akzeptoren einsetzen.

So kann zum Beispiel bei der Synthese von Sialyllactosamin (Abb. 52) nicht umgesetztes Lactosamin gezielt durch Inkubation einer verdünnten Lösung des Produkt-Edukt-Gemischs mit *Bacillus circulans* β -Galactosidase und *A. oryzae* *N*-Acetylhexosaminidase hydrolytisch abgebaut werden. In diesem Fall läßt sich diese Reaktion aufgrund ähnlicher Inkubationsbedingungen sogar als Ein-Topf-Reaktion durchführen. Die terminale *N*-Acetylneuraminsäureeinheit des Produkts fungiert hier als eine Art Schutzgruppe und maskiert die Galactosyleinheit so gegen einen Abbau durch die β -Galactosidase. Freie Galactose und *N*-Acetylglucosamin können in einem weiteren Aufreinigungszyklus (Abb. 56) problemlos abgetrennt werden.

Nach diesem Muster wurden alle obenbeschriebenen polymergebundenen Produkte, die mit den jeweiligen Regioisomeren verunreinigt waren, vor ihrer Abspaltung einer selektiven Glycosidase-katalysierten Hydrolyse unterworfen.

4.5 Abspaltung vom Polymer

Für die Abspaltung vom Polymer bieten sich, wie eingangs erwähnt, verschiedene Methoden an. Durch Hydrierung unter milden Bedingungen (5% Pd/C in Ethanol bei Raumtemperatur und 1 atm H₂) wird die Bindung zwischen dem Polymer und dem Dioxyxylylrest gespalten.¹²¹ Man erhält somit das 1-*O-p*-Methylbenzyl-geschützte Oligosaccharid. Unter stärkeren Hydrierungsbedingungen (10% Pd/C, 50%ige Essigsäure, 50°C, 3 atm H₂) wird der MPEG-DOX-Linker komplett entfernt und man erhält die 1-OH-freie Verbindung.¹²¹

Mit beiden Methoden werden in den meisten Fällen gute bis sehr gute Abspaltungsraten erzielt. Allerdings kann es vorkommen, daß der Abspaltprozeß nicht vollständig verläuft, was wahrscheinlich auf die Komplexbildung von Metallkationen mit Polyethylenglycol zurückzuführen ist. Ähnliche Effekte wurden von *Bergbreiter et al.* beschrieben.¹²⁹ Daß man die Komplexbildung bestimmter Metallkationen mit PEG auch zur selektiven Spaltung unter recht schonenden Bedingungen nutzen kann, zeigt eine weitere Methode, bei der eine Acetolyse unter Scandium(III)trifluormethansulfonat-Katalyse durchgeführt wird.¹³⁰ Bei diesem Verfahren wird PEG so komplexiert, daß die benachbarte Benzylfunktion einer Acetolyse durch Acetanhydrid zugänglich ist. Ein durchaus nützlicher Nebeneffekt ist die komplette Acetylierung des Oligosaccharids. Allerdings muß aufgrund des Vorhandenseins der terminalen Neu5Ac-Funktion in einem Vorschrift die Carboxygruppe verestert werden, da einige terminal sialylierte Oligosaccharide unter Acetylierungsbedingungen zur Lactonbildung neigen. Dieses ließe sich zwar abschließend auch wieder hydrolysieren, aber aus Gründen der einfacheren NMR-Analytik wurde die Bildung eines Methylesters als der bevorzugte Weg gewählt.

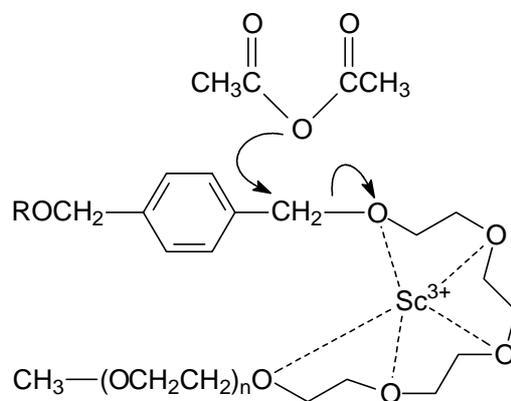


Abb. 57

Somit kann durch einen einzigen Schritt das Produkt vom Polymer abgespalten werden (Abb. 57) und gleichzeitig in ein für die NMR-Analytik geeignetes Schutzgruppenmuster überführt werden. Hierbei bleibt am anomeren Zentrum des reduzierenden Zuckers eine selektiv abspaltbare Schutzgruppe erhalten. Kahne *et al.* berichteten z. B. über die Abspaltung von *p*-Methoxybenzylethern durch 1%ige Trifluoressigsäure in Dichlormethan.¹³¹

Das Konzept einer selektiv abspaltbaren Schutzgruppe am anomeren Zentrum ist insbesondere interessant, wenn das Produkt in einer anschließenden Blocksynthese weiterverwendet werden soll.

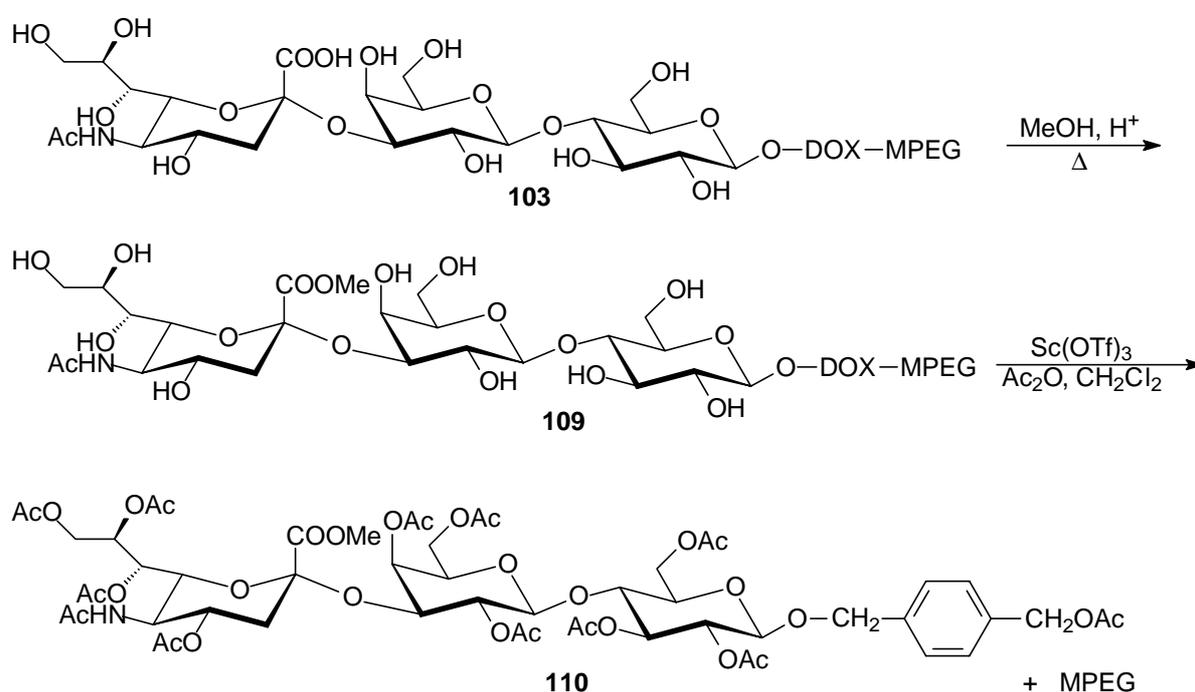
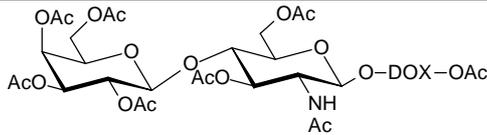
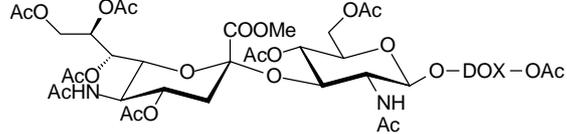
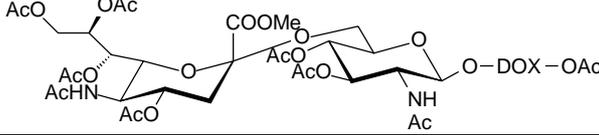
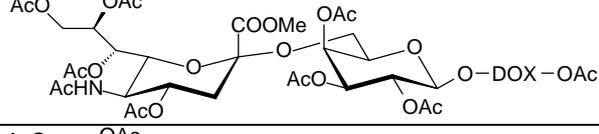
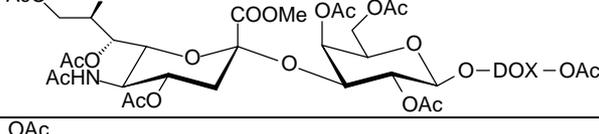
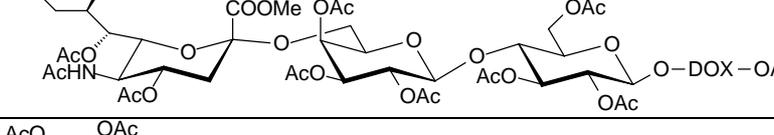
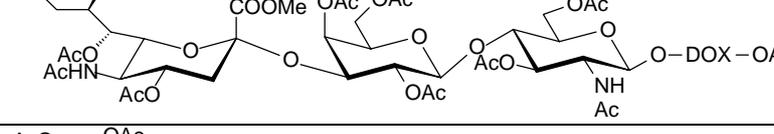
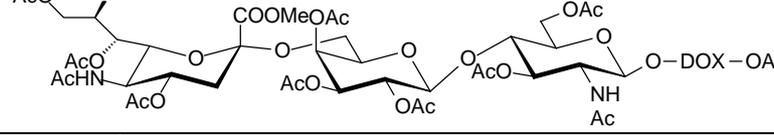
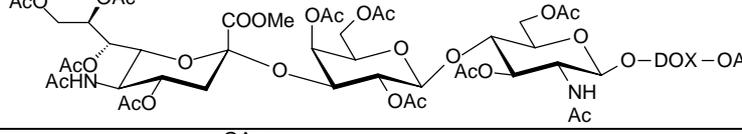
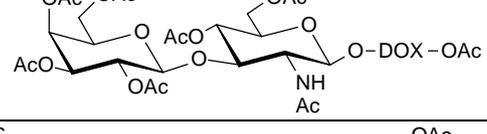
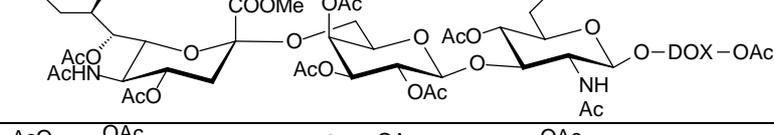
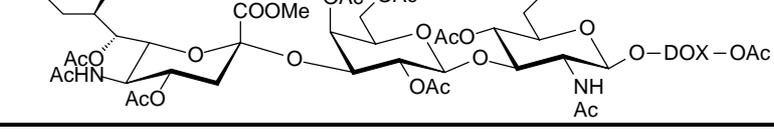


Abb. 58

Nach diesem Schema wurden die Sialyloligosaccharide in durchgehend hohen Ausbeuten von zumeist über 95% vom Polymer abgespalten und als peracetylierte Derivate gewonnen (s. Tabelle 2).

MPEG-Konjugat	Produkt	Gesamtausbeute nach Abspaltung
97		97a 17%
98		98a 22%
99		99a 16%
100		100a 13%
101		101a 15%
102		102a 14%
103		103a 14%
104		104a 11%
105		105a 12%
106		106a 21%
107		107a 9%
108		108a 7%

Tab. 2 Abspaltung vom Polymer

5 Zusammenfassung

Sialyloligosaccharide spielen eine zentrale Rolle in diversen biologischen Prozessen. Zur Untersuchung dieser Funktionen ist die Synthese von Oligosaccharidsequenzen mit terminal α -glycosidisch gebundenen Sialinsäureeinheiten von großer Bedeutung, da diese Strukturen bei der Isolierung aus biologischem Material meist nur in geringer Menge und unzureichender Reinheit gewonnen werden können.

Mit klassisch-chemischen Methoden sind hier bereits in den letzten Jahren beachtliche Fortschritte erzielt worden, allerdings sind die Synthesen präparativ meist sehr aufwendig und verlaufen nur selten stereo- sowie regioselektiv und mit befriedigenden Ausbeuten. Eine in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewinnende Alternative bietet hier die enzymatische Glycosidsynthese. Neben den Sialyltransferasen bieten durch geeignete Techniken auch die Sialidasen, die *in vivo* für die Hydrolyse von Sialyloligosacchariden zuständig sind, die Möglichkeit zum Sialyltransfer auf geeignete Akzeptorsubstrate. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sialidasen aus *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium*, Newcastle Disease Virus sowie die Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* auf ihr Transglycosylierungspotential untersucht und eine Reihe biologisch relevanter Strukturen dargestellt.

Speziell unter dem Gesichtspunkt der Stereo- und Regioselektivität bietet die Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* eine überzeugende Alternative zu etablierten Verfahren. Die Fähigkeit des regio-spezifischen N-Acetylneuraminsäure-Transfers konnte synthetisch zur Darstellung von zahlreichen biologisch relevanten Neu5Ac α (2–3)Gal β 1-R-Motiven genutzt werden, die bisher sowohl klassisch-chemisch als auch enzymatisch nur äußerst schwer zugänglich waren. Insgesamt zeigt die Trans-Sialidase den Sialyltransferasen vergleichbare Eigenschaften des selektiven N-Acetylneuraminsäure-Transfers, ohne daß komplexe Zuckernucleotid-Donoren eingesetzt werden müssen bei einer gleichzeitig hohen Variabilität des Aglycons an der terminalen β -Galactosyleinheit.

So konnten unter anderem die regioselektiv sialylierten T_N- und T-Antigen-Epitope [Neu5Ac α (2-3/6)GalNAc α -O-Ser/Thr bzw. Neu5Ac α (2-3/6)Gal β (1-3)GalNAc α -O-Ser/Thr] synthetisiert werden, die als tumorassoziierte Zelloberflächenstrukturen bekannt sind und unter anderem in GM₁-Glycolipiden, menschlichen Erythrozyten und in einem Knochenmark-Makrophagenlektin als terminaler Glycanteil nachgewiesen worden sind. Die Darstellung der oben genannten und analoger Oligosaccharid-Strukturen ist für immunologische

Untersuchungen und für die Entwicklung von Impfstoffen gegen tumorassoziierte Antigene von besonderem Interesse.

Desweiteren konnte durch eine Kombination klassisch-chemischer mit chemoenzymatischen Methoden sialylierte Epitope der Lacto-N-tetraose und der Lacto-N-neotetraose synthetisiert werden. Diese Pentasaccharide spielen als Hauptbestandteile der Humanmilch eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen bakterielle und virale Infektionen des Gastrointestinaltrakts von Kleinkindern.

Durch eine Thioglycosid-unterstützte Blocksynthese von transglycolytisch hergestellten Building Blocks ließen sich gezielt die Vorteile der jeweiligen Methoden nutzen und Nachteile in bezug auf Stereo- und Regioselektivität, Transfereffizienz und intermediäre Reinigungsschritte umgehen.

Schließlich konnte gezeigt werden, daß die polymerunterstützte Flüssigphasensynthese auf Polyethylenglykol eine in hohem Maße geeignete Methode zum Aufbau biologisch relevanter Glykokonjugate und ihrer Derivate mit chemoenzymatischen Glycosylierungsmethoden ist. Aufgrund des experimentellen Konzepts einer Synthese in gelöster Phase und der Aufarbeitung unter Festphasenbedingungen können sowohl die kinetischen Vorteile einer Reaktion in Lösung genutzt als auch der weitgehende Verzicht auf zeit- und arbeitsaufwendige chromatographische Reinigungsschritte erreicht werden.

5 Summary

Sialylated oligosaccharides are playing a major role in a diversity of biological processes. The growing awareness of the crucial role sialylation plays in the regulation of cellular and molecular recognition in biological systems has led to an increased interest in this area. In order to establish structure-reactivity-relationships procedures have to be developed that allow the stereoselective synthesis of terminally sialylated oligosaccharides in sufficient quantities since isolation from natural sources has proved to be less effective and excludes access to non-natural derivatives.

Despite considerable recent progress classical chemical methods lack experimental simplicity and stereospecificity. Chemoenzymatic approaches employing sialyltransferases and sialidases as synthetic tools have offered an alternative access to the family of sialylated glycostructures with excellent stereospecificity.

The concept of using the reversible nature of glycosidases for the synthesis of various oligosaccharides has reached the status of a facile procedure and found extended use as a simple, cheap and efficient glycosylation method.

The major objective of this work was to demonstrate the feasibility of the transsialylation approach for the synthesis of various sialyl oligosaccharides and to develop a versatile toolbox for regioselective sialylation procedures that allow syntheses of a wide variety of natural and non-natural sialyl oligosaccharides.

By selecting glycosidases with different regioselectivities such as *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium* and Newcastle disease virus sialidase and trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* synthetic access towards the two major naturally occurring glycosylation patterns, $\alpha(2-3)$ - and $\alpha(2-6)$ -sialylation, could be achieved.

Concerning stereo- and regioselectivity, especially the trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* represents a convincing alternative to established procedures. Its ability to regio-specifically transfer *N*-acetylneuraminic acid in $\alpha(2-3)$ -position to Gal β 1-R motifs has been employed to synthesize a variety of biologically relevant structures of the type Neu5Ac $\alpha(2-3)$ Gal β 1-R.

Using the described techniques a diversity of sialylated glycostructures could be synthesized including regioselectively sialylated epitopes of T- and T_N-antigen [T: Neu5Ac $\alpha(2-3/6)$ -Gal $\beta(1-3)$ GalNAc α -O-Ser/Thr, T_N: Neu5Ac $\alpha(2-3/6)$ GalNAc α -O-Ser/Thr]. These compounds

are known to be tumor-associated antigens present in glycoproteins on the surface of tumor cells. Furthermore, they have been discovered in GM₁-glycolipids, on human erythrocytes and in a bone marrow macrophage lectin. The design of synthetic and semi-synthetic oligosaccharide epitopes for immunological testing and as potential cancer vaccines is, therefore, of special interest.

By a combined classical chemical and chemoenzymatic approach sialylated lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose were synthesized. These pentasaccharides play, as major constituents of human milk, an important role in the immune response of infants against bacterial and viral infections of the gastrointestinal tract.

Building blocks, prepared by transglycosylation procedures, were coupled in a block synthesis applying thioglycoside-methods. Thus, the synthetic advantages of the respective methods could be exploited, and disadvantages with regard to stereo- and regioselectivity, transfer efficiency and intermediate purification were avoided.

It could be demonstrated that the combination of glycosidase-catalyzed transglycosylation procedures with polymer-supported solution-phase methodology on polyethylene glycol represents a simple and useful method for the synthesis of biologically relevant glycoconjugates. Based on the solubility of the polymer under reaction conditions and its insolubility during workup in various ethers, the synthetic step can be performed in aqueous solution phase whereas workup follows solid-phase procedures and, therefore, avoids time-consuming chromatographic steps.

6. Experimenteller Teil

Allgemeine Angaben

Dünnschichtchromatographie

Alle Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) verfolgt. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption sowie durch Anfärben mit 20%iger ethanolischer Schwefelsäure und anschließender Wärmebehandlung. Sialylierte Verbindungen wurden mit einer Resorcinlösung in verdünnter Salzsäure¹³² oder einer stark verdünnten Lösung einer 1:1-Mischung aus Naphthoresorcin und 20%iger ethanolischer Schwefelsäure mit anschließender Wärmebehandlung detektiert.

Säulenchromatographie

Kieselgelchromatographie wurde nach der Flash-Methode mit Kieselgel 60 (230-400 mesh, 40-63 μm , Merck) durchgeführt.

Für Trennungen durch Größenausschlußchromatographie wurde Biogel P2 in silanisierten Glassäulen verwendet.

Trennungen an Anionentauscherharz wurden mit Dowex 1x2 (200-400 mesh, Cl-Form, Serva) durchgeführt.

HPLC-Trennungen wurden an einer Niederdruckgradientenpumpe L-6250 (Merck/Hitachi) und einem Diodenarray-Detektor L-3000 mit der Software LiChrograph V4.0 (Merck) an LiChrospher NH₂-Aminosäulen (5 μm , 4 x 250 mm) und LiChrospher RP18-Reversed Phase-Säulen (5 μm , 4 x 250 mm) durchgeführt.

NMR-Spektroskopie

¹H- und ¹³C-NMR- sowie die entsprechenden 2D-Spektren wurden mit Bruker-Spektrometern AMX-400 (100.67 MHz bei ¹³C) und DRX-500 (125.83 MHz bei ¹³C) bei 300 K gemessen. Als interner Standard für ¹H-NMR-Spektren bei Messungen in deuterierten organischen Lösungsmitteln diente Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm). Bei ¹H-Messungen in D₂O wurde auf den HDO-Peak ($\delta = 4.80$ ppm) als Referenz geeicht, bei ¹³C-Messungen wurde mit Acetonitril ($\delta = 1.47$ ppm) als internem Standard kalibriert. Die Zuordnung der Signale erfolgte, wenn notwendig, durch ¹H-¹H-COSY-, TOCSY-, ¹H-¹³C-COSY-, HMQC- oder HMBC-Experimente. Die Konnektivitäten der Kohlenstoffatome wurde durch DEPT-Experimente ermittelt. Bei der Nomenklatur linearer Ringsysteme wurden die Protonen bzw.

Kohlenstoffatome durch eine vom reduzierenden zum terminalen Zucker aufsteigende Indizierung gekennzeichnet.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Olympus BH Polarisationsmikroskop mit Mettler-Heiztisch FP 82 ermittelt und sind unkorrigiert.

Polarimetrie

Die Bestimmung der Drehwerte erfolgte mit einem Perkin-Elmer-Polarimeter 241 (Natrium-D-Linie 589 nm, Küvettenlänge 1 dm) bei 25°C.

Massenspektroskopie

FAB-Massenspektroskopie wurde an einem VG Analytical 70-250 S Spektrometer (Microtech) durchgeführt.

MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem Bruker Biflex III im positive reflector mode aufgenommen. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure verwendet.

Gefriertrocknung

Wäßrige Lösungen wurden an einer Lyovac GT (Leybold-Heraeus) gefriergetrocknet.

Zentrifugen:

Eppendorf Tischzentrifuge 5415

Spektralphotometrie

Spektrometrische Messungen wurden mit einem Beckmann-Spektralphotometer DU-62 in Polyethylenküvetten mit 1cm Schichtdicke gemessen.

pH-Messungen

pH-Werte wurden mit einem WTW pH521-pH-Meter gemessen.

Enzyme

Sialidase (EC 3.2.1.18) aus *Vibrio cholerae* (Chiron Behring GmbH)

Sialidase (EC 3.2.1.18) aus *Clostridium perfringens* (New England Biolabs GmbH)

Sialidase (EC 3.2.1.18) aus *Salmonella typhimurium* (New England Biolabs GmbH)

Sialidase (EC 3.2.1.18) aus Newcastle Disease Virus (Oxford Glycosystems Ltd., UK)

Trans-Sialidase (EC 3.2.1.18) aus *Trypanosoma cruzi* (Präparation aus *E. coli*-Klon)

β -Galactosidase (EC 3.2.1.23) aus Rinderhoden (Rohpräparation)

β -Galactosidase (EC 3.2.1.23) aus *Bacillus circulans* (Daiwa Kasei Co., Ltd., Japan)

Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Acetylierung

Die OH-freie Verbindung wird in Pyridin gelöst und mit Essigsäureanhydrid (2 Äquivalente je OH-Funktion) versetzt. Bei Raumtemperatur wird bis zur vollständigen Umsetzung gerührt. Anschließend wird unter vermindertem Druck eingengt und der Rückstand mehrmals mit Toluol kodestilliert. Sofern erforderlich erfolgt eine flashchromatographische Reinigung des Produktes.

AAV 2: Deacetylierung

Variante a: Deacetylierung unter Zemplén-Bedingungen¹³³

Die zu entschützende Verbindung wird in absolutem Methanol gelöst und mit einer frisch bereiteten Lösung aus Natriummethanolat in absolutem Methanol (0.1 M) versetzt, bis ein pH-Wert von 8 - 8.5 erreicht ist. Bei Raumtemperatur wird bis zur vollständigen Umsetzung gerührt. Im folgenden neutralisiert man mit Dowex 50W-X8 H⁺-Ionentauscher, filtriert und wäscht mit Methanol. Unter vermindertem Druck wird bis zur Trockene eingengt.

Variante b: Deacetylierung mit DBU

Die zu entschützende Verbindung wird in absolutem Methanol gelöst und mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt (pro 10 ml Methanol etwa 0.7 mmol DBU, entspricht ca. 100µl). Bei Raumtemperatur wird bis zur vollständigen Umsetzung gerührt. Im folgenden neutralisiert man mit Dowex 50W-X8 H⁺-Ionentauscher, filtriert und wäscht mit Methanol. Unter vermindertem Druck wird bis zur Trockene eingengt.

AAV 3 Assay zur Ermittlung der Aktivität der Sialidase

Zu 100 µl einer Stammlösung aus 9.0 mg (0.02 mmol) *p-Np*-Neu5Ac in 8 ml Inkubationspuffer (s. AAV 6-9) werden 10µl einer Lösung von lyophilisierter Sialidase in verdünntem (1:10) Inkubationspuffer (s. AAV 6-9) gegeben. In Blindansätzen wird die Enzymzugabe durch Inkubationspuffer A bzw. unbehandeltes Trägermaterial ersetzt. Die Inkubationen erfolgen über 30 min bei 37°C und werden durch Zusatz von jeweils 900 µl 0.1 M Natriumcarbonatlösung abgebrochen. Es wird die Extinktion bei 400 nm gemessen und die Differenzen zu den jeweiligen Blindwerten bestimmt. Die Aktivitäten ergeben sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$A = \frac{\Delta E_{400} \cdot V_A}{t \cdot \varepsilon \cdot V_E \cdot V_P \cdot d} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right]$$

wobei	$V_A = 1 \text{ ml}$	Analysenvolumen
	$V_E = 0.002 \text{ ml}$	Volumen der Enzymlösung
	$V_P = 0.1 \text{ ml}$	Probenvolumen
	$\varepsilon = 16.02 \text{ } \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Extinktionskoeffizient
	$t = 30 \text{ min}$	Inkubationsdauer
	$d = 1 \text{ cm}$	Schichtdicke der Küvette

Der Extinktionskoeffizient ε wird aus einer Konzentrationsreihe von *p*-Nitrophenol, gelöst in 9 Teilen 0.1 M Natriumcarbonatlösung und einem Teil Inkubationspuffer, ermittelt.

AAV 4: Enzymatische Transgalactosylierung mit β -Galactosidase aus *Bacillus circulans*

Eine Lösung aus Akzeptor und *p*-Np- β Gal (3 Äquiv.) in Inkubationspuffer (50 mM NaOAc, pH 5.0) wird mit 1 U β -Galactosidase aus *Bacillus circulans*, gelöst in 100 μ l Puffer, versetzt und bei 30°C im Schüttelbad inkubiert. Nach beendeter Reaktion wird das Enzym durch fünfminütiges Erhitzen in einem siedenden Wasserbad denaturiert. Freies *p*-Nitrophenol wird durch Extraktion mit Ethylacetat entfernt. Die Aufreinigung erfolgt über eine Biogel-P2-Säule (16 x 900 mm) durch Elution mit destilliertem Wasser.

AAV 5: Enzymatische Transgalactosylierung mit β -Galactosidase aus Rinderhoden

Eine Lösung aus Akzeptor und *p*-Np- β Gal (3 Äquiv.) in McIlvaine-Puffer (50 mM NaH_2PO_4 / Zitronensäure, pH 4.3) wird mit 1 U β -Galactosidase aus Rinderhoden, gelöst in 100 μ l Puffer, versetzt und bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Nach beendeter Reaktion wird das Enzym durch fünfminütiges Erhitzen in einem siedenden Wasserbad denaturiert. Freies *p*-Nitrophenol wird durch Extraktion mit Ethylacetat entfernt. Die Aufreinigung erfolgt über eine Biogel-P2-Säule (16 x 900 mm) durch Elution mit destilliertem Wasser.

AAV 6: Enzymatische Transsialylierung: Allgemeine Prozedur

Abhängig von der Art der verwendeten Sialidase werden *p*-Np-Neu5Ac (**18**) und der jeweilige Akzeptor in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:7 in dem entgasten Inkubationspuffer mit der entsprechenden Sialidase inkubiert. Inkubationszeit, Puffer und Inkubationstemperatur hängen von der Quelle der Sialidase ab (s. die jeweiligen Arbeitsvorschriften).

Der Verlauf der Reaktion wird per HPLC¹³⁴ und dünnschichtchromatographisch (Ethanol / 1 M Ammoniumacetat (pH 7.4) = 5:1, alternativ: n-Butanol/Essigsäure/Wasser 5:2:2) verfolgt. Nach vollständiger Reaktion wird die Inkubation durch fünfminütiges Erhitzen auf 100°C abgebrochen. Die Mischung wird mit Kationenaustauscher Dowex 50 WX 8 (H⁺-Form) auf pH 6.8 angesäuert und zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert, mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 5 ml verdünnt und auf eine Ionentauschersäule (Dowex 1x2, Phosphatform, 1.1 x 19 cm) aufgetragen. Unreagierter Akzeptor wird mit 200 ml destilliertem Wasser von der Säule gewaschen. Mit 5 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.8) werden 5 ml-Fractionen von der Säule eluiert und diese mit dem Resorcin-Sprühreagenz¹³² auf *N*-Acetylneuraminsäuregehalt getestet. Produktfraktionen werden vereinigt, lyophilisiert, in 2 ml destilliertem Wasser gelöst, auf eine Biogel-P2-Säule (16 x 900 mm) aufgetragen und mit destilliertem Wasser eluiert. Nicht umgesetzter Akzeptor wird quantitativ zurückgewonnen. Sialyloligosaccharid-enthaltende Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert. NMR-Proben werden vor der Messung mehrmals in D₂O gelöst und lyophilisiert.

AAV 7: Enzymatische Transsialylierung mit Sialidase aus *Vibrio cholerae*

Eine Lösung aus 50 µmol *p*-Np-Neu5Ac (**18**) und 350 µmol Akzeptor (Donor-Akzeptor-Verhältnis: 1:7) gelöst in 250 µl entgastem Inkubationspuffer (0.1 M NaOAc, 0.5 mM CaCl₂, pH 5.5) wird mit 1 U Sialidase aus *Vibrio cholerae* bei 30°C gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 6 inkubiert.

AAV 8: Enzymatische Transsialylierung mit Sialidase aus *Clostridium perfringens*

Eine Lösung aus 50 µmol *p*-Np-Neu5Ac (**18**) und 350 µmol Akzeptor (Donor-Akzeptor-Verhältnis: 1:7) gelöst in 250 µl entgastem Inkubationspuffer (0.1 M NaOAc, 0.5 mM CaCl₂, pH 5.1) wird mit 1 U Sialidase aus *Clostridium perfringens* bei 37°C gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 6 inkubiert.

AAV 9: Enzymatische Transsialylierung mit Sialidase aus *Salmonella typhimurium*

Eine Lösung aus 50 µmol *p*-Np-Neu5Ac (**18**) und 250 µmol Akzeptor (Donor-Akzeptor-Verhältnis: 1:5) gelöst in 250 µl entgastem Inkubationspuffer (0.1 M NaOAc, pH 5.1) wird mit 1 U Sialidase aus *Salmonella typhimurium* bei 30°C gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 6 inkubiert.

AAV 10: Enzymatische Transsialylierung mit Sialidase aus Newcastle Disease Virus

Eine Lösung aus 50 μmol *p*-Np-Neu5Ac (**18**) und 250 μmol Akzeptor (Donor-Akzeptor-Verhältnis: 1:5) gelöst in 250 μl entgastem Inkubationspuffer (0.1 M NaOAc, pH 5.5) wird mit 0.25 U Sialidase aus Newcastle Disease Virus bei 37°C gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 6 inkubiert.

AAV 11: Enzymatische Transsialylierung mit Trans-Sialidase aus Trypanosoma cruzi

Eine Lösung aus 50 μmol MU-Neu5Ac (**19**) und 45 μmol Akzeptor (0.9 Äquiv.) gelöst in 2.5 ml entgastem Inkubationspuffer (50 mM Natriumcacodylat/HCl, pH 6.9, 50 μg BSA (ultrareinst), 0.02% NaN₃) wird mit 1 U rekombinanter *T. cruzi* Trans-Sialidase-Präparation bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsverfolgung und Aufarbeitung erfolgt analog AAV 6.

AAV 12: Selektive Sialidase-katalysierte Hydrolyse der regioisomeren Nebenprodukte

Nach vollständiger Transsialylierung wird die Reaktion durch 6-minütiges Erhitzen auf 90°C abgebrochen. Die Mischung wird mit dem Inkubationspuffer auf 600 μl verdünnt. Dann werden für die Hydrolyse von α (2-6)-verknüpften Nebenprodukten 10 mU *Clostridium perfringens* Sialidase bzw. für die Hydrolyse von α (2-3)-verknüpften Nebenprodukten 10 mU Newcastle Disease Virus Sialidase zugegeben. Die Mischung wird 1 min bei 25°C inkubiert. Um die Reaktion abubrechen werden 400 μl Ethanol zugefügt und die Reaktionsmischung in einem offenen Reaktionsgefäß 5 min auf 90°C erhitzt. Die weitere Aufreinigung erfolgt analog der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 6.

**AAV 13: Enzymatische Transsialylierung auf polymergebundene Akzeptoren:
Allgemeine Prozedur**

Der Verlauf der Reaktion wird photometrisch bei 400 nm und dünnschichtchromatographisch (Ethanol / 1 M Ammoniumacetat (pH 7.4) = 5 : 1) verfolgt unter Verwendung des Resorcin-Sprühreagenzes¹³² zum Nachweis von N-Acetylneuraminsäure. Die Inkubation wird durch Zugabe von 1 ml 0.1 M Na₂CO₃-Lösung gefolgt von einer 3-minütigen Ultraschall-Behandlung abgebrochen. Die Mischung wird mit Kationentauscher Dowex 50 WX 8 (H⁺-Form) auf pH 6.8 eingestellt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und zweimal mit je 10 ml Toluol codestilliert. Der Rückstand wird in 10 ml trockenem Dichlormethan aufgenommen und mit *tert*-Butylmethylether (200 ml) ausgefällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, mit 50 ml *tert*-Butylmethylether gespült und aus Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeutebestimmung erfolgt aufgrund der sehr viel größeren Masse des

Polymers per NMR, indem man die Signale des Produkts mit den Signalen des noch auf dem Polymer gebundenen Edukts in Relation setzt.

AAV 14: Enzymatische Transsialylierung mit Sialidase aus *Vibrio cholerae* auf polymergebundene Akzeptoren

Eine Lösung aus 50 μmol *p*-Np-Neu5Ac (**18**) (21 mg) und 25 μmol Akzeptor (Donor-Akzeptor-Verhältnis 2 : 1) in 150 μl entgastem Inkubationspuffer (0.1 M NaOAc, 0.5 mM CaCl_2 , pH 5.5) wird mit 1 U Sialidase aus *Vibrio cholerae* bei 30°C inkubiert. Die eingesetzte Akzeptormenge bezieht sich hierbei auf die Beladungsdichte des auf dem Polymer gebundenen Akzeptors und kann daher je nach Beladung variieren.

AAV 15: Enzymatische Transsialylierung mit Sialidase aus *Salmonella typhimurium* auf polymergebundene Akzeptoren

Eine Lösung aus 50 μmol *p*-Np-Neu5Ac (**18**) und 20 μmol Akzeptor (Donor-Akzeptor-Verhältnis 2.5 : 1) in 150 μl entgastem Inkubationspuffer (0.1 M NaOAc, pH 5.1) wird mit 1 U Sialidase aus *Salmonella typhimurium* bei 30°C inkubiert. Die eingesetzte Akzeptormenge bezieht sich hierbei auf die Beladungsdichte des auf dem Polymer gebundenen Akzeptors und kann daher je nach Beladung variieren.

AAV 16: Abspaltung MPEG-gebundener Produkte vom Polymer

Ca. 30 μmol des polymergebundenen Trisaccharids werden in 1.5 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Essigsäureanhydrid (1.5 ml) und Scandium-(III)-trifluormethansulfonat [$\text{Sc}(\text{OTf})_3$, 10 mg, 0.02 mmol] werden nacheinander hinzugefügt. Nach 6 h Rühren unter Argon wird die Mischung in einem Eisbad auf 0°C gekühlt und *tert*-Butylmethylether (150 ml) zur Ausfällung des Polymeradduktes zugegeben. Das Filtrat wird zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 10 ml trockenem Methanol suspendiert und 100 mg Kationenaustauscher-Harz (Dowex 50 WX 8 H^+ -Form) werden hinzugefügt. Nach 6 h Rühren bei Raumtemperatur wird der Ionenaustauscher abfiltriert. Das Filtrat wird eingengt und durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (üblicherweise Petrolether / Ethylacetat = 3 : 1) gereinigt. Man erhält das am anomeren Zentrum *p*-Acetoxymethylbenzyl-substituierte Oligosaccharid.

Allyl-2-azido-2-desoxy-3-O-(β-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosid (8)

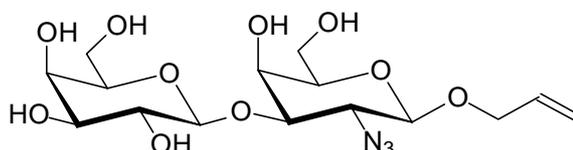
2-Azido-2-desoxygalactosid (183 mg, 0.75 mmol) wird mit *p*-Np-βGal (678 mg, 2.25 mmol) nach AAV 5 umgesetzt. Man erhält Verbindung **8** in 24% Ausbeute (74 mg).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.⁶⁶

8 C₁₅H₂₅N₃O₁₁ (M 423.37)

weißer amorpher Feststoff

[α]_D²⁰ = -1.9° c (1.0, H₂O)

**Methyl-2-desoxy-3-O-(β-D-galactopyranosyl)-α-D-lyxo-hexopyranosid (12)**

2-Desoxygalactosid **11a** (151 mg, 0.85 mmol) wird mit *p*-Np-βGal (768 mg, 2.55 mmol) nach AAV 5 umgesetzt. Man erhält Verbindung **12** in 21% Ausbeute (61 mg).

12 C₁₃H₂₄O₁₀ (M 340.32)

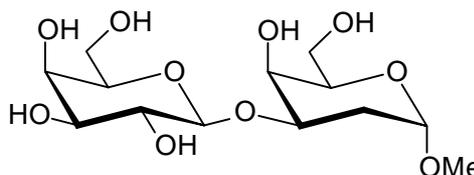
Ausbeute: 61 mg (21%)

weißer amorpher Feststoff

[α]_D²⁰ +51° (c 0.7, H₂O)

Ber.: 45.88, H: 7.11

Gef.: 45.53, H: 7.28



¹H NMR (D₂O) δ 5.16 (dd, *J*_{1,2eq} 0.8 Hz, *J*_{1,2ax} = 3.8 Hz, 1 H, *H*-1), 4.52 (d, *J*_{1',2'} = 8.0 Hz, 1 H, *H*-1'), 4.20 (ddd, *J*_{3,4} = 2.8 Hz, 1 H, *H*-3), 4.11 (bd, *J*_{3,4} = 2.6 Hz, 1 H, *H*-4), 4.01 (ddd, *J*_{5,6a} = 6.4 Hz, *J*_{5,6b} = 6.6 Hz, *J*_{6a,6b} = 12.2 Hz, 1 H, *H*-5), 3.93 (bd, 1 H, *H*-4'), 3.82 - 3.66 (m, 5 H, *H*-6a, *H*-6b, *H*-6a', *H*-6b', *H*-5'), 3.62 (dd, *J*_{3',4'} = 3.6 Hz, 1 H, *H*-3'), 3.54 (s, 3 H, OCH₃), 3.57 (dd, *J*_{1',2'} = 7.8 Hz, *J*_{2',3'} = 9.6 Hz, 1 H, *H*-2'), 2.03 - 1.98 (m, 2 H, *H*-2ax, *H*-2eq).

¹³C NMR (D₂O) δ 105.02 (C-1'), 98.69 (C-1), 76.07 (C-5'), 74.19 (C-3), 73.84 (C-3'), 71.85 (C-2'), 71.09 (C-5), 69.62 (C-4'), 67.72 (C-6), 66.39 (C-4), 62.11 (C-6'), 54.64 (OCH₃), 31.53 (C-2).

Methyl-2-desoxy-4-O-(β-D-galactopyranosyl)-α-D-lyxo-hexopyranosid (13)

2-Desoxygalactosid **11a** (140 mg, 0.79 mmol) wird mit *p*-Np-βGal (722 mg, 2.4 mmol) nach AAV 4 umgesetzt. Man erhält **13** in 36% Ausbeute (96 mg).

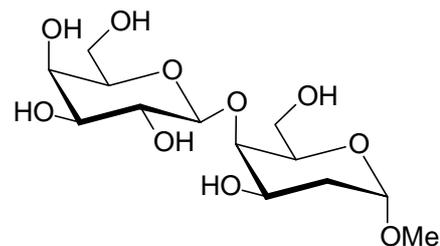
13 C₁₃H₂₄O₁₀ (M 340.32)

weißer amorpher Feststoff

[α]_D²⁰ +11.2° (c 0.6 H₂O)

Ber.: C: 45.88, H: 7.11

Gef.: C: 45.67, H: 7.02



¹H NMR (D₂O) δ 5.11 (dd, $J_{1,2eq} = 0.9$ Hz, $J_{1,2ax} = 3.6$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.50 (d, $J_{1',2'} = 7.8$ Hz, 1 H, *H*-1'), 4.16 (ddd, $J_{3,4} = 2.8$ Hz, 1 H, *H*-3), 4.09 (bd, $J_{4,5} = 1.0$ Hz, 1 H, *H*-4), 3.88 (ddd, $J_{5,6a} = 6.4$ Hz, $J_{5,6b} = 6.6$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, 1 H, *H*-5), 3.81 (dd, $J_{3',4'} = 3.2$ Hz, 1 H, *H*-4'), 3.72 (m, 2 H, *H*-6a, *H*-6b), 3.67 (m, 2 H, *H*-6a', *H*-6b'), 3.68 (m, 1 H, *H*-5'), 3.57 (dd, $J_{2',3'} = 10.0$ Hz, 1 H, *H*-3'), 3.54 (s, 3 H, OCH₃), 3.48 (dd, $J_{2,3'} = 10.0$ Hz, 1 H, *H*-2'), 2.00-1.96 (m, 2 H, *H*-2ax, *H*-2eq).

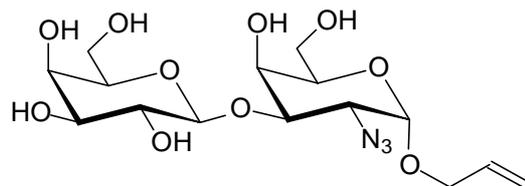
¹³C NMR (D₂O) δ 104.32 (C-1'), 98.74 (C-1), 75.84 (C-4), 75.21 (C-5'), 73.23 (C-3'), 71.56 (C-2'), 71.21 (C-5), 68.94 (C-4'), 68.25 (C-3), 67.88 (C-6), 61.83 (C-6'), 54.79 (OCH₃), 31.48 (C-2).

Allyl-2-azido-2-desoxy-3-*O*-(β-D-galactopyranosyl)-α-D-galactopyranosid (14)

2-Azido-2-desoxygalactosid **6b** (200 mg, 0.82 mmol) wird mit *p*-Np-βGal (740 mg, 2.46 mmol) nach AAV 5 umgesetzt. Man erhält **14** in 21% Ausbeute (72 mg).

14 C₁₅H₂₅N₃O₁₁ (M 423.37)

weißer amorpher Feststoff

[α]_D²⁰ = +18.7° (c 0.8, H₂O)

¹H NMR (D₂O) δ 5.95 (m, 1 H, OCH₂-CH=CH₂), 5.32-5.25 (m, 2 H, OCH₂-CH=CH₂), 5.01 (d, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.49 (d, $J_{1',2'} = 7.8$ Hz, 1 H, *H*-1'), 4.10 (ddd, $J_{4,5} = 1.0$ Hz, 1 H, *H*-5), 4.07 (dd, $J_{3,4} = 3.6$, 1 H, *H*-4), 4.02 (m, 2 H, *H*-4', OCH₂-CH=CH₂), 3.99 (dd, $J_{2,3} = 10.4$ Hz, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, 1 H, *H*-3), 3.87-3.80 (m, 3 H, *H*-2, *H*-6a, *H*-6b,), 3.77-3.71 (m, 2 H, *H*-6a', *H*-6b'), 3.66 (m, 1 H, *H*-5'), 3.57 (dd, $J_{2',3'} = 10.0$ Hz, $J_{3',4'} = 3.2$ Hz, 1 H, *H*-3'), 3.42 (dd, 1 H, *H*-2').

¹³C NMR (D₂O) δ 133.15 (OCH₂-CH=CH₂), 117.97 (OCH₂-CH=CH₂), 104.19 (C-1'), 96.51 (C-1), 78.52 (C-3), 75.11 (C-5'), 72.56 (C-3'), 72.02 (C-4), 70.65 (C-2'), 70.52 (C-5), 68.70 (C-4'), 62.31 (C-6'), 61.35 (C-2), 61.04 (C-6), 60.77 (OCH₂-CH=CH₂).

Phenyl-2-azido-2-desoxy-3-O-(β-D-galactopyranosyl)-1-thio-β-D-glucopyranosid (15)

2-Azido-2-desoxythiogalactosid **7** (244 mg, 0.82 mmol) wird mit *p-Np*-βGal (740 mg, 2.46 mmol) nach AAV 4 umgesetzt. Man erhält Verbindung **15** in 19% Ausbeute (71 mg).

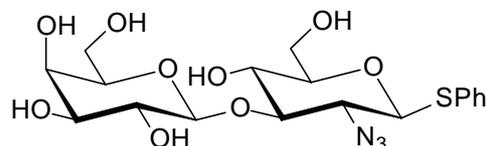
15 C₁₈H₂₅N₃O₉S (M 459.47)

weißer amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.7^{\circ}$ c (0.5, H₂O)

Ber.: C 47.05 H 5.48 N 9.14

Gef.: C 46.87 H 5.46 N 9.07



¹H NMR (D₂O) δ 7.58 (m, 2 H, Ph), 7.33 (m, 3H, Ph), 4.92 (d, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.45 (d, $J_{1,2'} = 7.7$ Hz, 1 H, *H*-1'), 3.90-3.88 (m, 2 H, *H*-6a, *H*-2), 3.91 (dd, $J_{3,4'} = 3.8$ Hz, 1 H, *H*-4'), 3.53 (dd, 1 H, *H*-4), 3.83 (dd, 1 H, *H*-3), 3.80 (dd, 1 H, *H*-6b), 3.76-3.74 (m, 2 H, *H*-6a', *H*-6b'), 3.69 (m, 1 H, *H*-5'), 3.61 (dd, $J_{2,3'} = 9.8$ Hz, $J_{3,4'} = 3.0$ Hz, 1 H, *H*-3'), 3.50 (dd, 1 H, *H*-2'), 3.49 (m, 1 H, *H*-5),

¹³C NMR (D₂O) δ 133.61-129.17 (Ph), 104.18 (C-1'), 91.75 (C-1), 82.77 (C-3), 76.09 (C-5'), 73.19 (C-3'), 69.46 (C-4), 71.21 (C-2'), 76.02 (C-5), 69.27 (C-4'), 61.92 (C-6'), 55.41 (C-2), 61.29 (C-6).

Phenyl-2-azido-2-desoxy-4-O-(β-D-galactopyranosyl)-1-thio-β-D-glucopyranosid (16)

2-Azido-2-desoxythiogalactosid **7** (244 mg, 0.82 mmol) wird mit *p-Np*-βGal (740 mg, 2.46 mmol) nach AAV 4 umgesetzt. Man erhält Verbindung **16** in 24% Ausbeute (90 mg).

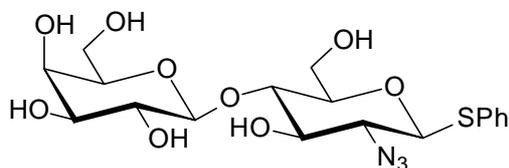
16 C₁₈H₂₅N₃O₉S (M 459.47)

weißer amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 6.7^{\circ}$ c (0.6, H₂O)

Ber.: C 47.05 H 5.48 N 9.14

Gef.: C 46.99 H 5.41 N 9.09



¹H NMR (D₂O) δ 7.58 (m, 2 H, Ph), 7.33 (m, 3H, Ph), 4.95 (d, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.46 (d, $J_{1,2'} = 8.2$ Hz, 1 H, *H*-1'), 3.97 (m, 1 H, *H*-6a), 3.93 (dd, $J_{3,4'} = 4.0$ Hz, $J_{4,5'} = 1.0$ Hz, 1 H, *H*-4'), 3.86 (m, 1 H, *H*-6b), 3.81 (dd, 1 H, *H*-2), 3.75 (dd, 1 H, *H*-3), 3.74 (dd, 1 H, *H*-4), 3.73-3.71 (m, 2 H, *H*-6a', *H*-6b'), 3.65 (dd, $J_{2,3'} = 9.8$ Hz, $J_{3,4'} = 3.0$ Hz, 1 H, *H*-3'), 3.61 (m, 1 H, *H*-5), 3.61 (m, 1 H, *H*-5'), 3.47 (dd, 1 H, *H*-2').

^{13}C NMR (D_2O) δ 133.27-128.92 (Ph), 103.76 (C-1'), 103.51 (C-1), 73.05 (C-3), 76.22 (C-5'), 73.35 (C-3'), 79.11 (C-4), 71.69 (C-2'), 75.31 (C-5), 69.31 (C-4'), 61.85 (C-6'), 55.97 (C-2), 60.79 (C-6).

***O*-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-3-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-D-glucopyranose (17)**

Nach AAV 11 werden Lactose (**61**) und der Neu5Ac-Donor **19** für 14 h mit *Trypanosoma cruzi* Sialidase inkubiert. Man erhält Verbindung **17** in 49% Ausbeute (13.9 mg).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.¹³⁵

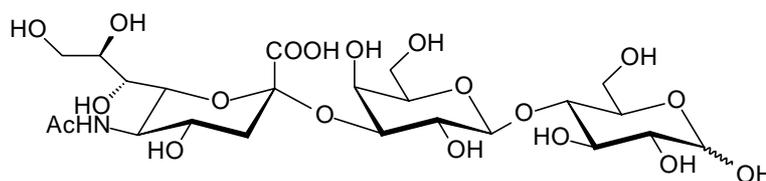
17 $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{NO}_{19}$ (M 633.55)

weißer amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 31.4^\circ$ (0.6, H_2O)

Ber.: C 43.60 H 6.20 N 2.21

Gef.: C 44.12 H 5.81 N 2.54



***O*-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-6)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-(1-3)-L-threonin (20)**

Die Verbindungen **4a** und **18** werden 20 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 36 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **20** in 16% Ausbeute (4.9 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 10% (3.1 mg).

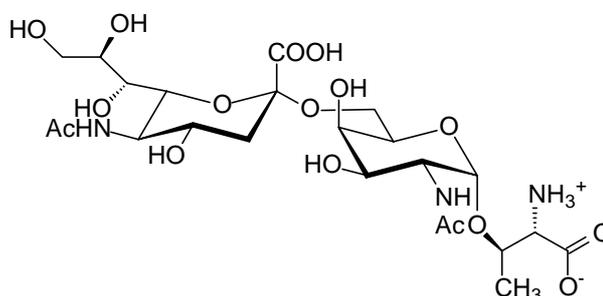
20 $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{16} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (M 613.57)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} +61^\circ$ (c 0.2, H_2O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 42.51, H 6.67, N 6.47.

Gef.: C 42.86, H 6.56, N 6.51.



^1H NMR (D_2O) δ 4.91 (dd, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, 1 H, H -1), 4.37 (dq, $J_{\alpha\text{CH}, \beta\text{CH}_3} = 2.4$ Hz, 1 H, Thr β CH), 4.16 (dd, $J_{2,3} = 11.1$ Hz, 1 H, H -2), 4.12 (dd, $J_{6a,6b} = 10.4$ Hz, 1 H, H -6a), 4.02 (dd, $J_{4,5} = 0.8$ Hz, $J_{3,4} = 2.7$ Hz, 1 H, H -4), 3.99 (m, 1 H, H -5), 3.90-3.86 (m, 3 H, Thr α CH, H -8', H -9a'), 3.83 (dd, $J_{5',6'} = 10.2$ Hz, 1 H, H -5'), 3.70 (dd, $J_{6',7'} = 1.4$ Hz, 1 H, H -6'), 3.66 - 3.62 (m,

3 H, *H*-9b', *H*-4', *H*-6b), 3.58 (dd, $J_{7',8'} = 8.9$ Hz, 1 H, *H*-7'), 2.71 (dd, $J_{3'eq,3'ax} = 12.0$ Hz, $J_{3'eq,4'} = 4.6$ Hz, 1 H, *H*-3'eq), 2.06, 2.03 (2s, 6 H, COCH₃), 1.69 (t, $J_{3'ax,4'} = 12.2$ Hz, 1 H, *H*-3'ax), 1.35 (d, $J_{\beta\text{CH},\gamma\text{CH}_3} = 6.4$ Hz, 3 H, Thr γ CH₃).

¹³C NMR (D₂O) δ 175.77 (COCH₃'), 174.91 (COCH₃), 174.26 (C-1'), 173.84 (ThrCO), 101.03 (C-2'), 99.58 (C-1), 76.03 (Thr β CH), 73.23 (C-6'), 72.60 (C-8'), 71.92 (C-5), 69.17 (C-7'), 69.04 (C-4'), 68.94 (C-4), 68.49 (C-3), 64.54 (C-6), 63.48 (C-9'), 59.89 (Thr α CH), 52.67 (C-5'), 50.33 (C-2), 40.87 (C-3'), 22.87 (COCH₃'), 22.74 (COCH₃), 19.01 (Thr γ CH₃).

***O*-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-(1-3)-L-threonin (**21**)**

Die Verbindungen **4a** und **18** werden 24 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 20 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **21** in 15% Ausbeute (4.6 mg), bei Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase in 10% (3.1 mg).

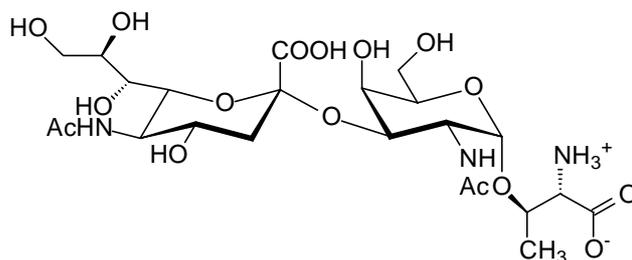
21 C₂₃H₃₉N₃O₁₆ (M 613.57)

$[\alpha]_D^{20} +69^\circ$ (*c* 0.4, H₂O).

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 45.02, H 6.41, N 6.85.

Gef.: C 44.38, H 6.58, N 6.69.



¹H NMR (D₂O) δ 4.94 (d, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.42 (dq, $J_{\alpha\text{CH},\beta\text{CH}} = 2.6$ Hz, 1 H, Thr β CH), 4.27 (dd, $J_{2,3} = 11.2$ Hz, *H*-2), 4.17 (dd, $J_{4,5} = 0.8$ Hz, *H*-4), 4.07 (m, 1H, *H*-5), 4.02 (dd, $J_{3,4} = 2.9$ Hz, 1 H, *H*-3), 3.90 – 3.87 (m, 3 H, *H*-8', *H*-9a', Thr α CH), 3.86 (dd, $J_{5',6'} = 10.0$ Hz, *H*-5'), 3.72 (dd, $J_{4',5'} = 9.6$ Hz, *H*-4'), 3.69 - 3.65 (m, 4 H, *H*-6a, *H*-6b, *H*-6', *H*-9b'), 3.59 (dd, $J_{7',8'} = 9.4$ Hz, *H*-7'), 2.77 (dd, $J_{3'eq,4'} = 4.5$ Hz, $J_{3'ax,3'eq} = 12.2$ Hz, 1 H, *H*-3'eq'), 2.05, 2.02, (2s, 6H, COCH₃), 1.79 (t, $J_{3'ax,4'} = 11.2$ Hz, 1 H, *H*-3'ax'), 1.38 (d, 3 H, $J_{\beta\text{CH},\gamma\text{CH}_3} = 6.6$ Hz, Thr γ CH₃).

¹³C NMR (D₂O) δ 175.72 (COCH₃'), 175.59 (COCH₃), 174.66 (C-1'), 173.77 (ThrCO), 100.43 (C-2'), 99.47 (C-1), 78.02 (C-3), 76.37 (Thr β CH), 73.53 (C-6'), 72.63 (C-8'), 71.56 (C-5), 69.37 (C-4), 69.17 (C-4'), 68.83 (C-7'), 63.24 (C-9'), 62.12 (C-6), 59.69 (Thr α CH), 52.44 (C-5'), 49.34 (C-2), 40.55 (C-3'), 23.17 (COCH₃), 22.77 (COCH₃'), 19.52 (Thr γ CH₃).

***O*-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-6)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-(1-3)-L-serin (22)**

Die Verbindungen **4b** und **18** werden 20 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 36 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **22** in 13% Ausbeute (3.9 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 9% (2.7 mg).

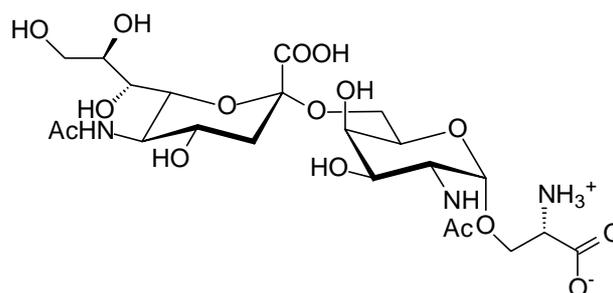
Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.¹³⁶

22 C₂₂H₃₇N₃O₁₆ (M 599.54)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 44.07, H 6.22, N 7.00.

Gef.: C 44.68, H 6.54, N 6.55.



***O*-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-3)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-(1-3)-L-serin (23)**

Die Verbindungen **4b** und **18** werden 24 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 20 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **23** in 12% Ausbeute (4.2 mg), bei Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase in 5% (Bestimmung per HPLC, keine Isolierung).

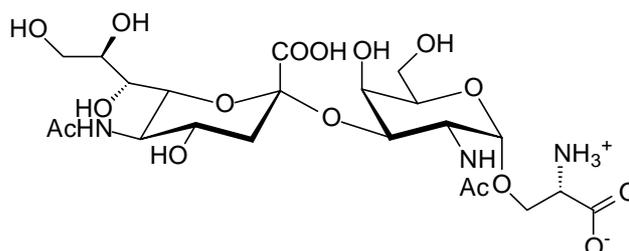
Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.¹³⁶

23 C₂₂H₃₇N₃O₁₆ (M 599.54)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 44.07, H 6.22, N 7.00.

Gef.: C 44.35, H 6.39, N 7.05.



Methyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-6)-2-desoxy- α -D-lyxo-hexopyranosid (24)

Die Verbindungen **11a** und **18** werden 24 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 36 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **24** in 26% Ausbeute (6.1 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 15% (3.5 mg).

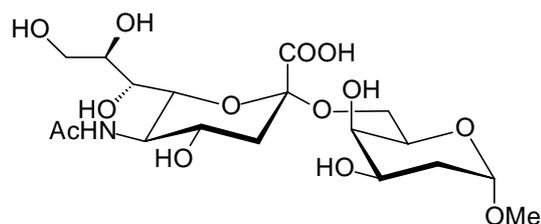
24 C₁₈H₃₁NO₁₃ (M 469.44)

$[\alpha]_D^{20} +124^\circ$ (*c* 0.8, H₂O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 46.05, H 6.66, N 2.98.

Gef.: C 45.41, H 6.89, N 2.91.



¹H NMR (D₂O) δ 5.08 (dd, $J_{1,2eq} = 0.8$ Hz, $J_{1,2ax} = 3.6$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.09 (d, $J_{3,4} = 3.6$ Hz, 1 H, *H*-3), 4.01 – 3.97 (m, 2 H, *H*-5, *H*-6a), 3.94 (bd, $J_{4,5} = 1.0$ Hz, 1 H, *H*-4), 3.89 – 3.86 (m, 2 H, *H*-8', *H*-9a'), 3.82 (dd, $J_{5',6'} = 10.2$ Hz, 1 H, *H*-5'), 3.72 (dd, $J_{6',7'} = 1.6$ Hz, 1 H, *H*-6'), 3.65 (dd, 1 H, *H*-9b'), 3.65 – 3.61 (m, 2 H, *H*-6b, *H*-4'), 3.57 (dd, 1 H, *H*-7'), 3.53 (s, 3 H, OCH₃), 2.71 (dd, $J_{3eq',4'} = 4.8$ Hz, $J_{3eq',3ax'} = 12.3$ Hz, 1 H, *H*-3eq'), 1.96 - 1.92 (m, $J_{2ax,3} = 12.4$ Hz, $J_{2eq,3} = 5.8$ Hz, $J_{2ax,2eq} = 13.0$ Hz, 2 H, *H*-2ax, *H*-2eq), 1.74 (t, $J_{3ax',4'} = 12.0$ Hz, 1 H, *H*-3ax').

¹³C NMR (D₂O) δ 175.81 (COCH₃'), 174.29 (C-1'), 100.68 (C-2'), 98.76 (C-1), 73.44 (C-6'), 72.54 (C-8'), 71.28 (C-5), 70.45 (C-6), 69.23 (C-4'), 69.20 (C-7'), 67.99 (C-3), 65.11 (C-4), 63.51 (C-9'), 54.76 (OCH₃), 52.71 (C-5'), 40.91 (C-3'), 31.72 (C-2), 22.91 (COCH₃').

Methyl-(5-Acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-2-desoxy-α-D-lyxo-hexopyranosid (25)

Die Verbindungen **11a** und **18** werden 24 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 16 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **25** in 22% Ausbeute (5.2 mg), bei Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase in 14% (3.3 mg).

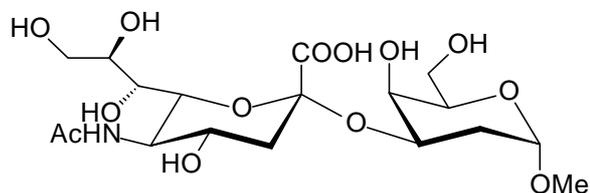
25 C₁₈H₃₁NO₁₃ (M 469.44)

$[\alpha]_D^{20} +108^\circ$ (*c* 1, H₂O).

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 46.05, H 6.66, N 2.98.

Gef.: C 45.74, H 6.83, N 2.82.



¹H NMR (D₂O) δ 5.13 (dd, $J_{1,2eq} = 0.8$ Hz, $J_{1,2ax} = 3.6$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.13 (ddd, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 1 H, *H*-3), 4.07 (d, 1 H, *H*-4), 3.88 - 3.85 (m, 3 H, *H*-5', *H*-8', *H*-9a'), 3.68 (dd, $J_{4',5'} = 9.8$ Hz, 1 H, *H*-4'), 3.65 (dd, $J_{6',7'} = 1.8$ Hz, *H*-6'), 3.64 (dd, *H*-9b'), 3.60 (dd, $J_{7',8'} = 9.2$ Hz, *H*-7'), 3.70 - 3.67 (m, 2 H, *H*-6a, *H*-6b), 3.54 (s, 3 H, OCH₃), 2.76 (dd, $J_{3eq',4'} = 4.8$ Hz,

$J_{3\text{eq}',3\text{ax}'} = 12.4$ Hz, 1 H, $H\text{-}3\text{eq}'$), 2.00 - 1.96 (m, $J_{2\text{ax},3} = 12.2$, $J_{2\text{eq},3} = 5.6$ Hz, $J_{2\text{ax},2\text{eq}} = 13.0$ Hz, 2 H, $H\text{-}2\text{ax}$, $H\text{-}2\text{eq}$), 1.79 (t, $J_{3\text{ax}',4'} = 11.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}3\text{ax}'$).

^{13}C NMR (D_2O) δ 175.83 (COCH_3'), 174.71 (C-1'), 100.28 (C-2'), 98.77 (C-1), 74.68 (C-3), 73.58 (C-6'), 72.59 (C-8'), 71.12 (C-5), 69.21 (C-4'), 68.96 (C-7'), 67.81 (C-6), 65.16 (C-4), 63.41 (C-9'), 54.72 (OCH_3), 52.53 (C-5'), 40.48 (C-3'), 31.68 (C-2), 22.86 (COCH_3').

Methyl-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-6)-2-desoxy- β -D-lyxo-hexopyranosid (26)

Die Verbindungen **11b** und **18** werden 20 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 36 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **26** in 21% Ausbeute (4.9 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 14% (3.4 mg).

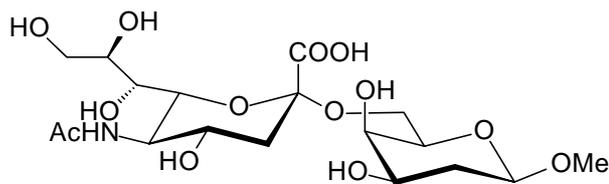
26 $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NO}_{13} \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$ (M 469.44)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} -28^\circ$ (c 0.7, H_2O).

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 44.34, H 6.83, N 2.87.

Gef.: C 44.97, H 6.75, N 2.93.



^1H NMR (D_2O) δ 4.54 (dd, $J_{1,2\text{eq}} = 2.4$ Hz, $J_{1,2\text{ax}} = 9.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}1$), 4.01 (dd, $J_{6\text{a},6\text{b}} = 11.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}6\text{a}$), 3.95 - 3.86 (m, 4 H, $H\text{-}8'$, $H\text{-}9\text{a}'$, $H\text{-}5'$, $H\text{-}4$), 3.84 (ddd, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 1 H, $H\text{-}3$), 3.76 (ddd, $J_{5,6\text{a}} = 8.0$ Hz, $J_{5,6\text{b}} = 4.8$ Hz, $H\text{-}5$), 3.70 (dd, $J_{6',7'} = 1.7$ Hz, 1 H, $H\text{-}6'$), 3.64 (dd, 1 H, $H\text{-}9\text{b}'$), 3.61 (dd, $J_{4',5'} = 9.2$ Hz, 1 H, $H\text{-}4'$), 3.56 (dd, $J_{7',8'} = 8.6$ Hz, 1 H, $H\text{-}7'$), 3.54 (s, 3 H, OCH_3), 3.52 (dd, 1 H, $H\text{-}6\text{b}$), 2.72 (dd, $J_{3\text{eq}',4'} = 4.6$ Hz, $J_{3\text{ax}',3\text{eq}'} = 12.4$ Hz, 1 H, $H\text{-}3\text{eq}'$), 2.04 (ddd, $J_{2\text{eq},3} = 5.2$ Hz, $J_{2\text{eq},2\text{ax}} = 12.0$ Hz, 1 H, $H\text{-}2\text{eq}$), 1.74 (t, $J_{3\text{ax}',4'} = 12.2$ Hz, 1 H, $H\text{-}3\text{ax}'$), 1.68 (dt, $J_{2\text{ax},3} = 11.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}2\text{ax}$).

^{13}C NMR (D_2O) δ 175.80 (COCH_3'), 174.34 (C-1'), 101.63 (C-1), 100.92 (C-2'), 75.67 (C-5), 72.62 (C-8'), 72.58 (C-6'), 69.13 (C-7'), 69.12 (C-4'), 68.48 (C-6), 68.19 (C-3), 67.21 (C-4), 63.48 (C-9'), 56.88 (OCH_3), 52.66 (C-5'), 40.84 (C-3'), 33.69 (C-2), 22.88 (COCH_3').

Methyl-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-2-desoxy- β -D-lyxo-hexopyranosid (27)

Die Verbindungen **11b** und **18** werden 24 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 16 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella*

typhimurium Sialidase entsteht **27** in 20% Ausbeute (4.7 mg), bei Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase in 14% (3.3 mg).

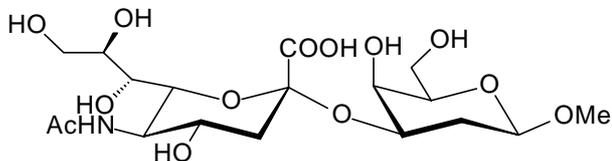
27 C₁₈H₃₁NO₁₃ (M 469.44)

$[\alpha]_D^{20} -19^\circ$ (c 1, H₂O).

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 46.05, H 6.66, N 2.98.

Gef.: C 45.67, H 6.77, N 2.92.



¹H NMR (D₂O) δ 4.56 (dd, $J_{1,2eq} = 2.4$ Hz, $J_{1,2ax} = 10.0$ Hz, 1 H, H-1), 4.09 (dd, $J_{3,4} = 3.6$ Hz, 1 H, H-3), 3.93 (bd, $J_{4,5} = 1.0$ Hz, 1 H, H-4), 3.89 - 3.86 (m, 2 H, H-8', H-9'), 3.83 (dd, $J_{5',6'} = 10.4$ Hz, 1 H, H-5'), 3.80 - 3.76 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 3.71 (ddd, $J_{5,6a} = 8.0$ Hz, $J_{5,6b} = 4.6$ Hz, H-5), 3.69 (dd, $J_{4',5'} = 9.6$ Hz, 1 H, H-4'), 3.67 (dd, $J_{6',7'} = 1.9$ Hz, 1 H, H-6'), 3.65 (dd, $J_{8',9b'} = 6.7$ Hz, $J_{9a',9b'} = -12.2$ Hz, 1 H, H-9b'), 3.60 (dd, $J_{7',8'} = 9.0$ Hz, H-7'), 3.54 (s, 3 H, OCH₃), 2.76 (dd, $J_{3eq',4'} = 4.6$ Hz, $J_{3ax',3eq'} = 12.5$ Hz, 1 H, H-3eq'), 2.00 (ddd, $J_{2eq,3} = 5.3$ Hz, $J_{2eq,2ax} = 12.4$ Hz, 1 H, H-2eq), 1.80 (t, $J_{3ax',4'} = 11.6$ Hz, 1 H, H-3ax'), 1.68 (dt, $J_{2ax,3} = 12.0$ Hz, 1 H, H-2ax).

¹³C NMR (D₂O) δ 175.81 (COCH₃'), 174.78 (C-1'), 101.57 (C-1), 100.32 (C-2'), 75.69 (C-5), 75.21 (C-3), 73.54 (C-6'), 72.57 (C-8'), 69.12 (C-4'), 68.87 (C-7'), 67.34 (C-4), 63.47 (C-9'), 61.78 (C-6), 56.85 (OCH₃), 52.50 (C-5'), 40.44 (C-3'), 33.72 (C-2), 22.83 (COCH₃).

Allyl-(5-Acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-6)-2-azido-2-desoxy-α-D-galactopyranosid (28)

Die Verbindungen **6b** und **18** werden 72 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 108 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **28** in 8% Ausbeute (2.1 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase konnte kein Umsatz festgestellt werden.

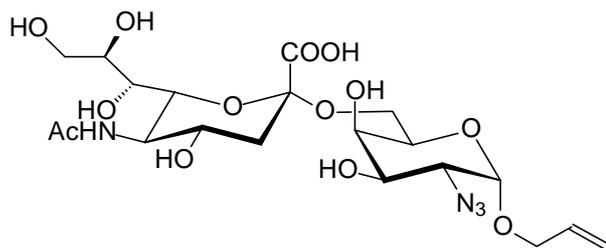
28 C₂₀H₃₂N₄O₁₃ (M 536.49)

$[\alpha]_D^{20} = 13.2^\circ$ (c 0.8, H₂O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 44.78, H 6.01, N 10.44

Gef.: C 44.87, H 5.95, N 10.38



^1H NMR (D_2O) δ 5.97 (m, 1 H, $\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$), 5.31-5.26 (m, 2 H, $\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$), 4.93 (d, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, 1 H, $H-1$), 4.06 (dd, $J_{6a,6b} = 10.2$ Hz, 1 H, $H-6a$), 4.03 (dd, 1 H, $\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$), 3.99 (dd, $J_{2,3} = 10.6$ Hz, 1 H, $H-2$), 3.97 (dd, $J_{4,5} = 1.0$ Hz, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 1 H, $H-4$), 3.89 – 3.86 (m, 3 H, $H-8'$, $H-9a'$, $H-2$), 3.81 (dd, $J_{5',6'} = 9.9$ Hz, 1 H, $H-5'$), 3.74 (m, 2 H, $H-5$, $H-6'$), 3.72 (m, 1 H, $H-6b$) 3.67 - 3.64 (m, 3 H, $H-9b'$, $H-4'$, $H-3$), 3.62 (dd, 1 H, $H-7'$), 2.72 (dd, $J_{3'\text{eq},3'\text{ax}} = 12.2$ Hz, $J_{3'\text{eq},4'} = 4.8$ Hz, 1 H, $H-3'\text{eq}$), 2.04 (s, 3 H, COCH_3), 1.69 (t, $J_{3'\text{ax},4'} = 12.0$ Hz, 1 H, $H-3'\text{ax}$),

^{13}C NMR (D_2O) δ 175.79 (COCH_3'), 174.37 (C-1'), 132.98 ($\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$), 117.85 ($\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$), 100.74 (C-2'), 96.47 (C-1), 78.49 (C-3), 74.95 (C-5), 73.48 (C-6'), 72.62 (C-8'), 71.86 (C-4), 69.17 (C-7'), 69.03 (C-4'), 64.69 (C-6), 63.47 (C-9'), 61.44 (C-2), 60.80 ($\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$), 52.53 (C-5'), 40.65 (C-3'), 22.74 (COCH_3),

Allyl-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosid (29)

Die Verbindungen **6b** und **18** werden 36 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 80 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **29** in 12% Ausbeute (4.7 mg), bei Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase konnte kein Umsatz beobachtet werden.

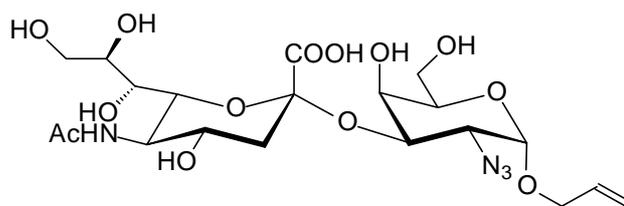
29 $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{13}$ (M 536.49)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 22.9^\circ$ (c 0.8, H_2O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 44.78, H 6.01, N 10.44

Gef.: C 44.75, H 5.93, N 10.37



^1H NMR (D_2O) δ 5.97 (m, 1 H, $\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$), 5.34-5.27 (m, 2 H, $\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$), 4.95 (d, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, 1 H, $H-1$), 4.03 (dd, 1 H, $H-4'$, $\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$), 3.94-3.91 (m, 2 H, $H-4$, $H-3$), 3.89 – 3.86 (m, 3 H, $H-8'$, $H-9a'$, $H-2$), 3.84 (dd, $J_{5',6'} = 9.9$ Hz, 1 H, $H-5'$), 3.69 (m, 1 H, $H-5$), 3.77-3.72 (m, 2 H, $H-6b$, $H-6b$) 3.68 - 3.63 (m, 3 H, $H-9b'$, $H-4'$, $H-6'$), 3.61 (dd, 1 H, $H-7'$), 2.76 (dd, $J_{3'\text{eq},3'\text{ax}} = 12.2$ Hz, $J_{3'\text{eq},4'} = 4.8$ Hz, 1 H, $H-3'\text{eq}$), 2.03 (s, 3 H, COCH_3), 1.79 (t, $J_{3'\text{ax},4'} = 12.1$ Hz, 1 H, $H-3'\text{ax}$),

^{13}C NMR (D_2O) δ 175.81 (COCH_3'), 174.61 (C-1'), 133.05 ($\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$), 117.91 ($\text{OCH}_2\text{-CH=CH}_2$), 100.63 (C-2'), 96.55 (C-1), 79.36 (C-3), 75.04 (C-5), 73.67 (C-6'), 72.61 (C-8'),

69.72 (C-4), 69.23 (C-4'), 68.93 (C-7'), 63.39 (C-9'), 61.50 (C-2), 60.99 (C-6), 61.28 (OCH₂-CH=CH₂), 52.51 (C-5'), 40.59 (C-3'), 22.85 (COCH₃).

Allyl-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-6)-2-azido-2-desoxy- β -D-galactopyranosid (30)

Die Verbindungen **6a** und **18** werden 72 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 108 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **30** in 10% Ausbeute (2.7 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase konnte kein Umsatz festgestellt werden.

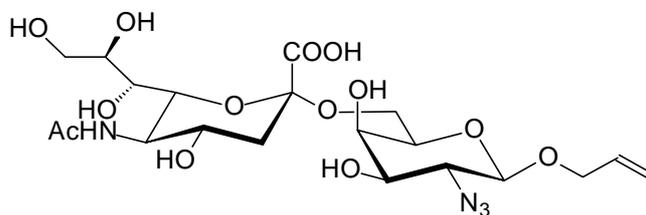
30 C₂₀H₃₂N₄O₁₃ (M 536.49)

$[\alpha]_D^{20} = -5.4^\circ$ (c 0.6, H₂O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 44.78, H 6.01, N 10.44

Gef.: C 44.57, H 5.92, N 10.53



¹H NMR (D₂O) δ 5.99 (m, 1 H, OCH₂-CH=CH₂), 5.33-5.26 (m, 2 H, OCH₂-CH=CH₂), 4.52 (d, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 1 H, H-1), 4.02 (m, 2 H, OCH₂-CH=CH₂, H-6a), 3.89 (dd, $J_{3,4} = 3.6$ Hz, 1 H, H-4), 3.87 – 3.85 (m, 2 H, H-8', H-9a'), 3.81 (dd, $J_{5,6'} = 10.2$ Hz, 1 H, H-5'), 3.74-3.72 (m, 2 H, H-6', H-6b), 3.66 - 3.63 (m, 4 H, H-9b', H-4', H-5, H-3), 3.57-3.55 (m, 1 H, H-2, H-7'), 2.69 (dd, $J_{3'eq,3'ax} = 11.8$ Hz, $J_{3'eq,4'} = 4.5$ Hz, 1 H, H-3'eq), 2.03 (s, 3 H, COCH₃), 1.72 (t, $J_{3'ax,4'} = 12.4$ Hz, 1 H, H-3'ax).

¹³C NMR (D₂O) δ 175.69 (COCH₃'), 174.25 (C-1'), 133.25 (OCH₂-CH=CH₂), 118.75 (OCH₂-CH=CH₂), 100.92 (C-2'), 100.45 (C-1), 74.41 (C-5), 73.42 (C-6'), 73.21 (C-3), 72.58 (C-8'), 71.13 (OCH₂-CH=CH₂), 70.23 (C-4), 69.35 (C-7'), 68.53 (C-4'), 64.21 (C-6), 63.52 (C-9'), 62.54 (C-2), 52.69 (C-5'), 40.94 (C-3'), 22.90 (COCH₃).

Allyl-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-2-azido-2-desoxy- β -D-galactopyranosid (31)

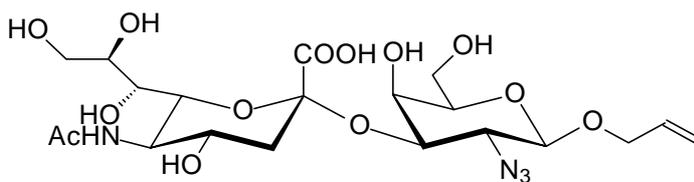
Die Verbindungen **6a** und **18** werden 36 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 94 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **31** in 12% Ausbeute (3.2 mg), bei Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase konnte kein Umsatz beobachtet werden.

31 C₂₀H₃₂N₄O₁₃ (M 536.49)[α]_D²⁰ = -18.6° (c 1.0, H₂O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 44.78, H 6.01, N 10.44

Gef.: C 44.71, H 5.96, N 10.37



¹H NMR (D₂O) δ 5.98 (m, 1 H, OCH₂-CH=CH₂), 5.35-5.27 (m, 2 H, OCH₂-CH=CH₂), 4.46 (d, J_{1,2} = 8.2 Hz, 1 H, H-1), 4.18 (dd, J_{2,3} = 10.2 Hz, J_{3,4} = 3.0 Hz, 1 H, H-3), 4.01 (dd, 1 H, H-4', OCH₂-CH=CH₂), 3.97 (dd, 1 H, H-4), 3.90 – 3.87 (m, 2 H, H-8', H-9a'), 3.85 (dd, 1 H, H-5'), 3.78-3.74 (m, 2 H, H-6b, H-6b), 3.69 - 3.63 (m, 4 H, H-9b', H-4', H-6', H-5), 3.60 (dd, 1 H, H-7'), 3.49 (dd, J_{2,3} = 10.2 Hz, 1 H, H-2), 2.77 (dd, J_{3'eq,3'ax} = 12.1 Hz, J_{3'eq,4'} = 4.8 Hz, 1 H, H-3'eq), 2.02 (s, 3 H, COCH₃), 1.81 (t, J_{3'ax,4'} = 12.0 Hz, 1 H, H-3'ax).

¹³C NMR (D₂O) δ 175.85 (COCH₃'), 174.68 (C-1'), 133.29 (OCH₂-CH=CH₂), 118.79 (OCH₂-CH=CH₂), 100.84 (C-2'), 100.74 (C-1), 80.15 (C-3), 74.98 (C-5), 73.71 (C-6'), 72.59 (C-8'), 70.54 (OCH₂-CH=CH₂), 69.23 (C-4'), 68.20 (C-4), 69.02 (C-7'), 63.45 (C-9'), 62.68 (C-2), 60.91 (C-6), 52.60 (C-5'), 40.52 (C-3'), 22.81 (COCH₃).

Phenyl-(5-Acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-6)-1-thio-β-D-galactopyranosid (32)

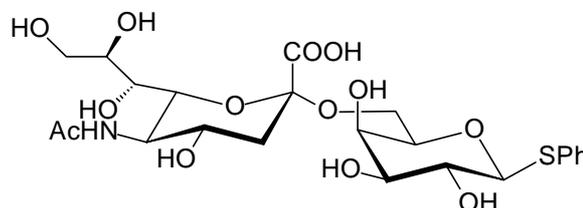
Die Verbindungen **7a** und **18** werden 20 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 36 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **32** in 16% Ausbeute (4.5 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 12% (3.4 mg).

32 C₂₃H₃₃NO₁₃S (M 563.58)[α]_D²⁰ = 7.1° (c 0.4, H₂O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 49.02, H 5.90, N 2.45

Gef.: C 48.69, H 5.77, N 2.57



¹H NMR (D₂O) δ 7.58-7.34 (m, 5 H, Ph), 4.84 (d, J_{1,2} = 8.0 Hz, 1 H, H-1), 3.97 (dd, J_{5a,6a} = 7.8 Hz, J_{6a,6b} = 10.1 Hz, 1 H, H-6a), 3.92 (dd, J_{3,4} = 3.5 Hz, J_{4,5} = 1.2 Hz, 1 H, H-4), 3.87 (dd, 3 H, H-8'), 3.85 (dd, 1 H, H-9a'), 3.81 (m, 1 H, H-5), 3.79 (dd, 1 H, H-5'), 3.71 (dd, J_{5',6'} = 10.0 Hz, 1 H, H-6'), 3.68 (dd, 1 H, H-3), 3.65 (m, 1 H, H-4'), 3.63 (dd, 1 H, H-9b'), 3.55 (m, 1

H, *H*-6b), 3.53 (dd, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, 1 H, *H*-2), 2.68 (dd, $J_{3_{\text{eq}'},4'} = 4.7$ Hz, 1 H, *H*-3eq'), 2.03 (s, 3 H, NHCOCH_3), 1.71 (t, $J_{3_{\text{ax}'},4'} = 11.8$ Hz, $J_{3_{\text{ax}'},3_{\text{eq}'}} = 12.1$ Hz, 1 H, *H*-3ax').

^{13}C NMR (D_2O) δ 175.79 (COCH_3'), 174.40 (C-1'), 133.48-129.02 (Ph), 104.53 (C-1), 101.01 (C-2'), 74.63 (C-5), 73.39 (C-6'), 73.32 (C-3), 72.53 (C-8'), 71.38 (C-2), 69.29 (C-7'), 69.23 (C-4), 68.92 (C-4'), 64.20 (C-6), 63.47 (C-9'), 52.70 (C-5'), 40.92 (C-3'), 22.90 (COCH_3').

Phenyl-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-1-thio- β -D-galactopyranosid (33)

Die Verbindungen **7a** und **18** werden 24 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 16 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **33** in 14% Ausbeute (3.9 mg), bei Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase ebenfalls in 14% (3.9 mg).

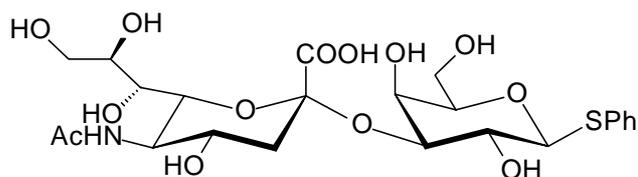
33 $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{NO}_{13}\text{S}$ (M 563.58)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -13.5^\circ$ (c 0.4, H_2O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 49.02, H 5.90, N 2.45

Gef.: C 49.14, H 5.86, N 2.42



^1H NMR (D_2O) δ 7.60 - 7.35 (m, 5 H, Ph), 4.85 (d, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, 1H, *H*-1), 4.11 (dd, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 1 H, *H*-3), 3.97 (dd, $J_{4,5} = 0.8$ Hz, 1 H, *H*-4), 3.86-3.84 (m, 3 H, *H*-8', *H*-9a', *H*-5'), 3.73-3.71 (m, 2 H, *H*-6a, *H*-6b), 3.69-3.62 (m, 4 H, *H*-5, *H*-4', *H*-6', *H*-9b'), 3.59 (dd, 1 H, *H*-7'), 3.53 (dd, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, 1 H, *H*-2), 2.75 (dd, $J_{3_{\text{eq}'},4'} = 4.8$ Hz, $J_{3_{\text{ax}'},3_{\text{eq}'}} = 12.0$ Hz, 1 H, *H*-3eq'), 2.03 (s, 3 H, NHCOCH_3), 1.78 (t, $J_{3_{\text{ax}'},4'} = 12.0$ Hz, 1 H, *H*-3ax').

^{13}C NMR (D_2O) δ 175.87 (COCH_3'), 174.53 (C-1'), 133.29-128.55 (Ph), 100.47 (C-2'), 88.21 (C-1), 79.64 (C-5), 77.94 (C-3), 73.61 (C-6'), 72.59 (C-8'), 69.11 (C-4'), 68.83 (C-7'), 68.55 (C-4), 68.31 (C-2), 63.27 (C-9'), 61.92 (C-6), 52.51 (C-5'), 40.52 (C-3'), 22.85 (COCH_3').

Phenyl-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-6)-1-thio-2-azido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (34)

Die Verbindungen **7** und **18** werden 20 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 36 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase

entsteht **34** in 12% Ausbeute (3.5 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 10% (2.9 mg).

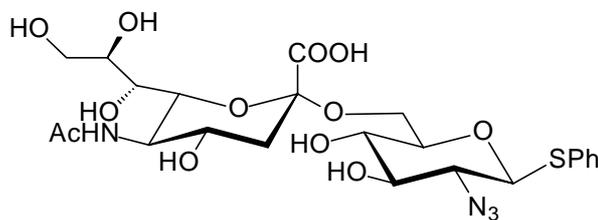
34 C₂₃H₃₂N₄O₁₂S (M 588.59)

[α]_D²⁰ = -2.7° (c 0.3, H₂O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 46.94, H 5.48, N 9.53

Gef.: C 47.03, H 5.42, N 9.52



¹H NMR (D₂O) δ 7.60-7.37 (m, 5 H, Ph), 4.82 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1 H, *H*-1), 3.95 (m, 1 H, *H*-6a), 3.89 (dd, $J_{3,4} = 4.0$ Hz, 1 H, *H*-4), 3.88 – 3.86 (m, 2 H, *H*-8', *H*-9a'), 3.79 (dd, $J_{5',6'} = 9.8$ Hz, 1 H, *H*-5'), 3.77-3.73 (m, 2 H, *H*-6', *H*-6b), 3.69 - 3.61 (m, 4 H, *H*-9b', *H*-4', *H*-5, *H*-3), 3.56-3.53 (m, 1 H, *H*-2, *H*-7'), 2.68 (dd, $J_{3'eq,3'ax} = 11.9$ Hz, $J_{3'eq,4'} = 4.8$ Hz, 1 H, *H*-3'eq), 2.03 (s, 3 H, COCH₃), 1.73 (t, $J_{3'ax,4'} = 12.2$ Hz, 1 H, *H*-3'ax).

¹³C NMR (D₂O) δ 175.74 (COCH₃'), 174.19 (C-1'), 133.17-128.74 (Ph), 100.88 (C-2'), 89.32 (C-1), 74.36 (C-5), 73.50 (C-6'), 73.18 (C-3), 72.63 (C-8'), 70.14 (C-4), 69.41 (C-7'), 68.37 (C-4'), 64.30 (C-6), 63.55 (C-9'), 62.56 (C-2), 52.74 (C-5'), 40.89 (C-3'), 22.88 (COCH₃).

Phenyl-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-3)-1-thio-2-azido-2-desoxy- β -D-galactopyranosid (35)

Die Verbindungen **7** und **18** werden 24 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 16 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **35** in 12% Ausbeute (3.5 mg), bei Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase in 9% (2.6 mg).

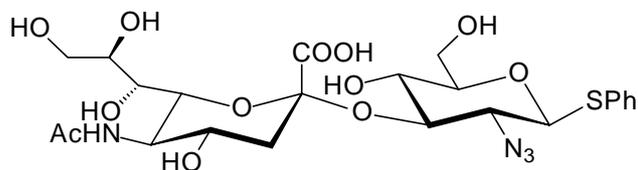
35 C₂₃H₃₂N₄O₁₂S (M 588.59)

[α]_D²⁰ = -18° (c 0.6, H₂O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 46.94, H 5.48, N 9.53

Gef.: C 46.92, H 5.41, N 9.57



¹H NMR (D₂O) δ 7.59-7.35 (m, 5 H, Ph), 4.82 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.14 (dd, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 1 H, *H*-3), 4.03 (dd, 1 H, *H*-4), 3.87-3.83 (m, 3 H, *H*-5', *H*-8', *H*-9a'), 3.79-3.75 (m, 2 H, *H*-6a, *H*-6b), 3.70-3.63 (m, 4 H, *H*-9b', *H*-4', *H*-6', *H*-5), 3.59 (dd, 1 H, *H*-7'),

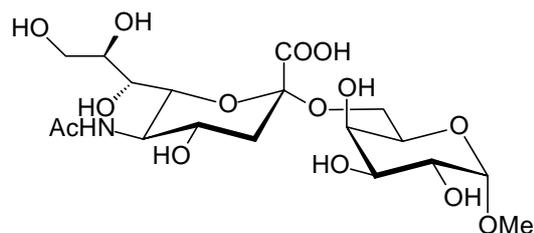
3.47 (dd, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, 1 H, $H-2$), 2.76 (dd, $J_{3'_{\text{eq}},3'_{\text{ax}}} = 11.8$ Hz, $J_{3'_{\text{eq}},4'} = 4.7$ Hz, 1 H, $H-3'_{\text{eq}}$), 2.03 (s, 3 H, COCH_3), 1.78 (t, $J_{3'_{\text{ax}},4'} = 11.9$ Hz, 1 H, $H-3'_{\text{ax}}$).

^{13}C NMR (D_2O) δ 175.81 (COCH_3 '), 174.79 (C-1'), 133.35-128.99 (Ph), 100.98 (C-2'), 89.31 (C-1), 80.07 (C-3), 75.11 (C-5), 73.65 (C-6'), 72.50 (C-8'), 69.17 (C-4'), 69.05 (C-7'), 68.17 (C-4), 63.55 (C-9'), 62.53 (C-2), 61.02 (C-6), 52.49 (C-5'), 40.48 (C-3'), 22.76 (COCH_3).

Methyl-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-6)- α -D-galactopyranosid (36)

Die Verbindungen **10a** und **18** werden 20 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 24 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **36** in 18% Ausbeute (4.4 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 10% (2.4 mg).

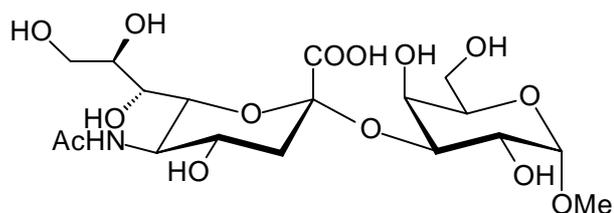
Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.²⁸



Methyl-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)- α -D-galactopyranosid (37)

Die Verbindungen **10a** und **18** werden 24 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 20 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **37** in 16% Ausbeute (3.9 mg) und bei Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase in 17% (4.1 mg).

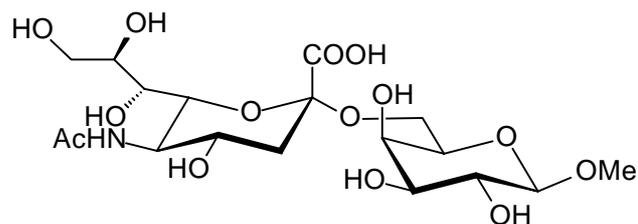
Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.²⁸



Methyl-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-6)- β -D-galactopyranosid (38)

Die Verbindungen **10b** und **18** werden 20 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 24 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **38** in 16% Ausbeute (3.9 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 10% (2.4 mg).

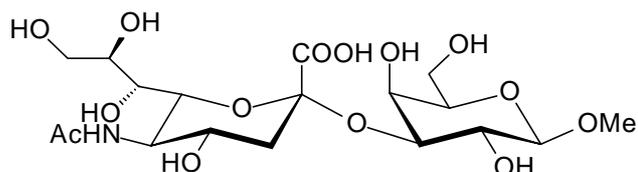
Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.²⁸



Methyl-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-3)- β -D-galactopyranosid (39)

Die Verbindungen **10b** und **18** werden 24 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 20 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **39** in 15% Ausbeute (3.6 mg), bei Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase in 18% (4.5 mg).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.²⁸



O-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-6)-O-(β -D-galactopyranosyl)-(1-3)-2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-(1-3)-L-threonin (40)

Die Verbindungen **5a** und **18** werden 26 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 48 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **40** in 12% Ausbeute (4.7 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 4% (Bestimmung per HPLC, keine Isolierung).

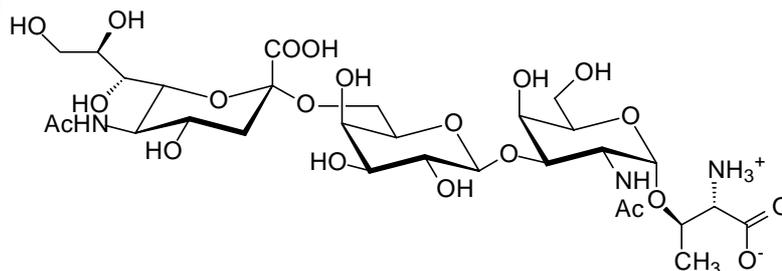
40 C₂₉H₄₉N₃O₂₁·2 H₂O (M 775.71)

[α]_D²⁰ +7° (c 0.6, H₂O).

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 42.89, H 6.58, N 5.18

Gef.: C 43.13, H 6.46, N 5.32.



¹H NMR (D₂O) δ 4.91 (d, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.46 (d, $J_{1',2'} = 7.6$ Hz, 1 H, *H*-1'), 4.41 (dq, $J_{\alpha\text{CH},\beta\text{CH}} = 2.6$ Hz, 1 H, ThrβCH), 4.27 (dd, $J_{2,3} = 11.2$ Hz, 1 H, *H*-2), 4.21 (dd, $J_{4,5} = 0.8$ Hz, 1 H, *H*-4), 4.07 (dd, $J_{3,4} = 2.8$ Hz, 1 H, *H*-3), 4.05 (m, 1 H, *H*-5), 3.98 (dd, $J_{6a',6b'} = 10.2$ Hz, 1 H, *H*-6a'), 3.93 - 3.83 (m, 4 H, *H*-4', *H*-8'', *H*-9a'', ThrαCH), 3.82 - 3.80 (m, 2 H, *H*-5', *H*-5''), 3.70 (dd, $J_{6'',7''} = 1.7$ Hz, 1 H, *H*-6''), 3.69 - 3.61 (m, 5 H, *H*-3', *H*-4'', *H*-9b'', *H*-6a, *H*-6b), 3.56 (dd, $J_{7'',8''} = 8.4$ Hz, 1 H, *H*-7''), 3.54 (dd, $J_{2',3'} = 9.8$ Hz, 1 H, *H*-2'), 3.52 (dd, 1 H, *H*-6b'), 3.50 (dd, $J_{2',3'} = 9.8$ Hz, 1 H, *H*-2'), 2.72 (dd, $J_{3\text{eq}'',4''} = 4.6$ Hz, $J_{3\text{ax}'',3\text{eq}''} = 12.2$ Hz, 1 H, *H*-3eq''), 2.02, 2.01 (2s, 6 H, COCH₃), 1.67 (t, $J_{3\text{ax}'',4''} = 12.0$ Hz, 1 H, *H*-3ax'), 1.35 (d, $J_{\beta\text{CH},\gamma\text{CH}} = 6.6$ Hz, 3 H, ThryCH).

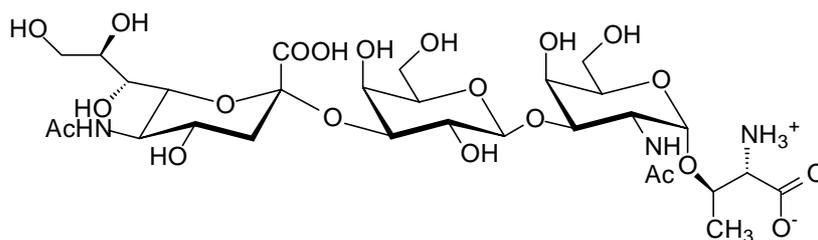
¹³C NMR (D₂O) δ 175.82 (COCH₃''), 175.00 (COCH₃'), 174.31 (C-1''), 173.64 (ThrCO), 105.87 (C-1'), 100.79 (C-2''), 99.62 (C-1), 78.02 (C-3), 76.01 (ThrβCH), 75.62 (C-3', C-5'), 73.40 (C-6''), 72.54 (C-8''), 71.92 (C-2'), 71.62 (C-5), 69.82 (C-4'), 69.49 (C-4), 69.22 (C-7''), 69.13 (C-4''), 64.53 (C-6'), 63.53 (C-9''), 61.74 (C-6), 59.67 (ThrαCH), 52.74 (C-5''), 48.93 (C-2), 40.79 (C-3''), 23.24 (COCH₃), 22.88 (COCH₃''), 19.32 (ThryCH₃).

***O*-(5-Acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-*O*-(β-D-galactopyranosyl)-(1-3)-2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-(1-3)-L-threonin (41).**

Die Verbindungen **5a** und **18** werden 24 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 20 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **41** in 11% Ausbeute (4.3 mg), bei Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase in 10% (3.9 mg).

Nach AAV 11 werden Verbindung **5a** und **19** mit *Trypanosoma cruzi* Sialidase inkubiert. Es bildet sich **41** in 22% (7.7 mg)

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.¹³⁷



***O*-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1-3)-2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-(1-3)-L-serin (44)**

Die Verbindungen **5b** und **18** werden 26 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 48 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **44** in 10% Ausbeute (3.8 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase konnte kein Umsatz beobachtet werden.

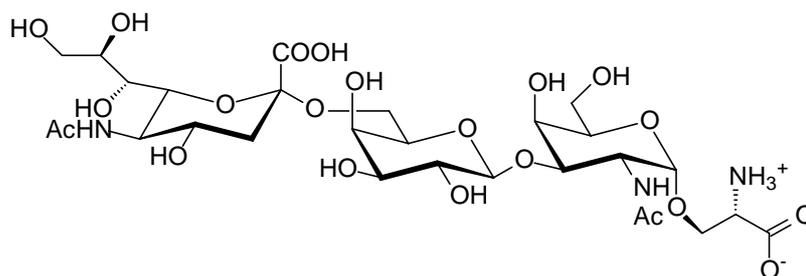
44 C₂₈H₄₇N₃O₂₁ (M 761.68)

$[\alpha]_D^{20} = 83^\circ$ (c 0.5, H₂O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 44.15, H 6.22, N 5.52

Gef.: C 44.08, H 6.13, N 5.51



¹H NMR (D₂O) δ 4.91 (d, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.49 (d, $J_{1',2'} = 7.7$ Hz, 1 H, *H*-1'), 4.15 (bt, $J_{\alpha\text{CH},\beta\text{CH}} = 2.9$ Hz, $J_{\alpha\text{CH},\beta'\text{CH}} = 10.8$ Hz, 1 H, Ser α CH), 4.25 (dd, $J_{2,3} = 10.9$ Hz, 1 H, *H*-2), 4.07-4.04 (m, 2 H, *H*-3, *H*-5), 3.99-3.96 (m, 2 H, *H*-6a', Ser β CH), 3.94 - 3.85 (m, 4 H, *H*-4', *H*-8", *H*-9a", Ser β' CH), 3.83 - 3.79 (m, 2 H, *H*-5', *H*-5"), 3.76 - 3.61 (m, 6 H, *H*-6", *H*-3', *H*-4", *H*-9b", *H*-6a, *H*-6b), 3.57-3.50 (m, 4 H, *H*-7", *H*-2', *H*-6b', *H*-2'), 2.71 (dd, $J_{3\text{eq}',4''} = 4.7$ Hz, $J_{3\text{ax}',3\text{eq}''} = 11.8$ Hz, 1 H, *H*-3eq"), 2.03, 2.02 (2s, 6 H, COCH₃), 1.69 (t, $J_{3\text{ax}'',4''} = 11.9$ Hz, 1 H, *H*-3ax').

¹³C NMR (D₂O) δ 175.76 (COCH₃"'), 174.95 (COCH₃') 174.45 (C-1"), 161.58 (SerCO), 105.63 (C-1'), 100.81 (C-2"), 98.54 (C-1), 77.87 (C-3), 75.67 (C-3'), 75.53 (C-5'), 73.31 (C-6"), 72.39 (C-8"), 71.89 (C-2'), 71.55 (C-5), 69.77 (C-4'), 69.53 (C-4), 69.25 (C-7"), 69.09 (C-4"), 68.79 (Ser β CH), 64.71 (C-6'), 63.50 (C-9"), 61.69 (C-6), 55.56 (Ser α CH), 52.56 (C-5"), 48.85 (C-2), 40.83 (C-3"), 22.95 (COCH₃"'), 22.58 (COCH₃').

***O*-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-3)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1-3)-2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-(1-3)-L-serin (45)**

Die Verbindungen **5b** und **18** werden 24 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 20 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **45** in 11% Ausbeute (4.2 mg), bei Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase in 8% (3.0 mg).

Nach AAV 11 werden Verbindung **5b** und **19** mit *Trypanosoma cruzi* Sialidase inkubiert. Es bildet sich **45** in 20% (6.8 mg).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.¹³⁸

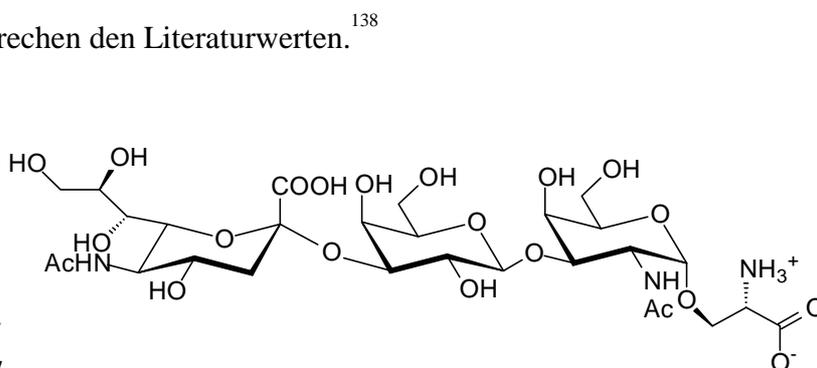
45 C₂₈H₄₇N₃O₂₁ (M 761.68)

$[\alpha]_D^{20} = 24^\circ$ (c 0.4, H₂O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 44.15, H 6.22, N 5.52

Gef.: C 44.09, H 6.22, N 5.47



Methyl-(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-6)-(2-6)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-3)-2-desoxy- α -D-lyxo-hexopyranosid (46)

Die Verbindungen **12** und **18** werden 20 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 24 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **46** in 14% Ausbeute (4.4 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase konnte kein Umsatz beobachtet werden.

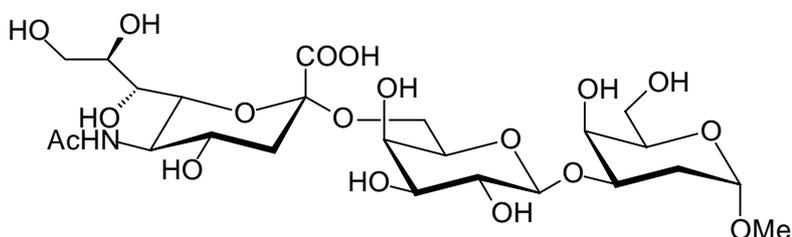
46 C₂₄H₄₁NO₁₈ (M 631.58)

$[\alpha]_D^{20} = 38^\circ$ (c 1.0, H₂O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 45.62, H 6.54, N 2.22

Gef.: C 45.44, H 6.50, N 2.09



¹H NMR (D₂O) δ 5.14 (dd, $J_{1,2eq} = 0.7$ Hz, $J_{1,2ax} = 3.6$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.49 (d, $J_{1',2'} = 8.0$ Hz, 1 H, *H*-1'), 4.16 (ddd, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 1 H, *H*-3), 4.09 (dd, $J_{3,4} = 3.0$ Hz, 1 H, *H*-4), 4.01 (ddd, $J_{5,6a} = 6.3$ Hz, $J_{5,6b} = 6.5$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.9$ Hz, 1 H, *H*-5), 3.97 (dd, 1 H, $J_{6a',6b'} = 9.8$ Hz, *H*-6a'), 3.92

(dd, 1 H, $H-4'$), 3.89 - 3.85 (m, 2 H, $H-9a''$, $H-8''$), 3.85 - 3.82 (m, 2 H, $H-5'$, $H-5''$), 3.82 - 3.66 (m, 7 H, $H-6a$, $H-6b$, $H-6b'$, $H-4''$, $H-3'$, $H-9a''$, $H-6''$), 3.58 - 3.53 (m, 3 H, $H-2'$, $H-6b'$, $H-7''$), 3.52 (s, 3 H, OCH_3), 2.70 (dd, $J_{3\text{eq}'',4''} = 5.0$ Hz, $J_{3\text{eq}'',3\text{ax}''} = 12.1$ Hz, 1 H, $H-3\text{ax}''$), 2.02 - 1.94 (m, 2 H, $H-2\text{ax}$, $H-2\text{eq}$), 1.71 (t, $J_{3\text{ax}'',4''} = 12.2$ Hz, 1 H, $H-3\text{ax}''$).

^{13}C NMR (D_2O) δ 175.75 (COCH_3), 174.22 (C-1''), 104.49 (C-1'), 100.83 (C-2''), 98.81 (C-1), 74.66 (C-5'), 74.25 (C-3), 73.47 (C-6''), 73.25 (C-3'), 72.67 (C-8''), 71.63 (C-2'), 71.21 (C-5), 69.36 (C-4'), 69.25 (C-7''), 69.03 (C-4''), 67.73 (C-6), 66.44 (C-4), 64.13 (C-6'), 63.47 (C-9''), 54.52 (OCH_3), 52.65 (C-5''), 40.74 (C-3''), 31.47 (C-2), 22.87 (COCH_3).

Methyl-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-3)-2-desoxy- α -D-lyxo-hexopyranosid (47)

Die Verbindungen **12** und **18** werden 24 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 20 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **47** in 14% Ausbeute (4.4 mg), bei Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase in 10% (3.1 mg).

Nach AAV 11 werden Verbindung **12** und **19** mit *Trypanosoma cruzi* Sialidase inkubiert. Man erhält Verbindung **47** in 16% Ausbeute (4.5 mg).

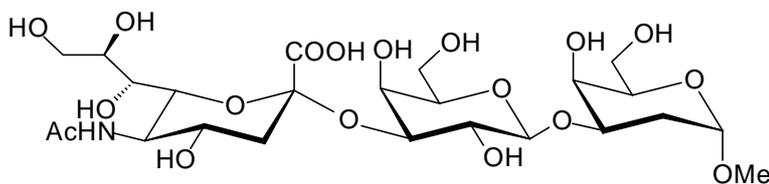
47 $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{NO}_{18}$ (M 631.58)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 52^\circ$ (c 0.5, H_2O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 45.64, H 6.54, N 2.22

Gef.: C 45.59, H 6.52, N 2.28



^1H NMR (D_2O) δ 5.12 (dd, $J_{1,2\text{eq}} = 1.0$ Hz, $J_{1,2\text{ax}} = 4.2$ Hz, 1 H, $H-1$), 4.54 (d, $J_{1',2'} = 7.9$ Hz, 1 H, $H-1'$), 4.15-4.11 (m, 2 H, $H-3$, $H-4$), 4.08 (dd, $J_{3',4'} = 3.6$ Hz, 1 H, $H-3'$), 4.03 (ddd, $J_{5,6a} = 6.2$ Hz, $J_{5,6b} = 6.5$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.8$ Hz, 1 H, $H-5$), 3.96 (bd, $J_{4',5'} = 0.8$ Hz, 1 H, $H-4'$), 3.88 - 3.83 (m, 3 H, $H-8''$, $H-9b''$, $H-5''$), 3.79 - 3.65 (m, 7 H, $H-6a$, $H-6b$, $H-6a'$, $H-6b'$, $H-5'$, $H-6''$, $H-4''$, $H-9b''$), 3.62 (dd, $J_{7'',8''} = 9.2$ Hz, 1 H, $H-7''$), 3.53 (s, 3 H, OCH_3), 3.51 (m, 1 H, $H-2'$), 2.77 (dd, 1 H, $J_{3\text{eq}'',4''} = 4.9$ Hz, $J_{3\text{eq}'',3\text{ax}''} = 12.2$ Hz, $H-3\text{eq}''$), 2.03 - 1.97 (m, 2 H, $H-2\text{ax}$, $H-2\text{eq}$), 1.80 (t, 1 H, $J_{3\text{ax}'',4''} = 12.2$ Hz, $H-3\text{ax}''$).

^{13}C NMR (D_2O) δ 175.86 (COCH_3''), 174.63 (C-1''), 104.68 (C-1'), 100.65 (C-2''), 98.54 (C-1), 76.26 (C-3'), 75.97 (C-5'), 74.02 (C-3), 73.81 (C-6''), 72.74 (C-8''), 71.22 (C-5), 70.31

(C-2'), 69.25 (C-4''), 68.85 (C-7''), 68.44 (C-4'), 67.87 (C-6), 66.45 (C-4), 63.57 (C-9''), 61.97 (C-6'), 54.71 (OCH₃), 52.49 (C-5''), 40.63 (C-3''), 31.49 (C-2), 22.83 (COCH₃'').

Methyl (5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-6)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-2-desoxy- α -D-lyxo-hexopyranosid (48).

Die Verbindungen **13** und **18** werden 22 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 28 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **48** in 15% Ausbeute (4.7 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 5% (Bestimmung per HPLC, keine Isolierung).

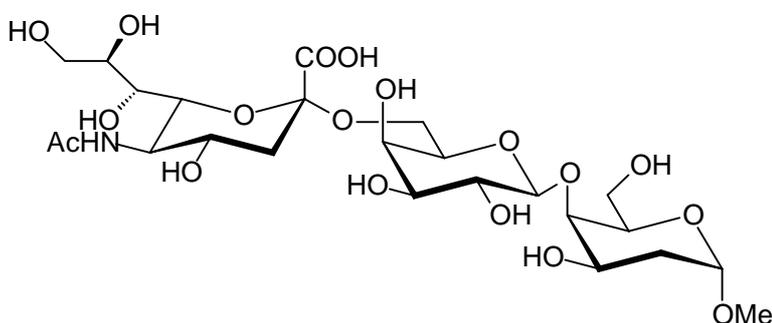
48 C₂₄H₄₁NO₁₈ (M 631.58)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} +14^{\circ}$ (c 1, H₂O).

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 45.64, H 6.54, N 2.22.

Gef.: C 45.72, H 6.62, N 2.19.



¹H NMR (D₂O) δ 5.09 (dd, $J_{1,2\text{eq}} = 1.0$ Hz, $J_{1,2\text{ax}} = 3.8$ Hz, 1 H, H-1), 4.44 ($J_{1',2'} = 8.0$ Hz, 1 H, H-1'), 4.14 (ddd, $J_{3,4} = 3.1$ Hz, 1 H, H-3), 4.07 (bd, $J_{4,5} = 0.9$ Hz, 1 H, H-4), 3.97 (dd, 1 H, $J_{6\text{a}',6\text{b}'} = 10.2$ Hz, H-6a'), 3.93 (m, 1 H, H-4'), 3.88 - 3.85 (m, 3 H, H-5, H-9a'', H-8''), 3.84 - 3.82 (m, 2 H, H-5', H-5''), 3.73 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 3.68 - 3.63 (m, 4 H, H-4'', H-3', H-9a'', H-6''), 3.56 - 3.54 (m, 3 H, H-2', H-6b', H-7''), 3.54 (s, 3 H, OCH₃), 3.52 (m, $J_{2',3'} = 9.9$ Hz, 1 H, H-2'), 2.68 (dd, $J_{3\text{eq}'',4''} = 4.8$ Hz, $J_{3\text{eq}'',3\text{ax}''} = 12.3$ Hz, 1 H, H-3ax''), 1.99-1.95 (m, 2 H, H-2ax, H-2eq), 1.72 (t, $J_{3\text{ax}'',4''} = 12.2$ Hz, 1 H, H-3ax'').

¹³C NMR (D₂O) δ 175.81 (COCH₃), 174.35 (C-1''), 104.27 (C-1'), 100.89 (C-2''), 98.69 (C-1), 75.81 (C-4), 74.53 (C-5'), 73.44 (C-6''), 73.19 (C-3'), 72.61 (C-8''), 71.59 (C-2'), 71.24 (C-5), 69.31 (C-7''), 69.22 (C-4'), 69.08 (C-4''), 68.16 (C-3), 67.88 (C-6), 64.18 (C-6'), 63.53 (C-9''), 54.80 (OCH₃), 52.71 (C-5''), 40.86 (C-3''), 31.52 (C-2), 22.91 (COCH₃).

Methyl (5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-2-desoxy- α -D-lyxo-hexopyranosid (49)

Die Verbindungen **13** und **18** werden 22 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 20 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **49** in 10% Ausbeute (3.2 mg) und bei Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase in 8% (2.5 mg).

Nach AAV 11 werden Verbindung **13** und **19** mit *Trypanosoma cruzi* Sialidase inkubiert. Es bildet sich **49** in 23% (6.5 mg)

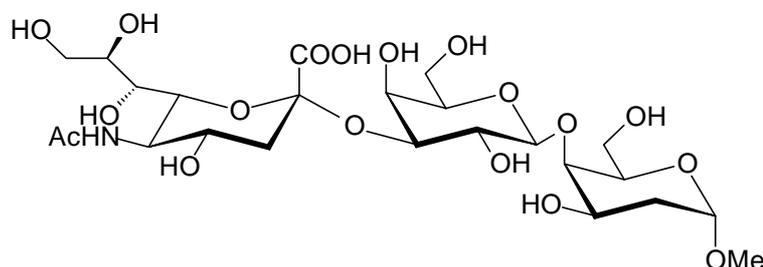
49 C₂₄H₄₁NO₁₈ (M 631.58)

[α]_D²⁰ +25° (c 1, H₂O).

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 45.64, H 6.54, N 2.22.

Gef.: C 45.44, H 6.61, N 2.25.



¹H NMR (D₂O) δ 5.06 (dd, $J_{1,2eq} = 1.0$ Hz, $J_{1,2ax} = 3.6$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.56 (d, $J_{1',2'} = 8.0$ Hz, 1 H, *H*-1'), 4.16 (ddd, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 1 H, *H*-3), 4.12 (bd, $J_{4,5} = 0.8$ Hz, 1 H, *H*-4), 4.09 (dd, $J_{3',4'} = 3.6$ Hz, 1 H, *H*-3'), 3.94 (bd, $J_{4',5'} = 0.8$ Hz, 1 H, *H*-4'), 3.91 (ddd, $J_{5,6a} = 6.3$ Hz, $J_{5,6b} = 6.4$ Hz, 1 H, *H*-5), 3.88 - 3.85 (m, 2 H, *H*-8", *H*-9b"), 3.84 (dd, $J_{5'',6''} = 10.4$ Hz, 1 H, *H*-5"), 3.73 - 3.64 (m, 6 H, *H*-4", *H*-5', *H*-6a', *H*-6b', *H*-6a, *H*-6b), 3.66 (dd, $J_{6'',7''} = 1.8$ Hz, 1 H, *H*-6"), 3.65 (m, 1 H, *H*-9b"), 3.61 (dd, $J_{7'',8''} = 9.6$ Hz, 1 H, *H*-7"), 3.57 (s, 3 H, OCH₃), 3.52 (m, $J_{2',3'} = 9.8$ Hz, 1 H, *H*-2'), 2.76 (dd, 1 H, $J_{3eq'',4''} = 4.8$ Hz, $J_{3eq'',3ax''} = 12.4$ Hz, *H*-3eq"), 2.01 - 1.99 (m, 2 H, *H*-2ax, *H*-2eq), 1.80 (t, 1 H, $J_{3ax'',4''} = 12.2$ Hz, *H*-3ax").

¹³C NMR (D₂O) δ 175.80 (COCH₃"), 174.71 (C-1"), 104.38 (C-1'), 100.43 (C-2"), 98.74 (C-1), 76.43 (C-3'), 75.89 (C-5'), 75.72 (C-4), 73.67 (C-6"), 72.61 (C-8"), 71.22 (C-5), 70.08 (C-2'), 69.18 (C-4"), 68.94 (C-7"), 68.15 (C-4'), 68.08 (C-3), 67.86 (C-6), 63.38 (C-9"), 61.94 (C-6'), 54.77 (OCH₃), 52.54 (C-5"), 40.72 (C-3"), 31.44 (C-2), 22.87 (COCH₃").

Allyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-6)- β -D-galactopyranosyl)-(1-3)-2-azido-2-desoxy- β -D-galactopyranosid (50**)**

Die Verbindungen **8** und **18** werden 20 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 42 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **50** in 12% Ausbeute (4.1 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 7% (2.4 mg).

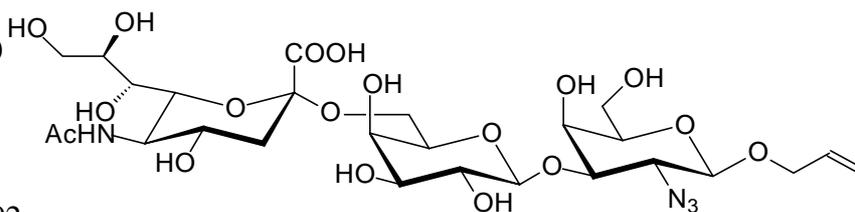
50 C₂₆H₄₂N₄O₁₈ (M 698.63)

[α]_D²⁰ -51° (c 0.9, H₂O).

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 44.70, H 6.06, N 8.02.

Gef.: C 45.10, H 5.94, N 8.16.



^1H NMR (D_2O) δ 5.96 (m, 1 H, $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 5.34 - 5.27 (m, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 4.51 (d, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 1 H, $H-1$), 4.46 (d, $J_{1,2'} = 8.0$ Hz, 1 H, $H-1'$), 4.23 (dd, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 1 H, $H-3$), 4.21 - 4.15 (m, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 4.12 (dd, $J_{4,5} = 1.2$ Hz, 1 H, $H-4$), 4.00 (dd, $J_{6a',6b'} = -10.2$ Hz, 1 H, $H-6a'$), 3.93 (bd, $J_{3',4'} = 3.8$ Hz, $J_{4',5'} = 1.6$ Hz, 1 H, $H-4'$), 3.90 (dd, 1 H, $H-8''$), 3.87 (dd, 1 H, $H-9a''$), 3.83 (dd, $J_{5'',6''} = 10.3$ Hz, 1 H, $H-5''$), 3.81 (m, 1 H, $H-5'$), 3.75 - 3.67 (m, 3 H, $H-6''$, $H-6a$, $H-6b$), 3.67 (dd, 1 H, $H-3'$), 3.65 (dd, 1 H, $H-9b''$), 3.61 (dd, $J_{4'',5''} = 8.9$ Hz, 1 H, $H-4''$), 3.59 - 3.48 (m, 5 H, $H-7''$, $H-2'$, $H-6b'$, $H-2$, $H-5$), 2.71 (dd, $J_{3\text{eq}'',4''} = 4.8$ Hz, 1 H, $H-3\text{eq}''$), 2.03 (s, 3 H, NHCOCH_3), 1.74 (t, $J_{3\text{ax}'',4''} = 11.9$ Hz, $J_{3\text{ax}'',3\text{eq}''} = 12.4$ Hz, 1 H, $H-3\text{ax}''$).

^{13}C NMR (D_2O) δ 175.82 (COCH_3''), 174.28 (C-1''), 133.39 ($\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 119.07 ($\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 104.43 (C-1'), 100.96 (C-2''), 100.78 (C-1), 80.22 (C-3), 75.07 (C-5), 74.44 (C-5'), 73.39 (C-6''), 73.34 (C-3'), 72.57 (C-8''), 71.76 (C-2'), 70.89 ($\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 69.31 (C-7''), 69.24 (C-4'), 69.19 (C-4''), 68.15 (C-4), 64.22 (C-6'), 63.48 (C-9''), 62.84 (C-2), 61.07 (C-6), 52.73 (C-5''), 40.97 (C-3''), 22.88 (CH_3'').

Allyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-3)-2-azido-2-desoxy- β -D-galactopyranosid (51)

Die Verbindungen **8** und **18** werden 24 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 20 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **51** in 11% Ausbeute (3.8 mg) ebenso wie bei dem Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase (11%, 3.9 mg).

Nach AAV 11 werden Verbindung **8** und **19** mit *Trypanosoma cruzi* Sialidase inkubiert. Es bildet sich **51** in 28% (8.8 mg).

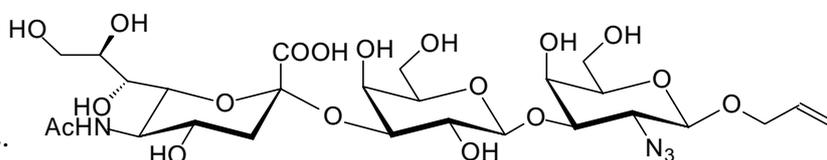
51 $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{18} \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$ (M 698.63)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} -34^\circ$ (c 0.8, H_2O).

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 43.56, H 6.19, N 7.82.

Gef.: C 43.59, H 6.02, N 7.87.



^1H NMR (D_2O) δ 5.92 (m, 1 H, $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 5.32 - 5.24 (m, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 4.56 (d, $J_{1,2'} = 7.8$ Hz, 1H, $H-1'$), 4.53 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1 H, $H-1$), 4.25 (dd, $J_{3,4} = 3.6$ Hz, 1 H, $H-3$), 4.22 - 4.17 (m, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CHCH}_2$), 4.15 (dd, $J_{4,5} = 1.5$ Hz, 1 H, $H-4$), 4.12 - 4.08 (m, 2 H, $H-3'$ and $H-4$), 3.95 (bd, $J_{4',5'} = 0.7$ Hz, 1 H, $H-4'$), 3.89 (dd, $J_{8'',9a''} = 2.6$ Hz, 1 H, $H-8''$), 3.87 (dd,

$J_{9a'',9b''} = 12.2$ Hz, 1 H, $H-9a''$), 3.83 (dd, $J_{5'',6''} = 10.2$ Hz, 1 H, $H-5''$), 3.71 (m, 2 H, $H-6a'$, $H-6b'$), 3.76 - 3.63 (m, 6 H, $H-5'$, $H-4''$, $H-6''$, $H-9b''$, $H-6a$, $H-6b$), 3.63 (dd, $J_{2',3'} = 9.6$ Hz, 1 H, $H-2'$), 3.60 (dd, $J_{7'',8''} = 9.6$ Hz, 1 H, $H-7''$), 3.57 (dd, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, 1 H, $H-2$), 2.76 (dd, $J_{3eq'',4''} = 4.8$ Hz, $J_{3ax'',3eq''} = 12.2$ Hz, 1 H, $H-3eq''$), 2.03 (s, 3 H, $NHCOCH_3$), 1.80 (t, $J_{3ax'',4''} = 12.0$ Hz, 1 H, $H-3ax''$).

^{13}C NMR (D_2O) δ 175.84 ($COCH_3''$), 174.64 (C-1''), 133.41 (OCH_2CHCH_2), 119.10 (OCH_2CHCH_2), 105.21 (C-1'), 100.93 (C-1), 100.46 (C-2''), 80.37 (C-3), 76.49 (C-3'), 75.69 (C-5''), 75.15 (C-5), 73.69 (C-6''), 72.62 (C-8''), 70.93 (OCH_2CHCH_2), 69.94 (C-2'), 69.17 (C-4''), 69.01 (C-7''), 68.23 (C-4'), 68.19 (C-4), 63.43 (C-9''), 62.90 (C-2), 61.64 (C-6'), 61.15 (C-6), 52.53 (C-5''), 40.59 (C-3''), 22.83 (CH_3'').

Allyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-6)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-3)-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosid (52)

Die Verbindungen **14** und **18** werden 20 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 36 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **52** in 10% Ausbeute (3.5 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 4% (Bestimmung erfolgte per HPLC, keine Isolierung).

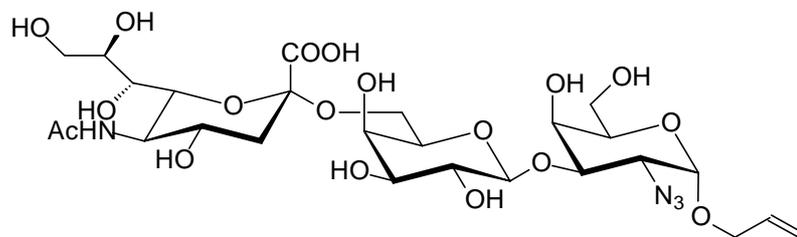
52 $C_{26}H_{42}N_4O_{18}$ (M 698.63)

$[\alpha]_D^{20} = 12.3^\circ$ (c 0.6, H_2O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 44.70, H 6.06, N 8.02

Gef.: C 44.89, H 6.14, N 7.95



1H NMR (D_2O) δ 5.89 (m, 1 H, $OCH_2-CH=CH_2$), 5.30-5.24 (m, 2 H, $OCH_2-CH=CH_2$), 5.03 (d, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, 1 H, $H-1$), 4.48 (d, $J_{1',2'} = 8.0$ Hz, 1 H, $H-1'$), 4.13 (ddd, $J_{4,5} = 0.8$ Hz, 1 H, $H-5$), 4.07 (dd, $J_{3,4} = 3.6$, 1 H, $H-4$), 4.02-3.97 (m, 3 H, $H-6a'$, $H-3$, $OCH_2-CH=CH_2$), 3.92 (bd, $J_{3',4'} = 4.2$ Hz, $J_{4',5'} = 1.8$ Hz, 1 H, $H-4'$), 3.90 (dd, 1 H, $H-8''$), 3.86 (dd, 1 H, $H-9a''$), 3.84-3.71 (m, 5 H, $H-2$, $H-6a$, $H-6b$, $H-6a'$, $H-5''$), 3.69-3.65 (m, 3 H, $H-9b''$, $H-6''$, $H-5'$), 3.63-3.60 (m, 2 H, $H-4''$, $H-3'$), 3.58 - 3.52 (m, 2 H, $H-7''$, $H-6b'$), 3.47 (dd, 1 H, $H-2'$), 2.69 (dd, $J_{3eq'',4''} = 4.5$ Hz, 1 H, $H-3eq''$), 2.03 (s, 3 H, $NHCOCH_3$), 1.73 (t, $J_{3ax'',4''} = 12.1$ Hz, $J_{3ax'',3eq''} = 12.0$ Hz, 1 H, $H-3ax''$).

^{13}C NMR (D_2O) δ 175.75 ($COCH_3''$), 174.17 (C-1''), 132.89 ($OCH_2-CH=CH_2$), 117.70 ($OCH_2-CH=CH_2$), 103.89 (C-1'), 100.78 (C-2''), 96.83 (C-1), 78.37 (C-3), 74.83 (C-5'), 73.23

(C-6''), 73.15 (C-3'), 72.47 (C-8''), 71.94 (C-4), 71.35 (C-2'), 70.33 (C-5), 69.25 (C-7''), 69.12 (C-4'), 69.10 (C-4''), 64.35 (C-6'), 63.41 (C-9''), 61.15 (C-6), 60.98 (C-2), 60.61 (OCH₂-CH=CH₂), 52.59 (C-5''), 40.91 (C-3''), 22.78 (CH₃'').

Allyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-3)-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosid (53)

Die Verbindungen **14** und **18** werden 28 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 24 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **53** in 11% Ausbeute (3.8 mg) ebenso wie bei dem Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase (10%, 3.5 mg).

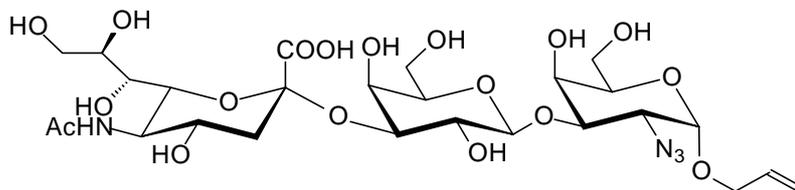
53 C₂₆H₄₂N₄O₁₈ (M 698.63)

$[\alpha]_D^{20} = 4.7^\circ$ (c 1.0, H₂O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 44.70, H 6.06, N 8.02

Gef.: C 44.31, H 6.15, N 7.92



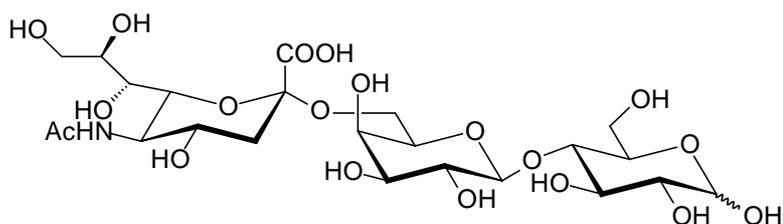
¹H NMR (D₂O) δ 5.93 (m, 1 H, OCH₂-CH=CH₂), 5.34-5.26 (m, 2 H, OCH₂-CH=CH₂), 5.03 (d, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, 1 H, H-1), 4.52 (d, $J_{1,2'} = 7.9$ Hz, 1 H, H-1'), 4.12-4.09 (m, 2 H, H-3', H-5), 4.03 (dd, $J_{3,4} = 3.8$ Hz, 1 H, H-4), 4.02-3.98 (m, 2 H, OCH₂-CH=CH₂, H-3), 3.96 (bd, $J_{4,5'} = 0.8$ Hz, 1 H, H-4'), 3.89-3.87 (m, 2 H, H-8'', H-9a''), 3.83-3.75 (m, 4 H, H-5'', H-2, H-6a, H-6b), 3.75-3.61 (m, 9 H, H-6a', H-6b', H-5', H-4'', H-6'', H-9b'', H-6a, H-6b, H-2'), 3.60 (dd, $J_{7'',8''} = 9.8$ Hz, 1 H, H-7''), 3.57 (dd, $J_{2',3'} = 10.6$ Hz, $J_{3',4'} = 3.0$ Hz, 1 H, H-3'), 2.75 (dd, $J_{3eq'',4''} = 4.4$ Hz, $J_{3ax'',3eq''} = 11.8$ Hz, 1 H, H-3eq''), 2.03 (s, 3 H, NHCOCH₃), 1.80 (t, $J_{3ax'',4''} = 11.9$ Hz, 1 H, H-3ax'').

¹³C NMR (D₂O) δ 175.90 (COCH₃''), 174.69 (C-1''), 133.07 (OCH₂-CH=CH₂), 118.11 (OCH₂-CH=CH₂), 104.85 (C-1'), 100.51 (C-2''), 96.74 (C-1), 78.67 (C-3), 76.57 (C-3'), 75.78 (C-5'), 73.81 (C-6''), 72.23 (C-4), 70.70 (C-5), 70.11 (C-2'), 69.22 (C-4''), 69.13 (C-7''), 68.31 (C-4'), 63.42 (C-9''), 61.75 (C-6'), 61.42 (C-2), 61.35 (OCH₂-CH=CH₂), 61.18 (C-6), 52.47 (C-5''), 40.63 (C-3''), 22.90 (CH₃'').

(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-6)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)- β -D-glucopyranose (55)

Die Verbindungen **56** und **18** werden 20 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 36 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **55** in 12% Ausbeute (4.1 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 9% (2.4 mg).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturwerten.¹³⁵



Phenyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-6)-(β-D-galactopyranosyl)-(1-3)-1-thio-2-azido-2-desoxy-β-D-glucopyranosid (57)

Die Verbindungen **15** und **18** werden 28 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 36 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **57** in 11% Ausbeute (4.0 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 5% (Bestimmung erfolgte per HPLC, keine Isolierung).

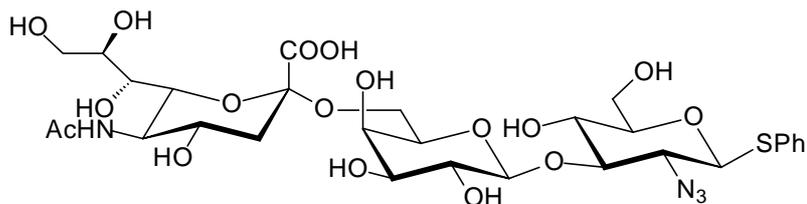
57 C₂₉H₄₂N₃O₁₇S (M 736.72)

$[\alpha]_D^{20} = -24^\circ$ c (c 0.6, H₂O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 47.28, H 5.75, N 5.70

Gef.: C 47.21, H 5.71, N 5.75



¹H NMR (D₂O) δ 7.59-7.37 (m, 5 H, Ph), 4.84 (d, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 1 H, H-1), 4.45 (d, $J_{1',2'} = 7.9$ Hz, 1 H, H-1'), 4.19 (dd, 1 H, H-3), 4.09 (dd, $J_{4,5} = 1.0$ Hz, 1 H, H-4), 3.99 (dd, $J_{6a',6b'} = 9.9$ Hz, 1 H, H-6a'), 3.91 (dd, $J_{3',4'} = 3.6$ Hz, $J_{4',5'} = 1.5$ Hz, 1 H, H-4'), 3.89-3.87 (m, 2 H, H-8'', H-9a''), 3.83 (m, 1 H, H-5'), 3.79 (dd, $J_{5'',6''} = 10.0$ Hz, 1 H, H-5''), 3.75 - 3.67 (m, 3 H, H-6'', H-6a, H-6b), 3.66 (dd, 1 H, H-3'), 3.64 (dd, 1 H, H-9b''), 3.62 (dd, $J_{4'',5''} = 9.2$ Hz, 1 H, H-4''), 3.59 - 3.48 (m, 5 H, H-7'', H-2', H-6b', H-2, H-5), 2.68 (dd, $J_{3eq'',4''} = 5.1$ Hz, 1 H, H-3eq''), 2.03 (s, 3 H, NHC(=O)CH₃), 1.72 (t, $J_{3ax'',4''} = 12.0$ Hz, $J_{3ax'',3eq''} = 12.2$ Hz, 1 H, H-3ax'').

^{13}C NMR (D_2O) δ 175.69 (COCH_3''), 174.24 ($\text{C-1}''$), 133.31-128.57 (Ph), 104.25 ($\text{C-1}'$), 100.93 ($\text{C-2}''$), 89.11 (C-1), 80.15 (C-3), 75.15 (C-5), 74.56 ($\text{C-5}'$), 73.39 ($\text{C-3}'$), 73.21 ($\text{C-6}''$), 72.52 ($\text{C-8}''$), 71.55 ($\text{C-2}'$), 69.22 ($\text{C-7}''$), 69.20 ($\text{C-4}'$), 69.17 (C-4), 68.99 ($\text{C-4}''$), 64.16 ($\text{C-6}'$), 63.52 ($\text{C-9}''$), 62.91 (C-2), 61.15 (C-6), 52.69 ($\text{C-5}''$), 40.87 ($\text{C-3}''$), 22.84 (CH_3'').

Phenyl-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-3)-1-thio-2-azido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (58**)**

Die Verbindungen **15** und **18** werden 28 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 36 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **58** in 10% Ausbeute (3.7 mg), bei dem Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase (12%, 4.4 mg).

Nach AAV 11 werden Verbindung **15** und **19** mit *Trypanosoma cruzi* Sialidase inkubiert. Es bildet sich **58** in 26% (8.6 mg)

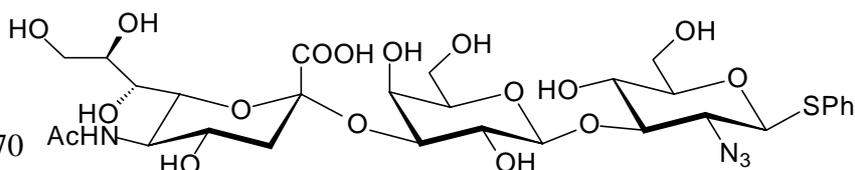
58 $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_{17}\text{S}$ (M 736.72)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -28^\circ$ (c 0.4, H_2O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 47.28, H 5.75, N 5.70

Gef.: C 47.43, H 5.66, N 5.73



^1H NMR (D_2O) δ 7.61-7.36 (m, 5 H, Ph), 4.86 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1 H, $H-1$), 4.50 (d, $J_{1,2'} = 8.1$ Hz, 1 H, $H-1'$), 4.19 (dd, $J_{3,4} = 4.0$ Hz, 1 H, $H-3$), 4.12 (dd, $J_{4,5} = 1.6$ Hz, 1 H, $H-4$), 4.08 (dd, 1 H, $H-3'$), 3.93 (bd, $J_{4',5'} = 0.9$ Hz, 1 H, $H-4'$), 3.87-3.84 (m, 3 H, $H-8''$, $H-9a''$, $H-5''$), 3.76 (m, 2 H, $H-6a'$, $H-6b'$), 3.70 - 3.62 (m, 6 H, $H-5'$, $H-4''$, $H-6''$, $H-9b''$, $H-6a$, $H-6b$), 3.59 (dd, 1 H, $H-7''$), 3.54 (m, 2 H, $H-2'$, $H-2$), 2.75 (dd, $J_{3\text{eq}'',4''} = 4.6$ Hz, $J_{3\text{ax}'',3\text{eq}''} = 12.0$ Hz, 1 H, $H-3\text{eq}''$), 2.03 (s, 3 H, NHCOCH_3), 1.78 (t, $J_{3\text{ax}'',4''} = 11.6$ Hz, 1 H, $H-3\text{ax}''$).

^{13}C NMR (D_2O) δ 175.78 (COCH_3''), 174.59 ($\text{C-1}''$), 133.10-128.75 (Ph), 104.25 ($\text{C-1}'$), 100.39 ($\text{C-2}''$), 90.14 (C-1), 80.42 (C-3), 76.36 ($\text{C-3}'$), 75.82 ($\text{C-5}'$), 75.22 (C-5), 73.61 ($\text{C-6}''$), 72.57 ($\text{C-8}''$), 69.86 ($\text{C-2}'$), 69.11 ($\text{C-4}''$), 68.81 ($\text{C-7}''$), 68.35 (C-4), 68.12 ($\text{C-4}'$), 63.32 ($\text{C-9}''$), 62.88 (C-2), 61.89 ($\text{C-6}'$), 61.18 (C-6), 52.44 ($\text{C-5}''$), 40.62 ($\text{C-3}''$), 22.87 (CH_3'').

Phenyl-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-6)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-1-thio-2-azido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (59)

Die Verbindungen **16** und **18** werden 28 h (*Vibrio cholerae* Sialidase) bzw. 36 h (*Clostridium perfringens* Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Vibrio cholerae* Sialidase entsteht **59** in 13% Ausbeute (4.8 mg), bei Einsatz von *Clostridium perfringens* Sialidase in 8% (2.9 mg).

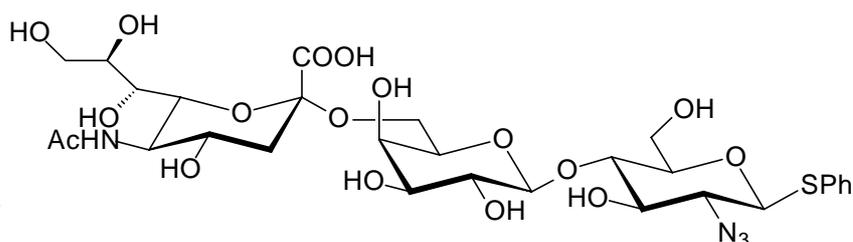
59 C₂₉H₄₂N₃O₁₇S (M 736.72)

$[\alpha]_D^{20} = -2.1^\circ$ (c 0.3, H₂O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 47.28, H 5.75, N 5.70

Gef.: C 47.02, H 5.65, N 5.74



¹H NMR (D₂O) δ 7.59-7.35 (m, 5 H, Ph), 5.14 (dd, $J_{1,2eq} = 1.0$ Hz, $J_{1,2ax} = 3.8$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.45 ($J_{1,2'} = 7.7$ Hz, 1 H, *H*-1'), 3.99 (dd, $J_{4,5} = 1.0$ Hz, 1 H, *H*-4), 3.96 (dd, 1 H, $J_{6a',6b'} = 9.9$ Hz, *H*-6a'), 3.94 (m, 1 H, *H*-3), 3.91 (m, 1 H, *H*-4'), 3.88 - 3.86 (m, 2 H, *H*-9a'', *H*-8''), 3.83-3.81 (m, 2 H, *H*-5', *H*-5), 3.79 (m, 1 H, *H*-5''), 3.73 - 3.61 (m, 7 H, *H*-4'', *H*-3', *H*-9a'', *H*-6'', *H*-6a, *H*-6b, *H*-2), 3.56-3.54 (m, 3 H, *H*-2', *H*-6b', *H*-7''), 3.53 (m, 1 H, *H*-2'), 2.67 (dd, $J_{3eq'',4''} = 5.0$ Hz, $J_{3eq'',3ax''} = 12.1$ Hz, 1 H, *H*-3ax''), 1.71 (t, $J_{3ax'',4''} = 12.0$ Hz, 1 H, *H*-3ax'').

¹³C NMR (D₂O) δ 175.79 (COCH₃''), 174.16 (C-1''), 133.32-128.91 (Ph), 104.41 (C-1'), 100.82 (C-2''), 87.54 (C-1), 81.31 (C-4), 75.22 (C-5), 74.51 (C-5'), 73.39 (C-6''), 73.28 (C-3'), 73.04 (C-3), 72.59 (C-8''), 71.64 (C-2'), 69.27 (C-7''), 69.19 (C-4'), 69.14 (C-4''), 64.25 (C-6'), 63.47 (C-9''), 60.97 (C-6), 56.39 (C-2), 52.69 (C-5''), 40.91 (C-3''), 22.86 (COCH₃).

Phenyl-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-1-thio-2-azido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (60)

Die Verbindungen **16** und **18** werden 28 h (*Salmonella typhimurium* Sialidase) bzw. 36 h (Newcastle Disease Virus Sialidase) gemäß AAV 6 inkubiert. Bei Einsatz von *Salmonella typhimurium* Sialidase entsteht **60** in 12% Ausbeute (3.7 mg), ebenso bei dem Einsatz von Newcastle Disease Virus Sialidase (12%, 4.4 mg).

Nach AAV 11 werden Verbindung **16** und **19** mit *Trypanosoma cruzi* Sialidase inkubiert. Es bildet sich **60** in 32% (10.6 mg).

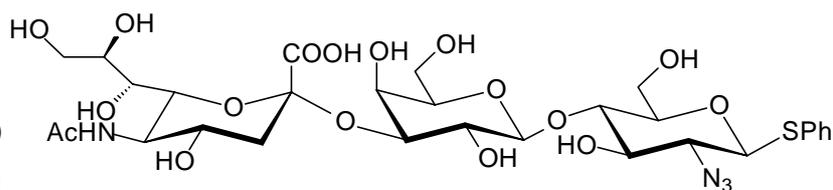
60 C₂₉H₄₂N₄O₁₇S (M 736.72)

[α]_D²⁰ = -1.8° (c 0.6, H₂O)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 47.28, H 5.75, N 5.70

Gef.: C 47.21, H 5.83, N 5.64



¹H NMR (D₂O) δ 7.62-7.38 (m, 5 H, Ph), 5.10 (dd, $J_{1,2eq} = 0.8$ Hz, $J_{1,2ax} = 3.8$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.54 (d, $J_{1',2'} = 7.6$ Hz, 1 H, *H*-1'), 4.12 (m, 1 H, *H*-3'), 3.97 (dd, $J_{4',5'} = 1.0$ Hz, 1 H, *H*-4'), 3.90 (m, 3 H, *H*-8'', *H*-6a, *H*-6b), 3.87 (dd, 1 H, *H*-9b''), 3.85 (dd, $J_{5'',6''} = 10.2$ Hz, 1 H, *H*-5''), 3.82 (dd, 1 H, *H*-3), 3.73 - 3.64 (m, 5 H, *H*-4'', *H*-5', *H*-6a', *H*-6b', *H*-2), 3.65-3.63 (m, 2 H, *H*-6'', *H*-9b''), 3.67 (dd, 1 H, *H*-4), 3.62 (ddd, 1 H, *H*-5), 3.60-3.58 (m, 2 H, *H*-7'', *H*-2'), 2.77 (dd, 1 H, $J_{3eq'',4''} = 4.6$ Hz, $J_{3eq'',3ax''} = 12.0$ Hz, *H*-3eq''), 1.80 (t, 1 H, $J_{3ax'',4''} = 12.0$ Hz, *H*-3ax'').

¹³C NMR (D₂O) δ 175.79 (COCH₃''), 174.75 (C-1''), 133.14-128.83 (Ph), 103.56 (C-1'), 100.68 (C-2''), 87.24 (C-1), 76.33 (C-3'), 76.02 (C-5'), 75.54 (C-5), 74.22 (C-4), 73.75 (C-6''), 73.61 (C-3), 72.65 (C-8''), 70.18 (C-2'), 69.24 (C-4''), 69.05 (C-7''), 68.34 (C-4'), 63.47 (C-9''), 61.85 (C-6'), 60.26 (C-6), 56.89 (C-2), 52.62 (C-5''), 40.65 (C-3''), 22.84 (COCH₃'').

Methyl-*O*-(methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat)-(2-6)-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-*O*-(3,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-tert-butylidiphenylsilyl- β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-*O*-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (68)

Zu einer auf -40°C gekühlten Lösung von N-Iodsuccinimid (20 mg, 0.09 mmol), Molsieb 4 Å (200 mg) und 1 ml Toluol gibt man eine Lösung von **66** (90 mg, 70 μ mol) und **67** (20 mg, 60 μ mol) in Toluol. Anschließend gibt man 50 μ l einer gesättigten Lösung von Trifluoressigsäure (TfOH) in CCl₄ (ca. 2 M) hinzu. Die Mischung läßt man unter Rühren über einen Zeitraum von 1.5 h auf -10°C erwärmen. Für eine weitere Stunde läßt man bei -10°C rühren. Man verdünnt mit 20 ml Ethylacetat und quencht die Reaktion durch Zugabe von gesättigter NaHCO₃-Lösung. Die Mischung wird über Celite filtriert. Die zwei Phasen werden getrennt. Die organische Phase wäscht man mit wässriger Na₂S₂O₃-Lösung. Diese wäßrige Phase wird mit EtOAc gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, eingeengt und flashchromatographisch gereinigt (PE/EE 2:1). Man erhält

53% (56 mg) von Verbindung **68**, daneben etwa 8% α -Anomer und ca. 10% einer nicht identifizierten Verbindung.

68 C₈₁H₁₁₁N₄O₄₂Si (M 1840.85)

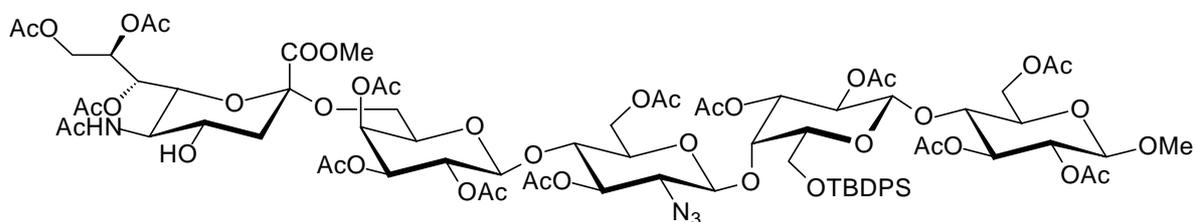
$[\alpha]_D^{20} = -21.6^\circ$ (c 0.3, CHCl₃)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 52.85, H 6.08, N 3.04

Gef.: C 53.89, H 6.34, N 1.66

MALDI-TOF 1863.84 (M + Na)⁺, 1879.94 (M + K)⁺



¹H NMR (CDCl₃) δ 7.70 – 7.24 (m, 10, Ph), 5.74 (dd, 1 H, *H*-4^{III}), 5.70 (ddd, 1 H, *H*-8^{IV}), 5.61 (dd, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, 1 H, *H*-2^{III}), 5.44 (dd, $J_{7,8} = 9.0$ Hz, 1 H, *H*-7^{IV}), 5.26 (dd, 1 H, *H*-3^{III}), 5.22 (t, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.8$ Hz, 1 H, *H*-3), 5.10 (dd, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, 1 H, *H*-2^I), 4.93 (t, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, 1 H, *H*-2), 4.87 (2d, 2 H, *H*-1^{III}, *H*-3^{II}), 4.85 (ddd, $J_{4,5} = 10.2$ Hz, 1 H, *H*-4^{IV}), 4.65 (dd, 1 H, *H*-3^I), 4.61 (d, $J_{3,4} = 4.0$ Hz, *H*-4^I), 4.59 (dd, $J_{9a,9b} = 12.2$ Hz, 1 H, *H*-9a^{IV}), 4.51 (d, 1 H, *H*-1^{II}), 4.49 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1 H, *H*-1^I), 4.48 (dd, 1 H, *H*-6b^{II}), 4.46 (d, $J_{1,2} = 10.0$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.42 (dd, 1 H, *H*-6b), 4.34 (dd, 1 H, *H*-9b^{IV}), 4.32 (d, 1 H, NH^V), 4.29 (ddd, $J_{5,6} = 10.6$ Hz, 1 H, *H*-5^{IV}), 4.20 (dd, 1 H, *H*-6b^{II}), 4.13 (m, 2 H, *H*-6^{IV}, *H*-6b^I), 4.10 (dd, $J_{5,6a} = 5.6$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, 1 H, *H*-6a), 4.08 (dd, $J_{5,6a} = J_{6a,6b} = 6.0$ Hz, 1 H, *H*-6a^I), 4.06 (dd, 1 H, *H*-6b^{III}), 3.88 (ddd, 1 H, *H*-5^{III}), 3.83 (m, 2 H, *H*-5^I, *H*-4^{II}), 3.78 (s, 3 H, OCH₃), 3.77 (t, $J_{3,4} = 9.9$ Hz, 1 H, *H*-4), 3.62 (ddd, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, $J_{5,6a} = 5.5$ Hz, $J_{5,6b} = 2.0$ Hz, 1 H, *H*-5), 3.61 (dd, 1 H, *H*-6b^{III}), 3.59 (ddd, 1 H, *H*-5^{II}), 3.56 (dd, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, 1 H, *H*-2^{II}), 3.33 (s, 3 H, CH₃^{IV}), 2.69 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12.7$ Hz, $J_{3e,4} = 4.6$, 1 H, *H*-3eq^{IV}), 2.15 – 1.36 (14s, 42 H, 13 OAc, 1 NAc), 2.03 (dd, $J_{3ax,4} = 12.0$ Hz, 1 H, *H*-3ax^{IV}), 1.01 (s, 9 H, SiCCH₃).

Methyl-*O*-(methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat)-(2-6)-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1-4)-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-*O*-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (69)

Verbindung **68** (53 mg, 30 μ mol) wird mit $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (105 mg, 450 μ mol) und Borsäure (H_3BO_3 , 55 mg, 900 μ mol) in 3 ml Ethanol gelöst. Unter starkem Rühren gibt man langsam eine Suspension von Natriumborhydrid (28 mg, 750 μ mol) in 1 ml Ethanol hinzu, so daß die Temperatur nicht über 20°C steigt. Nach 30 min werden 3 ml Essigsäure und 6 ml Ethanol zugegeben und die Mischung dreimalig mit 5 ml Toluol codestilliert. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen und nacheinander gegen verdünnte KHSO_4 -Lösung, gesättigte NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und eingengt.

Das so erhaltene Produkt wird in 2 ml Dichlormethan/Trifluoressigsäure (95%) (9:1) aufgenommen und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend engt man im Hochvakuum ein und codestilliert mehrmals mit Toluol. Im folgenden wird mit Acetanhydrid/Pyridin nachacetyliert. Die Mischung wird mehrmals mit Toluol codestilliert. Das so erhaltene Rohprodukt wird flaschromatographisch gereinigt (Toluol / Aceton 3 : 1) Man erhält 35 mg (21 mmol, 70%) der Titelverbindung.

69 $\text{C}_{69}\text{H}_{96}\text{N}_2\text{O}_{44}$ (M 1657.50)

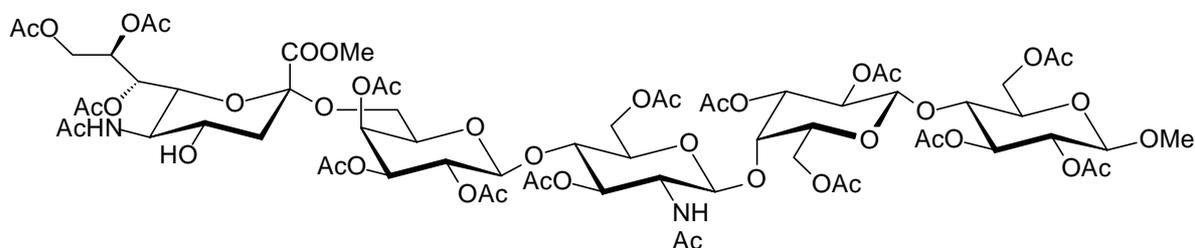
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -21.6^\circ$ (c 0.3, CHCl_3)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 50.01, H 5.84, N 1.69

Gef.: C 49.86, H 5.77, N 1.65

MALDI-TOF 1680.49 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 1696.60 ($\text{M} + \text{K}^+$)



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.72 – 7.25 (m, 10, Ph), 5.72 (ddd, 1 H, $H\text{-}8^{\text{IV}}$), 5.70 (dd, 1 H, $H\text{-}4^{\text{III}}$), 5.59 (dd, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, 1 H, $H\text{-}2^{\text{III}}$), 5.43 (dd, $J_{7,8} = 8.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}7^{\text{IV}}$), 5.32 (d, $J_{3,4} = 4.0$ Hz, $H\text{-}4^{\text{I}}$), 5.23 (dd, 1 H, $H\text{-}3^{\text{III}}$), 5.21 (t, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.2$ Hz, 1 H, $H\text{-}3$), 5.11 (dd, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}2^{\text{I}}$), 4.90 (t, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, 1 H, $H\text{-}2$), 4.88 (d, 1 H, $H\text{-}1^{\text{III}}$), 4.86 (m, 2 H, $H\text{-}$

3^{II}, H-4^{IV}), 4.63 (dd, 1 H, H-3^I), 4.59 (dd, $J_{9a,9b} = 11.9$ Hz, 1 H, H-9a^{IV}), 4.53 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1 H, H-1^I), 4.50 (d, 1 H, H-1^{II}), 4.47 (m, 2 H, H-6b^{II}, H-1), 4.39 (dd, 1 H, H-6b), 4.32 (d, 1 H, NH^V), 4.31 (dd, 1 H, H-9b^{IV}), 4.27 (ddd, $J_{5,6} = 10.3$ Hz, 1 H, H-5^{IV}), 4.18 (dd, 1 H, H-6b^{II}), 4.11 (dd, 1 H, H-6^{IV}), 4.09 (dd, $J_{5,6a} = 5.8$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, 1 H, H-6a), 4.01 (dd, 1 H, H-6b^{III}), 3.92 (ddd, 1 H, H-5^{III}), 3.87 (dd, $J_{5,6a} = J_{6a,6b} = 6.0$ Hz, 1 H, H-6a^I), 3.85 (dd, 1 H, H-6b^I), 3.82 (m, 2 H, H-5^I, H-4^{II}), 3.77 (s, 3 H, OCH₃), 3.75 (t, $J_{3,4} = 10.1$ Hz, 1 H, H-4), 3.65 (ddd, $J_{4,5} = 9.8$ Hz, $J_{5,6a} = 5.6$ Hz, $J_{5,6b} = 1.8$ Hz, 1 H, H-5), 3.59 (m, 2 H, H-6b^{III}, H-5^{II}), 3.57 (dd, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, 1 H, H-2^{II}), 3.31 (s, 3 H, CH₃^{IV}), 2.70 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12.5$ Hz, $J_{3e,4} = 4.4$, 1 H, H-3eq^{IV}), 2.17 – 1.33 (16s, 48 H, 14 OAc, 2 NAc), 2.01 (dd, $J_{3ax,4} = 12.0$ Hz, 1 H, H-3ax^{IV}), 1.00 (s, 9 H, SiCCH₃).

Methyl-*O*-(methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat)-(2-3)-*O*-(2,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1-3)-*O*-(2,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1-3)-*O*-(2,6-di-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (73)

Zu einer auf -40°C gekühlten Lösung von N-Iodsuccinimid (20 mg, 0.09 mmol), Molsieb 4 Å (200 mg) und 1 ml Toluol gibt man eine Lösung von **72** (95 mg, 72 μmol) und **71** (25 mg, 63 mmol) in Toluol. Anschließend gibt man 50 μl einer gesättigten Lösung von Trifluoressigsäure (TfOH) in CCl₄ (ca. 2 M) hinzu. Die Mischung läßt man unter Rühren über einen Zeitraum von 1.5 h auf -10°C erwärmen. Man verdünnt mit 20 ml Ethylacetat und quencht die Reaktion durch Zugabe von gesättigter NaHCO₃-Lösung. Die Mischung wird über Celite filtriert. Die zwei Phasen werden getrennt. Die organische Phase wäscht man mit wässriger NaS₂O₃-Lösung. Diese wäßrige Phase wird mit EtOAc gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, eingengt und flashchromatographisch gereinigt (PE/EE 2:1). Man erhält 78% (83 mg) von Verbindung **73**, daneben etwa 5% α -Anomer und ca. 7% des Bisadduktes.

73 C₆₅H₈₈N₄O₄₀ (M 1565.41)

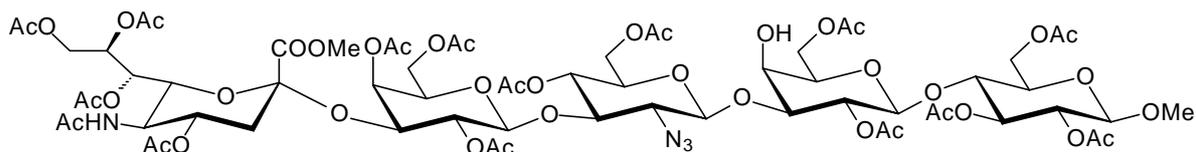
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -3.5^{\circ}$ (c 0.1, CHCl₃)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 48.66, H 5.53, N 3.49

Gef.: C 49.33, H 6.59, N 3.62

MALDI-TOF 1588.40 (M + Na)⁺, 1604.50 (M + K)⁺



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 5.75 (dt, 1 H, $H\text{-}8^{\text{IV}}$), 5.72 (d, 1 H, NH), 5.39 (d, $J_{3,4} = 2.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}4^{\text{I}}$), 5.36 (dd, $J_{7,8} = 9.3$ Hz, 1H, $H\text{-}7^{\text{IV}}$), 5.15 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4$ Hz, 1 H, $H\text{-}3$), 5.06 (dd, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, $H\text{-}2^{\text{III}}$), 4.99-4.97 (m, 2 H, $H\text{-}2^{\text{I}}$, $H\text{-}4^{\text{II}}$), 4.96 (dd, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, $J_{2,3} = 9.6$ Hz, 1 H, $H\text{-}2$), 4.91 (dd, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, 1 H, $H\text{-}1^{\text{III}}$), 4.87 (d, $J_{3,4} = 2.6$ Hz, $H\text{-}4^{\text{III}}$), 4.83 (dt, $J_{3\text{eq},4} = 4.4$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = J_{4,5} = 12.1$ Hz, 1 H, $H\text{-}4^{\text{IV}}$), 4.75 (dd, $J_{5,6} = 10.1$ Hz, $J_{6,7} = 2.2$ Hz, $H\text{-}6^{\text{IV}}$), 4.62 (dd, 1 H, $H\text{-}3^{\text{II}}$), 4.57 (dd, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, $J_{3,4} = 2.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}3^{\text{III}}$), 4.51 (d, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}1$), 4.49 (dd, 1 H, $H\text{-}6$), 4.39 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1 H, $H\text{-}1^{\text{I}}$), 4.37 (d, $J_{1,2} = 8.1$ Hz, 1 H, $H\text{-}1^{\text{II}}$), 4.29 (dd, $J_{9\text{a},9\text{b}} = 12.4$ Hz, $J_{8,9\text{b}} = 2.4$ Hz, $H\text{-}9\text{b}^{\text{IV}}$), 4.24 (dd, $J_{6\text{a},6\text{b}} = 12.6$ Hz, $J_{5,6\text{a}} = 6.6$ Hz, 1 H, $H\text{-}6\text{a}^{\text{II}}$), 4.17 (dd, $J_{5,6} = 10.2$ Hz, $H\text{-}5^{\text{IV}}$), 4.13 (d, 1 H, NH), 3.75 (s, 3 H, $\text{COOCH}_3^{\text{IV}}$), 4.00 (dd, $J_{8,9\text{a}} = 5.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}9\text{a}^{\text{IV}}$), 3.72 (bt, 1 H, $H\text{-}5^{\text{III}}$), 3.59 (m, 1 H, $H\text{-}5$), 3.47-3.44 (m, 2 H, $H\text{-}3^{\text{I}}$, $H\text{-}6\text{a}^{\text{III}}$), 3.39 (dd, $J_{6\text{a},6\text{b}} = 11.0$ Hz, $J_{5,6\text{b}} = 7.8$ Hz, $H\text{-}6\text{b}^{\text{III}}$), 2.61 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.4$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}3\text{eq}^{\text{IV}}$), 2.17 – 1.33 (15s, 45 H, 14 OAc, 1 NAc), 1.91 (dd, $J_{3\text{ax},4} = 11.8$ Hz, 1 H, $H\text{-}3\text{ax}^{\text{IV}}$).

Methyl-*O*-(methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat)-(2-3)-*O*-(2,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1-3)-*O*-(2,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1-3)-*O*-(2,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (74)

Verbindung **73** (80 mg, 51 μmol) wird mit $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (175 mg, 750 μmol) und Borsäure (H_3BO_3 , 91 mg, 1.5 mmol) in 5 ml Ethanol gelöst. Unter starkem Rühren gibt man langsam eine Suspension von Natriumborhydrid (47 mg, 1.25 mmol) in 1 ml Ethanol hinzu, so daß die Temperatur nicht über 20°C steigt. Nach 30 min werden 3 ml Essigsäure und 10 ml Ethanol zugegeben und die Mischung dreimal mit 10 ml Toluol codestilliert. Im folgenden wird mit Acetanhydrid/Pyridin nachacetyliert. Die Mischung wird mehrmals mit Toluol codestilliert. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen und nacheinander gegen verdünnte KHSO_4 -Lösung, gesättigte NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und eingeengt.

Das Rohprodukt wird flaschromatographisch gereinigt (Toluol / Aceton 3 : 1) Man erhält 65 mg (21 μmol , 78%) der Titelverbindung.

74 C₆₉H₉₆N₂O₄₄ (M 1657.50)

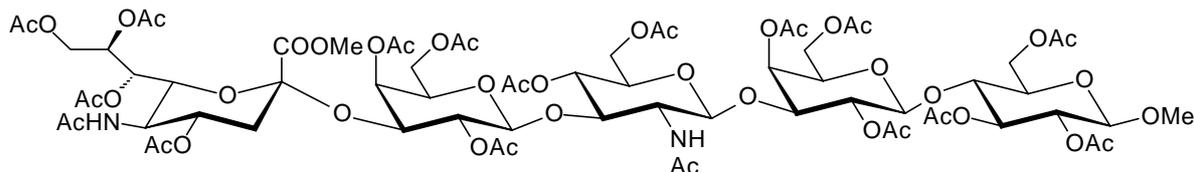
[α]_D²⁰ = -12.7° (c 0.5, CHCl₃)

weißer amorpher Feststoff

Ber.: C 50.01, H 5.84, N 1.69

Gef.: C 49.90, H 5.69, N 1.57

MALDI-TOF 1680.49 (M + Na)⁺, 1696.60 (M + K)⁺



¹H NMR (CDCl₃) δ 5.74 (dt, 1 H, *H*-8^{IV}), 5.72 (d, 1 H, NH), 5.38 (d, *J*_{3,4} = 2.8 Hz, 1 H, *H*-4^I), 5.33 (dd, *J*_{7,8} = 9.3 Hz, 1H, *H*-7^{IV}), 5.12 (dd, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 9.6 Hz, 1 H, *H*-3), 5.05 (dd, *J*_{1,2} = 8.0 Hz, *J*_{2,3} = 10.2 Hz, *H*-2^{III}), 4.99 (dd, *J*_{1,2} = 8.0 Hz, *J*_{2,3} = 9.7 Hz, 1 H, *H*-2^I), 4.97 (m, 2 H, *H*-4^{II}), 4.95 (dd, *J*_{1,2} = 8.0 Hz, *J*_{2,3} = 9.8 Hz, 1 H, *H*-2), 4.91 (dd, *J*_{1,2} = 7.9 Hz, 1 H, *H*-1^{III}), 4.86 (dt, *J*_{3eq,4} = 4.6 Hz, *J*_{3ax,4} = *J*_{4,5} = 12.0 Hz, 1 H, *H*-4^{IV}), 4.83 (d, *J*_{3,4} = 2.6 Hz, *H*-4^{III}), 4.75 (dd, *J*_{5,6} = 9.9 Hz, *J*_{6,7} = 1.8 Hz, *H*-6^{IV}), 4.61 (dd, 1 H, *H*-3^{II}), 4.57 (dd, *J*_{2,3} = 9.8 Hz, *J*_{3,4} = 2.6 Hz, 1 H, *H*-3^{III}), 4.53 (dd, 1 H, *H*-6), 4.51 (d, *J*_{1,2} = 8.0 Hz, 1 H, *H*-1), 4.39-4.37 (m, 2 H, *H*-1^I, *H*-1^{II}), 4.32 (dd, *J*_{9a,9b} = 12.3 Hz, *J*_{8,9b} = 2.1 Hz, *H*-9b^{IV}), 4.26 (dd, *J*_{6a,6b} = 12.2 Hz, *J*_{5,6a} = 6.1 Hz, 1 H, *H*-6a^{II}), 4.13 (dd, *J*_{5,6} = 9.8 Hz, *H*-5^{IV}), 4.13 (d, 1 H, NH), 4.00 (dd, *J*_{8,9a} = 5.8 Hz, 1 H, *H*-9a^{IV}), 3.75 (s, 3 H, COOCH₃^{IV}), 3.71 (bt, 1 H, *H*-5^{III}), 3.55 (m, 1 H, *H*-5), 3.46-3.44 (m, 2 H, *H*-6a^{III}, *H*-3^I), 3.43 (dd, *J*_{6a,6b} = 11.0 Hz, *J*_{5,6b} = 7.8 Hz, *H*-6b^{III}), 2.59 (dd, *J*_{3ax,3eq} = 12.2 Hz, *J*_{3eq,4} = 4.6 Hz, 1 H, *H*-3eq^{IV}), 2.21 – 1.35 (17s, 51 H, 15 OAc, 2 NAc), 1.93 (dd, *J*_{3ax,4} = 12.0 Hz, 1 H, *H*-3ax^{IV}).

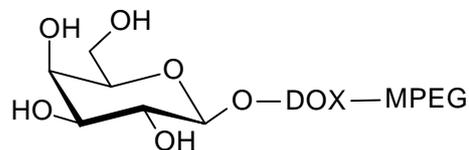
[MPEG][DOX]yl-4-*O*- β -D-galactopyranoside (**81**)

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyltrichloroacetimidat (495 mg, 1 mmol, **79**), MPEG-DOX-OH (2.6 g, 0.54 mmol, **78**) und Molsieb MS 3 Å (1 g) werden unter Argon in trockenem Dichlormethan gelöst. Man läßt die Mischung für 1 h bei Raumtemperatur rühren und kühlt dann auf 0°C. Nach Zugabe von Trimethylsilyltrifluoromethansulfonat (TMSOTf, 96 μ l, 0.54 mmol) rührt man erneut für 45 min. Anschließend gibt man Diisopropylethylamin (85 μ l) hinzu und läßt für weitere 10 min rühren. Die Mischung wird filtriert. Zur Ausfällung wird mit einem Überschuß *tert*-Butylmethylether (100 ml) versetzt. Das Polymer wird abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen.. Man erhält Verbindung **80**, die nach AAV 2

(Variante b) mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) deacetyliert wird. Die Aufarbeitung erfolgt analog durch Ausfällung mit *tert*-Butylmethyl-ether (100 ml) und Filtration. Das so erhaltene Rohprodukt wird aus heißem Ethanol (75 ml) umkristallisiert. Man erhält Verbindung **81** in 84% Ausbeute (2.43 g).

gelblicher amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -43.1^\circ$ (c 0.8, CHCl_3)



$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ 7.75-7.63 (m, 4 H, ArH), 5.74 (m, 2 H, OCH_2Ar), 5.59 (m, 2 H, ArOCH_2PEG), 4.83 (d, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.80-4.50 (CH_2O), 4.36 (OCH_3), 3.91 (dd, $J_{2,3} = 10.6$ Hz, 1 H, *H*-2), 3.87-3.81 (m, 2 H, *H*-6a, *H*-6b), 3.81 (dd, $J_{2,3} = 10.6$ Hz, $J_{3,4} = 9.8$ Hz, 1 H, *H*-3), 3.59 (dd, $J_{3,4} = 9.8$ Hz, 1 H, *H*-4), 3.50 (ddd, $J_{4,5} = 9.6$ Hz, $J_{5,6a} = 6.0$ Hz, $J_{5,6b} = 2.0$ Hz, 1 H, *H*-5).

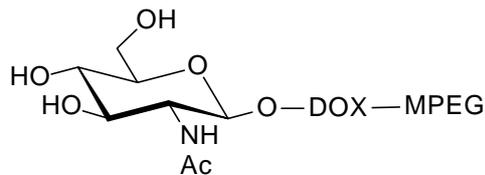
$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ 139.07-127.84 (Ar-C), 108.32 (OCH_2Ar), 104.17 (C-1), 75.33 (C-5), 73.01 (C-3), 70.98 (C-2), 68.95 (C-4), 68.52 (CH_2O), 61.19 (C-6), 23.43 (OCH_3).

[MPEG][DOX]yl-4-*O*-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid (**91**).

4-*O*-2-acetamido-2-deoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylchlorid (914 mg, 2.5 mmol, 5 Äquiv., **89**) und MPEG-DOX-OH (2.6 g, 0.5 mmol, 1 Äquiv., **78**) werden unter Argon in trockenem Dichlormethan gelöst und mit Silbertrifluormethansulfonat (514 mg, 2 mmol, 4 Äquiv.) versetzt. Unter Rückfluß läßt man die Mischung für 8 h rühren. Die Mischung wird filtriert. Zur Ausfällung wird mit einem Überschuß *tert*-Butylmethylether (120 ml) versetzt. Das Polymer wird abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen.. Man erhält Verbindung **90**, die nach AAV 2 (Variante b) mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) deacetyliert wird. Die Aufarbeitung erfolgt analog durch Ausfällung mit *tert*-Butylmethyl-ether (120 ml) und Filtration. Das so erhaltene Rohprodukt wird aus heißem Ethanol (80 ml) umkristallisiert. Man erhält Verbindung **91** in 87% Ausbeute (2.54 g).

gelblicher amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -23.5^\circ$ (c 0.5, CHCl_3)



$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ 7.75-7.62 (m, 4 H, ArH), 5.75 (m, 2 H, OCH_2Ar), 5.58 (m, 2 H, ArOCH_2PEG), 4.80-4.50 (CH_2O , *H*-1), 4.36 (OCH_3), 3.89 (dd, 1 H, *H*-6b), 3.70 (dd, 1 H, *H*-6a), 3.59 (dd, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, 1 H, *H*-2), 3.53 (dd, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, $J_{3,4} = 9.6$ Hz, 1 H, *H*-3),

3.41 (ddd, $J_{4,5} = 9.2$ Hz, $J_{5,6a} = 6.4$ Hz, $J_{5,6b} = 2.2$ Hz, 1 H, $H-5$), 3.30 (dd, $J_{3,4} = 9.6$ Hz, 1 H, $H-4$), 2.03 (COCH₃).

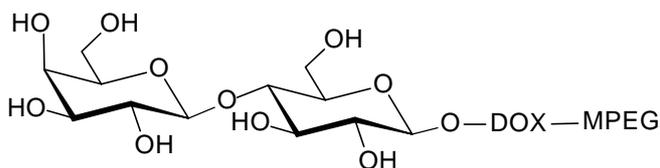
¹³C NMR (D₂O) δ 175.71 (C=O), 139.23-127.97 (Ar-C), 108.37 (OCH₂Ar), 101.87 (C-1), 76.69 (C-5), 74.28 (C-3), 70.69 (C-4), 68.45 (CH₂O), 61.47 (C-6), 54.51 (C-2), 23.39 (OCH₃).

[MPEG][DOX]yl-4-*O*-[β -D-galactopyranosyl]- β -D-glucopyranosid (**94**).

4-*O*-[2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyltrichloroacetimidat (938 mg, 1.2 mmol, **92**), MPEG-DOX-OH (3.1 g, 0.6 mmol, **78**) und Molsieb MS 3 Å (1 g) werden unter Argon in trockenem Dichlormethan gelöst. Man läßt die Mischung für 1 h bei Raumtemperatur rühren und kühlt dann auf -20°C . Nach Zugabe von Trimethylsilyltrifluoromethansulfonat (TMSOTf, 108 μl , 0.6 mmol) rührt man für 6 h. Anschließend gibt man Diisopropylethylamin (100 μl) hinzu und läßt für weitere 10 min rühren. Zur Ausfällung wird mit einem Überschuß *tert*-Butylmethylether (180 ml) versetzt. Das Polymer wird abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen. Man erhält Verbindung **93**, die nach AAV 2 (Variante b) mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) deacetyliert wird. Die Aufarbeitung erfolgt analog durch Ausfällung mit *tert*-Butylmethyl-ether (180 ml) und Filtration. Das so erhaltene Rohprodukt wird aus heißem Ethanol (150 ml) umkristallisiert. Man erhält Verbindung **94** in 76% Ausbeute (2.49 g).

gelblicher amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -19.4^{\circ}$ (c 0.6, CHCl₃)



¹H NMR (D₂O) δ 7.76-7.63 (m, 4 H, ArH), 5.75 (m, 2 H, OCH₂Ar), 5.57 (m, 2 H, ArOCH₂PEG), 4.80-4.50 (CH₂O, $H-1'$, $H-1$), 4.36 (OCH₃), 3.99 (dd, $J_{5,6a} = 5.1$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.3$ Hz, 1 H, $H-6a$), 3.89 (dd, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, 1 H, $H-2'$), 3.85-3.80 (m, 3 H, $H-6a'$, $H-6b'$, $H-6b$), 3.79 (dd, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, $J_{3,4} = 9.9$ Hz, 1 H, $H-3'$), 3.67-3.65 (m, 2 H, $H-4$, $H-3$), 3.63 (ddd, $J_{5,6a} = 5.1$ Hz, $J_{5,6b} = 2.2$ Hz, 1 H, $H-5$), 3.61 (dd, $J_{3,4} = 10.2$ Hz, 1 H, $H-4'$), 3.52 (ddd, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, $J_{5,6a} = 5.9$ Hz, $J_{5,6b} = 1.9$ Hz, 1 H, $H-5'$), 3.35 (dd, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, 1 H, $H-2$).

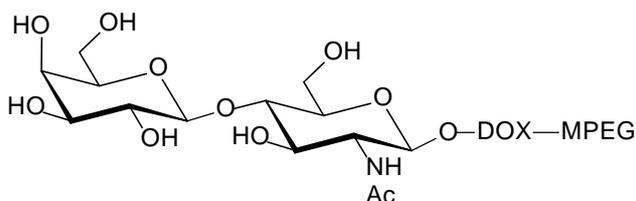
¹³C NMR (D₂O) δ 139.18-127.99 (Ar-C), 108.42 (OCH₂Ar), 103.55 (C-1), 103.13 (C-1'), 78.77 (C-4), 75.54 (C-5'), 74.89 (C-3), 74.63 (C-5), 72.97 (C-2), 72.93 (C-3'), 71.17 (C-2'), 68.93 (C-4'), 68.31 (CH₂O), 61.13 (C-6'), 57.22 (C-6), 23.47 (OCH₃).

[MPEG][DOX]yl-4-*O*-[β -D-galactopyranosyl]-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid (97).

4-*O*-[2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-2-acetamido-2-deoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylchlorid (1.635 g, 2.5 mmol, 5 Äquiv., **95**) und MPEG-DOX-OH (2.6 g, 0.5 mmol, 1 Äquiv., **78**) werden unter Argon in trockenem Dichlormethan gelöst und mit Silbertrifluormethansulfonat (514 mg, 2 mmol, 4 Äquiv.) versetzt. Unter Rückfluß läßt man die Mischung für 10 h rühren. Die Mischung wird filtriert. Zur Ausfällung wird mit einem Überschuß *tert*-Butylmethylether (150 ml) versetzt. Das Polymer wird abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen. Man erhält Verbindung **96**, die nach AAV 2 (Variante b) mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) deacetyliert wird. Die Aufarbeitung erfolgt analog durch Ausfällung mit *tert*-Butylmethyl-ether (150 ml) und Filtration. Das so erhaltene Rohprodukt wird aus heißem Ethanol (100 ml) umkristallisiert. Man erhält Verbindung **97** in 81% Ausbeute (2.68 g).

gelblicher amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -27.8^{\circ}$ (c 0.5, CHCl₃)



¹H NMR (D₂O) δ 7.76-7.63 (m, 4 H, ArH), 5.74 (m, 2 H, OCH₂Ar), 5.57 (m, 2 H, ArOCH₂PEG), 4.80-4.50 (CH₂O, *H*-1), 4.45 (d, $J_{1,2'} = 7.6$ Hz, 1 H, *H*-1'), 4.36 (OCH₃), 3.91 (m, 2 H, *H*-6a, *H*-4'), 3.82 (dd, $J_{2,3} = 10.3$ Hz, 1 H, *H*-2), 3.86 (dd, 1 H, *H*-6b), 3.77-3.74 (m, 2 H, *H*-6a', *H*-6b'), 3.73-3.71 (m, 2 H, *H*-3, *H*-4), 3.69 (m, 1 H, *H*-5'), 3.65 (dd, $J_{2',3'} = 10.2$ Hz, $J_{3',4'} = 3.2$ Hz, 1 H, *H*-3'), 3.51 (dd, $J_{2',3'} = 10.2$ Hz, 1 H, *H*-2'), 3.59 (ddd, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, $J_{5,6a} = 5.9$ Hz, $J_{5,6b} = 1.9$ Hz, 1 H, *H*-5), 2.03 (COCH₃).

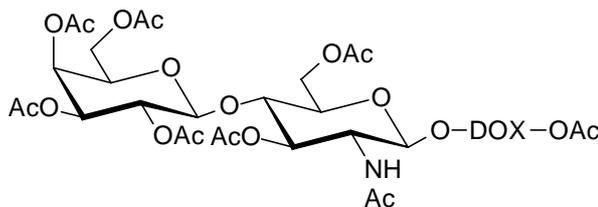
¹³C NMR (D₂O) δ 175.27 (C=O), 139.34-127.91 (Ar-C), 108.57 (OCH₂Ar), 103.79 (C-1'), 103.36 (C-1), 79.05 (C-4), 75.83 (C-5'), 75.27 (C-5), 73.35 (C-3'), 73.03 (C-3), 71.49 (C-2'), 69.07 (C-4'), 68.42 (CH₂O), 61.55 (C-6'), 60.69 (C-6), 55.81 (C-2), 22.81 (COCH₃), 23.43 (OCH₃).

***p*-Acetoxybenzyl- β -D-galactopyranosyl-4-*O*-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid (97a)**

Verbindung **91** und *p*-Np- β Gal werden gemäß AAV 4 mit *Bacillus circulans* β -Galactosidase inkubiert. Nach Ausfällung des Polymers erhält man Verbindung **97** in 19% Ausbeute. Die Aufarbeitung erfolgt gemäß AAV 13. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt gemäß AAV 16. Man erhält **97a** in einer Gesamtausbeute von 9 mg (18%).

97a C₃₆H₄₇NO₁₉ (M 797.76)[α]_D²⁰ = +6.1° (c 0.8, CHCl₃)

weißer amorpher Feststoff



¹H NMR (CDCl₃) δ 7.33-7.29 (m, 4 H, Ar-H), 5.32 (d, $J_{3',4'} = 3.4$ Hz, 1 H, *H*-4'), 5.09 (m, 2 H, CH₂OAc), 5.06 (dd, $J_{1',2'} = 8.0$ Hz, $J_{2',3'} = 9.9$ Hz, 1 H, *H*-2'), 5.01 (dd, $J_{3,4} = 9.2$ Hz, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, 1 H, *H*-3), 4.97 (d, $J_{2',3'} = 9.9$ Hz, $J_{3',4'} = 3.4$ Hz, 1 H, *H*-3'), 4.87 (d, 1 H, OCH_aH_bAr), 4.62 (d, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.57 (d, 1 H, OCH_aH_bAr), 4.51 (d, $J_{1',2'} = 8.0$ Hz, 1 H, *H*-1'), 4.15-4.08 (m, 2 H, *H*-6a', *H*-6b'), 4.25 (dd, 1 H, *H*-6a), 4.15 (dd, 1 H, *H*-6b), 3.96 (dd, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, 1 H, *H*-2), 3.85 (m, 1 H, *H*-5'), 3.69 (dd, $J_{3,4} = 9.2$ Hz, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, 1 H, *H*-4), 3.53 (ddd, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, $J_{5,6a} = 1.6$ Hz, $J_{5,6b} = 5.2$ Hz, 1 H, *H*-5), 2.11-1.91 (8s, 24 H, 7 OAc, 1 NAc).

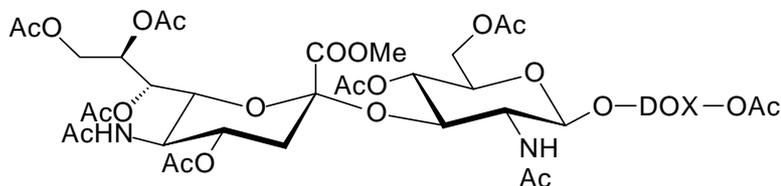
¹³C NMR (CDCl₃) δ 170.83-168.95 (C=O), 137.03-128.33 (Ar-C), 100.07 (C-1'), 99.37 (C-1), 74.76 (C-4), 71.89 (C-5), 71.32 (C-3), 70.14 (CH₂OAc), 70.02 (C-3'), 69.90 (C-5'), 68.24 (C-2'), 65.88 (C-4'), 61.52 (C-6'), 60.14 (C-6), 55.99 (CH₂O), 53.29 (OCH₃), 52.39 (C-2), 23.23-20.41 (CH₃).

***p*-Acetoxybenzyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (98a)**

Die Verbindungen **91** und **18** werden 28 h gemäß AAV 15 mit *Salmonella typhimurium* Sialidase inkubiert. Nach Ausfällung des Polymers erhält man Verbindung **98** zunächst in 13% Ausbeute. Das frisch gefällte Polymer wurde nach Trocknung erneut nach AAV 15 inkubiert und die Ausbeute so auf 21%, in einem dritten Zyklus auf 24% gesteigert. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt gemäß AAV 16. Man erhält **98a** in einer Gesamtausbeute von 12 mg (22%).

98a C₄₂H₅₆N₂O₂₂ (M 940.90)[α]_D²⁰ = -3.2° (c 0.5, CHCl₃)

weißer amorpher Feststoff



¹H NMR (CDCl₃) δ 7.35-7.29 (m, 4 H, Ar-H), 5.51-5.48 (m, 2 H, *H*-3, *H*-8'), 5.37 (dd, $J_{7',8'} = 9.0$ Hz, $J_{6',7'} = 2.7$ Hz, 1 H, *H*-7'), 5.11 (m, 2 H, CH₂OAc), 4.89 (d, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.86-4.83 (m, 2 H, *H*-4', OCH_aH_bAr), 4.53 (d, 1 H, OCH_aH_bAr), 4.29 (dd, $J_{8',9a'} = 2.7$ Hz, $J_{9a',9b'} = 3.0$ Hz, 1 H, *H*-9a'), 4.20 (dd, $J_{8',9b'} = 5.6$ Hz, $J_{9a',9b'} = 3.0$ Hz, 1 H, *H*-9b'), 4.11 (dd,

$J_{5,6b} = 4.9$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.0$ Hz, 1 H, $H-6b$), 3.92 (t, $J_{4,5} = 6.0$ Hz, 1 H, $H-5$), 3.75 (dd, $J_{3,4} = 8.9$ Hz, $J_{4,5} = 6.0$ Hz, 1 H, $H-4$), 3.69-3.62 (m, 1 H, $H-2$), 3.61 (dd, $J_{6',7'} = 2.7$ Hz, $J_{5',6'} = 11.3$ Hz, 1 H, $H-6'$), 2.59 (dd, $J_{3eq',4'} = 4.7$ Hz, $J_{3ax',3eq'} = 12.1$ Hz, 1 H, $H-3eq'$), 2.27-1.90 (9s, 27 H, 7 OAc, 2 NAc), 1.71 (t, $J_{3ax',4'} = 12.4$ Hz, $J_{3ax',3eq'} = 12.1$ Hz, 1 H, $H-3ax'$),
 ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171.10-169.27 (C=O), 168.02 (C-1'), 137.12-128.65 (Ar-C), 99.67 (C-1), 96.97 (C-2'), 77.39 (C-5), 71.65 (C-3), 71.97 (C-4), 71.93 (C-6'), 70.29 (CH_2OAc), 69.17 (C-4'), 67.62 (C-8'), 67.19 (C-7'), 66.03 (CH_2O), 62.31 (C-9'), 62.11 (C-6), 54.61 (C-2), 53.23 (OCH_3), 49.05 (C-5'), 37.44 (C-3'), 23.22-20.19 (COCH_3).

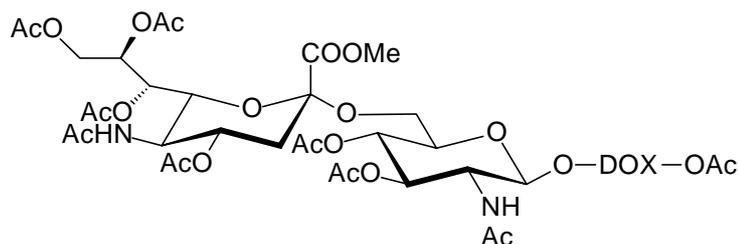
***p*-Acetoxybenzyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-6)-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (99a)**

Die Verbindungen **91** und **18** werden 24 h gemäß AAV 14 mit *Vibrio cholerae* Sialidase inkubiert. Nach Ausfällung des Polymers erhält man Verbindung **99** in 17% Ausbeute. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt gemäß AAV 16. Man erhält **99a** in einer Gesamtausbeute von 9 mg (16%).

99a $\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_{22}$ (M 940.90)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.5^\circ$ (c 0.5, CHCl_3)

weißer amorpher Feststoff



^1H NMR (CDCl_3) δ 7.36-7.28 (m, 4 H, Ar-H), 5.69 (ddd, $J_{7,8'} = 9.2$ Hz, $J_{8',9a'} = 2.5$ Hz, $J_{8',9b'} = 5.8$ Hz, 1 H, $H-8'$), 5.53 (dd, $J_{6',7'} = 2.5$ Hz, $J_{7,8'} = 9.2$ Hz, 1 H, $H-7'$), 5.25 (dd, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, 1 H, $H-3$), 5.15 (m, 2 H, CH_2OAc), 5.12 (dd, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, $J_{4,5} = 10.1$ Hz, 1 H, $H-4$), 4.84 (d, 1 H, $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{Ar}$), 4.81 (ddd, $J_{4',5'} = 9.9$ Hz, 1 H, $H-4'$), 4.68 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1 H, $H-1$), 4.59 (dd, $J_{8',9a'} = 2.5$ Hz, $J_{9a',9b'} = 12.5$ Hz, 1 H, $H-9a'$), 4.51 (d, 1 H, $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{Ar}$), 4.36 (dd, $J_{8',9b'} = 5.8$ Hz, $J_{9a',9b'} = 12.5$ Hz, 1 H, $H-9b'$), 4.27 (ddd, $J_{4',5'} = 9.9$ Hz, $J_{5',6'} = 10.2$ Hz, 1 H, $H-5'$), 4.08 (dd, $J_{5',6'} = 10.2$ Hz, $J_{6',7'} = 2.5$ Hz, 1 H, $H-6'$), 4.05 (dd, $J_{5a,6a} = 5.9$ Hz, $J_{6a,6b} = 10.3$ Hz, 1 H, $H-6a$), 3.93 (dd, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, 1 H, $H-2$), 3.77 (m, 1 H, $H-5$), 3.65 (dd, $J_{5a,6b} = 7.5$ Hz, $J_{6a,6b} = 10.3$ Hz, 1 H, $H-6b$), 3.34 (s, 3 H, OMe), 2.71 (dd, $J_{3eq',4'} = 4.6$ Hz, $J_{3eq',3ax'} = 12.4$ Hz, 1 H, $H-3eq'$), 2.19-1.72 (9s, 27 H, 7 OAc, 2 NAc), 1.95 (t, $J_{3ax',4'} = 12.0$ Hz, $J_{3ax',3eq'} = 12.4$ Hz, 1 H, $H-3ax'$).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171.13-169.28 (C=O), 168.27 (C-1'), 137.05-128.27 (Ar-C), 99.38 (C-1), 96.85 (C-2'), 77.69 (C-5), 71.75 (C-4), 70.18 (CH_2OAc), 68.47 (C-3), 66.52 (CH_2O), 65.97

(C-6), 71.59 (C-6'), 69.03 (C-4'), 67.31 (C-8'), 67.16 (C-7'), 62.35 (C-9'), 54.67 (C-2), 53.24 (OCH₃), 49.11 (C-5'), 37.23 (C-3'), 22.93-20.18 (CH₃).

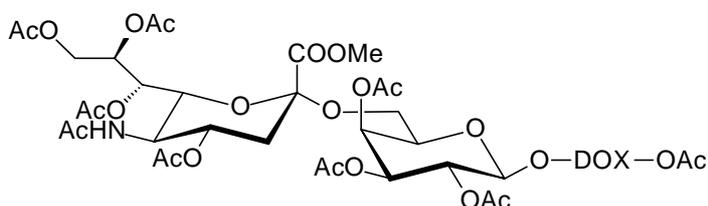
***p*-Acetoxybenzyl-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-6)- β -D-galactopyranosid (100a)**

Die Verbindungen **81** und **18** werden 24 h gemäß AAV 14 mit *Vibrio cholerae* Sialidase inkubiert. Nach Ausfällung des Polymers erhält man Verbindung **100** in 15% Ausbeute. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt gemäß AAV 16. Man erhält **100a** in einer Gesamtausbeute von 8 mg (13%).

100a C₄₂H₅₅NO₂₃ (M 941.88)

$[\alpha]_D^{20} = +5.2^\circ$ (c 0.3, CHCl₃)

weißer amorpher Feststoff



¹H NMR (CDCl₃) δ 7.35-7.30 (m, 4 H, Ar-H), 5.77 (dd, $J_{3,4} = 3.6$ Hz, $J_{4,5} = 1.2$ Hz, 1 H, H-4), 5.67 (ddd, $J_{7',8'} = 8.9$ Hz, $J_{8',9a'} = 2.6$ Hz, $J_{8',9b'} = 5.6$ Hz, 1 H, H-8'), 5.59 (dd, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, 1 H, H-2), 5.49 (dd, $J_{6',7'} = 2.2$ Hz, $J_{7',8'} = 9.2$ Hz, 1 H, H-7'), 5.31 (dd, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, $J_{3,4} = 3.6$ Hz, 1 H, H-3), 5.11 (m, 2 H, CH₂OAc), 4.86 (d, 1 H, OCH_aH_bAr), 4.83 (ddd, $J_{4',5'} = 10.2$ Hz, 1 H, H-4'), 4.79 (d, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 1 H, H-1), 4.57 (dd, $J_{8',9a'} = 2.6$ Hz, $J_{9a',9b'} = 12.3$ Hz, 1 H, H-9a'), 4.53 (d, 1 H, OCH_aH_bAr), 4.37 (dd, $J_{8',9b'} = 5.6$ Hz, $J_{9a',9b'} = 12.3$ Hz, 1 H, H-9b'), 4.31 (ddd, $J_{4',5'} = 10.2$ Hz, $J_{5',6'} = 10.4$ Hz, 1 H, H-5'), 4.11 (dd, $J_{5',6'} = 10.4$ Hz, $J_{6',7'} = 2.2$ Hz, 1 H, H-6'), 4.05 (dd, $J_{5a,6a} = 5.9$ Hz, $J_{6a,6b} = 10.3$ Hz, 1 H, H-6a), 3.79 (m, 1 H, H-5), 3.61 (dd, $J_{5a,6b} = 7.5$ Hz, $J_{6a,6b} = 10.3$ Hz, 1 H, H-6a), 3.31 (s, 3 H, OMe), 2.70 (dd, $J_{3eq',4'} = 4.7$ Hz, $J_{3eq',3ax'} = 12.6$ Hz, 1 H, H-3eq'), 2.15-1.70 (9s, 27 H, 8 OAc, NAc), 1.97 (t, $J_{3ax',4'} = 11.9$ Hz, $J_{3ax',3eq'} = 12.6$ Hz, 1 H, H-3ax').

¹³C NMR (CDCl₃) δ 170.94-169.12 (C=O), 168.31 (C-1'), 136.99-128.03 (Ar-C), 99.78 (C-1), 96.72 (C-2'), 71.63 (C-6'), 70.87 (C-5), 70.37 (C-3), 70.22 (CH₂OAc), 68.97 (C-4'), 68.39 (C-2), 67.42 (C-8'), 66.98 (C-4), 66.95 (C-7'), 66.38 (CH₂O), 66.07 (C-6), 62.21 (C-9'), 53.31 (OCH₃), 49.03 (C-5'), 37.28 (C-3'), 22.89-20.25 (CH₃).

***p*-Acetoxybenzyl-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)- β -D-galactopyranosid (101a)**

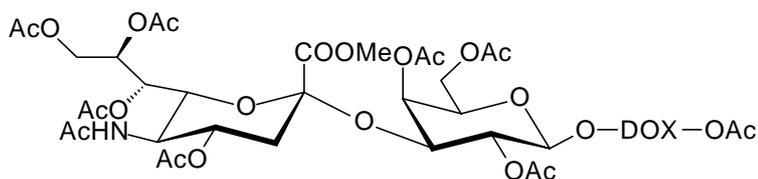
Die Verbindungen **81** und **18** werden 24 h gemäß AAV 14 mit *Salmonella typhimurium* Sialidase inkubiert. Nach Ausfällung des Polymers erhält man Verbindung **99** in 16%

Ausbeute. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt gemäß AAV 16. Man erhält **101a** in einer Gesamtausbeute von 8 mg (15%).

101a C₄₂H₅₅NO₂₃ (M 941.88)

$[\alpha]_D^{20} = -1.9^\circ$ (c 0.3, CHCl₃)

weißer amorpher Feststoff



¹H NMR (CDCl₃) δ 7.33-7.29 (m, 4 H, Ar-H), 5.51 (dd, $J_{7',8'} = 9.2$ Hz, $J_{8',9a'} = 2.8$ Hz, $J_{8',9b'} = 5.4$ Hz, 1 H, *H*-8'), 5.37 (dd, $J_{7',8'} = 9.2$ Hz, $J_{6',7'} = 2.8$ Hz, 1 H, *H*-7'), 5.09 (m, 2 H, CH₂OAc), 4.87 (m, 2 H, *H*-4, OCH_aH_bAr), 4.85 (m, 1 H, *H*-4'), 4.57 (d, 1 H, OCH_aH_bAr), 4.55 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.51 (dd, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, 1 H, *H*-3), 4.31 (dd, $J_{8',9a'} = 2.8$ Hz, $J_{9a',9b'} = 3.2$ Hz, 1 H, *H*-9a'), 4.22 (dd, $J_{8',9b'} = 5.4$ Hz, $J_{9a',9b'} = 3.2$ Hz, 1 H, *H*-9b'), 3.87 (t, $J_{4,5} = 5.9$ Hz, 1 H, *H*-5), 3.84 (s, 3 H, OCH₃), 3.77 (s, 3 H, OCH₃), 3.65 (dd, $J_{6',7'} = 2.8$ Hz, $J_{5',6'} = 11.4$ Hz, 1 H, *H*-6'), 2.60 (dd, $J_{3eq',4'} = 4.6$ Hz, $J_{3ax',3eq'} = 11.9$ Hz, 1 H, *H*-3eq'), 2.23-1.86 (8s, 24 H, 7 OAc, 1 NAc), 1.72 (t, $J_{3ax',4'} = 12.0$ Hz, $J_{3ax',3eq'} = 11.9$ Hz, 1 H, *H*-3ax').

¹³C NMR (CDCl₃) δ 170.95-169.34 (C=O), 167.85 (C-1'), 137.35-128.51 (Ar-C), 100.34 (C-2), 99.47 (C-1), 96.68 (C-2'), 75.67 (C-5), 71.79 (C-6'), 71.51 (C-3), 70.33 (C-2), 70.28 (CH₂OAc), 69.27 (C-4'), 67.38 (C-8'), 67.13 (C-7'), 67.05 (C-4), 66.07 (CH₂O), 62.33 (C-9'), 61.40 (C-6), 53.32 (OCH₃), 48.91 (C-5'), 37.49 (C-3'), 23.34-20.22 (COCH₃).

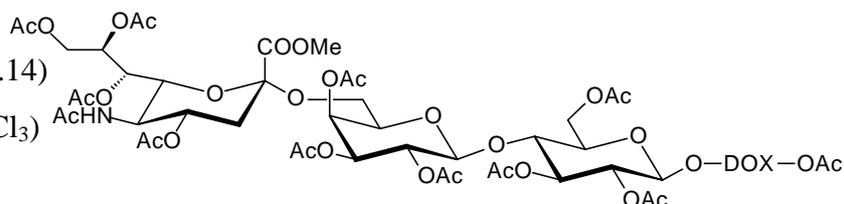
***p*-Acetoxybenzyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl-2,6-O-(β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid (**102a**)**

Die Verbindungen **94** und **18** werden 24 h gemäß AAV 14 mit *Vibrio cholerae* Sialidase inkubiert. Nach Ausfällung des Polymers erhält man Verbindung **102** in 16% Ausbeute. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt gemäß AAV 16. Man erhält **102a** in einer Gesamtausbeute von 7 mg (14%).

102a C₅₄H₇₁NO₃₁ (M 1230.14)

$[\alpha]_D^{20} = +11.1^\circ$ (c 0.4, CHCl₃)

weißer amorpher Feststoff



¹H NMR (D₂O) δ 7.37-7.31 (m, 4 H, Ar-H), 5.73 (dd, $J_{3',4'} = 3.6$ Hz, $J_{4',5'} = 1.2$ Hz, 1 H, *H*-4'), 5.65 (ddd, $J_{7'',8''} = 9.0$ Hz, $J_{8'',9a''} = 2.5$ Hz, $J_{8'',9b''} = 5.8$ Hz, 1 H, *H*-8''), 5.59 (dd, $J_{2',3'} = 10.0$ Hz, 1 H, *H*-2'), 5.48 (dd, $J_{6'',7''} = 2.5$ Hz, $J_{7'',8''} = 9.0$ Hz, 1 H, *H*-7''), 5.29 (dd, $J_{2',3'} = 10.0$ Hz, $J_{3',4'} =$

3.5 Hz, 1 H, $H-3'$), 5.14 (d, $J_{2,3} = 9.3$ Hz, 1 H, $H-3$), 5.09-5.06 (m, 2 H, CH_2OAc , $H-4$), 4.87-4.85 (m, 1 H, $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{Ar}$), 4.82-4.79 (m, 2 H, $H-4''$, $H-1'$), 4.74 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1 H, $H-1$), 4.55 (dd, $J_{8'',9a''} = 2.5$ Hz, $J_{9a'',9b''} = 12.6$ Hz, 1 H, $H-9a''$), 4.51 (m, 1 H, $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{Ar}$), 4.33 (dd, $J_{8'',9b''} = 5.8$ Hz, $J_{9a'',9b''} = 12.6$ Hz, 1 H, $H-9b''$), 4.27 (ddd, $J_{4'',5''} = 10.0$ Hz, $J_{5'',6''} = 10.5$ Hz, 1 H, $H-5''$), 4.09 (dd, $J_{5'',6''} = 10.5$ Hz, $J_{6'',7''} = 2.5$ Hz, 1 H, $H-6''$), 4.04 (dd, $J_{5a',6a'} = 6.2$ Hz, $J_{6a',6b'} = 10.6$ Hz, 1 H, $H-6a'$), 3.83 (m, 1 H, $H-5'$), 3.67 (dd, $J_{5a',6b'} = 7.5$ Hz, $J_{6a',6b'} = 10.6$ Hz, 1 H, $H-6b'$), 3.65 (ddd, $J_{4,5} = 9.3$ Hz, 1 H, $H-5$), 3.35 (s, 3 H, OMe), 2.70 (dd, $J_{3\text{eq}'',4''} = 4.6$ Hz, $J_{3\text{ax}'',3\text{ax}''} = 12.2$ Hz, 1 H, $H-3\text{eq}''$), 2.19-1.57 (12s, 36 H, 11 OAc, 1 NAc), 1.97 (t, $J_{3\text{ax}'',4''} = 11.9$ Hz, $J_{3\text{ax}'',3\text{eq}''} = 12.2$ Hz, 1 H, $H-3\text{ax}''$).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171.32-169.27 (C=O), 167.85 (C-1''), 137.15-128.19 (Ar-C), 103.65 (C-1), 99.82 (C-1'), 96.79 (C-2''), 84.72 (C-3), 82.97 (C-2), 77.64 (C-5), 73.39 (C-4), 71.73 (C-6''), 70.27 (C-3'), 70.25 (CH_2OAc), 70.10 (C-5'), 69.28 (C-6), 68.83 (C-4''), 68.35 (C-2'), 67.32 (C-8''), 67.09 (C-7''), 66.29 (C-4'), 65.97 (C-6'), 65.87 (CH_2O), 62.35 (C-9''), 53.26 (OCH_3), 48.65 (C-5''), 37.23 (C-3''), 23.21-20.40 (COCH_3).

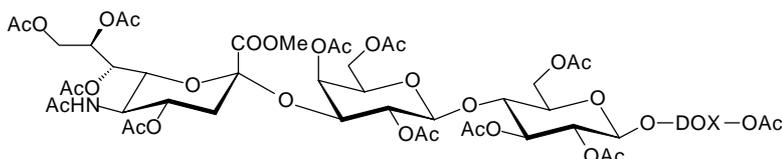
***p*-Acetoxybenzyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure-(2-3)-4-O-(β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid (103a)**

Die Verbindungen **94** und **18** werden 24 h gemäß AAV 14 mit *Salmonella typhimurium* Sialidase inkubiert. Nach Ausfällung des Polymers erhält man Verbindung **103** in 15% Ausbeute. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt gemäß AAV 16. Man erhält **103a** in einer Gesamtausbeute von 7 mg (14%).

103a $\text{C}_{54}\text{H}_{71}\text{NO}_{31}$ (M 1230.14)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +9.7^\circ$ (c 0.3, CHCl_3)

weißer amorpher Feststoff



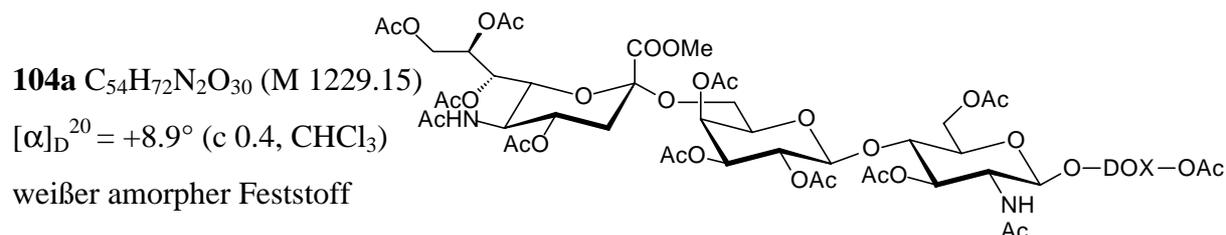
^1H NMR (CDCl_3) δ 7.37-7.31 (m, 4 H, Ar-H), 5.47 (dd, $J_{7'',8''} = 9.3$ Hz, $J_{8'',9a''} = 3.0$ Hz, $J_{8'',9b''} = 5.5$ Hz, 1 H, $H-8''$), 5.37 (dd, $J_{7'',8''} = 9.3$ Hz, $J_{6'',7''} = 2.5$ Hz, 1 H, $H-7''$), 5.19 (dd, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, $H-3$), 5.08 (m, 2 H, CH_2OAc), 5.01 (dd, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, 1 H, $H-4$), 4.84 (m, 2 H, $H-4'$, $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{Ar}$), 4.83 (m, 1 H, $H-4''$), 4.76 (d, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, 1 H, $H-1$), 4.58 (d, 1 H, $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{Ar}$), 4.57 (d, $J_{1,2'} = 8.0$ Hz, 1 H, $H-1'$), 4.53 (dd, $J_{2',3'} = 10.0$ Hz, $J_{3',4'} = 3.6$ Hz, 1 H, $H-3'$), 4.33 (dd, $J_{8'',9a''} = 3.0$ Hz, $J_{9a'',9b''} = 3.1$ Hz, 1 H, $H-9a''$), 4.27 (dd, $J_{8'',9b''} = 5.5$ Hz, $J_{9a'',9b''} = 3.1$ Hz, 1 H, $H-9b''$), 3.93 (t, $J_{4',5'} = 5.9$ Hz, 1 H, $H-5'$), 3.79 (s, 3 H, OCH_3), 3.68 (dd, $J_{6'',7''} = 2.5$ Hz, $J_{5'',6''} = 11.1$ Hz, 1 H, $H-6''$), 3.67 (t, $J_{4,5} = 9.3$ Hz, 1 H, $H-5$), 2.61 (dd, $J_{3\text{eq}'',4''} = 4.9$ Hz,

$J_{3ax'',3eq''} = 12.1$ Hz, 1 H, $H-3eq''$), 2.29-1.81 (8s, 24 H, 7 OAc, 1 NAc), 1.73 (t, $J_{3ax'',4''} = 12.0$ Hz, $J_{3ax'',3eq''} = 12.1$ Hz, 1 H, $H-3ax''$)).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 171.10-169.48 (C=O), 167.93 (C-1''), 136.97-128.30 (Ar-C), 103.87 (C-1), 99.97 (C-1'), 96.75 (C-2''), 84.85 (C-3), 83.03 (C-2), 77.80 (C-5), 75.30 (C-5'), 73.29 (C-4), 71.76 (C-6''), 71.27 (C-3'), 70.13 (CH_2OAc), 70.08 (C-2'), 69.19 (C-6), 69.04 (C-4''), 67.53 (C-8''), 67.01 (C-7''), 66.85 (C-4'), 65.86 (CH_2O), 62.21 (C-9''), 61.17 (C-6'), 53.14 (OCH_3), 48.84 (C-5''), 37.19 (C-3''), 23.10-20.29 ($COCH_3$).

***p*-Acetoxybenzyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-(6)-4-O-(β -D-galactopyranosyl)-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (104a)**

Die Verbindungen **97** und **18** werden 16 h gemäß AAV 14 mit *Vibrio cholerae* Sialidase inkubiert. Nach Ausfällung des Polymers erhält man Verbindung **104** in 12% Ausbeute. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt gemäß AAV 16. Man erhält **104a** in einer Gesamtausbeute von 6 mg (11%).

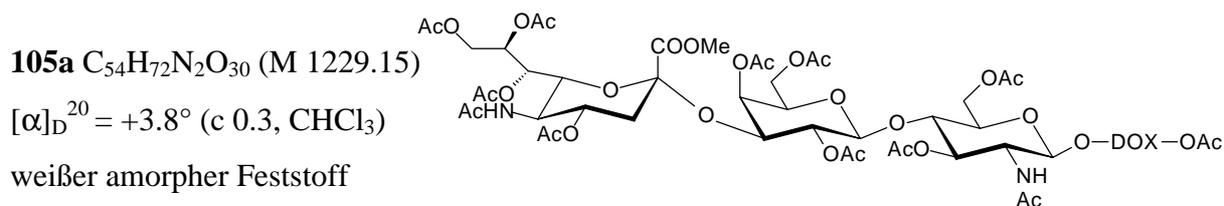


1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.35-7.29 (m, 4 H, Ar-H), 5.75 (dd, $J_{3',4'} = 3.7$ Hz, $J_{4',5'} = 1.6$ Hz, 1 H, $H-4'$), 5.65 (ddd, $J_{7'',8''} = 9.4$ Hz, $J_{8'',9a''} = 2.6$ Hz, $J_{8'',9b''} = 5.7$ Hz, 1 H, $H-8''$), 5.59 (dd, $J_{2',3'} = 9.8$ Hz, 1 H, $H-2'$), 5.53 (dd, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, $J_{3,4} = 8.6$ Hz, 1 H, $H-3$), 5.43 (dd, $J_{6'',7''} = 2.4$ Hz, $J_{7'',8''} = 9.4$ Hz, 1 H, $H-7''$), 5.28 (dd, $J_{2',3'} = 9.8$ Hz, $J_{3',4'} = 3.7$ Hz, 1 H, $H-3'$), 5.11 (m, 2 H, CH_2OAc), 4.91 (d, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 1 H, $H-1$), 4.86 (d, 1 H, OCH_aH_bAr), 4.83-4.78 (m, 2 H, $H-4''$, $H-1'$), 4.56 (dd, $J_{8'',9a''} = 2.6$ Hz, $J_{9a'',9b''} = 12.3$ Hz, 1 H, $H-9a''$), 4.53-4.47 (m, 2 H, $H-6a$, OCH_aH_bAr), 4.37 (dd, $J_{8'',9b''} = 5.7$ Hz, $J_{9a'',9b''} = 12.3$ Hz, 1 H, $H-9b''$), 4.27 (ddd, $J_{4'',5''} = 9.9$ Hz, $J_{5'',6''} = 10.8$ Hz, 1 H, $H-5''$), 4.15 (dd, $J_{5,6b} = 4.7$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, 1 H, $H-6b$), 4.12 (dd, $J_{5'',6''} = 10.8$ Hz, $J_{6'',7''} = 2.4$ Hz, 1 H, $H-6''$), 4.01 (dd, $J_{5a',6a'} = 5.9$ Hz, $J_{6a',6b'} = 10.5$ Hz, 1 H, $H-6a'$), 3.87 (t, $J_{4,5} = 5.9$ Hz, 1 H, $H-5$), 3.82 (m, 1 H, $H-5'$), 3.77 (dd, $J_{3,4} = 8.3$ Hz, $J_{4,5} = 9.8$ Hz, 1 H, $H-4$), 3.67-3.61 (m, 2 H, $H-2$, $H-6a'$), 3.37 (s, 3 H, OMe), 2.69 (dd, $J_{3eq'',4''} = 4.8$ Hz, $J_{3eq'',3ax''} = 12.5$ Hz, 1 H, $H-3eq''$), 2.23-1.63 (12s, 36 H, 11 OAc, 1 NAc), 1.96 (t, $J_{3ax'',4''} = 11.9$ Hz, $J_{3ax'',3eq''} = 12.5$ Hz, 1 H, $H-3ax''$)).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 170.75-168.73 (C=O), 168.25 (C-1''), 137.12-128.21 (Ar-C), 100.15 (C-1'), 99.55 (C-1), 96.85 (C-2''), 74.83 (C-4), 71.92 (C-5), 71.59 (C-6''), 71.39 (C-3), 70.22 (CH_2OAc), 70.15 (C-3'), 69.97 (C-5'), 69.14 (C-4''), 68.19 (C-2'), 67.58 (C-8''), 67.07 (C-7''), 66.25 (C-4'), 65.98 (CH_2O), 65.93 (C-6'), 62.25 (C-9''), 60.19 (C-6), 53.37 (OCH_3), 52.53 (C-2), 49.14 (C-5''), 37.31 (C-3''), 23.19-20.38 (CH_3).

***p*-Acetoxybenzyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl-lonsäure-(2-3)-4-O-(β -D-galactopyranosyl)-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (105a)**

Die Verbindungen **97** und **18** werden 24 h gemäß AAV 14 mit *Salmonella typhimurium* Sialidase inkubiert. Nach Ausfällung des Polymers erhält man Verbindung **105** in 14% Ausbeute. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt gemäß AAV 16. Man erhält **105a** in einer Gesamtausbeute von 7 mg (12%).



^1H NMR (CDCl_3) δ 7.32-7.27 (m, 4 H, Ar-H), 5.56 (dd, $J_{7'',8''} = 8.9$ Hz, $J_{8'',9a''} = 2.6$ Hz, $J_{8'',9b''} = 5.2$ Hz, 1 H, $H-8''$), 5.53 (dd, $J_{2,3} = 9.7$ Hz, $J_{3,4} = 8.5$ Hz, 1 H, $H-3$), 5.34 (dd, $J_{7'',8''} = 8.9$ Hz, $J_{6'',7''} = 2.6$ Hz, 1 H, $H-7''$), 5.07 (m, 1 H, CH_2OAc), 4.87-4.84 (m, 3 H, $H-4'$, $H-4''$, $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{Ar}$), 4.83 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1 H, $H-1$), 4.57-4.55 (m, 2 H, $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{Ar}$, $H-1'$), 4.50-4.47 (m, 3 H, $H-6a$, $H-3'$, $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{Ar}$), 4.31 (dd, $J_{8'',9a''} = 2.6$ Hz, $J_{9a'',9b''} = 3.4$ Hz, 1 H, $H-9a''$), 4.19 (dd, $J_{8'',9b''} = 5.2$ Hz, $J_{9a'',9b''} = 3.4$ Hz, 1 H, $H-9b''$), 4.12 (dd, $J_{5,6b} = 5.0$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.9$ Hz, 1 H, $H-6b$), 3.86 (t, $J_{4',5'} = 5.9$ Hz, 1 H, $H-5'$), 3.83 (t, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, 1 H, $H-5$), 3.75 (dd, $J_{3,4} = 8.5$ Hz, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, 1 H, $H-4$), 3.73 (s, 3 H, OCH_3), 3.67-3.60 (m, 3 H, $H-2$, $H-6a'$, $H-6''$), 2.59 (dd, $J_{3\text{eq}'',4''} = 4.7$ Hz, $J_{3\text{ax}'',3\text{eq}''} = 12.0$ Hz, 1 H, $H-3\text{eq}''$), 2.23-1.86 (8s, 24 H, 7 OAc, 1 NAc), 1.71 (t, $J_{3\text{ax}'',4''} = 12.0$ Hz, $J_{3\text{ax}'',3\text{eq}''} = 12.0$ Hz, 1 H, $H-3\text{ax}''$).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 171.21-169.52 (C=O), 167.84 (C-1''), 137.17-128.43 (Ar-C), 100.08 (C-1'), 99.47 (C-1), 96.77 (C-2''), 78.13 (C-5), 75.30 (C-5'), 74.53 (C-4), 71.78 (C-6''), 71.23 (C-3'), 70.14 (CH_2OAc), 70.05 (C-2'), 69.09 (C-4''), 68.69 (C-3), 67.46 (C-8''), 66.98 (C-7''), 66.85 (C-4'), 65.90 (CH_2O), 62.25 (C-9''), 62.08 (C-6), 61.23 (C-6'), 54.31 (C-2), 53.37 (OCH_3), 48.91 (C-5''), 37.23 (C-3''), 23.23-20.19 (COCH_3).

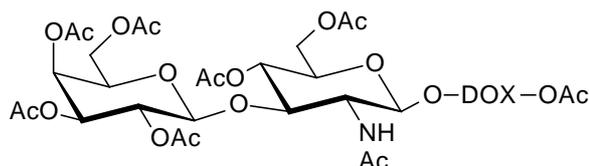
***p*-Acetoxybenzyl- β -D-galactopyranosyl-3-*O*-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid
(106a)**

Verbindung **91** und *p*-Np- β Gal werden gemäß AAV 5 mit β -Galactosidase aus Rinderhoden inkubiert. Nach Ausfällung des Polymers erhält man Verbindung **106** in 19% Ausbeute. Die Aufarbeitung erfolgt gemäß AAV 13. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt gemäß AAV 16. Man erhält **106a** in einer Gesamtausbeute von 11 mg (21%).

106a C₃₆H₄₇NO₁₉ (M 797.76)

$[\alpha]_D^{20} = -1.7^\circ$ (c 0.6, CHCl₃)

weißer amorpher Feststoff



¹H NMR (CDCl₃) δ 7.34-7.27 (m, 4 H, Ar-H), 5.49 (m, 1 H, *H*-3), 5.30 (d, $J_{3',4'} = 3.6$ Hz, 1 H, *H*-4'), 5.10 (dd, $J_{1',2'} = 8.1$ Hz, $J_{2',3'} = 10.2$ Hz, 1 H, *H*-2'), 5.09 (m, 1 H, CH₂OAc), 4.95 (d, $J_{2',3'} = 10.2$ Hz, $J_{3',4'} = 3.6$ Hz, 1 H, *H*-3'), 4.87 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1 H, *H*-1), 4.85 (d, 1 H, OCH_aH_bAr), 4.51 (d, 1 H, OCH_aH_bAr), 4.47 (d, $J_{1',2'} = 8.1$ Hz, 1 H, *H*-1'), 4.17-4.11 (m, 2 H, *H*-6a', *H*-6b'), 4.09 (dd, $J_{5,6b} = 5.0$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.8$ Hz, 1 H, *H*-6b), 3.91 (t, $J_{4,5} = 6.0$ Hz, 1 H, *H*-5), 3.83 (m, 1 H, *H*-5'), 3.71 (dd, $J_{3,4} = 9.0$ Hz, $J_{4,5} = 5.8$ Hz, 1 H, *H*-4), 3.63 (m, 1 H, *H*-2), 2.16-1.84 (8s, 24 H, 7 OAc, 1 NAc).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 170.65-169.13 (C=O), 137.26-128.57 (Ar-C), 100.32 (C-1'), 99.39 (C-1), 77.28 (C-5), 75.61 (C-3), 72.08 (C-4), 70.11 (CH₂OAc), 69.83 (C-3'), 69.63 (C-5'), 68.75 (C-2'), 66.03 (CH₂O), 65.37 (C-4'), 61.95 (C-6), 61.14 (C-6'), 52.67 (C-2), 23.34-20.45 (CH₃).

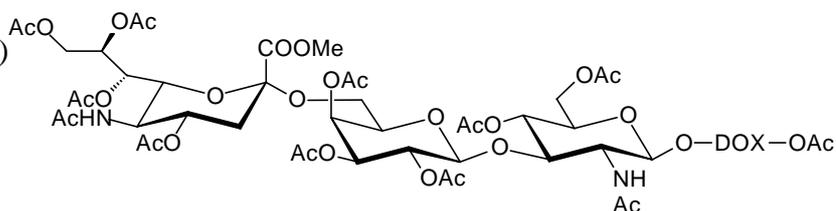
***p*-Acetoxybenzyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure-(2-6)-3-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid
(107a)**

Die Verbindungen **105** und **18** werden 24 h gemäß AAV 14 mit *Vibrio cholerae* Sialidase inkubiert. Nach Ausfällung des Polymers erhält man Verbindung **107** in 10% Ausbeute. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt gemäß AAV 16. Man erhält **107a** in einer Gesamtausbeute von 6 mg (9%).

107a C₅₄H₇₂N₂O₃₀ (M 1229.15)

$[\alpha]_D^{20} = +3.9^\circ$ (c 0.3, CHCl₃)

weißer amorpher Feststoff



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.37-7.29 (m, 4 H, Ar-H), 5.73 (dd, $J_{3',4'} = 3.6$ Hz, $J_{4',5'} = 1.9$ Hz, 1 H, $H-4'$), 5.61 (ddd, $J_{7'',8''} = 9.2$ Hz, $J_{8'',9a''} = 2.8$ Hz, $J_{8'',9b''} = 5.9$ Hz, 1 H, $H-8''$), 5.52 (m, 2 H, $H-2'$, $H-3$), 5.39 (dd, $J_{6'',7''} = 2.6$ Hz, $J_{7'',8''} = 9.2$ Hz, 1 H, $H-7''$), 5.25 (dd, $J_{2',3'} = 10.0$ Hz, $J_{3',4'} = 3.6$ Hz, 1 H, $H-3'$), 5.10 (m, 1 H, CH_2OAc), 4.88 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1 H, $H-1$), 4.86-4.81 (m, 3 H, $H-4''$, $H-1'$, $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{Ar}$), 4.53 (dd, $J_{8'',9a''} = 2.8$ Hz, $J_{9a'',9b''} = 12.1$ Hz, 1 H, $H-9a''$), 4.52 (d, 1 H, $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{Ar}$), 4.33 (dd, $J_{8'',9b''} = 5.9$ Hz, $J_{9a'',9b''} = 12.1$ Hz, 1 H, $H-9b''$), 4.25 (ddd, $J_{4'',5''} = 9.6$ Hz, $J_{5'',6''} = 10.2$ Hz, 1 H, $H-5''$), 4.11 (dd, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, 1 H, $H-6b$), 4.09 (dd, $J_{5'',6''} = 10.2$ Hz, $J_{6'',7''} = 2.6$ Hz, 1 H, $H-6''$), 3.97 (dd, $J_{5a',6a'} = 6.0$ Hz, $J_{6a',6b'} = 10.2$ Hz, 1 H, $H-6a'$), 3.91 (t, $J_{4,5} = 5.7$ Hz, 1 H, $H-5$), 3.68 (dd, $J_{3,4} = 8.9$ Hz, $J_{4,5} = 6.2$ Hz, 1 H, $H-4$), 3.77 (m, 1 H, $H-5'$), 3.59 (m, 1 H, $H-2$), 3.58 (s, 3 H, OMe), 2.70 (dd, $J_{3\text{eq}'',4''} = 4.9$ Hz, $J_{3\text{eq}'',3\text{ax}''} = 12.2$ Hz, 1 H, $H-3\text{eq}''$), 2.29-1.71 (12s, 36 H, 11 OAc, 1 NAc), 2.19-1.80 (8s, 24 H, 7 OAc, 1 NAc), 1.95 (t, $J_{3\text{ax}'',4''} = 11.9$ Hz, $J_{3\text{ax}'',3\text{eq}''} = 12.2$ Hz, 1 H, $H-3\text{ax}''$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 170.89-169.17 (C=O), 168.14 (C-1''), 137.23-128.74 (Ar-C), 100.32 (C-1'), 99.73 (C-1), 96.77 (C-2''), 79.14 (C-4), 75.52 (C-5), 72.98 (C-3), 71.73 (C-6''), 70.17 (CH_2OAc), 69.89 (C-5'), 69.63 (C-3'), 69.22 (C-4''), 68.30 (C-2'), 67.69 (C-8''), 67.13 (C-7''), 66.03 (C-4'), 65.89 (CH_2O), 65.79 (C-6'), 62.33 (C-9'), 61.86 (C-6), 53.13 (OCH_3), 49.03 (C-5''), 37.27 (C-3''), 23.19-20.44 (COCH_3).

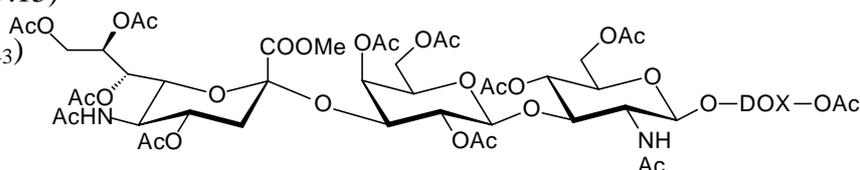
***p*-Acetoxybenzyl-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure-(2-3)-3-O-(β -D-galactopyranosyl)-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (108a)**

Die Verbindungen **105** und **18** werden 24 h gemäß AAV 14 mit *Salmonella typhimurium* Sialidase inkubiert. Nach Ausfällung des Polymers erhält man Verbindung **108** in 8% Ausbeute. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt gemäß AAV 16. Man erhält **108a** in einer Gesamtausbeute von 6 mg (7%).

108a $\text{C}_{54}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_{30}$ (M 1229.15)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4.5^\circ$ (c 0.3, CHCl_3)

weißer amorpher Feststoff



$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.37-7.30 (m, 4 H, Ar-H), 5.43 (m, 2 H, $H-3$, $H-8''$), 5.33 (dd, $J_{7'',8''} = 9.1$ Hz, $J_{6'',7''} = 2.6$ Hz, 1 H, $H-7''$), 5.11 (m, 2 H, CH_2OAc), 4.89 (d, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, 1 H, $H-1$), 4.87-4.85 (m, 2 H, $H-4'$, $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{Ar}$), 4.81 (dd, 1 H, $H-4''$), 4.57 (d, 1 H, $\text{OCH}_a\text{H}_b\text{Ar}$), 4.51 (d, $J_{1',2'} = 7.8$ Hz, 1 H), 4.53-4.50 (m, 2 H, $H-3'$, $H-1'$), 4.30 (dd, $J_{8'',9a''} = 2.7$ Hz, $J_{9a'',9b''} = 3.0$ Hz, 1

H, *H*-9a"), 4.25 (dd, $J_{8'',9b''} = 5.6$ Hz, $J_{9a'',9b''} = 3.0$ Hz, 1 H, *H*-9b"), 4.13 (dd, $J_{5,6b} = 4.7$ Hz, $J_{6a,6b} = 12.0$ Hz, 1 H, *H*-6b), 3.90 (t, $J_{4',5'} = 5.7$ Hz, 1 H, *H*-5'), 3.88 (t, $J_{4,5} = 5.7$ Hz, 1 H, *H*-5), 3.76 (s, 3 H, OCH₃), 3.68 (dd, $J_{3,4} = 8.7$ Hz, $J_{4,5} = 5.7$ Hz, 1 H, *H*-4), 3.65 (dd, $J_{6'',7''} = 2.8$ Hz, $J_{5'',6''} = 10.8$ Hz, 1 H, *H*-6''), 3.61 (m, 1 H, *H*-2), 2.60 (dd, $J_{3eq'',4''} = 4.8$ Hz, $J_{3ax'',3eq''} = 12.0$ Hz, 1 H, *H*-3eq''), 2.23-1.75 (12s, 36 H, 10 OAc, 2 NAc), 1.72 (t, $J_{3ax'',4''} = 12.1$ Hz, $J_{3ax'',3eq''} = 12.0$ Hz, 1 H, *H*-3ax'').

¹³C NMR (CDCl₃) δ 170.95-169.34 (C=O), 167.91 (C-1''), 137.12-128.65 (Ar-C), 101.97 (C-1), 100.25 (C-1'), 96.83 (C-2''), 79.27 (C-4), 75.63 (C-5), 75.37 (C-5'), 73.15 (C-3), 71.85 (C-6''), 71.29 (C-3'), 70.21 (CH₂OAc), 70.15 (C-2'), 69.11 (C-4''), 67.57 (C-8''), 67.05 (C-7''), 66.92 (C-4'), 65.97 (CH₂O), 62.28 (C-9''), 61.24 (C-6'), 60.93 (C-6), 53.19 (OCH₃), 48.94 (C-5''), 37.31 (C-3''), 23.15-20.35 (COCH₃).

7 Literatur

- (1) Schauer, R.; Kamerling, J. P. In: *Glycoproteins II* J. Montreuil, J.F.G. Vliegenthart, H. Schachter (Eds.), Elsevier Science, **1997**, 243-402.
- (2) Giannis, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1994**, *33*, 178-181.
- (3) Yuen, C.-T.; J., O. B.; Stoll, M.; Lemoine, R.; Lubineau, A.; Kiso, M.; Hasegawa, A.; Bockovich, N. J.; Nicolaou, K. C.; Feizi, T. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 1595-1598.
- (4) Varki, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 7390-7397.
- (5) Phillips, M. L.; Nudelman, E.; Gaeta, F. C. A.; Perez, M.; Singhal, A. K.; Hakomori, S.; Paulson, J. C. *Science*, **1990**, *250*, 1130-1132.
- (6) Lasky, L. A. *Science*, **1992**, *258*, 964-969.
- (7) Ryan, C. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 1-2.
- (8) Feizi, T. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1993**, *3*, 701-704.
- (9) Lloyd, K. O.; Old, L. J. *Cancer Res*, **1989**, *49*, 3445-3451.
- (10) Fukushima, K.; Hiroto, M.; Terasaki, P. I.; Wakisaki, A.; Togashi, H.; Chia, D.; Suyama, N.; Fukushi, Y.; Nudelman, E.; Hakamori, S. *Cancer Res.*, **1984**, *44*, 5279-5285.
- (11) Hakomori, S. *Cancer Res.*, **1985**, *45*, 2405-2411.
- (12) Lockhoff, O. *Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie*, Vol. E14a/3, Thieme, Stuttgart, **1992**, 621-1077.
- (13) Toshima, K.; Tatsuta, K. *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 1503-1531.
- (14) Schmidt, R. R.; Kinzy, W. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1994**, *50*, 21-123.
- (15) Kanie, O.; Barresi, F.; Ding, Y.; Labbe, J.; Otter, A.; Forsberg, L. S.; Ernst, B.; Hindsgaul, O. *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, **1995**, *34*, 2720-2721.
- (16) Ding, Y.; Kanie, O.; Labbe, J.; Palcic, M.; Ernst, B.; Hindsgaul, O. In: *Glycoimmunology* (Eds. A. Alavi, J.S. Axford), Plenum Press, New York, **1995**, 261-269.
- (17) Thiem, J.; Treder, W. *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, **1986**, *25*, 1096-1098.
- (18) Kornfeld, R.; Kornfeld, S. *Ann. Rev. Biochem.*, **1985**, *54*, 631-634.
- (19) Sinnott, M. J. *Chem. Rev.*, **1990**, *90*, 1171-1202.
- (20) Post, C. B.; Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 1317-1319.
- (21) Legler, G. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **1990**, *48*, 319-384.
- (22) Larsson, P. O.; Hedbys, L.; Svensson, S.; Mosbach, K. *Meth. Enzymol.*, **1987**, *136*, 230-233.

-
- (23) Nilsson, K. G. I. *Carbohydr. Res.*, **1987**, *167*, 95-103.
- (24) Johansson, E.; Hedbys, L.; Larsson, P.-O.; Mosbach, K.; Gunarsson, A. *Biotechnol. Letters*, **1986**, *8*, 421-423.
- (25) Ajisaka, K.; Nishida, H.; Fujimoto, H. *Biotechnol. Letters*, **1987**, *9*, 243-245.
- (26) Hedbys, L.; Larsson, P. O.; Mosbach, K.; Svensson, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1984**, *123*, 8-15.
- (27) Svensson, S. C.; Thiem, J. *Carbohydr. Res.*, **1990**, *200*, 391-402.
- (28) Thiem, J.; Sauerbrei, B. *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, **1991**, *30*, 1503-1505.
- (29) Gambert, U.; Thiem, J. *Carbohydr. Res.*, **1997**, *299*, 85-89.
- (30) Farkas, E.; Thiem, J.; Ajisaka, K. *Carbohydr. Res.*, **2000**, *328*, 293-299.
- (31) Schmidt, D.; Sauerbrei, B.; Thiem, J. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 8518-8526.
- (32) Suzuki, K.; Fujimoto, H.; Ito, Y.; Sasaki, T.; K., A. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 1211-1214.
- (33) Singh, S.; Crout, D. H. G.; Packwood, J. *Carbohydr. Res.*, **1995**, *279*, 321-325.
- (34) Ooi, Y.; Hashimoto, T.; Mitsuo, N.; Satoh, T. *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, *33*, 1808-1814.
- (35) Merrifield, R. B.; Singer, J.; Chait, B. *Anal. Biochem.*, **1988**, *174*, 399-414.
- (36) Caruthers, M. H. *Science*, **1985**, *230*, 281-285.
- (37) Fréchet, J. M. J. In: *Polymer-Supported Reactions in Organic Syntheses* (Eds.: P. Hodge, D. C. Sherrington), Wiley, Chichester, **1980**, 1-2.
- (38) Fréchet, J. M.; Schuerch, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 492-496.
- (39) Yan, L.; Taylor, L. C. M.; Goodnow Jr., R.; Kahne, D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 6953-6954.
- (40) Danishefsky, S. J.; McClure, K. F.; Randolph, J. T.; Ruggeri, R. B. *Science*, **1993**, *260*, 1307-1309.
- (41) Schuster, M.; Wang, P.; Paulson, J. C.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 1135-1136.
- (42) Varki, A. *Glycobiology*, **1993**, *3*, 97-130.
- (43) Hirschberg, C. B.; Snider, M. D. *Annu. Rev. Biochem.*, **1987**, *56*, 63-87.
- (44) Rademacher, T. W.; Parekh, R. B.; Dwek, R. A. *Annu. Rev. Biochem.*, **1988**, *57*, 785-838.
- (45) Reuter, G.; Gabius, H. J. *Cell. Mol. Life Sci.*, **1999**, *55*, 368-422.
- (46) Sauerbrei, B. *Dissertation, Universität Hamburg*, **1992**.
- (47) Schmidt, D. *Diplomarbeit, Universität Hamburg*, **1997**.

- (48) nicht veröffentlichte Stabilitätsstudien.
- (49) Friebolin, H.; Baumann, W.; Hauck, M.; Kurz, D.; Wajda, R.; Weisshaar, G.; Keilich, G.; Ziegler, D.; Brossmer, L.; von Nicolai, H. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, **1984**, 365, 1309-1321.
- (50) Vliegthart, J. F. G.; von Halbeek, H.; Dorland, L. *Pure Appl. Chem.*, **1981**, 53, 45-77.
- (51) Vliegthart, J. F. G.; Dorland, L.; von Halbeek, H. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1983**, 41, 209-374.
- (52) Machytka, D.; Klein, R. A.; Egge, H. *Carbohydr. Res.*, **1994**, 254, 289-294.
- (53) Springer, G. F. *Science*, **1984**, 224, 1198-1206.
- (54) Hakomori, S. *Adv. Cancer Res.*, **1989**, 52, 257-331.
- (55) Hull, S. R.; Bright, A.; Carraway, K. L.; Abe, M.; Hayes, D. F.; Kufe, D. W. *Cancer Commun.*, **1989**, 1, 261-267.
- (56) Hakomori, S. *In Glycoproteins and Disease*; Montreuil, J.; Vliegthart, J. F. G.; Schachter, H., Eds.; Elsevier Science B. V.: Oxford, **1996**, 243-275.
- (57) Hakomori, S. *Annu. Rev. Immunol.*, **1984**, 2, 103-126.
- (58) van der Vleugel, D. M. J.; Zwikker, J. W.; Vliegthart, J. F. G.; van Boeckel, S. A. A.; van Boom, J. H. *Carbohydr. Res.*, **1982**, 105, 19-31.
- (59) Hansen, J.-E. S.; Clausen, H.; Hu, S. L.; Nielsen, J. O.; Olofsson, S. *Arch. Virol.*, **1992**, 126, 11-20.
- (60) Livingston, P. O. *Curr. Opinion Immunol.*, **1992**, 4, 624-629.
- (61) Cohen, J. S. *Science*, **1993**, 262, 841-843.
- (62) Kren, V.; Thiem, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, 34, 893-895.
- (63) Lemieux, R. U.; Ratcliffe, R. M. *Can. J. Chem.*, **1979**, 57, 1244-1251.
- (64) Grundler, G. G.; Schmidt, R. R. *Liebigs. Ann. Chem.*, **1984**, 1826-1847.
- (65) Paulsen, H.; Sinnwell, V. *Chem. Ber.*, **1978**, 111, 879-889.
- (66) Sabesan, S.; Lemieux, R. U. *Can. J. Chem.*, **1984**, 62, 644-654.
- (67) Nilsson, K. G. *Carbohydr. Res.*, **1987**, 167, 95-103.
- (68) Sabesan, S.; Neira, S. *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 5468-5472.
- (69) Alper, P. B.; Hung, S.-C.; Wong, C.-H. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 6029-6032.
- (70) Dietrich, H.; Espinosa, J. F.; Chiara, J. L.; Jimenez-Barbero, J.; Leon, Y.; Varela-Nieto, I.; Mato, J.-M.; Cano, F. H.; Foces-Foces, C.; Martin-Lomas, M. *Chem. Eur. J.*, **1999**, 5, 320-336.

-
- (71) Nagao, Y.; Nekado, T.; Ikeda, K.; Achiwa, K. *Chem. Pharm. Bull.*, **1995**, *43*, 1536-1542.
- (72) Pozsgay, V.; Jennings, H. J. *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 4042-4055.
- (73) Distler, J. J.; Jourdian, G. W. *Methods Enzymol.*, **1978**, *50*, 514-520.
- (74) Distler, J. J.; Jourdian, G. W. *J. Biol. Chem.*, **1973**, *248*, 6772-6780.
- (75) Vasella, A.; Witzig, C.; Chiara, J.-L.; Martin-Lomas, M. *Helv. Chim. Acta*, **1991**, *74*, 2073-2077.
- (76) Rothermel, J.; Faillard, H. *Carbohydr. Res.*, **1990**, *196*, 29-40.
- (77) Privalova, J. M.; Khorlin, Y. *Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.*, **1969**, 2785-2792.
- (78) Eschenfelder, V.; Brossmer, R. *Carbohydr. Res.*, **1987**, *162*, 294-297.
- (79) Ajisaka, K.; Fujimoto, H.; Isomura, M. *Carbohydrate Research*, **1994**, *259*, 103-115.
- (80) Makimura, Y.; Ishida, H.; Kondo, A.; Hasegawa, A.; Kiso, M. *J. Carbohydr. Chem.*, **1998**, *17*, 975-979.
- (81) Numata, M.; Sugimoto, M.; Shibayama, S.; Ogawa, T. *Carbohydr. Res.*, **1988**, *174*, 73-85.
- (82) Nicolaou, K. C.; Hummel, C. W.; Bockovich, N. J.; Wong, C.-H. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1991**, 870-872.
- (83) Hedbys, L.; Johansson, E.; Mosbach, K.; Larsson, P. O. *Carbohydr. Res.*, **1989**, *186*, 217-223.
- (84) Burleigh, B. A.; Andrews, N. W. *Annu. Rev. Microbiol.*, **1995**, *49*, 175-200.
- (85) Kipnis, T. L.; David, J. R.; Alper, C. A.; Sher, A.; Dias da Silva, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, *78*, 602-605.
- (86) Parodi, A. J.; Pollevick, G. D.; Mautner, M.; Buschiazzo, A.; Sanchez, D. O.; Frasch, A. C. *EMBO J.*, **1992**, *11*, 1705-1710.
- (87) Vandekerckhove, F.; Schenkman, S.; Pontes de Carvalho, L.; Tomlinson, S.; Kiso, M.; Yoshida, M.; Hasegawa, A.; Nussenzweig, V. *Glycobiology*, **1992**, *2*, 541-548.
- (88) Previato, J. O.; Jones, C.; Xavier, M. T.; Wait, R.; Travassos, L. R.; Parodi, A. J.; Mendonca-Previato, L. *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 7241-7250.
- (89) Scudder, P.; Doom, J. P.; Chuenkova, M.; Manger, I. D.; Pereira, M. E. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 9886-9891.
- (90) Roggentin, P.; Schauer, R.; Hoyer, L. L.; Vimr, E. R. *Glycoconj. J.*, **1989**, *6*, 349-353.
- (91) Buschiazzo, A.; Tavares, G. A.; Campetella, O.; Spinelli, S.; Cremona, M. L.; Paris, G.; Amaya, M. F.; Frasch, A. C.; Alzari, P. M. *Embo J*, **2000**, *19*, 16-24.
- (92) Pereira, M. E. A. *Science*, **1983**, *219*, 1444-1447.

-
- (93) Schenkman, S.; Jiang, M. S.; Hart, G. W.; Nussenzweig, V. *Cell*, **1991**, *65*, 1117-1125.
- (94) Ito, Y.; Paulson, J. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 7862-7863.
- (95) Lee, K. B.; Lee, Y. C. *Anal. Biochem.*, **1994**, *216*, 358-364.
- (96) Takahashi, N.; Lee, K. B.; Nakagawa, H.; Tsukamoto, Y.; Kawamura, Y.; Li, Y. T.; Lee, Y. C. *Anal. Biochem.*, **1995**, *230*, 333-342.
- (97) Vetere, A.; Paoletti, S. *FEBS Lett.*, **1996**, *399*, 203-206.
- (98) Vetere, A.; Ferro, S.; Bosco, M.; Cescutti, P.; Paoletti, S. *Eur. J. Biochem.*, **1997**, *247*, 1083-1090.
- (99) Vetere, A.; Miletich, M.; Bosco, M.; Paoletti, S. *Eur. J. Biochem.*, **2000**, *267*, 942-949.
- (100) Lubineau, A.; Basset-Carpentier, K.; Augé, C. *Carbohydrate Research*, **1997**, *300*, 161-167.
- (101) Cavallesco, R.; M.E.A., P. *J. Immunol.*, **1988**, *140*, 617-625.
- (102) Prioli, R. P.; Santiago Mejia, J.; Pereira, M. E. A. *J. Immunol.*, **1990**, *144*, 4384-4391.
- (103) Schenkman, S.; Chaves, L. B.; Pontes de Carvalho, L. C.; Eichinger, D. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 7970-7975.
- (104) Field, R. A. *persönliche Mitteilung*, .
- (105) Buschiazzo, A.; Frasc, A. C.; Campetella, O. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)*, **1996**, *42*, 703-710.
- (106) Roy, R.; Laferrière, C. A.; Dettman, H. *Carbohydr. Res.*, **1989**, *186*, C1-5.
- (107) Todeschini, A. R.; Mendonca-Previato, L.; Previato, J. O.; Varki, A.; van Halbeek, H. *Glycobiology*, **2000**, *10*, 213-221.
- (108) Smith, L. E.; Uemura, H.; Eichinger, D. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1996**, *79*, 21-33.
- (109) Look, G. C.; Ichikawa, Y.; Shen, G.-J.; Cheng, P.-W.; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.*, **1993**, 4326-4330.
- (110) Palcic, M. M.; Li, H.; Zanini, D.; Bhella, R. S.; Roy, R. *Carbohydr. Res.*, **1998**, *305*, 433-442.
- (111) Unverzagt, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1994**, *33*, 1102-1104.
- (112) Unverzagt, C. *Carbohydr. Res.*, **1998**, *305*, 423-431.
- (113) Estabrook, M. M.; Griffiss, J. M.; Jarvis, G. A. *Infect. Immun.*, **1997**, *65*, 4436-4444.
- (114) Kunz, C.; Rudloff, S. *Z. Ernährungswiss.*, **1996**, *35*, 22-31.
- (115) Zhang, Z.; Magnusson, G. *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 7304-7315.
- (116) DeNinno, M. P.; Eller, C.; Etienne, J. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 1623-1628.

-
- (117) Kuhn, R.; Lutz, P.; MacDonald, D. L. *Chemische Berichte*, **1966**, *99*, 611-617.
- (118) Veeneman, G. H.; van Leeuwen, S. H.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 1331-1334.
- (119) Zhu, X. X.; Ding, P.; Cai, M. S. *Carbohydr. Res.*, **1996**, *296*, 229-236.
- (120) Douglas, S. P.; Whitfield, D. M.; Krepinsky, J. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 5095-5097.
- (121) Douglas, S. P.; Whitfield, D. M.; Krepinsky, J. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *118*, 2116-2117.
- (122) Schmidt, D.; Thiem, J. *Chem. Commun.*, **2000**, *19*, 1919-1920.
- (123) Stöckl, W. P.; Weidman, H. J. *Carbohydr. Chem.*, **1989**, *8*, 169-181 und darin zitierte Literatur.
- (124) Matta, K. L.; Bahl, O. P. *Carbohydr. Res.*, **1972**, *21*, 460-464.
- (125) Ganem, B.; Small Jr., V. R. *J. Org. Chem.*, **1974**, *39*, 3728-3730.
- (126) Bhar, S.; Ranu, B. S. *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 745-754.
- (127) Rodebaugh, R.; Debenham, J. S.; Fraser-Reid, B. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 5477-5478.
- (128) Hodosi, G.; Krepinsky, J. J. *Synlett*, **1996**, 159-162.
- (129) Bergbreiter, D. E.; Kimmel, T.; Caraway, J. W. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 4757-4760.
- (130) Mehta, S.; Whitfield, D. M. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 5907-5910.
- (131) Kahne, D. *Synlett*, **1995**, 523-524.
- (132) Schauer, R. *Methods Enzymol.*, **1978**, *50*, 64-89.
- (133) Zemplén, G.; Pacsu, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1929**, *63*, 1613-1618.
- (134) Bergh, M. L.; Koppen, P.; van den Eijnden, D. H. *Carbohydr. Res.*, **1981**, *94*, 225-229.
- (135) Platzner, N.; Davoust, D.; Lhermitte, M.; Bauvy, C.; Meyer, D. M.; Derappe, C. *Carbohydr. Res.*, **1989**, *191*, 191-207.
- (136) Berman, E. *Magn. Reson. Chem.*, **1987**, *25*, 784-789.
- (137) Gambert, U.; Thiem, J. *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 107-110.
- (138) Iijima, H.; Ogawa, T. *Carbohydr. Res.*, **1988**, *172*, 183-193.

Ein besonderes Dankeschön geht an alle, die direkt und indirekt zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Meinen Eltern für Ihre Unterstützung in jeder Lebenslage.
- Ulja, ohne die Kohlenhydrate am Ende doch nur Kohlenhydrate gewesen wären.
- Meinen Mitstreitern aus Labor 313: Karin, die sich mit mir auf die Odyssee gemacht hat, eine e-mail-Adresse auf dem anderen Server zu organisieren, und Synke für ihr Verständnis, wenn die Musikk Lautstärke im Labor gelegentlich auch oberhalb der Hörschwelle war.
- Der Besatzung von Raumschiff 315: Dirk (II), der auch schon vor dem ersten Tee eine erschreckend gute Laune hatte, Sven für seine unschätzbaren Verdienste um das Bereitstellen von Download-Kapazitäten, René, der auch in Zeiten der Dürre immer noch einen Kaffee übrig hatte, und Daniel, der das Weih-Aceton erfunden hat.
- Erzsébet, die wirklich alles galactosyliert hat, und Lilia für diverse große und kleine Hilfen
- Allen aus den unendlichen Weiten von Labor 318: Saskia und Dirk (III), die zur Hardcore-Cappuccino- und Espresso-Fraktion gehören, sowie Angela, die australisches Lebensgefühl nach Hamburg gebracht hat.
- Den Insassen aus Strafkolonie 222: Swantje, die ganz nahe bei der Uni wohnt, und Christian, der Mann, den sie Lehrer nannten.
- Den 2 MALDInis Lars und Nico, die auf Moleküle geschossen haben.
- Patrick, ohne den die Trans-Sialidase wohl immer noch in den Bakterien wäre.
- Thisbe, die jetzt Kiel dendrimerisiert.
- Kirsten, die noch immer mit der Aufarbeitung einer Synthese beschäftigt ist.
- GG, bei der die Sonne auch an Regentagen schien.
- Inge, die auch aus Nanogramm-Mengen noch hochaufgelöste NMR-Spektren zaubern konnte.
- Ira, die immer wußte, wo es was gab.
- Eric Vimr, Robert Field und Sergio Schenkman for the clones.
- Vladimír Křen und Jana Dvořáková for the excellent cooperation and lots of fun in Prague.
- George Slim und Richard Furneaux for the proof that the laws of nature also work upside down.

Lebenslauf

Dirk Schmidt

*20.02.1970 in Hamburg

Schulbildung

1976 – 1980

Grundschule Uetersen

1980 – 1989

Ludwig-Meyn-Gymnasium Uetersen

Abschluß: Abitur

Zivildienst

07/89 – 09/90

Blutbank und Blutspendedienst des Kreiskrankenhauses
Pinneberg

Akademische Ausbildung

10/90 – 12/92

Chemie-Grundstudium an der Universität Hamburg

Abschluß: Vordiplom

01/93 – 04/97

Chemie-Hauptstudium an der Universität Hamburg

Abschluß: Diplom

08/96 – 04/97

Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. J. Thiem,
Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg

Thema: Präparative Sialidase-katalysierte Synthese von
Sialyloligosacchariden

05/97 – 12/00

Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. J. Thiem,
Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg

Thema: Chemoenzymatische Synthese von sialylierten
Oligosaccharidstrukturen durch Transglycosylierung

Auslandsaufenthalte

04/94 – 07/94

Studienaufenthalt an der Medicinal Chemistry Unit der
University of Newcastle-upon-Tyne, England

ERASMUS-Stipendium

Thema: Synthesis and Studies of Benzoprime Derivatives as
Potential Dihydrofolate Reductase Inhibitors

10/97 – 12/97

Forschungsaufenthalt an der Tschechischen Akademie der
Wissenschaften in Prag, Tschechische Republik

Thema: Modification of Chitoooligosaccharides by
Transglycosylation Methodology

08/98 – 10/98

Forschungsaufenthalt bei Industrial Research Ltd., Wellington,
Neuseeland

Thema: Synthesis of Oligosaccharides and Glycopeptides
Using Thermophilic Glycosidases

Beruflicher Werdegang

08/96 – 04/97

Studentische Hilfskraft in der NMR-Abteilung des Instituts für
Organische Chemie der Universität Hamburg

05/97 – 12/00

Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen des von der DFG
geförderten Sonderforschungsbereichs 470 („Glykostrukturen
in Biosystemen“)