

Assay-Entwicklung und Inhibitorsynthese für
die Trans-sialidase aus *Trypanosoma cruzi*

Dissertation

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

vorgelegt von
Sebastian Meinke
aus Hamburg

Hamburg 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Thiem
2. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

Tag der Disputation: 07. Mai 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2005 bis März 2010 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. J. Thiem am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

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

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Acetanhydrid
AcCl	Acetylchlorid
AcOH	Essigsäure
AIBN	2,2'-Azobis(isobutyronitril)
aq.	wäßrige Lösung
Arg	Arginin
Asp	Asparinsäure
AU	<i>absorption units</i>
BADMA	Benzaldehyd-dimethylacetal
Bn	Benzyl
BuOH	n-Butanol
c	Konzentration
CAZy	<i>Carbohydrate-Active enZymes Database</i>
CM	<i>cross metathesis</i>
CMP	Cytidinmonophosphat
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
Cy	Cyclohexyl
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
EE	Ethylacetat
EI	<i>electron impact</i>
eq	äquatorial bzw. Äquivalente
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
Glu	Glutaminsäure
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Lit.	Literaturwert
MAG	Myelin-assoziiertes Glycoprotein
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight</i>
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Mes	Mesityl
MS	Massenspektrometrie
4-MU	4-Methylumbelliferon
MuGal	4-Methylumbelliferyl-β-D-galactopyranosid
NaOAc	Natriumacetat

Abkürzungsverzeichnis

NaOMe	Natriummethanolat
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	<i>N</i> -Glycolyl-Neuraminsäure
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhanced spectroscopy</i>
PCC	Pyridinium-chlorochromat
PE	Petrolether 50-70
Ph	Phenyl
pNP	<i>para</i> -Nitrophenol
pTSA	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
quant.	quantitativ
RCM	<i>ring closing metathesis</i>
ROM	<i>ring opening metathesis</i>
ROMP	<i>ring opening metathesis polymerisation</i>
rt	Raumtemperatur
RU	<i>response units</i>
Siglec	<i>sialic acid binding Ig-like lectin</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance spectroscopy</i>
TBA	Tetrabutylammonium
tBu	<i>tert</i> -Butyl
tBuLi	<i>tert</i> -Butyllithium
TcTS	<i>Trypanosoma cruzi</i> Trans-sialidase
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U/min	Umdrehungen pro Minute
Zers.	Zersetzung

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kohlenhydrate – biologische Funktionen	1
1.2	Vorkommen und Bedeutung von Sialinsäuren.....	2
1.3	<i>Trypanosoma cruzi</i> und Chagas-Krankheit.....	4
1.4	Trans-sialidase aus <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcTS).....	7
2	Zielsetzung	11
3	Kenntnisstand.....	12
3.1	Messung der Enzymaktivität – bekannte Assays	12
3.2	Versuche zur Synthese von Inhibitoren der Trans-sialidase	15
4	Synthesen	20
4.1	Syntheseplanung.....	20
4.2	C-Glycoside der N-Acetylneuraminsäure	25
4.3	Synthese der Allyl-C-sialoside.....	27
4.4	Ruthenium-katalysierte Kreuzmetathese.....	29
4.5	Einführung eines Aromaten an der 9-Position	47
4.6	Einführung einer Carboxylgruppe an der 4-Position	50
5	Messungen.....	53
5.1	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	53
5.2	Reaktionsverfolgung der Trans-sialylierung mittels NMR-Spektroskopie.....	62
5.3	Messung des Umsatzes durch HPLC	66
6	Zusammenfassung.....	74
7	Summary	76
8	Experimenteller Teil.....	78
8.1	Methoden und Geräte	78
8.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	81
8.3	Synthesen der einzelnen Verbindungen	83
8.4	SPR-Messungen	151
8.5	Reaktionsverfolgung der enzymatischen Reaktion durch ¹ H-NMR	152
8.6	Messung des Umsatzes der enzymatischen Reaktion durch HPLC.....	153
9	Sicherheitsdaten	155
10	Literatur.....	159

1 Einleitung

1.1 Kohlenhydrate – biologische Funktionen

Kohlenhydrate stellen neben Nucleinsäuren, Peptiden und Lipiden eine der vier Hauptklassen der Biomoleküle dar und übernehmen in lebenden Organismen unterschiedlichste Funktionen. Sie fungieren als Energiequelle und –speicher (Stärke, Glycogen) sowie als Intermediate im Metabolismus.^[1] Daneben gehören sie insbesondere durch die Cellulose, die als pflanzliche Gerüstsubstanz durch Photosynthese weltweit in einer Menge von 200 Milliarden Tonnen pro Jahr erzeugt wird, zu den häufigsten organische Verbindungen überhaupt.^[2] Da Kohlenhydrate außerdem in Form der (Desoxy-)Ribose das Gerüst der Nucleinsäuren bilden und sowohl in Verbindung mit Peptiden (Glycopeptide) als auch mit Lipiden (Glycolipide) wichtige biologische Funktionen erfüllen, kann man sie als die eventuell wichtigste, auf jeden Fall aber vielseitigste Klasse der Biomoleküle bezeichnen.

Bis in die 50er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde die Rolle der Kohlenhydrate in biologischen Zusammenhängen jedoch unterschätzt.^[3] Dabei sind Kohlenhydrate aufgrund ihrer Polyfunktionalität und der daraus resultierenden Strukturvielfalt von möglichen Oligosacchariden als Informationsträger geradezu prädestiniert (Abbildung 1). Eine Berechnung aller verzweigten und unverzweigten reduzierenden Hexasaccharide kam auf die beeindruckende Zahl von 1.05 Billionen (10^{12}) möglichen Strukturen.^[4]

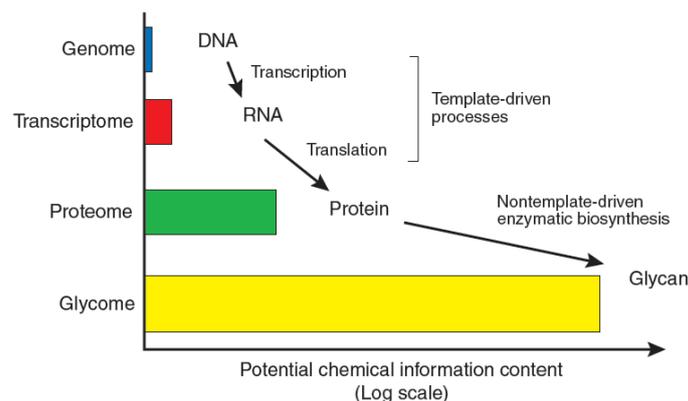


Abbildung 1: Relativer Informationsgehalt der Biomoleküle (schematische Darstellung)^[5]

Die Zelloberflächen von eukaryotischen Zellen sind zum großen Teil mit Glycoproteinen und Glycolipiden dekoriert (Abbildung 2). Die „äußere Erscheinung“ einer Zelle und damit auch die interzelluläre Kommunikation wird also durch die sogenannte Glycocalix bestimmt.

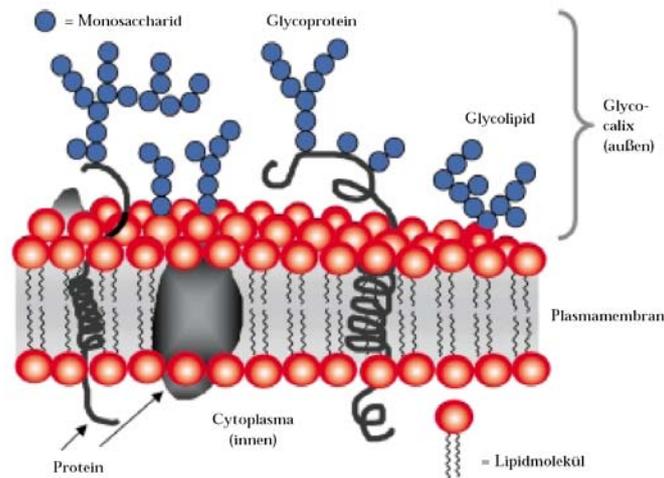


Abbildung 2: Ausschnitt aus der Zellmembran mit glycosylierten Proteinen und Lipiden^[2]

Glykokonjugate sind in fast allen Lebewesen vorhanden und an nahezu allen interzellulären Prozessen beteiligt. Dazu gehören auch die Funktionen des Immunsystems, wodurch die Erforschung dieser Prozesse medizinische Relevanz gewinnt. Der Informationsgehalt der Glykokonjugate wird durch die Wechselwirkung mit strukturspezifischen kohlenhydratbindenden Proteinen, den Lectinen und Selectinen, weitergegeben.

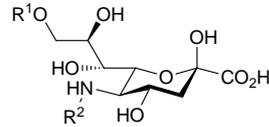
Zum Aufbau dieser Glykokonjugate werden von der Zelle Glycosyltransferasen exprimiert, so dass das Glycosylierungsmuster die Genexpression der Zelle widerspiegelt. So unterscheiden sich Krebszellen beispielsweise von gesunden Zellen durch veränderte Glykokonjugate auf ihrer Oberfläche.^[6]

Die Gesamtheit der Glykokonjugate eines Organismus wird in Anlehnung an das Genom als „Glykom“ bezeichnet. Zum Gebiet der *genomics* (Erforschung des Genoms, der Gesamtheit der Gene eines Organismus) und der *proteomics* (bezieht sich auf die Gesamtheit der Proteine) trat damit das Feld der *glycomics* als sich parallel mit den apparativen analytischen Möglichkeiten rasch entwickelnder Forschungszweig.^[5]

1.2 Vorkommen und Bedeutung von Sialinsäuren

In höheren Tieren und einigen Mikroorganismen sind die terminalen Kohlenhydrate in den Glykokonjugaten häufig Sialinsäuren.^[7,8] Die Gruppe der Sialinsäuren besteht aus

unterschiedlichen *N*- bzw. *O*-acylierten Derivaten der Neuraminsäure (Abbildung 3),^[9] deren häufigster Vertreter die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac, **1**) ist. Diese wurde 1941 erstmals aus Glycolipiden des Gehirns isoliert.^[10]



1	$R^1 = H$	$R^2 = Ac$	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
2	$R^1 = Ac$	$R^2 = Ac$	<i>N,O</i> ⁹ -Diacetylneuraminsäure
3	$R^1 = H$	$R^2 = \text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-$	<i>N</i> -Glycolylneuraminsäure

Abbildung 3: Die häufigsten Sialinsäuren

Inzwischen sind über 40 Mitglieder der Sialinsäure-Familie bekannt, die an verschiedenen Positionen *O*-Acetyl-, aber auch *O*-Lactyl-, *O*-Methyl-, *O*-Sulfat- oder *O*-Phosphat-Gruppen tragen können.^[11] Da die terminale Position der Sialinsäuren in Glycokonjugaten (Abbildung 4) sie zu einem wichtigen Liganden für Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen macht, ist die hohe Diversität wahrscheinlich der erforderlichen Spezifität dieser Erkennungsprozesse geschuldet.^[12]

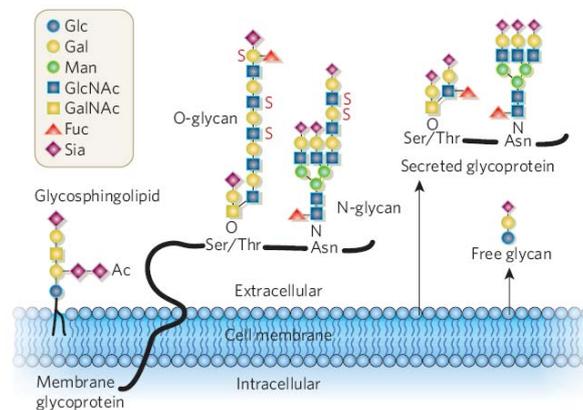


Abbildung 4: Sialinsäuren als terminale Kohlenhydrate auf der Zelloberfläche^[13]

Bei allen Säugetieren treten sowohl *N*-Acetyl- als auch *N*-Glycolylneuraminsäure auf,^[14] beim Menschen fehlt jedoch die *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc, **3**). Aufgrund einer Deletion im kodierenden Gen ist die CMP-Neu5Ac-Hydroxylase, die die *N*-Acetylgruppe der *N*-Acetylneuraminsäure hydroxyliert, in der menschlichen Sialinsäurebiosynthese nicht aktiv. Diese Mutation konnte zeitlich auf den Beginn der Entwicklung des menschlichen Gehirns vor etwa 2.1 bis 2.2 Millionen Jahren eingegrenzt werden, und wird als ein wichtiger Faktor

der Evolution gesehen.^[15] Interessanterweise finden sich in menschlichen Krebszellen Antigene, die Neu5Gc enthalten.^[16]

Sialinsäure-bindende Proteine (Siglecs: *sialic acid binding Ig-like lectins*^[17]) spielen eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation, und so verwundert es nicht, dass Krankheitserreger diese Mechanismen nutzen. Sialylierte Lactosamin-Strukturen, die normalerweise von Siglec-1 (Sialoadhesin, α ,2-3-spezifisch) und Siglec-2 (CD22, α ,2-6-spezifisch^[17]) erkannt werden, sind die wesentlichen Angriffspunkte der Hämagglutinine von Vogelgrippe (α ,2-3-spezifisch) und menschlicher Grippe (α ,2-6-spezifisch).^[13,18,19] Die Bindung von E-Selectin an Sialyl-Lewis-X (Sialyl-Le^X) spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsvorgängen,^[20,21] Sialyl-Le^X wird aber auch von *Pseudomonas aeruginosa* erkannt.^[13] Das mehrfach sialylierte Gangliosid GQ1b α wird vom Myelin-assoziierten Glycoprotein (MAG) gebunden,^[22,23] wodurch das Neuriten-Wachstum reguliert wird. Dieses Gangliosid wird ebenfalls von *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria, angegriffen.^[13] Das Sialyl-Tn-Antigen findet sich zum Beispiel in gp120, einem Glycoprotein des HI-Virus, das eine besondere Rolle bei der Zellinvasion des Virus spielt,^[24,25] aber auch auf der Oberfläche von Krebszellen.^[6,26]

Eine Sialylierung der Zelloberfläche schützt vor Angriff durch das Komplementsystem,^[13] was sich zum Beispiel auch die parasitären Trypanosomen zu Nutze machen.

1.3 *Trypanosoma cruzi* und Chagas-Krankheit

Trypanosomen (griech. „Bohrkörper“) sind Protozoen, die als von Insekten übertragende Parasiten für endemische zoonotische Erkrankungen in Afrika und Südamerika verantwortlich sind. *Trypanosoma cruzi* ist der Erreger der südamerikanischen Trypanomiasis,^[27] die nach ihrem Entdecker Carlos Chagas (erste Beschreibung 1909^[28]) häufig Chagas-Krankheit genannt wird. Er wird durch den Kot nachtaktiver, blutsaugender Raubwanzen (Spezies *Triatoma*, *Rhodnius* und *Panstrongylus*) übertragen. Durch Reiben gelangen die im Kot der Wanzen enthaltenden Trypanosomen über die Einstichstelle oder Schleimhäute (Bindehaut im Auge) in die Blutbahn. Andere mögliche Ansteckungswege sind Bluttransfusionen und die pränatale Infektion. Aus dem Blut gelangen die Parasiten in Gewebezellen, wo sie sich vermehren. Befallen werden Menschen und Wirbeltiere, wobei insbesondere Nagetiere als Zwischenwirte eine Rolle spielen.



Abbildung 5: *Rhodnius prolixus* bei der Blutmahlzeit^[29]

Die Chagas-Krankheit gilt in Mittel- und Südamerika als Volkskrankheit. Nach Informationen der *Pan American Health Organization* gab es 2005 in 21 betroffenen Ländern bei 108.6 Millionen gefährdeten Menschen im Verbreitungsgebiet der Krankheit 7.7 Millionen Infizierte, 42.200 Neuinfektionen durch Raubwanzenbiss und 14.385 neue Fälle durch Übertragung im Mutterleib. Am stärksten betroffen ist Bolivien, wo 6.8% der Bevölkerung infiziert sind.^[30]



Abbildung 6: Verbreitungsgebiet der Chagas Krankheit^[27]

Es werden eine akute und eine chronische Phase der Chagas-Krankheit unterschieden. Nach der Infektion kommt es zunächst zu einer lokalen Hautreaktion und zur Schwellung der regionalen Lymphknoten. In der akuten Phase, die in 95% der Fälle wegen fehlender Symptome nicht bemerkt wird,^[31] kann es 2-4 Wochen nach der Infektion zu Fieber, entzündlichem Hautausschlag, Lymphknotenentzündung, Leber- und Milzvergrößerung und in einigen Fällen zu einer Myokarditis kommen.^[32] Todesfälle durch Myokarditis oder Meningoenzephalitis kommen vor, in den meisten Fällen klingen die Symptome jedoch spontan ab.^[31] Es folgt eine symptomlose Latenzphase (8-10 Wochen nach akuter Phase). In der chronischen Phase zeigen sich 10-20 Jahre nach der akuten Phase chronische Kardiopathie (bei 30%), chronische Schäden am Verdauungstrakt (6%) und neurologische

Störungen (3%).^[33] Über die Hälfte der Erkrankten mit Kardiopathie sterben 7 Monate bis 2 Jahre nach Auftreten der Symptome.^[31]

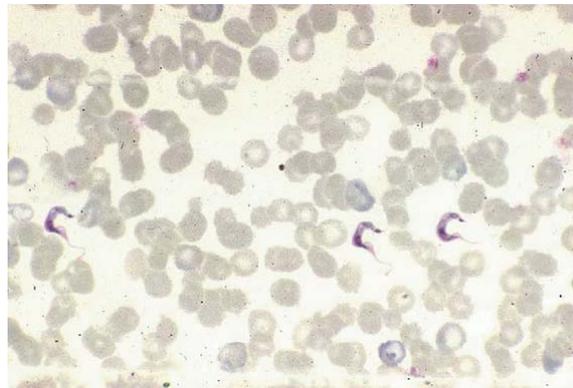


Abbildung 7: *Trypanosoma cruzi* Trypomastigoten im Blut^[34]

Als therapeutische Maßnahme stehen zwei Medikamente zur Verfügung, Nifurtimox (**4**) und Benznidazol (**5**, Abbildung 8), die allerdings cyto- und genotoxisch sind^[31] und daher starke Nebenwirkungen zeigen.

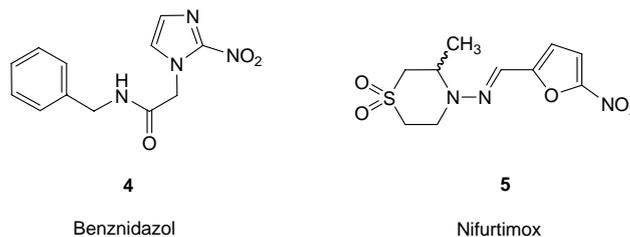


Abbildung 8: Chemotherapeutika zum Einsatz in der akuten Phase der Chagas-Krankheit

Sie wirken außerdem nur in der akuten Phase der Erkrankung. Auch ist die Wirkung nicht immer effektiv, so bleibt die Infektion in über 80% der Fälle bestehen^[31] und die chronische Phase wird in der Regel nicht verhindert.^[35] Die bislang erfolgreichste Methode der Eindämmung der Chagas-Krankheit ist das Bekämpfen des Vektors (*Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* und *Panstrongylus megistus*) durch Insektizide.^[31,36]

Um neue, verträglichere Ansätze der Therapie zu entwickeln, ist es hilfreich, die Mechanismen zu studieren, die hinter Infektion und Invasion der Wirtszellen stehen. *Trypanosoma cruzi* durchläuft in seinem Lebenszyklus verschiedene Stadien, die trypomastigote und amastigote Form (im Wirt; Abbildung 7) und die epimastigote Form (im Verdauungstrakt des Vektors).^[37] In der trypomastigoten Form, die während der Infektion und im Blut des Wirtsorganismus auftritt, exprimiert *T. cruzi* ein Enzym, die Trans-sialidase (TcTS), die in der Lage ist, *N*-Acetylneuraminsäure von Wirtszellen auf die

Zelloberflächenglycane des Parasiten zu übertragen. Da *T. cruzi* selbst nicht in der Lage ist, Sialinsäuren *de novo* zu synthetisieren,^[38] ist TcTS direkt oder indirekt für alle Prozesse verantwortlich, die innerhalb des komplexen Vorgangs der Zellinvasion durch Wechselwirkung mit sialylierten Kohlenhydratstrukturen stattfinden.^[39] Dazu gehört hauptsächlich das Anhaften an Wirtszellen^[40] und das Verlassen der Vakuolen und damit das Eindringen in das Zellplasma nach der Phagozytose,^[41] aber auch die induzierte Apoptose bei Zellen des Immunsystems^[42] und die Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung durch Wechselwirkung mit Siglecs.^[43] Trypomastigoten, die keine Trans-sialidase exprimieren, können nicht in Wirtszellen eindringen, erlangen diese Fähigkeit aber wieder bei Zugabe von exogener Trans-sialidase.^[44] Die Trans-sialidase ist daher ein vielversprechender Ansatzpunkt, um neue Strategien gegen die Chagas-Krankheit zu entwickeln.^[45]

1.4 Trans-sialidase aus *Trypanosoma cruzi* (TcTS)

Die Trans-sialidase aus *Trypanosoma cruzi* (TcTS) ist eine *exo- α -Sialidase* (EC 3.2.1.18, CAZy Glycosid-Hydrolase Familie GH33), die von den *T. cruzi* Trypomastigoten exprimiert wird. Es handelt sich um ein GPI-verankertes membranständiges Enzym.^[46]

In den achtziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts gab es erste Hinweise auf Sialidase-Aktivität in *T. cruzi* Trypomastigoten.^[47] Bald danach wurde die Trans-Glycosylierung entdeckt,^[48] bei der freie *N*-Acetylneuraminsäure nicht als Substrat fungiert. Es wurde beobachtet, dass 3'-Sialyllactose von TcTS umgesetzt wird und freie Lactose als Konkurrenzsubstrat die Sialylierung der Trypanosomen unterbindet.^[40] Klonierungsexperimente von Uemura *et al.* zeigten, dass Trans-sialidase- und Sialidase-Aktivität vom gleichen Enzym ausgehen.^[49] Die für die Aktivität entscheidende Genregion wurde eingegrenzt, und die Ähnlichkeit der Sequenz mit der bakterieller Sialidasen lieferte erste Hinweise auf den Mechanismus. Scudder *et al.* isolierten und charakterisierten das Enzym als α ,2-3-spezifische Trans-sialidase und fanden, dass die bevorzugte Trans-sialylierung in Abwesenheit eines Akzeptormoleküls einer (schwächer ausgeprägten) Hydrolaseaktivität weicht.^[50] Das Wildtyp-Enzym wurde von Schenkman *et al.* durch Papain-Verdau in ein 70 kDa schweres, aktives Fragment gespalten,^[51] das die Grundlage für die rekombinante Expression von TcTS schuf und damit die späteren Kristallstrukturuntersuchungen ermöglichte. Eine Sequenzierung eines aktiven und eines inaktiven TcTS-Klons^[52] offenbarte die entscheidende Rolle von Tyr₃₄₂, dem katalytischen

Nucleophil,^[53] und identifizierte weitere wichtige Aminosäuren im aktiven Zentrum. Die Ähnlichkeit zu bakteriellen Sialidasen zeigt sich auch in der Retention der Konfiguration am anomeren Zentrum der *N*-Acetylneuraminsäure.^[54] Es handelt sich dabei um einen klassischen Ping-Pong-Mechanismus.^[55] Dieser Name beschreibt das für diesen Mechanismus charakteristische alternierende Binden der Substrate und Freisetzen der Produkte.^[56]

TcTS entfernt Neu5Ac von an Zelloberflächen befindlichen α ,2-3-Sialylgalactosiden des Wirtsorganismus und überträgt diese α ,2-3-spezifisch auf terminale Galactoside des Parasiten. In Abbildung 9 ist der Mechanismus gezeigt, wie er insbesondere durch die Kristallstrukturuntersuchungen durch Frasch, Withers und Buschiazzo^[57,58] bestätigt wurde. Durch Bindung im aktiven Zentrum wird die Konformation des Substrates verzerrt ($B_{2,5}$), was die Umwandlung in die Halbsesselform des Übergangszustands (4H_5) und damit den Angriff des katalytischen Nucleophils Tyr₃₄₂ sowie die Spaltung der glycosidischen Bindung erleichtert. Für Protonenübertragung sind dabei Asp₅₉ und Glu₂₃₀ zuständig. Im kovalenten Intermediat liegt die Neuraminsäure in der bekannten Sesselkonformation (2C_5) und in β -Konfiguration vor. In Umkehrung dieser Schritte greift das Akzeptorsubstrat das anomere Zentrum an, wodurch insgesamt Retention der Konfiguration durch doppelte Inversion resultiert.

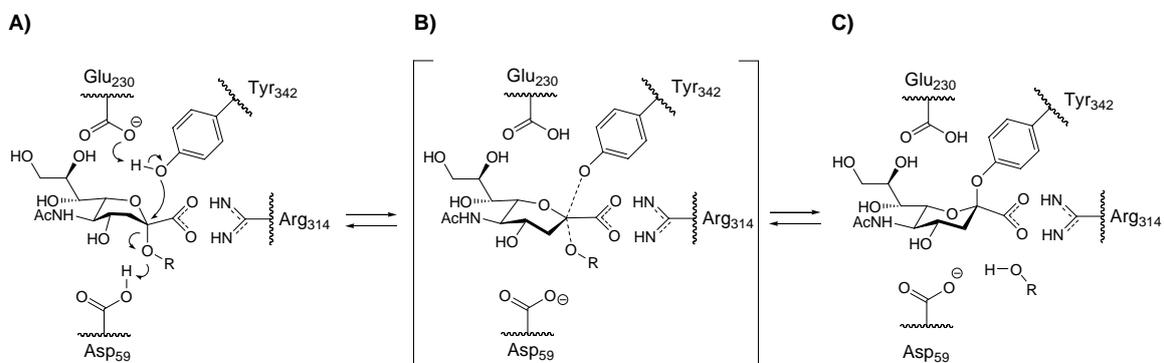


Abbildung 9: Der Mechanismus der Trans-sialidase aus *T. cruzi*; A) gebundenes Substrat, $B_{2,5}$ -Konformation; B) Übergangszustand, 4H_5 -Konformation; C) kovalentes Intermediat, 2C_5 -Konformation; R: β -Galactosid

Neben den direkt an der Reaktion beteiligten Aminosäuren im aktiven Zentrum existieren noch weitere Wechselwirkungen: eine ionische Bindung des Carboxylats zu Arg₃₁₄, mehrere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Substrat, Aminosäureseitenketten und Wassermolekülen sowie die hydrophobe Wechselwirkung der Lactose mit Trp₃₁₂ und Tyr₁₁₉ (Abbildung 10 und Abbildung 11). Diese beiden aromatischen Aminosäurereste bilden die

acceptor binding site, die durch Binden des Akzeptors dafür verantwortlich sind, dass es nicht zur Hydrolyse, sondern zur Transglycosylierung kommt.

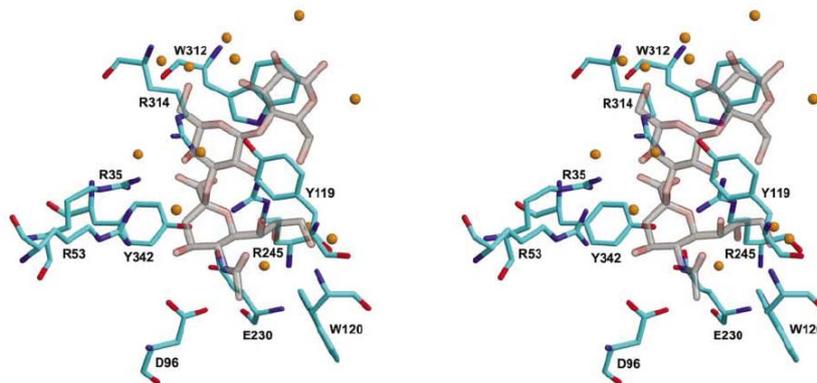


Abbildung 10: Stereoskopische Ansicht des aktiven Zentrums von TcTS_{D59A} im Komplex mit 3'-Sialyllactose (Blick von „unten“)^[58]

Erste Hinweise auf diese strukturelle Besonderheit wurden aus kinetischen Untersuchungen erhalten.^[59] Die Zuordnung dieser Akzeptor-bindenden Funktion zu den beiden aromatischen Aminosäuren Tyr₁₁₉ und Trp₃₁₂ gelang durch Vergleich mit trypanosomalen Sialidasen (*T. rangeli*), in denen Tyr₁₁₉ fehlt.^[60,61] Ein eindrucksvoller Beweis für die aus diesen beiden Aminosäuren gebildete *acceptor binding site* gelang durch Mutation der *T. rangeli* Sialidase: Nach Einführung des Tyrosins an die entsprechende Stelle zeigte das Enzym Trans-sialidase-Aktivität.^[62]

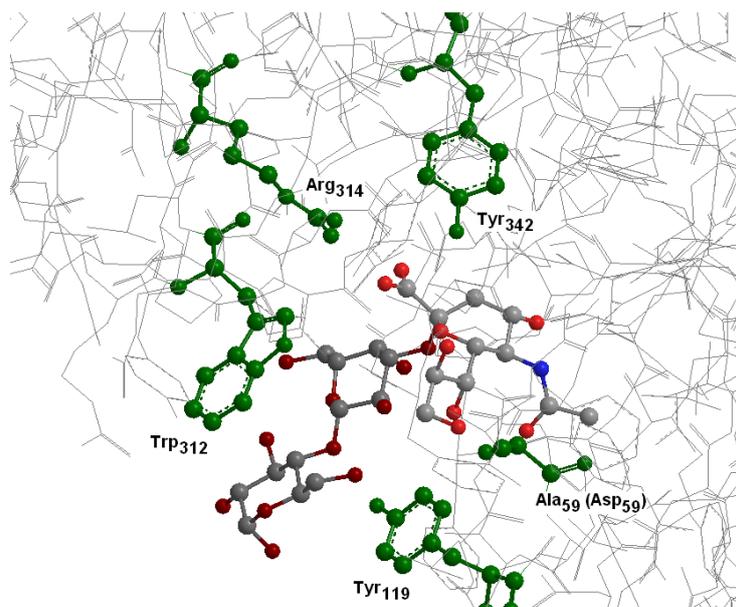


Abbildung 11: TcTS_{D59A} im Komplex mit 3'-Sialyllactose;^[58] einige wichtige Aminosäuren sind hervorgehoben

Schon früh wurde die Bandbreite an Substraten untersucht, die von TcTS toleriert werden.^[50,63] Als Akzeptoren eignen sich vor allem β -D-Galactoside,^[64] aber auch β -D-Fucoside, β -L-Arabinoside und 2-Desoxy-Derivate werden sialyliert.^[65] Besonders nützlich für die synthetische Anwendung ist die Toleranz gegenüber aromatischen Donor-Substraten wie *p*-Nitrophenyl- und Methylumbelliferylgalactosid. Eine Kettenverkürzung an der Glycerolseitenkette ist möglich,^[66,67] anstelle von *N*-Acetyl- wird auch *N*-Glycolyl- und (eingeschränkt) *N*-Propionylneuraminsäure erkannt.^[68]

2 Zielsetzung

Aus der in den Kapiteln 1.3 und 1.4 dargestellten Schlüsselrolle der Trans-sialidase aus *Trypanosoma cruzi* (TcTS) bei der Chagas Krankheit ergibt sich eine hohe Wahrscheinlichkeit, durch Inhibitoren dieses Enzyms einen Einfluß auf den Lebenszyklus der Parasiten und damit den Verlauf der Krankheit zu nehmen. Daher sollte in dieser Arbeit ein neuer Ansatz entwickelt werden, potentielle Inhibitoren zu synthetisieren und ihre Eigenschaften durch geeignete Messungen zu evaluieren.

Die Synthese sollte dabei ausgehend von der Betrachtung des durch Kristallstrukturanalysen^[57,58] bekannten aktiven Zentrums der Trans-sialidase geplant werden und ausgehend von geeigneten hydrolysestabilen Derivaten der *N*-Acetylneuraminsäure zu Liganden mit hoher Affinität zu TcTS führen.

Für die Messungen kamen Verfahren in Frage, aus denen die Affinitäten der synthetisierten Liganden zum Enzym im Gleichgewicht erhalten werden (thermodynamische Daten), und Messungen, in denen der Einfluß der synthetisierten Verbindungen auf die Enzymreaktion durch Messung des Umsatzes beobachtet werden kann (kinetische Daten). Die Meßbarkeit *in vitro* bringt immer ein mehr oder weniger starkes Abweichen von den Bedingungen der natürlichen Enzymreaktion mit sich, so dass unterschiedliche Messverfahren mit jeweils unterschiedlichen Vor- und Nachteilen verbunden sind.

In dieser Arbeit sollten die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR), die Informationen über die Affinität der Verbindungen zum Enzym liefert, sowie eine NMR-spektroskopische und eine HPLC-basierte Methode der Messung des Umsatzes in einer Enzymreaktion zum Einsatz kommen. Die Grundlagen dieser Messungen werden in Kapitel 5 genauer erläutert.

3 Kenntnisstand

3.1 Messung der Enzymaktivität – bekannte Assays

Die gebräuchlichen Messungen des Umsatzes der Trans-sialidase basieren auf verschiedenen Markierungen des Akzeptor-Substrates. Die ursprünglich am häufigsten angewandte Methode benutzt dabei ^{14}C -markiertes *N*-Acetyllactosamin, das anschließend an die enzymatische Reaktion abgetrennt wird (Anionenaustausch-Chromatographie), um die Konzentration szintillographisch zu vermessen.^[50,63] Die zugrundeliegende Reaktion reflektiert die natürlichen Substrat-Verhältnisse sehr gut, allerdings muß mit radioaktiven Reagenzien gearbeitet werden.

Assays, die auf photometrischen Messungen beruhen, setzen in der enzymatischen Reaktion als Akzeptor- oder Donor-Komponente β -Galactoside ein, die ein Chromophor tragen. Dabei ist nach der Reaktion ebenfalls eine Trennung bzw. Unterscheidung von Produkt und Akzeptor notwendig, um die Äquivalentkonzentration des Produkts messen zu können.

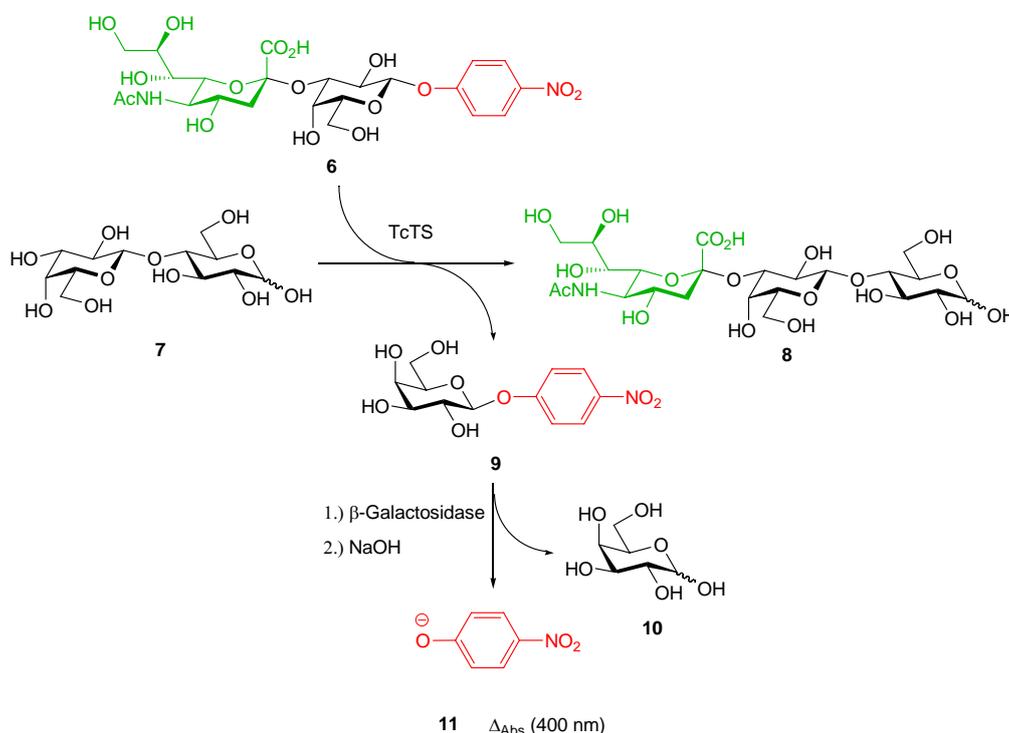


Abbildung 12: Spektrophotometrisches Assay nach Field *et al.*;^[69,70] desialylierter Donor 9 wird durch eine Galactosidase gespalten

Beispiele hierfür sind die Verwendung von 3-Sialyl-*p*-nitrophenylgalactosid als Donor^[69,70] oder *o*-Nitrophenylgalactosid als Akzeptor,^[71] die sich durch hohe Komplexität der Methode

auszeichnen, da die nichtsialylierten Galactoside nach einer bestimmten Reaktionszeit durch Umsatz mit einer β -Galactosidase gespalten werden (Abbildung 12). Der Umsatz wird dann durch Änderung der Absorption bei 400 nm (deprotoniertes Nitrophenol) photometrisch gemessen. Vorteile sind hier die Vermeidung von radioaktiven Reagenzien sowie die Verwendung von Galactosiden als Abgangsgruppe am Donor-Substrat und als Akzeptor. Dadurch bewegt man sich bei dieser Methode immer noch dicht an den natürlichen Substrat-Verhältnissen.

Ein fluorimetrisches Verfahren ist der Assay von Schrader und Schauer.^[72] In diesem wird die Sialylierung von Methylumbelliferylgalactosid (MuGal) nach Trennung von Akzeptor und Produkt und saurer Hydrolyse anhand der Fluoreszenz des Methylumbelliferons **14** gemessen (Abbildung 13). Neben der Vermeidung von radioaktiven Reagenzien und der Nutzung eines Akzeptor/Donor-Systems, das der natürlichen Reaktion relativ ähnlich ist, ist der Vorteil gegenüber den oben beschriebenen photometrischen Verfahren die höhere Empfindlichkeit der Fluorimetrie.

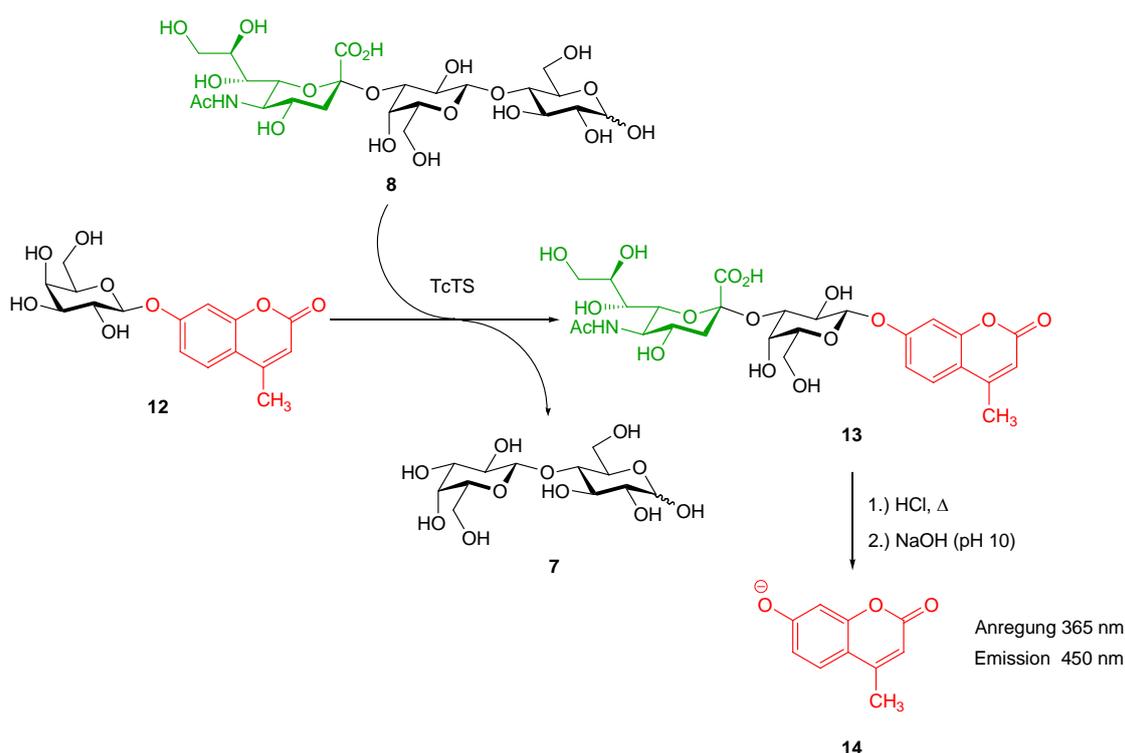


Abbildung 13: Das fluorimetrische Assay nach Schrader und Schauer^[72]

Methylumbelliferon als Chromophor wird sonst häufig einfach nach durch TcTS katalysierter hydrolytischer Freisetzung aus Methylumbelliferylsialosid vermessen, ein Assay, der häufig Anwendung findet,^[73-76] aber wegen der etwa 25fach verminderten Reaktivität von

Methylumbelliferylsialosid als Donor-Substrat^[50] gegenüber 3'-Sialyllactose **8** zu schwierig vergleichbaren Ergebnissen führt.

Die Anwendung der NMR-Spektroskopie als Methode zur Verfolgung der Trans-sialidase-Reaktion ist sehr flexibel, da verschiedene Donoren und Akzeptoren in unterschiedlichen Kombinationen verwendet werden können. Häufig findet dabei die Reaktion im Probenröhrchen statt, und es können beliebig viele Spektren aufgenommen werden.^[67,77,78] Voraussetzung ist die Beobachtung von signifikanten Protonen-Signalen, die nicht überlagern und somit einwandfrei integrierbar sind.

Eine Vereinfachung der NMR-basierten Methoden kann erreicht werden, indem die Reaktion in D₂O durchgeführt wird und in zeitlichen Abständen Proben aus der Reaktionslösung entnommen werden, deren Substratverhältnisse zur Zeit der Entnahme durch Denaturierung des Enzyms „eingefroren“ werden (Abbildung 14).^[68]

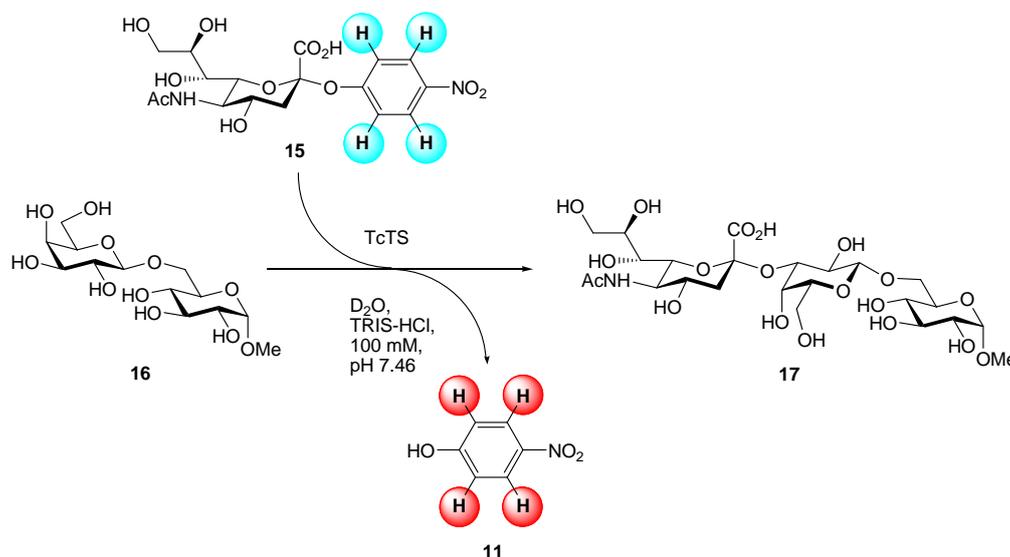


Abbildung 14: Reaktionsverfolgung und Aktivitätsmessung durch ¹H-NMR

Hier werden zur Messung die unterschiedlichen Protonensignale von gebundenem und freiem *p*-Nitrophenol herangezogen. Dieses Verfahren, das auf der Trans-sialidase-katalysierten Reaktion von *p*-Nitrophenylsialosid (pNP-Neu5Ac, **15**) mit Methyl- α -allolactosid **16** beruht, findet auch in dieser Arbeit Anwendung (siehe Kapitel 5.2). Für die einfache Anwendbarkeit wird hier der Nachteil der Verwendung des nicht-natürlichen Donors pNP-Neu5Ac und die Reaktion in D₂O in Kauf genommen.

3.2 Versuche zur Synthese von Inhibitoren der Trans-sialidase

Aus der Schlüsselrolle der Trans-sialidase bei der Chagas Krankheit ergibt sich eine hohe Wahrscheinlichkeit, durch Inhibitoren dieses Enzyms einen Einfluß auf den Lebenszyklus des Parasiten und damit den Verlauf der Krankheit nehmen zu können. Die Publikationen auf diesem Gebiet stammen fast alle aus den vergangenen zehn Jahren, und die Zahl der Publikationen ist recht übersichtlich.

Im Zuge der Untersuchung der Substrat-Toleranz von TcTS wurden unterschiedlichste Donor- und Akzeptorsubstrate auf ihre Eigenschaften in Trans-sialidase-katalysierten Reaktionen getestet (siehe Kapitel 1.4). Dabei wurden auch stärker bindende Konkurrenzsubstrate gefunden, die inhibitorische Wirkung zeigen, da sie gegenüber den natürlichen Substraten bevorzugt umgesetzt werden. So zeigt Lactitol (Abbildung 15, **18**) gegenüber *N*-Acetyllactosamin eine stärkere Tendenz, von TcTS sialyliert zu werden, und „entzieht“ der Reaktion dadurch die *N*-Acetylneuraminsäure. Dieser Effekt konnte auch in Zellkulturen beobachtet werden. Die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) von Lactitol betrug dabei 0.26 mM (*N*-Acetyllactosamin: 0.57 mM).^[79]

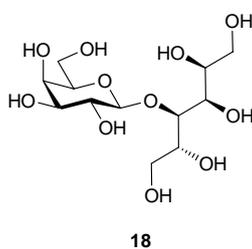
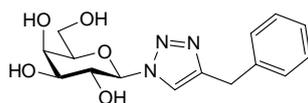


Abbildung 15: Lactitol als Konkurrenz-Akzeptor-Substrat^[79]

Diese Untersuchung deutet bereits auf die Nützlichkeit eines Akzeptorsubstrat-basierten Ansatzes in der Inhibitor-Entwicklung für TcTS hin. In einer Weiterentwicklung des Konkurrenzakzeptor-Ansatzes wurde die Galactose kürzlich in einer durch „Click-Chemie“ erzeugten Substanzbibliothek mit verschiedensten aromatischen oder nichtaromatischen Resten verknüpft. Die beste Inhibition (37% Aktivitätsminderung bei $c = 1$ mM) wurde mit Verbindung **19** (Abbildung 16) erreicht.^[80]

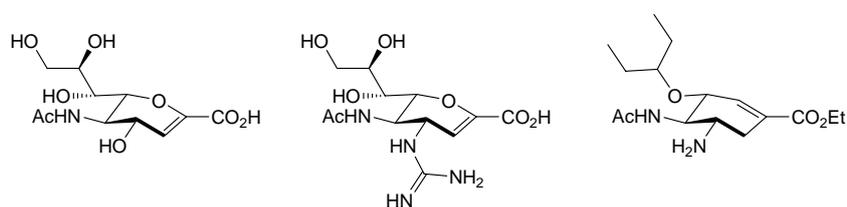


19

Abbildung 16: Galactosyl-Triazol als Konkurrenzsubstrat^[80]

Die Verbindungen zeigten zwar schwache Inhibition, interessanterweise aber trypanozide Eigenschaften bei *T. cruzi* Trypomastigoten *in vitro*.

Aufgrund des Sialidase-analogen Mechanismus' der Trans-sialidase^[57] kann das Glycal der *N*-Acetylneuraminsäure (**20**, Abbildung 17), der Prototyp aller Sialidase-Inhibitoren,^[81] auch hier als Übergangszustandsanalogon angesehen werden.



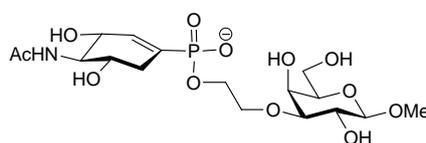
20 Neu5Ac2en

21 Zanamivir

22 Oseltamivir

Abbildung 17: Das Glycal der *N*-Acetylneuraminsäure (**20**) ist ein Sialidase-Inhibitor und der Prototyp der Influenza-Neuraminidase-Inhibitoren wie z. B. Zanamivir (Relenza, **21**) oder Oseltamivir (Tamiflu, **22**)

Allerdings zeigten Messungen, dass die Trans-sialidase-Aktivität (beim Umsatz von Methylumbelliferylsialosid als Donor) durch **20** nur mit $K_i = 12.29$ mM inhibiert wird.^[62] Die Verknüpfung dieses Strukturmotivs mit einem Akzeptor-Analogon jedoch führte zu stärkerer, auch wenn immer noch schwacher Inhibition.^[82,83] Das in Abbildung 18 gezeigte Molekül **23** wies einen IC_{50} -Wert von ~ 1.5 mM auf (benutzt wurde der Assay von Schrader und Schauer^[72]).



23

Abbildung 18: Verknüpfung des Übergangszustands-analogen Strukturmotivs von Neu5Ac2en (**20**) mit einem Akzeptor-Mimetikum über einen Phosphonsäureester

3-Fluor-sialylfluoride werden als Donorsubstrate von TcTS erkannt und umgesetzt, reagieren aber wegen des Elektronenzugs auf das anomere Zentrum verzögert mit dem Akzeptor.^[53] Diese Tatsache half bei der Aufklärung mechanistischer Aspekte, da der intermediäre

kovalente Enzym-Substrat-Komplex in einer Kristallstrukturanalyse untersucht werden konnte.^[58] Die Derivatisierung an der 9-Position (Abbildung 19) führte zu einer Verstärkung dieses Effekts, aber nicht, wie zuerst vermutet, durch hydrophobe Wechselwirkung mit der Umgebung der Glycerol-Seitenkette, sondern durch Bindung des aromatischen Restes von **24** in der *acceptor binding site*, was ebenfalls durch Kristallstrukturanalyse gezeigt wurde.^[84]

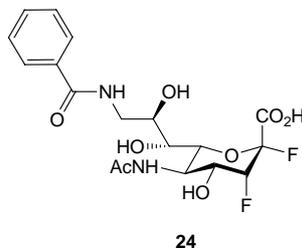


Abbildung 19: Der aromatische Rest an der 9-Position führt zu stärkerer Bindung

Allerdings sind auch hier millimolare Konzentrationen notwendig, um die Trans-sialidase zu inhibieren.

Des weiteren gibt es Ansätze, Inhibitoren unabhängig von Kohlenhydratstrukturen zu entwickeln. So wurden *N*-Acylaniline, welche die Sialidase aus *Vibrio cholerae* inhibierten, mit TcTS getestet, aber mit negativem Ergebnis.^[85] Noch am ehesten Ähnlichkeit mit der Struktur der *N*-Acetylneuraminsäure hat die Verbindung **25** in Abbildung 20, mit einem K_i -Wert von 0.33 mM (Assay: Hydrolyse von Methylumbelliferylsialosid).^[75]

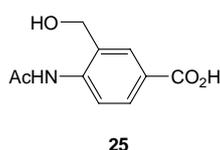


Abbildung 20: Aromatisches Analogon als Inhibitor von TcTS

Ein *molecular modeling* Ansatz führte durch Screening einer Substanzbibliothek zu Strukturen, deren Gemeinsamkeit mit Neu5Ac nur noch in der Carboxylgruppe besteht (Abbildung 21).^[76] Mit der gezeigten Substanz **26** wurde ein IC₅₀ von 0.15 mM erreicht (Assay: Hydrolyse von Methylumbelliferylsialosid).

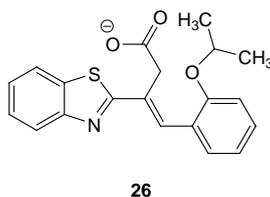
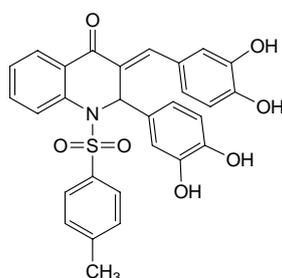


Abbildung 21: Kohlenhydratfremde Strukturen nach Abschätzung durch *in silico* Ansatz

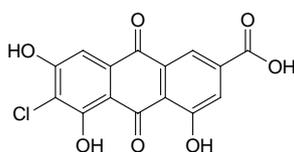
Chalkone mit Sulfonamid-Gruppe wurden von Withers *et al.* kürzlich als Inhibitoren getestet.^[73] Die IC_{50} -Werte sind beeindruckend ($IC_{50} = 0.6 \mu\text{M}$, Substanz **27** in Abbildung 22), aber angesichts der Strukturelemente stellt sich die Frage, ob diese Substanzen nicht eventuell das Enzym kovalent modifizieren, da es sich um Michael-Akzeptoren handelt.



27

Abbildung 22: Chalkonderivat als Inhibitor

Diesen Einwand erwähnen auch die Autoren der Veröffentlichung, schließen eine kovalente Modifikation des Enzyms allerdings wegen einer zeitunabhängigen Inhibitorwirkung aus.^[73] Flavon- und Antrachinonderivate wurden ebenfalls untersucht. Eine ähnlich starke inhibitorische Wirkung wie bei **27** wurde bei der chlorierten Verbindung **28** (Abbildung 23) gefunden ($IC_{50} = 0.58 \mu\text{M}$).^[74] Auch hier beruhte die Messung wieder auf der Hydrolyse von Methylumbelliferylsialosid.



28

Abbildung 23: Antrachinon-Derivat

Hier gelten im Prinzip ähnliche Vorbehalte wie bei den Chalkonderivaten, zum Beispiel Verbindung **27**.

Insgesamt muß bei der Interpretation der Ergebnisse immer berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Assays angewendet werden und daher die Werte, die zusätzlich noch mit unterschiedlichen Bedeutungen verknüpft sind (K_i , K_M , IC_{50}), nur bedingt vergleichbar sind. Einen guten Überblick über die Entwicklungen und die Prinzipien hinter der Inhibitorforschung für TcTS findet man bei Neres *et al.*^[45]

Über die synthetische Chemie hinaus sei noch erwähnt, dass bei Infektion mit *Trypanosoma cruzi* bei Mensch und Nagetier auch Antikörper gegen das aktive Zentrum der Trans-sialidase gebildet werden.^[86,87] Die Inhibition von TcTS durch Serum von Patienten kann deshalb als empfindlicher Nachweis einer Infektion dienen.^[88]

4 Synthesen

4.1 Syntheseplanung

Bei der Synthese von Inhibitoren für die Trans-sialidase aus *Trypanosoma cruzi* sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Überlegungen eine Rolle spielen:

- 1) Der Ausgangspunkt für die Synthese sollte bei den bekannten Substraten liegen, also ein Neuraminsäure-Grundgerüst beinhalten. Das erhöht die Wahrscheinlichkeit, bei synthetischen Abwandlungen wieder bindende Liganden für TcTS zu finden.
- 2) Der potentielle Inhibitor sollte vom Enzym nicht umgesetzt werden, also möglichst nicht enzymatisch hydrolysierbar sein.
Es ist zwar auch ein Ansatz denkbar, der hydrolysierbare Substanzen als mögliche Inhibitoren untersucht; solche Ansätze sind auch bereits in der Literatur bekannt.^[63,79] Es ist aber zu bedenken, dass die inhibitorische Wirkung solcher Konkurrenzsubstrate prinzipiell beschränkt sein muß, da mehrere Schritte in der enzymatischen Transglycosylierung durch TcTS die schnelle Eliminierung von Substratresten beinhalten (siehe Kap. 1.4), und damit die Umsetzbarkeit eine Affinität des Konkurrenzsubstrates im Bereich des natürlichen Substrats erfordert. Messungen wären mit hydrolysierbaren Substanzen schwierig, da die ohnehin nicht einfache Reaktionskinetik des Enzyms komplexer wird. Insbesondere Affinitätsmessungen mittels Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) sind bei Abreaktion der Liganden nicht mehr ohne weiteres auswertbar.
- 3) Es sollte eine hohe Affinität zum Enzym erreicht werden. Dazu sollen synthetische Abwandlungen am Grundgerüst vorgenommen werden, die eine Verbesserung der Bindungseigenschaften an das Enzym erwarten lassen. Dazu können Erkenntnisse aus Röntgenkristallstrukturen^[57,58] des Enzyms beitragen, in denen die Aminosäure-Seitenketten im aktiven Zentrum Ansatzpunkte für Derivatisierungen liefern.

Nicht-hydrolysierbare Derivate sind z. B. sogenannte C-Glycoside (**30**) der N-Acetylneuraminsäure, bei denen es sich eigentlich um cyclische Ether und damit Anhydro-

aldonsäuren handelt. Da der Begriff *C*-Glycoside aber gebräuchlich ist, wird er im Folgenden verwendet.

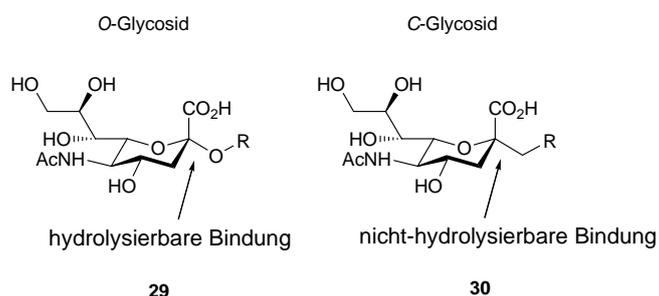


Abbildung 24: *C*-Glycoside als nicht hydrolysierbare Substratanaloga

C-Glycoside der *N*-Acetylneuraminsäure wurden unter anderem von Linhardt *et al.* als Inhibitoren von bakteriellen Neuraminidasen getestet, wobei Inhibitionskonstanten im mikromolaren Bereich erreicht wurden.^[89]

Diese Neu5Ac-*C*-Glycoside sollten gezielt synthetisch verändert werden, um eine stärkere Bindung des Liganden an das Enzym zu erreichen. Im Folgenden werden mögliche Strategien für diese Derivatisierungen entwickelt.

4.1.1 Die Bindungsstelle für den Akzeptor (*acceptor binding site*)

Die Trans-sialidase hat große Ähnlichkeit mit Sialidasen, bewirkt aber vorzugsweise einen Transfer von Sialinsäureresten auf β -Galactoside (Kap. 1.4). Mit dafür verantwortlich ist eine Bindungsstelle für diese Galactoside (*acceptor binding site*), die aus den beiden aromatischen Aminosäuren Tyr₁₁₉ und Trp₃₁₂ besteht (siehe Kap. 1.4).

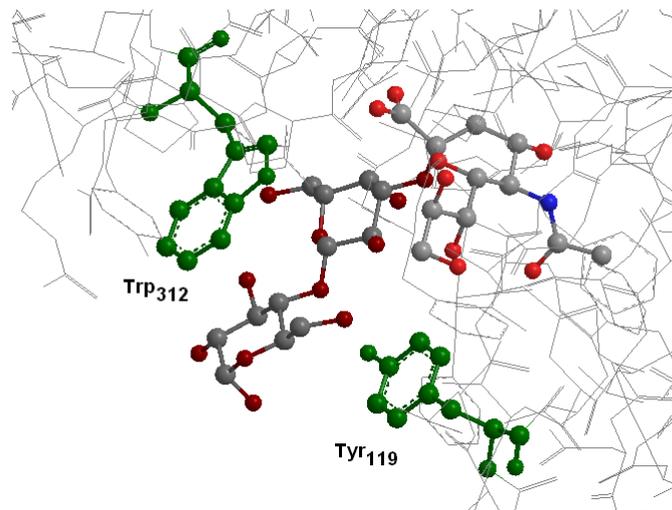


Abbildung 25: Die *acceptor binding site*, gebildet durch zwei aromatische Aminosäureseitenketten

Das Anbringen eines aromatischen Restes an das C-Glycosid könnte hier eine π - π -Wechselwirkung ausnutzen, um die Bindungseigenschaften zu verbessern.

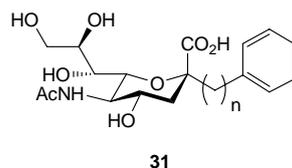


Abbildung 26: Aromatisches C-Glycosid für die Bindung in der *acceptor binding site* als Syntheseziel

Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und Proteinen involvieren häufig hydrophobe Interaktionen zwischen den meist axialen Ringprotonen und aromatischen Aminosäureseitenketten.^[90-93] Die erfolgreiche Bindung eines Aromaten in der *acceptor binding site* von TcTS zeigt sich z. B. durch die Erkennung von pNP-Neu5Ac und Methylumbelliferylsialosid als Donorsubstrate^[50] und in der Kristallstruktur von TcTS mit Methylumbelliferylsialosid.^[58] Auf die Bedeutung der *acceptor binding site* in der Inhibitor-Entwicklung für TcTS wurde bereits hingewiesen (Kap. 3.2).

4.1.2 Derivatisierung an der Seitenkette

Bei Betrachtung der Seitenkette in der Röntgenkristallstruktur fällt auf, dass es eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen 9-OH und dem Indol-Stickstoff von Trp₁₂₀ gibt (Abbildung 27).

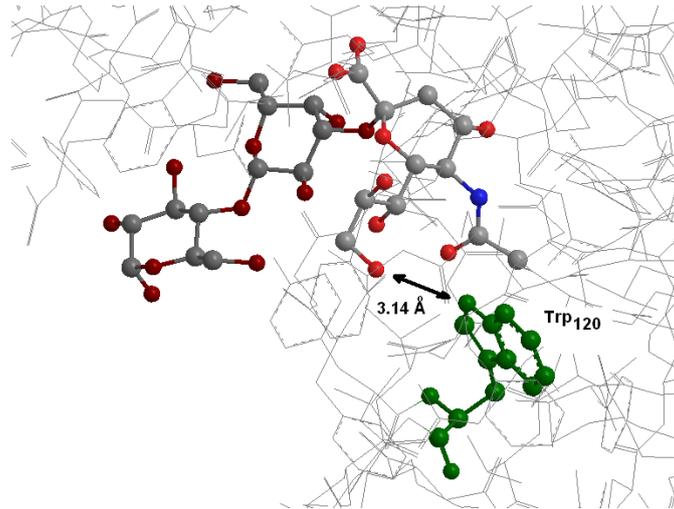


Abbildung 27: Die Wasserstoffbrückenbindung zu Trp₁₂₀, einem weiteren Target für eine π - π -Wechselwirkung

Eine π - π -Wechselwirkung könnte hier ebenfalls effektiv sein. Diese könnte durch einen aromatischen Rest an der Seitenkette bewirkt werden.

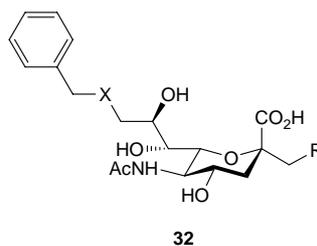


Abbildung 28: Aromatischer Rest an der Seitenkette als Synthesziel

Ein solches Konzept hat in der Arbeitsgruppe von B. Ernst zu sehr guten Liganden für das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG) geführt; dort wird eine Wechselwirkung zwischen dem aromatischen Rest an der Glycerol-Seitenkette der Neuraminsäure mit Tyr₁₂₇ des Proteins postuliert.^[23]

Der Verlust der Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 9-OH-Gruppe und Trp₁₂₀ ist für die Erkennung des Substrates nicht erheblich, wie die Arbeit von B. Neubacher gezeigt hat, in der seitenkettenverkürzte pNP-Sialoside problemlos von der Trans-sialidase erkannt und umgesetzt wurden.^[66]

4.1.3 Positive Ladungsdichte durch Arginin-Seitenkette

Im aktiven Zentrum von TcTS befinden sich außer dem obligatorischen Arg₃₁₄, das für die Bindung mit dem Carboxylat im Substrat zuständig ist (siehe Kap. 1.4) und in allen Sialidasen auftritt, auch noch zwei weitere Arginin-Seitenketten (Arg₃₅ und Arg₅₃), die in der Gegend der 4-OH-Gruppe der Sialinsäure zu sehen sind (Abbildung 29).

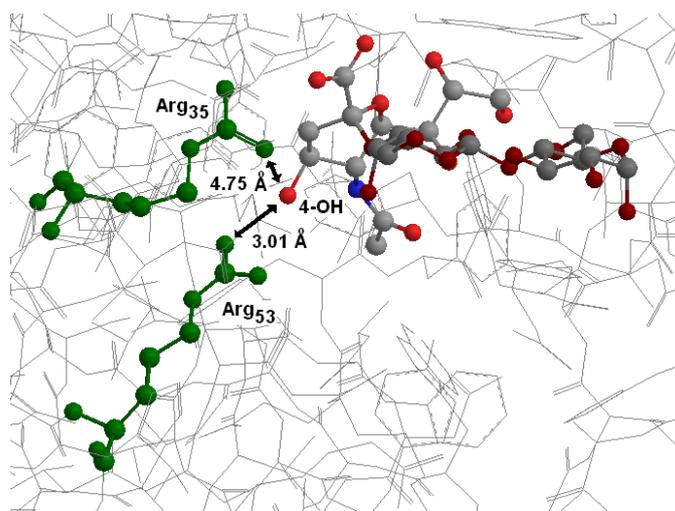
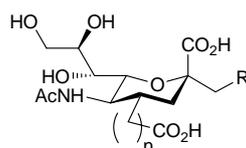


Abbildung 29: Die Arginin-Reste in der Nähe der 4-OH-Gruppe

Diese in physiologischer Umgebung positiv geladenen Reste könnten durch die Einführung einer weiteren Carboxylgruppe eine zusätzliche ionische Bindung mit dem Liganden eingehen.



33

Abbildung 30: Eine zusätzliche Carboxylgruppe als Syntheseziel

Dieses Prinzip wird z. B. bei den bekannten Influenza-Neuraminidase-Inhibitoren Zanamivir (Relenza) und Oseltamivir (Tamiflu) angewandt, um Selektivität zu erreichen; dort ist es eine positiv geladene Gruppe (4-Amino- bei Oseltamivir, 4-Guanidino- bei Zanamivir), die mit einem negativ geladenen Rest (Glu₁₁₉) der Influenza-Neuraminidase eine starke ionische Bindung eingeht.^[94]

4.2 C-Glycoside der N-Acetylneuraminsäure

C-Glycoside der Neuraminsäure können durch eine Vielfalt von synthetischen Verfahren erhalten werden. Literaturbekannte Synthesen nutzen beispielsweise die Alkylierung von 2-Desoxyderivaten,^[95] die Samarium-katalysierte Kupplung von Carbonylverbindungen mit 2-Sulfonylderivaten^[96,97] oder 2-O-Acetylverbindungen^[98] und sogar die *de novo* Synthese einer C-glycosidisch verknüpften Neu5Ac-Grundstruktur.^[99]

Von Paulsen *et al.* wurde eine radikalische Allylierungsreaktion entwickelt, die vom acetylierten Chlorid der N-Acetylneuraminsäure **34** ausgeht.^[100] Diese Methode liefert neben geringen Mengen an Glycal **37** sowohl das α - (**35**) als auch das β -konfigurierte Produkt (**36**) (Abbildung 31).

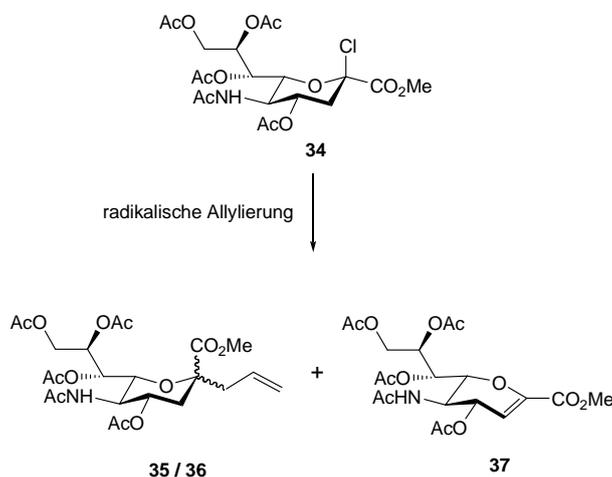


Abbildung 31: Radikalische Allylierung am anomeren Zentrum nach Paulsen^[100]

Die bei der Reaktion gewonnenen Produkte **35**, **36** und **37** sind alle von Nutzen für die im folgenden besprochenen Synthesen. Das α -konfigurierte Produkt **35** liefert die Ausgangssubstanz für die Synthese von Liganden für TcTS. Dort können die besprochenen Derivatisierungen durchgeführt werden (Abbildung 32). Die Allylgruppe ist hinreichend stabil für die Synthesen am Neuraminsäure-Kern und bietet selbst eine Vielzahl von Möglichkeiten zur chemischen Modifikation.

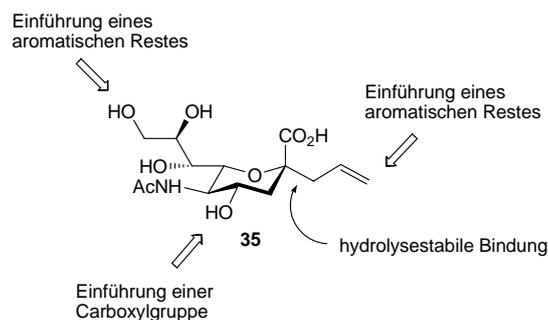


Abbildung 32: Allyl-C-Glycoside^[100] als geeignete Ausgangssubstanzen für die Syntheseplanung

Mithilfe des β -konfigurierten Produkts können Testsubstanzen synthetisiert werden, mit denen die Ergebnisse der α -konfigurierten Liganden überprüft werden können (siehe Kapitel 5.1.2). Auch das Glycal **37** kann dabei von Nutzen sein. Diese Diversität wiegt die geringe Selektivität der C-Glycosylierungsmethode auf.

4.2.1 Zur Nomenklatur der N-Acetylneuraminsäure-C-glycoside

Die Benennung der N-Acetylneuraminsäure-C-glycoside weicht von der üblichen N-Acetylneuraminsäureglycosid-Nomenklatur ab. Da es sich um Anhydro-aldonsäuren handelt, muss die Konfiguration an der Position 2 mit berücksichtigt werden und führt zu den in Abbildung 33 gezeigten Konfigurationsdeskriptoren.^[101]

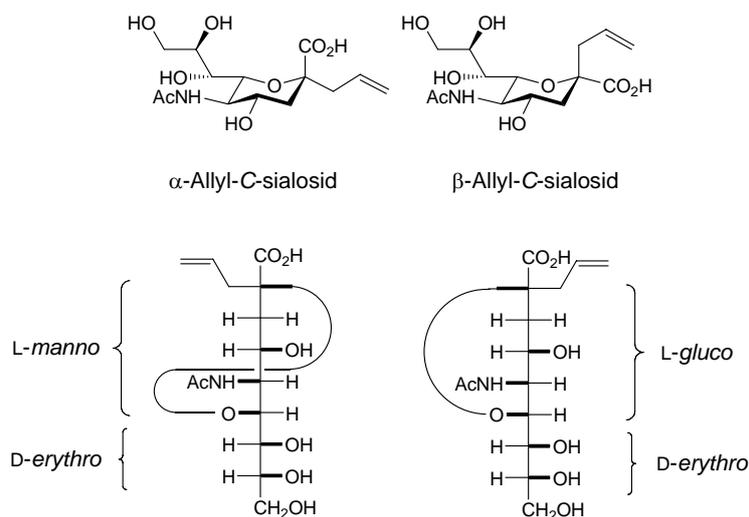


Abbildung 33: Konfiguration und Benennung der Allyl-C-sialoside

Das α -konfigurierte C-Sialosid ist damit die 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,5-didesoxy-2-C-(prop-2-enyl)-D-erythro-L-manno-nononsäure, das β -konfigurierte die 5-Acetamido-2,6-

anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(prop-2-enyl)-D-erythro-L-gluco-nononsäure. Entsprechendes gilt für die Derivate der hier gezeigten Allyl-C-glycoside.

4.3 Synthese der Allyl-C-sialoside

Ausgehend von *N*-Acetylneuraminsäure (**1**) ließ sich das peracetylierte Chlorid **34** über den Methylester **38** leicht darstellen. Nach der sauren Veresterung von **1** wurde das Produkt **38** in Acetylchlorid suspendiert und ging während der Reaktion in Lösung. Diese Aktivierung der Neuraminsäure über zwei Stufen verlief mit guten Ausbeuten.

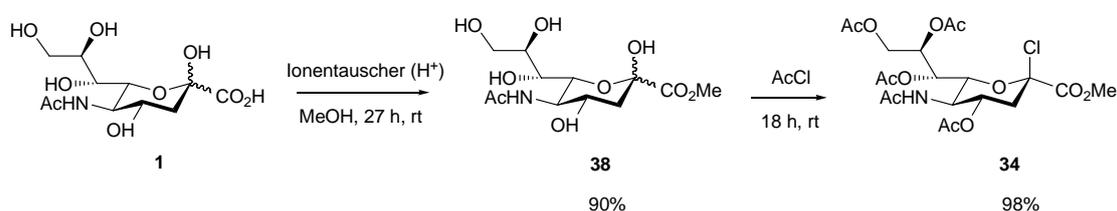


Abbildung 34: Synthese des Chlorids der *N*-Acetylneuraminsäure

Das Chlorid **34** ist das Startmaterial für die radikalische Allylierung.^[100] Bei dieser wird mit einem großen Überschuß an Allyltributylstannan gearbeitet, der aber bei der Aufarbeitung der Reaktion durch Waschen der produktthaltigen Acetonitril-Lösung mit Hexan entfernt werden kann. Es entstand ein Produkt-Gemisch, das auf dieser Stufe chromatographisch schlecht zu trennen war. Es bestand aus α - (32% Anteil im Gemisch) und β -konfiguriertem (56%) Allyl-C-glycosid (**35** und **36**) sowie dem Glycal **37** (12%).

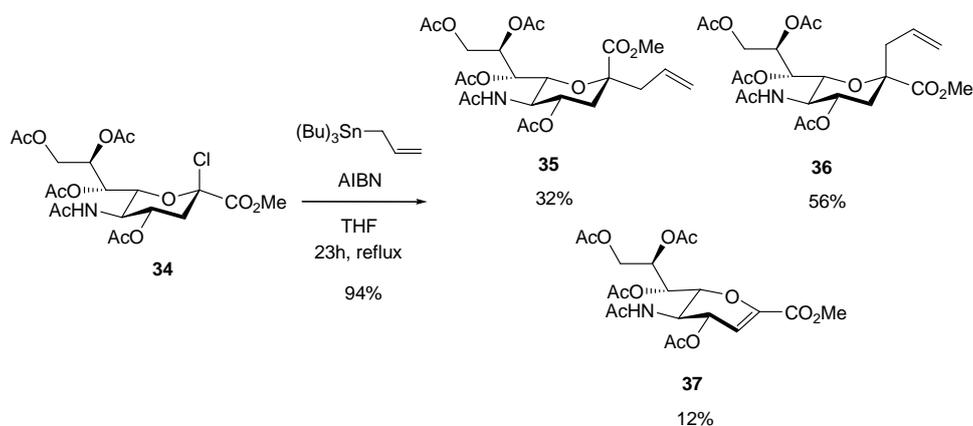


Abbildung 35: Radikalische Allylierung und Produktverhältnisse

Das Glycal **37** kann aus dem Chlorid auch selektiv durch Eliminierung erhalten werden; in dieser Arbeit wurde dafür die sterisch anspruchsvolle Base DBU verwendet.

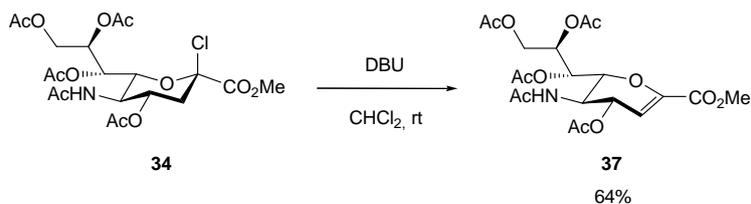


Abbildung 36: Eliminierung führt zum Glycal

Das Produktgemisch der radikalischen Allylierung konnte nach Deacetylierung säulenchromatographisch getrennt werden. Zur weiteren Derivatisierung wurden **39** und **40** erneut mit Pyridin/Acetanhydrid acetyliert.

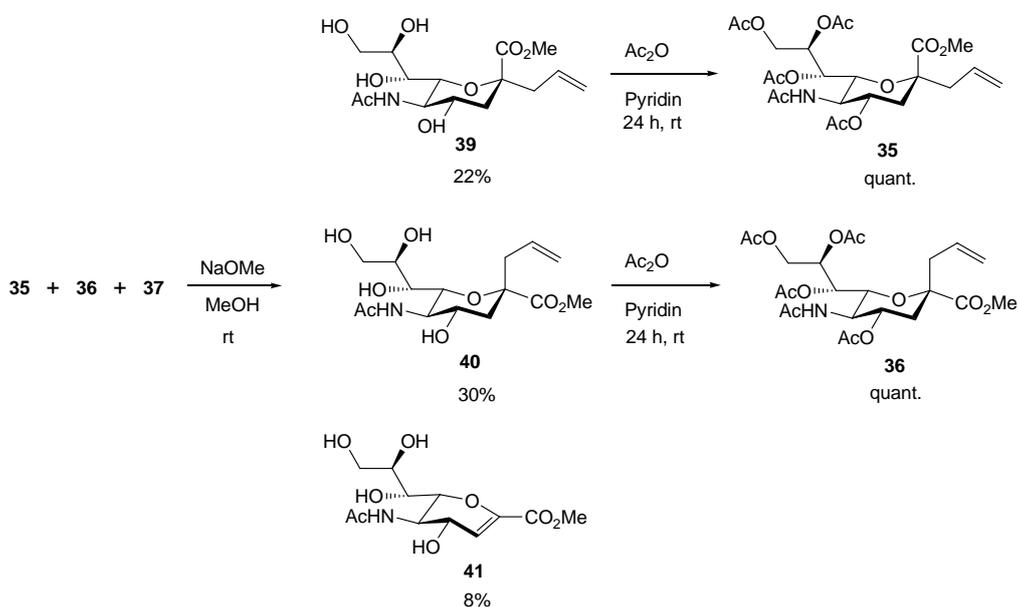


Abbildung 37: Trennung des Gemisches der radikalischen Allylierung durch Deacetylierung und erneute Acetylierung von **39** und **40**

Das durch Eliminierung erhaltene Glycal **37** wurde ebenfalls deacetyliert, wodurch wie oben (Abbildung 37) der Methyl ester **41** entsteht, dessen Verseifung zu Verbindung **20** bereits einen Liganden für spätere Messungen liefert.

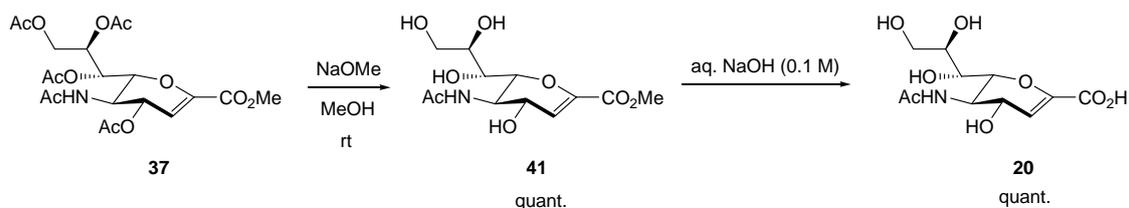


Abbildung 38: Vollständige Entschützung des Glycals

Die komplette Entschützung des α -Allyl-C-glycosids **39** führte zum Liganden **42**, dem hydrolysestabilen α -Allyl-C-glycosid, das als Analogon eines einfachen Alkyl-sialosids betrachtet werden kann. Im Vergleich der Ergebnisse dieser Verbindung mit denen der aromatisch substituierten Verbindungen können später Aussagen über den Einfluß des Aromaten auf die Affinität zum Enzym gemacht werden.

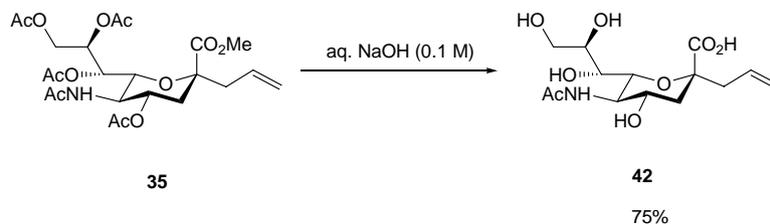


Abbildung 39: Komplette Entschützung des α -Allyl-C-glycosids

Da die Allylgruppe am anomeren Zentrum eine Vielzahl von Derivatisierungen ermöglicht, wurden diese Verbindungen als Startmaterial für die Synthese von Substratmimetika mit potentiell inhibitorischen Eigenschaften gewählt. Für die Verknüpfung der Allyl-C-glycoside mit geeigneten Aromaten fand vor allem die Ruthenium-katalysierte Kreuzmetathese Verwendung.

4.4 Ruthenium-katalysierte Kreuzmetathese

4.4.1 Einführung in die Olefin-Metathese

Die Olefin-Metathese, häufig nur kurz als Metathese (von griech. „metáthesis“: Umstellung, Veränderung) bezeichnet, ist formal eine Austauschreaktion, bei der zwischen zwei Kohlenstoff-Doppelbindungen Alkyliden-gruppen übertragen werden.^[102-104] Sie gehört damit zur Gruppe der C-C-Verknüpfungsreaktionen, die in der organischen Chemie von großem Wert für die Synthese sind. Der Begriff „Olefin-Metathese“ wurde in den sechziger Jahren von Calderon^[105] geprägt. Es handelt sich dabei um eine durch Übergangsmetalle katalysierte Gleichgewichtsreaktion. Als gesichert wird heute der sogenannte Chauvin-Mechanismus angenommen,^[106] der die Metathese als Folge von Cycloadditions- und Cycloreversionsschritten zwischen einem Metall-Carben-Komplex **43** und einem Olefin beschreibt. In einer [2+2]-Cycloaddition wird ein Metalla-Cyclobutanring **44** gebildet, der im Cycloreversionsschritt unter Ausbildung der neuen C-C-Doppelbindung zerfällt (Abbildung 40).

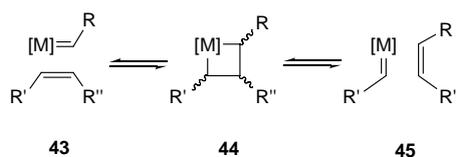
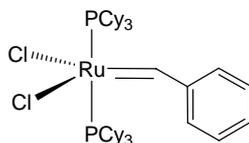


Abbildung 40: Der Cycloadditions-Cycloreversions-Mechanismus nach Chauvin^[106]

Von den frühen Anwendungen heterogener und homogener Katalysatoren in der Industrie^[105,107] über die extrem empfindlichen „Schrock-Carbene“^[108,109] führte die Entwicklung in den neunziger Jahren zu den heute bekannten Ruthenium-basierten Katalysatoren. Die Reaktivität gegenüber Doppelbindungen und damit die relative Toleranz gegenüber anderen funktionellen Gruppen nimmt in der Reihe Titan < Wolfram < Molybdän < Ruthenium zu,^[102] so dass sich die von Grubbs Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts vorgestellten^[110] Ruthenium-Carben-Komplexe wie **46** (Abbildung 41) schnell zu den heute am häufigsten verwendeten Metathese-Katalysatoren entwickelten. Die Katalysatoren auf Rutheniumbasis sind verhältnismäßig wenig luft- und feuchtigkeitsempfindlich und können im Gegensatz zu den Molybdänkatalysatoren unter Stickstoff als Schutzgas verwendet werden.



46

Abbildung 41: Der Grubbs-Katalysator der ersten Generation

Die Reaktion unter Verwendung von **46** ist sehr genau untersucht worden. Der Mechanismus der Katalyse beinhaltet einen Dissoziationsschritt, in dem ein Phosphinligand vom Komplex **47** abgelöst wird (Abbildung 42).^[111] Unter Anlagerung des Substrats wird der π-Komplex **49** gebildet, in dem sich der Ligand vermutlich *cis* zum Carben befindet. Wahrscheinlich findet die Dissoziation vor der Bildung des π-Komplexes statt.^[112,113]

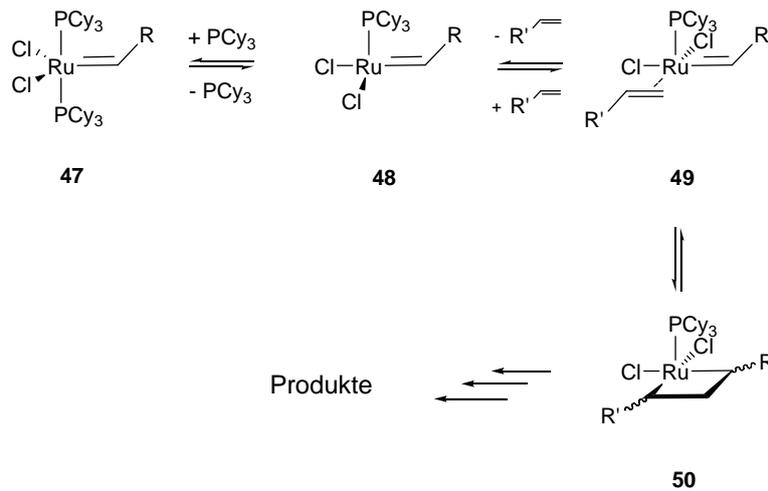


Abbildung 42: Dissoziations-Schritt und π -Komplex am Beispiel des Katalysators 46

Diese Details wurden zunächst aus kinetischen Untersuchungen abgeleitet. Es konnte jedoch auch bereits ein π -Komplex eines Metathese-Katalysators isoliert werden, der weiterhin Aktivität zeigte.^[114]

Der Ersatz eines Tricyclohexylphosphinliganden durch ein heterocyclisches Carben^[115] führte schließlich zum Grubbs-Katalysator der „zweiten Generation“ (**51** in Abbildung 43),^[116] der sich durch höhere Aktivität, Stabilität und Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen auszeichnet. Eine weitere Stabilisierung des Katalysators im festen Zustand wird nach Hoveyda^[117] durch die Einführung eines Oxo-Liganden erreicht. Zusammen mit dem Dihydroimidazolin-Liganden erhält man den Grubbs-Hoveyda-Katalysator der zweiten Generation, den sogenannten „Hoveyda-Katalysator“ **52**.^[118]

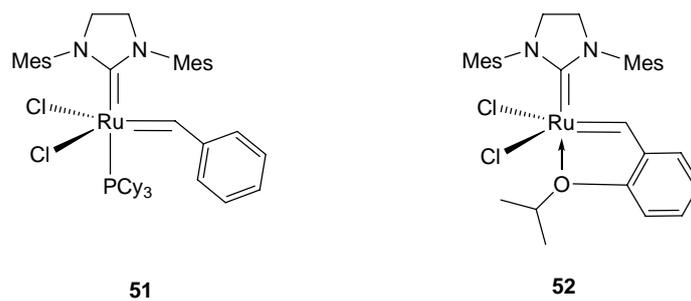


Abbildung 43: Der Grubbs-Katalysator der zweiten Generation (**51**) und der Hoveyda-Katalysator (**52**)

Der *ortho*-Isopropoxybenzyliden-Ligand am Ruthenium dissoziiert ähnlich wie der Phosphinligand im Katalysator **46** zu Beginn der katalytischen Aktivität vom Ruthenium. Nachdem das Substrat verbraucht ist, wird das *ortho*-Isopropoxystyrol vom Ruthenium

wieder „eingefangen“. Dadurch ist dieser Rutheniumkomplex wiederverwendbar und kann sogar säulenchromatographisch gereinigt werden.^[118]

Die Olefin-Metathese wird nach Reaktanden und Produkten in verschiedene Kategorien unterteilt.^[103]

Die Kreuzmetathese (*cross metathesis*, CM) bewirkt formal den Austausch von Substituenten zwischen zwei Olefinen und findet hauptsächlich Anwendung zur C-C-Verknüpfung zwischen zwei entzündigen Olefinen; Nebenprodukt ist dabei gasförmiges Ethen.

Die Ringschlußmetathese (*ring closing metathesis*, RCM) ist wegen ihrer einfachen Reaktionsführung am häufigsten in der Literatur vertreten; hier findet die Verknüpfungsreaktion intramolekular statt. Die umgekehrte Reaktion, die Ringöffnungsmetathese (*ring opening metathesis*, ROM), die häufig vom Abbau von Ringspannung profitiert, erfordert die Zuführung von Ethen; sie findet auch zur Polymerisation von beispielsweise Norbornen^[107,110] Verwendung (*ring opening metathesis polymerisation*, ROMP).

Neben diesen Hauptvarianten gibt es weitere Spezialfälle, so zum Beispiel Ringumlagerungsmetathese-Reaktionen^[119] oder asymmetrische Metathese-Reaktionen unter Verwendung von chiralen Katalysatoren.^[120-122]

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Kreuzmetathese zur Funktionalisierung von Allyl-C-Glycosiden der *N*-Acetylneuraminsäure.

4.4.2 Olefin-Metathese in der Kohlenhydratchemie

Die Olefin-Metathese ist bereits erfolgreich in der Kohlenhydratchemie angewendet worden. Einen Überblick über diese Chemie bis zum Jahrtausendwechsel bieten Roy^[123] und Jørgensen.^[124] Ziele der Anwendungen waren die Homodimerisierung von Allyl-*O*- und Allyl-*C*-glycosiden,^[125-129] die Kreuzmetathese von Allyl-*O*- und Allyl-*C*-glycosiden^[127,128,130-134] oder anderen olefinischen Kohlenhydratderivaten^[127,128,135] sowie der Aufbau von multivalenten Glyco-Clustern.^[136] Durch Ringschlußmetathese von Kohlenhydratderivaten konnten carbocyclische Derivate synthetisiert werden.^[137] Die Synthese von Disaccharid-Mimetika durch Kreuzmetathese von olefinischen Kohlenhydratderivaten ist ebenfalls möglich.^[131,133,135]

Die Anwendungen im Bereich der Sialinsäure-Chemie umfassen bisher lediglich die Dimerisierung von Allyl-substituierten Derivaten^[138] sowie Ringschlußmetathesen in einer

Totalsynthese von *N*-Acetylneuraminsäure^[139] und in der Synthese von Influenza-Neuraminidase-Hemmern.^[140]

Insgesamt ist die Zahl der Veröffentlichungen auf diesem Gebiet im Gegensatz zur übrigen organische Chemie eher gering.

4.4.3 Kreuzmetathese mit unsubstituiertem Styrol

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Kreuzmetathese-Reaktionen wurden die Katalysatoren **51** und **52** verwendet (Abbildung 44). **51** ist hinreichend stabil, um unter normalen Schlenk-Bedingungen verwendet zu werden, **52** kann sogar über Kieselgel chromatographiert werden,^[118] ist also potentiell wiederverwendbar. Eine dunkle Verfärbung der Reaktionslösung während der Reaktion läßt allerdings trotzdem auf teilweise Zersetzung schließen.

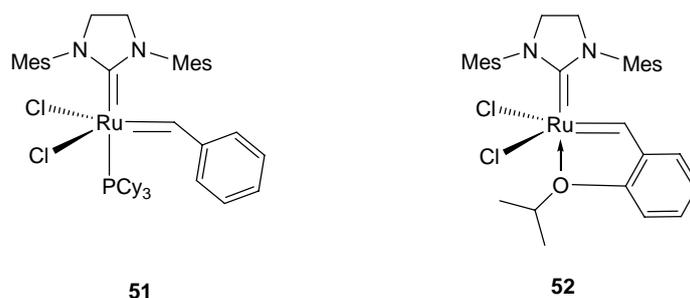


Abbildung 44: In dieser Arbeit verwendete Metathese-Katalysatoren

Die Schwierigkeit bei der Durchführung von Kreuzmetathese-Reaktionen im Gegensatz zu den intramolekular ablaufenden Ringschlußmetathesen ist das Auftreten von Nebenreaktionen wie Homodimerisierung und Polymerisation.^[141] Während bei den in dieser Arbeit durchgeführten Metathese-Reaktionen keine Polymerisationsprodukte nachweisbar waren, wurde die Bildung von Homodimeren der Allyl-C-glycoside von vornherein durch eine geeignete Reaktionsführung (großer Überschuß eines Reaktionspartners) ausgeschlossen. Bei der Reaktion von zwei Olefinen A und B kann es in der Theorie zu den Produkten AA, AB, BA und BB kommen, wobei AB und BA identisch sind. Die Verteilung dieser Produkte ist statistisch, so dass es bei gleicher Konzentration an A und B zu höchstens 50% Produkt (bei quantitativem Umsatz) kommen kann. Setzt man einen Überschuß an einem Reaktionspartner ein, kann man das Homodimer des anderen Reaktionspartners zurückdrängen. Dabei nimmt

man in Kauf, dass das Homodimer des Überschuß-Reaktanden das Hauptprodukt bildet, neben dem gewünschten Kreuzprodukt.



Abbildung 45: Theoretisch mögliche Produkte bei der Kreuzmetathese (CM)

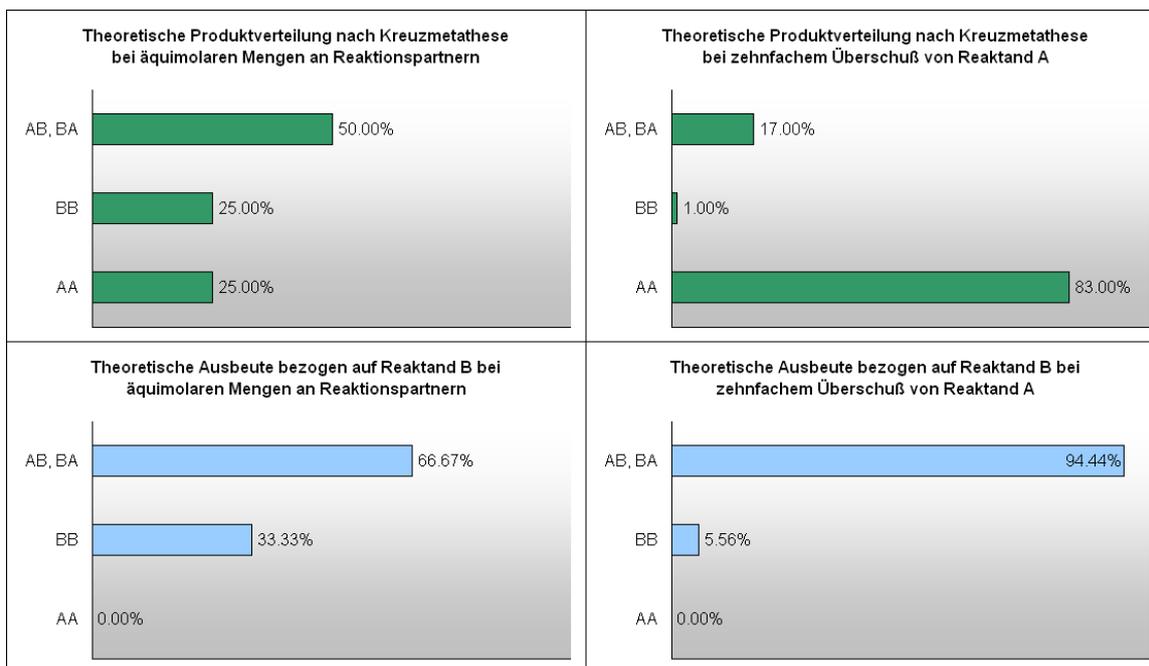


Abbildung 46: Theoretische Produktverhältnisse und Ausbeuten bei der Kreuzmetathese (bei angenommenem quantitativen Umsatz)

Wenn sich das Homodimer des Überschuß-Reaktanden leicht aus dem Gemisch abtrennen läßt, kann man auf diese Weise sicherstellen, die isolierte Ausbeute an Kreuzprodukt stark zu erhöhen. Dies ist bei der Reaktion der acetylierten Allyl-C-glycoside mit unsubstituiertem Styrol der Fall. Die Reaktion wurde in verdünnten (0.01 M) Lösungen des C-Glycosids in Dichlormethan mit einem 8-10fachen Überschuß an Styrol durchgeführt. Dadurch wurden keine Dimere der C-Glycoside beobachtet. Die Reaktion lief bei Raumtemperatur nicht vollständig ab, bei 40 °C konnten aber hohe Ausbeuten erzielt werden (Tabelle 1).^[142]

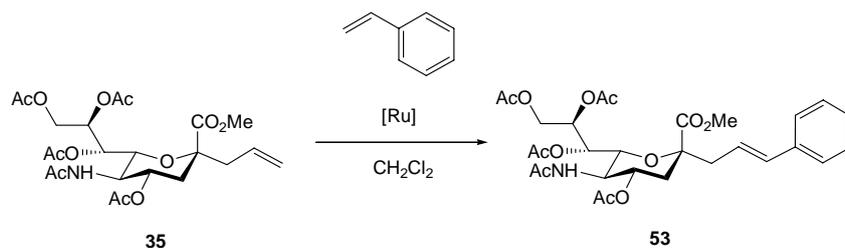
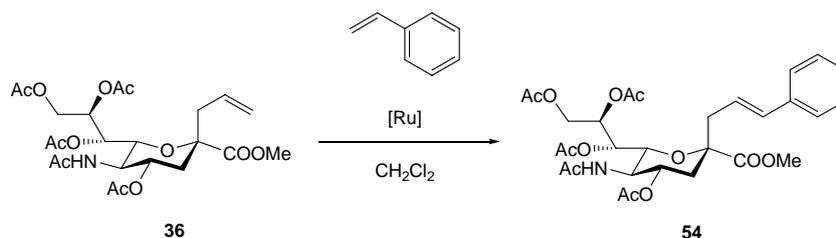

 Abbildung 47: Metathese mit dem α -C-Glycosid 35

 Abbildung 48: Metathese mit dem β -C-Glycosid 36

Tabelle 1: Bedingungen und Ausbeuten bei der Kreuzmetathese mit Styrol

Edukt	Katalysator	mol%	Reaktionstemperatur	Produkt	Ausbeute
35	51	9	25 °C	35 + 53	34%
35	51	5	40 °C	53	92%
35	52	16	25 °C	35 + 53	17%
35	52	24	40 °C	53	94%
36	51	12	40 °C	54	100%

Auffällig ist, dass nur (*E*)-konfigurierte Produkte beobachtet wurden (Kopplungskonstante der Doppelbindungsprotonen ~ 16 Hz).^[142] Da die Ruthenium-katalysierte Olefin-Metathese nicht *E/Z*-selektiv ist, kann vermutet werden, dass intermediär gebildetes (*Z*)-Produkt, das reaktiver ist als das *E*-Produkt,^[143] erneut reagiert und sich so durch mehrere Austausch-Schritte das thermodynamisch stabilere *trans*-Produkt bildet. Reaktionspartner ist dabei eventuell noch nicht umgesetztes Styrol, wahrscheinlicher jedoch das als Homodimer gebildete Stilben, da die Konzentration und die Reaktivität des Styrols so hoch ist, dass diese Reaktion bevorzugt abläuft.

Im Falle des Katalysators **51** unterscheidet sich die reaktive Spezies bei Verwendung von Styrol als Reaktand nicht von dem in die Reaktion eingesetzten Ruthenium-Komplex. Im Falle des Katalysators **52** wird intermediär durch Reaktion mit Styrol der Katalysator **51** gebildet, die Rückreaktion zu **52** durch „Einfang“ des *ortho*-Isopropoxystyrols^[118] läuft

jedoch offensichtlich während der gesamten Reaktionszeit ebenfalls ab, da die Grünfärbung der Lösung nicht in den roten Farbton der Reaktionslösung wie bei Katalysator **51** umschlägt. Ein Kreuzprodukt mit dem *ortho*-Isopropoxystyrol aus dem Katalysator **52** wurde nicht beobachtet.

Im Fall des unvollständigen Umsatzes (bei Raumtemperatur) konnten Edukt und Produkt nach Deacetylierung säulenchromatographisch getrennt werden. Die Produkte nach Reaktion bei 40 °C enthielten kein detektierbares Edukt mehr.

Nach Deacetylierung und Verseifung des α -konfigurierten Kreuzmetatheseproduktes wurde α -konfiguriertes C-Sialosid mit aromatischem Rest erhalten, das als Probe für die SPR-Untersuchungen die Hypothese der Bindung eines aromatischen Restes in der *acceptor binding site* zu überprüfen helfen sollte.

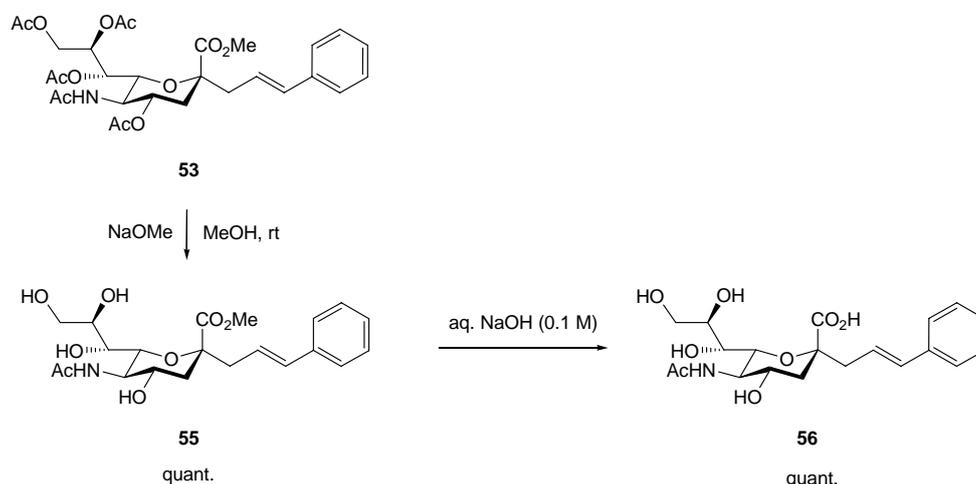


Abbildung 49: Entschützung des α -konfigurierten Metathese-Produkts

Die Hydrierung der Metathese-Produkte mit Wasserstoff bei Normaldruck unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle als Katalysator und die Deacetylierung und Verseifung des Methylesters ergaben das α - und β -konfigurierte aromatische C-Sialosid mit gesättigter Linker-Region.

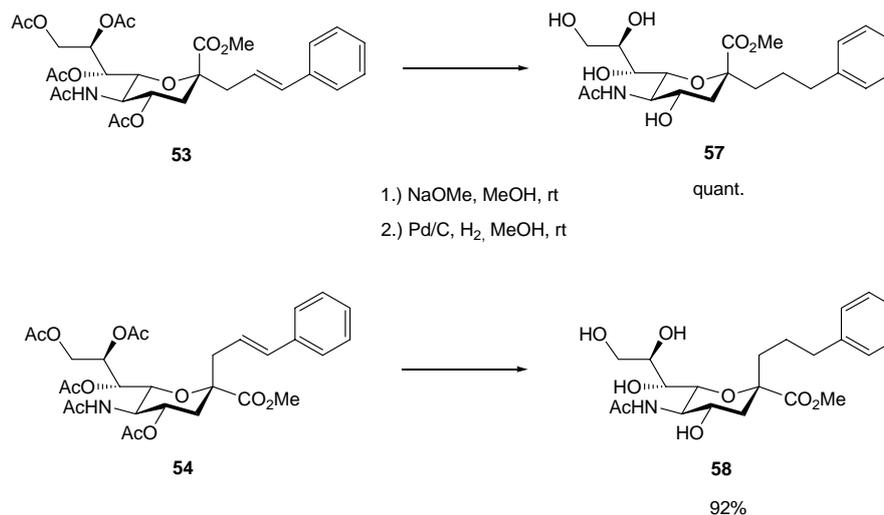


Abbildung 50: Acetylierung und Hydrierung der Kreuzmetathese-Produkte führt zu den gesättigten aromatische C-Glycosiden

Nach der Verseifung lagen mit diesen Verbindungen zwei weitere Liganden für Messungen vor. Im Falle des α -konfigurierten Derivats kann das SPR-Experiment Aufschluß über den Einfluß eines flexibleren C_3 -Spacers auf die Affinität geben. Durch das β -konfigurierte Derivat kann eine unspezifische Bindung an das Enzym außerhalb des aktiven Zentrums beobachtet oder ausgeschlossen werden.

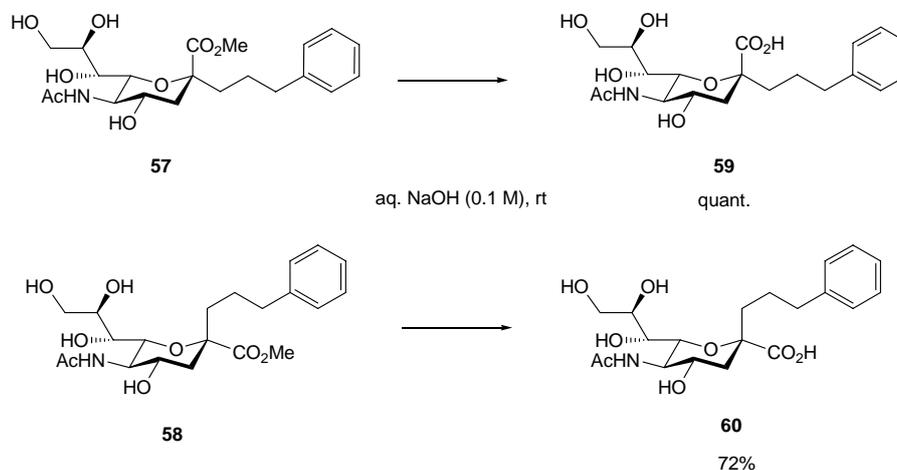


Abbildung 51: Verseifung der gesättigten aromatischen C-Glycoside

Die Vorteile der hier gezeigten Reaktionssequenz zur Synthese von aromatischen C-Sialosiden sind die geringe Anzahl an Stufen und die guten Ausbeuten nach einfachen Reinigungsschritten. Deshalb wurde die allgemeine Anwendbarkeit dieses Ansatzes zur Synthese von C-Sialosiden für biologische Anwendungen im Folgenden durch Kreuzmetathese mit substituierten Styrolen sowie Kohlenhydrat-Derivaten mit terminalen Doppelbindungen untersucht.

4.4.4 Kreuzmetathese mit *para*-substituierten Styrol-Derivaten

Durch Wittig-Reaktion der *para*-substituierten Benzaldehyde **61** und **62** konnten *para*-substituierte Styrole erhalten werden,^[144] die sich bezüglich der elektronischen Eigenschaften von einfachem Styrol unterscheiden.

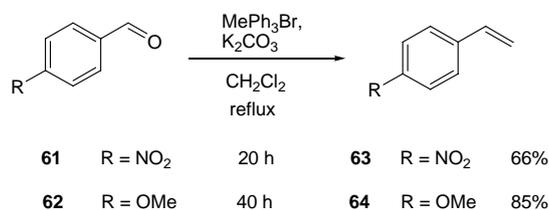


Abbildung 52: Synthese der *para*-substituierten Styrole **63** und **64**

Die Untersuchung der Kreuzmetathese unter Verwendung dieser Substrate ist nicht nur eine Erweiterung der Anwendbarkeit der oben beschriebenen Methode sondern auch mechanistisch interessant. Außerdem liefert diese Reaktion *C*-Glycoside mit aromatischem Rest, die durch ihre Substitution eventuell veränderte Affinitäten zeigen, da die elektronischen Eigenschaften des aromatischen Restes die Bindung zu den aromatischen Aminosäuren Tyr₁₁₉ und Trp₃₁₂ beeinflussen sollten.

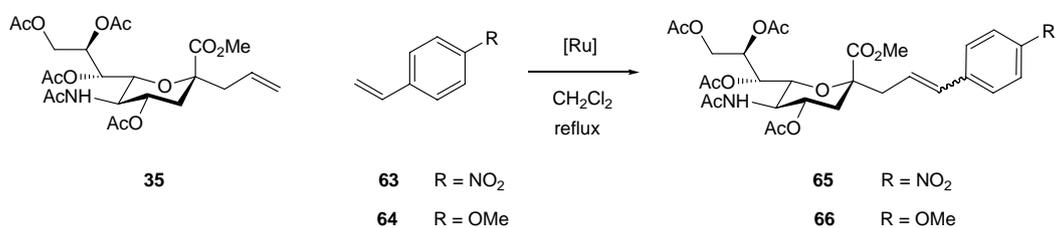


Abbildung 53: Kreuzmetathese mit *para*-substituierten Styrolen

Tabelle 2: Bedingungen und Ausbeuten

subst. Styrol	Katalysator	mol%	Produkt	Ausbeute	<i>E/Z</i>
63	52	12	65	quant.	5:1
64	51	5	35 + 66	14%	100% <i>E</i>
64	52	9	35 + 66	47%	100% <i>E</i>

Die Kreuzmetathese nach dem oben beschriebenen Protokoll verlief im Fall des *para*-Nitro-Substituenten quantitativ. Im ¹H-NMR-Spektrum war nur eine Verbindung zu erkennen, so dass zunächst auch von einer *trans*-Selektivität wie im Falle des unsubstituierten Styrols ausgegangen wurde. Die Doppelbindungsprotonen von **65** fielen in CDCl₃ allerdings zu

einem Signal zusammen, so dass die Vermutung nicht durch Kopplungskonstanten erhärtet werden konnte. Nach der Deacetylierung zu **68** war deutlich ein *cis/trans*-Verhältnis von 1:5 zu sehen. Da eine basisch induzierte Isomerisierung literaturbekannt ist,^[145] könnte das in der Zemplén-Deacetylierung vorhandene Methanolat eine solche bewirkt haben. Um auszuschließen, dass es sich bereits nach der Metathese um ein *cis/trans*-Gemisch handelte, wurde ein weiteres ¹H-NMR-Spektrum in deuteriertem Benzol aufgenommen. Hier lagen die Doppelbindungssignale weiter auseinander, und es war das gleiche *cis/trans*-Verhältnis zu sehen wie nach der Deacetylierung. Entweder ist also die Kreuzmetathese in diesem Fall nicht selektiv, oder die Isomerisierung findet durch einen anderen Mechanismus statt. Gegen die geringere Selektivität der Kreuzmetathese spricht der vollständige Umsatz bei der Reaktion. Wäre intermediär gebildetes *cis*-Produkt mit *para*-Nitro-Substituent nicht reaktiv genug, um erneut eine Metathese-Reaktion einzugehen (wie im Fall des unsubstituierten Styrols postuliert), so sollte das gebildete Stilben-Derivat aufgrund stärkeren Elektronenzugs auf die Doppelbindung noch unreaktiver sein und damit die Reaktion bei vollständiger Dimerisierung des *para*-Nitrostyrols zum Stillstand kommen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Da es bekannt ist, dass eine Isomerisierung von nitrosubstituierten Styrol-Derivaten durch photochemische Prozesse bewirkt werden kann,^[146] bietet dies eine mögliche Erklärung. Allerdings kann auch ein Einwirken des Katalysators als Lewis-Säure nicht ausgeschlossen werden.

Beim *para*-Methoxystyrol wurde nur *trans*-Produkt beobachtet, allerdings läuft hier die Reaktion nicht vollständig ab. Grubbs *et al.* berichten von einer im Gegensatz zum Ruthenium-Benzyliden-Komplex verringerten Reaktivität des *para*-Methoxy-substituierten Benzyliden-Komplexes,^[143,147] so dass die Reaktion mit *para*-Methoxystyrol aufgrund verringerter Reaktivität des Katalysator-Intermediats vermutlich nicht vollständig abläuft und der Katalysator sich vorher zersetzt. Fragen wirft die in diesem Fall beobachtete Selektivität auf: Nach der im Falle des unsubstituierten Styrols postulierten erneuten Reaktion des *cis*-Intermediates müßte dieses auch in diesem Fall reaktiver sein als das *C*-glycosidische Edukt **35**. Das könnte durch die Konjugation mit dem Aromaten erklärt werden. Sowohl bei **65** als auch **66** konnte eine geringe Menge des Stilben-Derivats isoliert werden.

Die Verwendung von Katalysator **51** bei der Reaktion mit Methoxystyrol führte zu einer sehr viel geringeren Ausbeute (14%). Da **51** weniger stabil ist als **52** steht das in Einklang mit den angestellten Überlegungen.

Aus diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, dass im Verlauf der Metathese zunächst die Reaktionspartner (durch ihren Überschuß und im Fall der Styrole durch die reaktivere Doppelbindung) zum Dimer reagieren. Dieses ist reaktiv genug, um mit dem Katalysator

erneut zu reagieren, und bildet mit dem reaktionsträgen (Unterschub und nicht konjugierte Doppelbindung) Allyl-C-glycosid **35** schließlich das Produkt. Das Produkt ist durch die konjugierte Doppelbindung reaktiver als das Allyl-C-glycosid und equilibriert daher in einer Folge von Kreuzmetathese-Schritten zum stabileren *trans*-Produkt. Das *cis/trans*-Gemisch bei Nitrostyrol ist daher vermutlich nicht direkt auf die Metathese zurückzuführen. Der unvollständige Umsatz bei Methoxystyrol hängt mit der Reaktivität des Katalysator-Intermediats zusammen.^[143,147]

Ein Experiment, das diese Vermutungen stützt, ist die in Abbildung 54 gezeigte Reaktion des Metatheseprodukts **53** mit dem *cis/trans*-Nitrostilben **67**, das tatsächlich im Gemisch das Produkt **65** liefert.

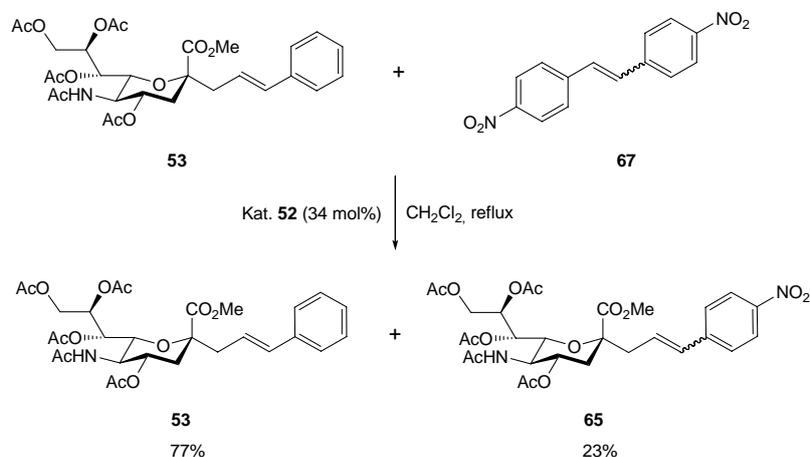


Abbildung 54: Metathese-Reaktion mit dem Dinitrostilben **67 und dem Metathese-Produkt **53**: Beide Edukte sind in der Lage, eine erneute Metathese-Reaktion einzugehen**

Die Produkte sind also tatsächlich in der Lage, erneut in die Reaktion einzugreifen.

Deacetylierung und Verseifung der *para*-substituierten Metathese-Produkte **65** und **66** lieferte die entsprechenden Verbindungen **70** und **71** für die späteren Messungen. Bei den methoxy-substituierten Verbindungen traten keine Probleme auf. Die Ausbeuten bei den nitro-substituierten Verbindungen liegen dagegen etwas niedriger als üblich, was eventuell auf Zersetzungs-Prozesse der empfindlichen Substanzen zurückzuführen ist. Ein Anzeichen dafür war die mit der Zeit stärker werdende dunkle Verfärbung der anfangs zitronengelben Verbindungen.

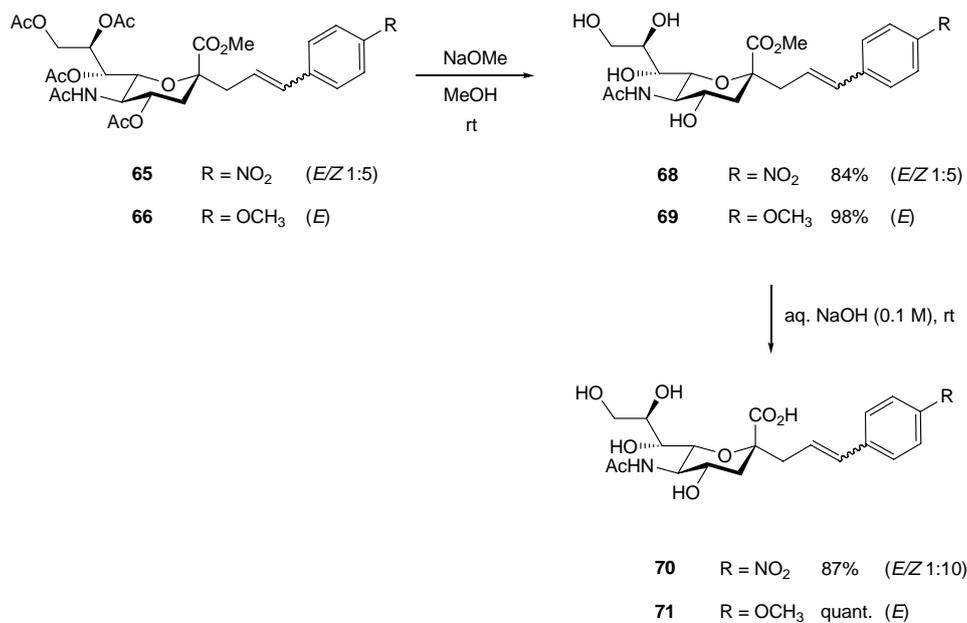


Abbildung 55: Entschützung der substituierten aromatischen C-Glycoside

Das deacetylierte nitro-substituierte Metathese-Produkt konnte ohne Probleme hydriert werden. Dazu ergab sich ein Zugang zu der amino-substituierten Verbindung **72** und, durch anschließende Acetylierung, auch zu der acetamido-substituierten Verbindung **74**. Die Verseifung der amino-substituierten Verbindung **72** wurde abweichend vom Standardvorgehen mit Triethylamin in Wasser durchgeführt, um Substanzverlust im Neutralisationsschritt mit saurem Ionentauscher bei der üblichen Verseifung in 0.1 molarer Natronlauge zu vermeiden. Dadurch wurde Ligand **73** nach Gefriertrocknen als Triethylammoniumsalz erhalten.

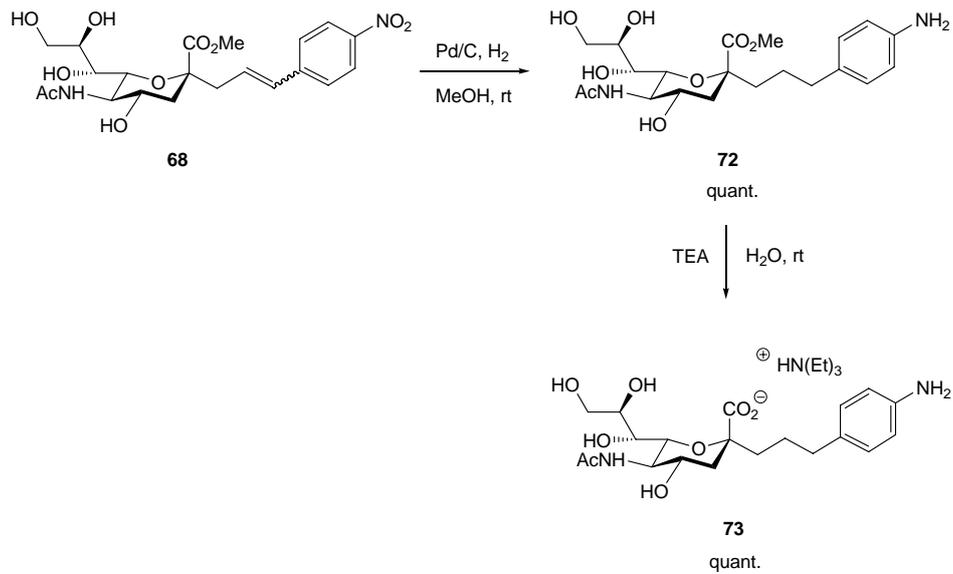


Abbildung 56: Hydrierung des nitro-substituierten aromatischen C-Glycosids 68 führt nach Verseifung zur amino-substituierten Verbindung 73

Acetylierung von 72 gab die peracetylierte Acetamido-Verbindung 74.

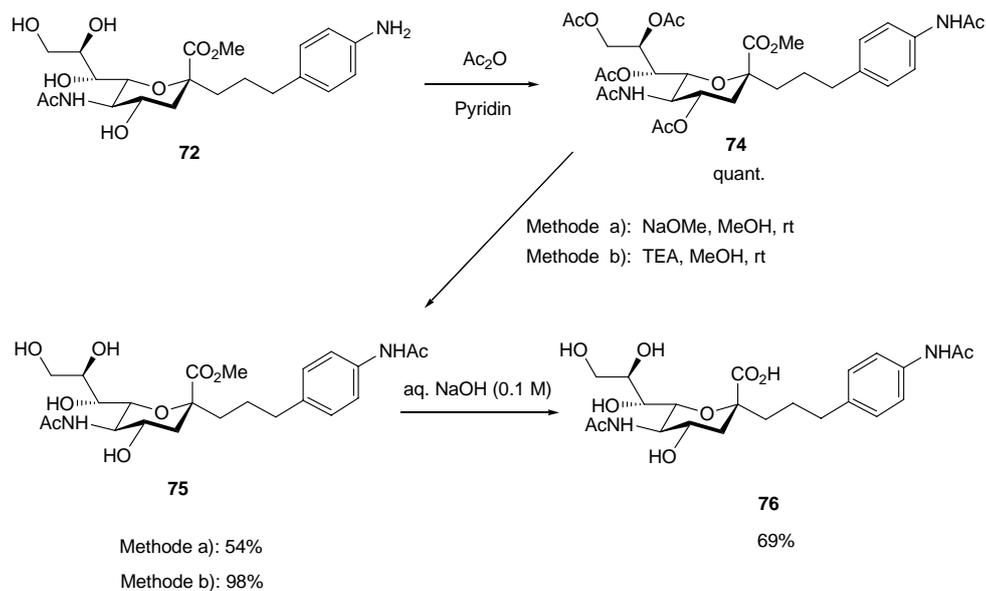


Abbildung 57: Synthese und Entschüttung der acetamido-substituierten Verbindung

Die verringerten Ausbeuten bei der folgenden Deacetylierung und der Verseifung sind eventuell auf leichte Basenlabilität der aromatischen *N*-Acetylgruppe zurückzuführen. Die Anwendung von Triethylamin in Methanol zur Deacetylierung lieferte dementsprechend eine höhere Ausbeute an 75 (98%). Außerdem sind die acetamido-substituierten Verbindungen 74, 75 und 76 sehr polar, was sich in den chromatographischen Reinigungsschritten durch erschwerte Elution der Produkte bemerkbar machte.

4.4.5 Kreuzmetathese mit ungesättigten Kohlenhydrat-Derivaten

Nach der erfolgreichen Anwendung der Kreuzmetathese-Reaktion in der Synthese aromatischer *C*-Glycoside ist es naheliegend, ein Kohlenhydrat-basiertes Olefin in dieser Reaktion zu verwenden, das zu einem *C*-Analogon eines *N*-Acetylneuraminsäure-Galactose-Disaccharids führen würde.

Die Einführung einer Doppelbindung in die Galactose gelang problemlos an der Position 6, die in Form der leicht erhältlichen Isopropyliden-galactose **77** leicht oxidiert werden konnte. Dazu wurde das Dess-Martin-Periodinan^[148] verwendet, das als mildes Oxidationsmittel in der Kohlenhydratchemie bereits erfolgreich angewendet wurde.^[149] Die Reaktion verlief mit 63% Ausbeute.

Durch Wittig-Reaktion wurde das terminale Olefin **79**^[150] erhalten, das als Überschußkomponente in die Kreuzmetathese eingesetzt wurde.

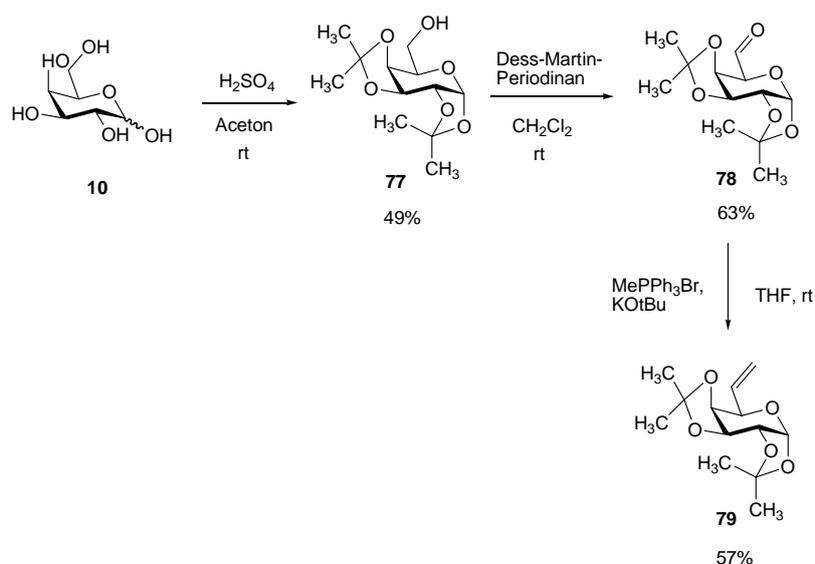


Abbildung 58: Synthese ungesättigten Galactose-Derivates **79** für die Kreuzmetathese

Die Ausbeute war hoch (93%), obwohl keine konjugierten aromatische Reste beteiligt waren. **80** wurde als *E/Z*-Gemisch im Verhältnis 3:1 erhalten, da hier das *cis*-Produkt wohl nicht reaktiv genug ist, um erneut in die Reaktion einzugreifen. Das steht in Einklang mit den oben angestellten Überlegungen.

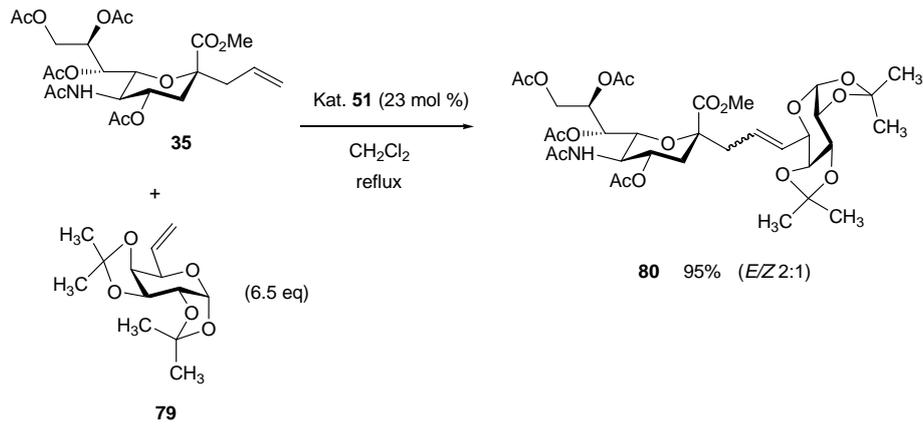


Abbildung 59: Synthese eines 6'-Sialylgalactose-Analogs durch Kreuzmetathese

Anschließende Hydrierung des Isomerengemisches und Entschützung gab ein einheitliches Ethylen-verbrücktes C-Analogon von $\alpha,2$ -6-verknüpfter Sialylgalactose.^[142] Sialyl $\alpha,2$ -6-galactose ist strukturverwandt mit dem Sialyl-Tn-Antigen (Sialyl $\alpha,2$ -6GalNAc)^[6,26] sowie Teil der Erkennungsstruktur des menschlichen Influenza A Hämagglutinins.^[13,19]

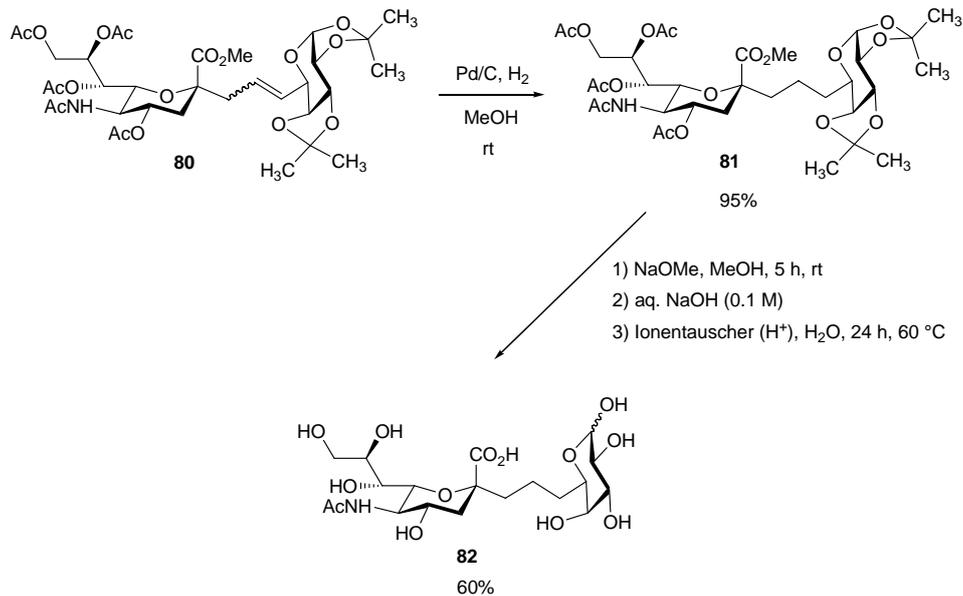
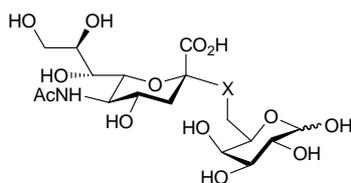


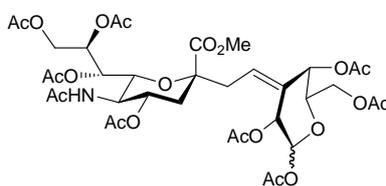
Abbildung 60: Entschützung des C-glycosidischen Disaccharid-Mimetikums



- 82** X = CH₂CH₂
83 X = O

Abbildung 61: Sialyl α ,2-6-galactose; C-glycosidisches Mimetikum **82 und O-glycosidisches („natürliches“) Disaccharid **83****

Anstelle des Sialyl α ,2-6-galactose-Analogons wäre für diese Arbeit natürlich das Analogon der Sialyl α ,2-3-galactose von Interesse. Dieses entspräche der Konfiguration in Substrat und Produkten der Trans-sialidase. Für ein Produkt ähnlich dem oben gezeigten Sialyl α ,2-6-galactose-Analogon müßte hier von einem 3-Desoxy-3-methylen-Derivat der Galactose ausgegangen werden. In dem Fall handelt es sich allerdings um ein disubstituiertes Olefin. Die Umsetzung solcher Edukte in Kreuzmetathese-Reaktionen unter Verwendung der Standard-Metathese-Katalysatoren ist wegen des sterischen Anspruchs der Reaktanden problematisch.^[151]



84

Abbildung 62: Hypothetisches C-glycosidisches Sialyl α ,2-3-Galactose-Analogon durch Kreuzmetathese

Einen leichten Zugang zu einem 3-Methylen-Derivat bietet die Isopropyliden-glucose **85**. Unter Verwendung dieses leicht erhältlichen Edukts wurde ein Zucker-Olefin synthetisiert, mit dem zwei vorläufige Metathese-Versuche unternommen wurden, zum Einen in der Form des isopropylidengeschützten Furanose-Derivats **87** und zum Anderen als acetyliertes Pyranose-Derivat **90**.

Das isopropylidengeschützte Olefin **87** läßt sich durch Oxidation und Wittig-Reaktion leicht darstellen. Durch irreversible Deprotonierung des Wittig-Salzes durch *tert*-Butyllithium und anschließende Zugabe von **86** kann verhindert werden, dass Verbindung **86** enolisiert,^[152] und dann einer Wittig-Reaktion nicht mehr zur Verfügung steht.

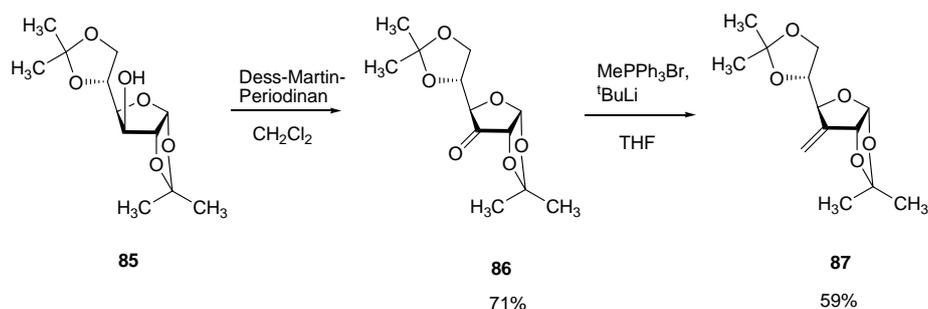


Abbildung 63: Darstellung des isopropylidengeschützten Zuckerolefins **87**

Nach der darauffolgenden Metathese-Reaktion mit dem Olefin **87** ließ sich jedoch kein Produkt isolieren. Auch in den NMR-Spektren der Rohsubstanz war lediglich das Edukt **35** zu erkennen.

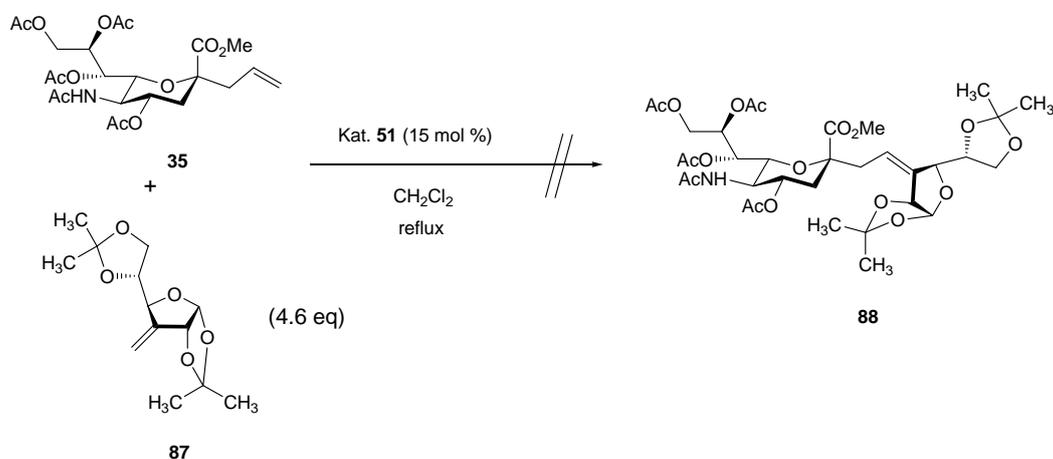


Abbildung 64: Versuch der Kreuzmetathese mit dem isopropylidengeschützten Zuckerolefin **87**

Da außer dem Substitutionsgrad der Doppelbindung auch noch die sperrigen Isopropyliden-Gruppen durch sterische Hinderung die Reaktion behindern könnten, wurde nach Entschützung und Acetylierung ein neuer Versuch unternommen, das nun acetylierte Olefin **90** umzusetzen.

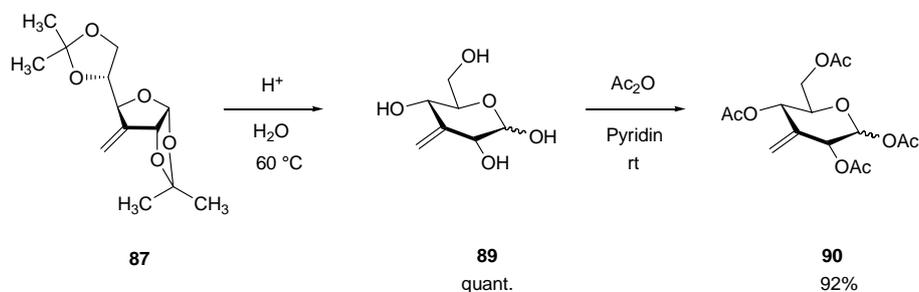


Abbildung 65: Umschüttung des Furanosids zur Verminderung der vermuteten sterischen Abstoßung

Auch hier konnte kein Produkt isoliert werden.

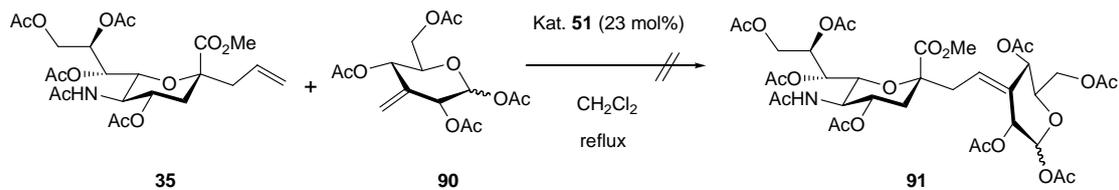


Abbildung 66: Metathese-Versuch mit dem acetylierten Glucose-Derivat

Im NMR-Spektrum der Rohsubstanz konnte neben dem Edukt **35** auch ein geringer Anteil an Verbindung **53**, die durch Kreuzmetathese mit dem Benzyliden-Liganden des Katalysators **51** entstanden sein muß, beobachtet werden. Dadurch kann ein Fehlschlagen der Reaktion durch Zersetzung des Katalysators ausgeschlossen werden.

4.5 Einführung eines Aromaten an der 9-Position

4.5.1 9-Benzylierung und Metathese

Anhand der Kristallstruktur von TcTS wird vermutet, dass die Hydroxygruppe an C-9 der *N*-Acetylneuraminsäure eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Indol-Stickstoff von Trp₁₂₀ eingeht.^[58] Daher schien ein 9-*O*-Benzylether vorteilhaft zu sein, um eine zusätzliche aromatische Wechselwirkung im aktiven Zentrum zu bewirken (siehe Kapitel 4.1.2).

Für die 9-*O*-Benzylierung wurde auf eine Methode von Shelke *et al.*^[22] zurückgegriffen, die über die regioselektive reduktive Öffnung eines Benzyliden-Acetals verläuft. Während die Autoren die Acetalisierung und die reduktive Öffnung an einem Benzyl-sialosid ohne Reinigung des Zwischenprodukts vornahmen, wurde das intermediäre Acetal in dieser Arbeit isoliert. Überraschenderweise wurde ein Gemisch aus 8,9- und 7,9-Acetal in einem Verhältnis von ca. 3:2 erhalten. Das 8,9-Acetal bestand aus einem 1:1 Gemisch von Diastereomeren, das 7,9-Acetal hingegen nur aus einer Spezies. Eine ähnliche Beobachtung wurde von Magnusson *et al.* bei einem *p*-Methoxybenzylidenacetal berichtet.^[153] Die Analyse der Kopplungskonstanten und der 2D-NMR-Spektren ergab eine äquatoriale Stellung des Phenylsubstituenten im vom Benzylidenacetal gebildeten 6-Ring in Verbindung **93**.

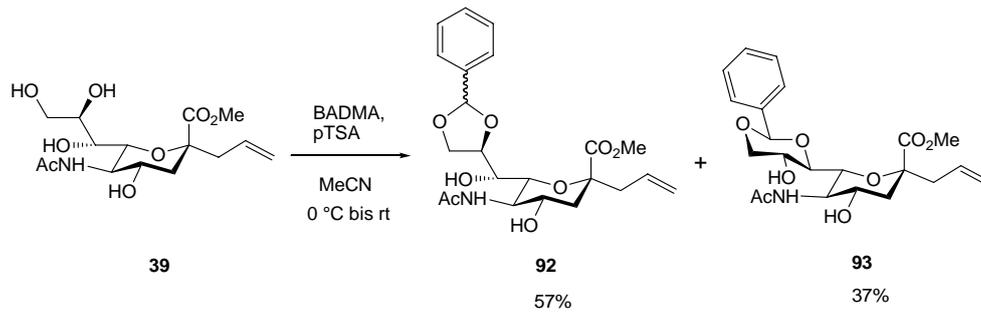


Abbildung 67: Benzylidenacetalsynthese

Getrennt in die folgende reduktive Acetalöffnung eingesetzt stellte sich das 7,9-Acetal **93** als unreaktiv heraus.

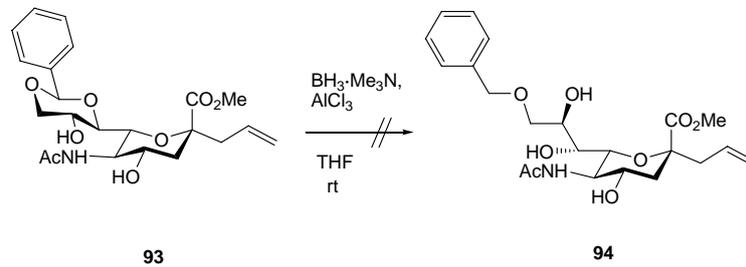


Abbildung 68: Versuch der reduktiven Ringöffnung mit **93**

Überraschend reagierten beide diastereomeren 8,9-Acetale **92** hingegen in 51% Ausbeute nur zum gewünschten 9-*O*-Benzyl-Derivat.

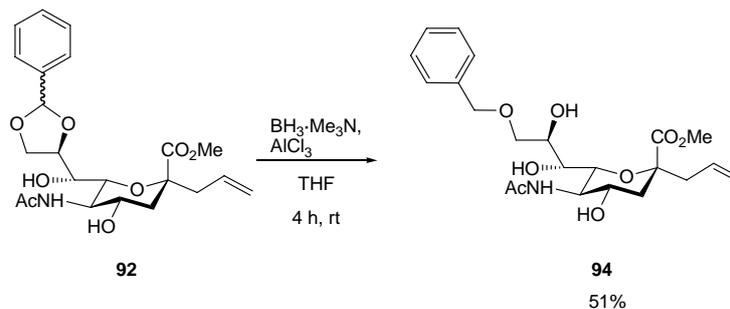


Abbildung 69: Selektive 9-Benzylierung durch reduktive Benzylidenacetalspaltung

Die Anwendung von Aluminiumchlorid als Lewis-Säure und Boran-Trimethylamin führt in Tetrahydrofuran nach Garegg zum Produkt mit der Benzylgruppe am primären Alkohol.^[154] Dies ist in Produkt **94** der Fall. Die normalerweise bei 5-Ring-Benzylidenacetalen beobachtete Abhängigkeit der Regioselektivität von *exo*- bzw. *endo*-Konfiguration spielt hier vermutlich keine Rolle, da das Benzylidenacetal an der beweglichen Glycerolseitenkette lokalisiert ist. Die Verseifung des Produkts ergab das C-Glycosid **95** in quantitativer Ausbeute.

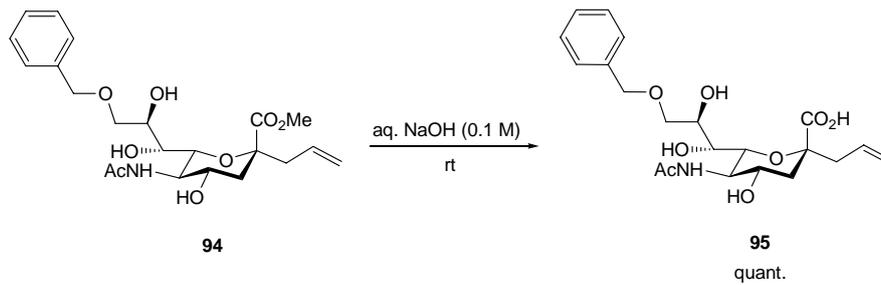


Abbildung 70: Verseifung des Methylesters

4.5.2 Kreuz-Metathese: Einführung eines zweiten Aromaten

Durch Acetylierung der Verbindung **94** wurde ein Edukt für eine Kreuzmetathese erhalten, die zu einem Produkt mit zwei endständigen aromatischen Resten führen sollte. Die Reaktion mit Styrol wurde nach dem bewährten Protokoll mit dem Katalysator **51** durchgeführt.

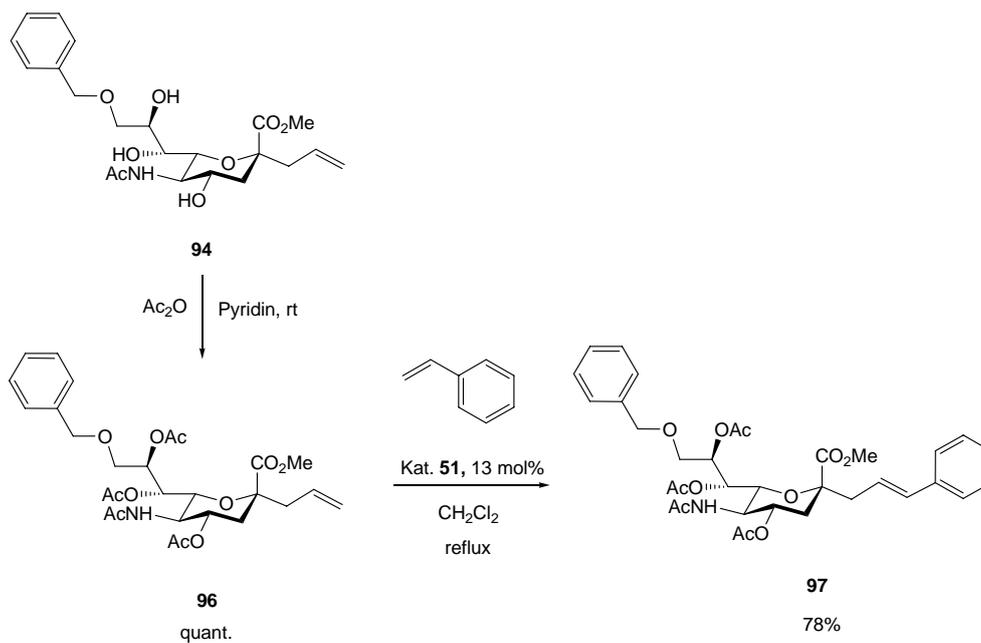


Abbildung 71: Kreuzmetathese mit Styrol mit dem 9-O-Benzylderivat **96**

Die Ausbeute von 78% war zufriedenstellend, wenn auch nicht so hoch wie in den Fällen ohne Benzylgruppe an der 9-Position.^[142] Es wurde wieder nur *trans*-konfiguriertes Produkt **97** beobachtet.

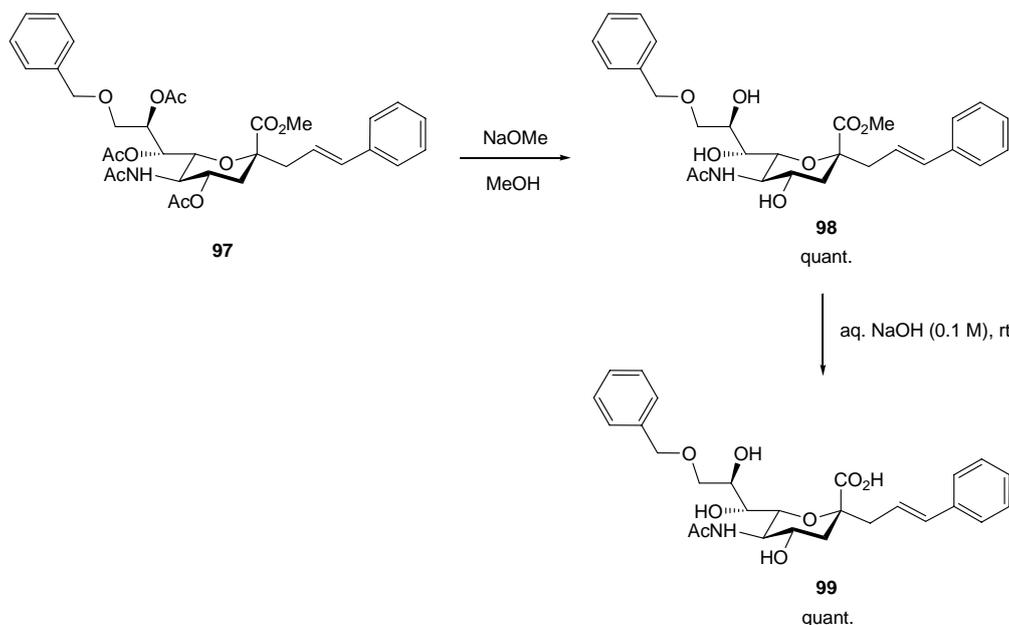


Abbildung 72: Entschützung des C-Glycosids **97** führt zum Liganden **99**

Die anschließende Deacetylierung und Verseifung des Methylesters lieferten den Liganden **99**. Da hier zwei aromatische Reste im Molekül vorhanden sind, kann eine Messung der Affinität von **99** zu TcTS Aufschluß über die Art der Bindung von **56** und **95** geben.

4.6 Einführung einer Carboxylgruppe an der 4-Position

Die Anwesenheit mehrerer Arginin-Seitenketten im aktiven Zentrum führte zu dem Entschluß, eine negative Ladung in einen Liganden einzuführen. Als aussichtsreichster Kandidat unter den Argininen für eine zusätzliche ionische Wechselwirkung erschien Arg₅₃, das vermutlich eine Wasserstoffbrückenbindung mit der 4-Hydroxygruppe eingeht (siehe Abbildung 29).^[58] Zur Einführung einer Carboxylgruppe sollte die 4-Hydroxygruppe oxidiert und anschließend einer Wittig-Reaktion mit dem stabilen Phosphor-Ylid Ethoxycarbonylmethylen-triphenylphosphoran unterworfen werden.

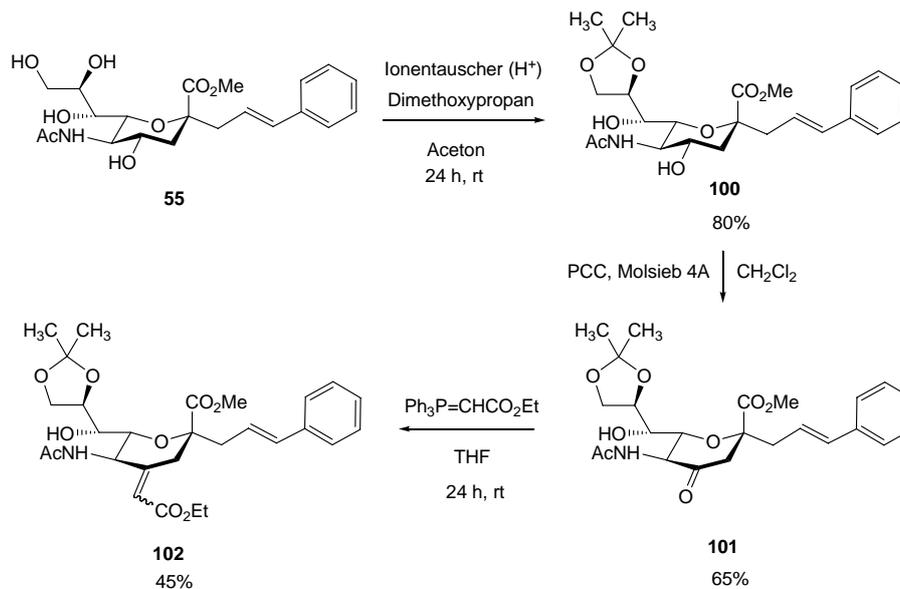


Abbildung 73: Oxidation und anschließende Wittig-Reaktion an der 4-Position zur Einführung einer Carboxylgruppe

Die Oxidation nach einer Methode von Zbiral^[155] erfordert die Schützung der 8- und der 9-Hydroxygruppe als Isopropylidenacetal. Die 7-Hydroxygruppe ist in **100** sterisch stark abgeschirmt, und die Oxidation durch Pyridiniumchlorochromat verläuft selektiv an der 4-Position (Abbildung 73). Durch Wittig-Reaktion wurde das ungesättigte Produkt **102** in 45% Prozent Ausbeute erhalten.

Die Hydrierung resultierte selektiv in dem Produkt **103** mit äquatorialer Konfiguration an der 4-Position (Abbildung 74). Die Konfiguration wurde durch NMR-Analytik bestätigt: das äquatoriale Proton an der 3-Position von **103**, das durch HMBC-Kopplung mit C-1 eindeutig identifizierbar ist, zeigt neben der großen geminalen Kopplungskonstante eine kleine vicinale Kopplung von 3.6 Hz, woraus auf *cis*-Stellung des Protons an Position 4 geschlossen werden kann. Die Signale von **H-5** und **H-3_{ax}** in Verbindung **103** erscheinen im ¹H-NMR-Spektrum als Multipletts, so dass ihre Kopplungen nicht beobachtet werden konnten.

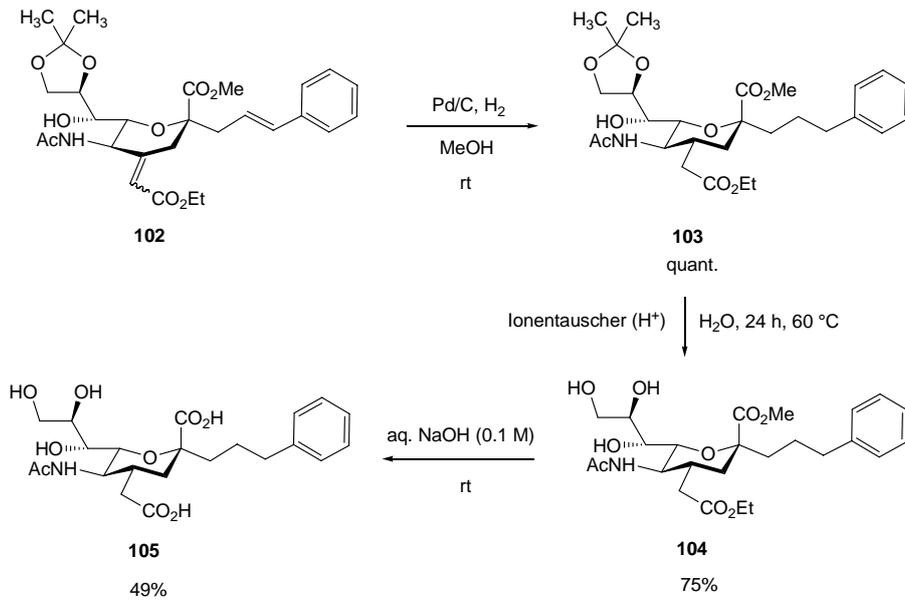


Abbildung 74: Diastereoselektive Hydrierung und Entschützung des Liganden mit zusätzlicher Carboxylgruppe

Abspaltung der Isopropyliden-Gruppen und Verseifung der Esterfunktionen lieferte das C-Sialosid **105** mit zwei Carboxylgruppen.

Aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Verbindungen **104** und **105** können die Kopplungskonstanten von **H-5** und **H-3_{ax}** entnommen werden: die in beiden Fällen großen *trans*-diaxialen Kopplungskonstanten ($J_{5,4} = 10.5 \text{ Hz}$ und $J_{3_{\text{ax}},4} = 12.7 \text{ Hz}$ in Verbindung **104**) bestätigen die äquatoriale Stellung des Substituenten an **C-4**.

5 Messungen

5.1 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

5.1.1 Die Methode

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR) ist eine optische Methode, um Adsorptionsvorgänge an Metalloberflächen zu messen. Beim Übergang von Licht aus einem optisch dichteren (hier ein Glasträger) in ein optisch dünneres Medium (hier eine Lösung) tritt beim Überschreiten eines kritische Winkels θ_k Totalreflexion ein. Die Intensität des reflektierten Lichtstrahls entspricht der des einfallenden Lichtstrahls. Ist der Glasträger jedoch mit einer dünnen Schicht eines Edelmetalls beschichtet, werden Oberflächenplasma-Schwingungen (Schwingungen der Leitungselektronen elektrischer Leiter um die positiv geladenen Atomrümpfe an der Oberfläche des Metalls) angeregt. Es tritt Resonanz auf, und damit eine Abschwächung der Totalreflexion (Abbildung 75), die beim Resonanzwinkel θ_R , am größten ist.

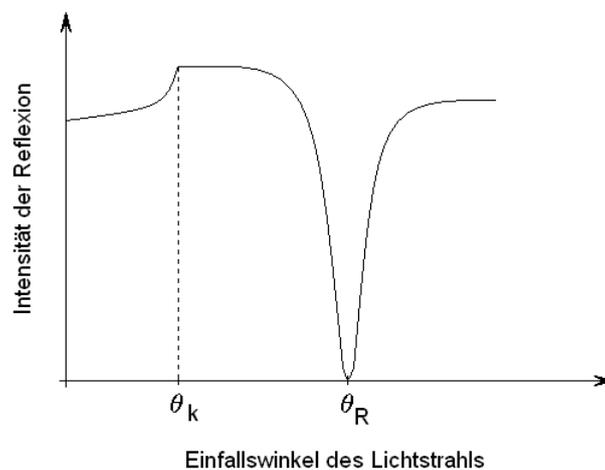


Abbildung 75: Reflexionskurve des Lichts; ab θ_k (kritischer Winkel) tritt Totalreflexion ein; θ_R ist der Resonanzwinkel

Die Quanten dieser Oberflächenplasma-Schwingungen nennt man Oberflächenplasmonen. Es existiert nun aufgrund der Plasma-Schwingungen ein evaneszentes elektrisches Feld, das in das optisch dünnere Medium hineinreicht (Abbildung 76). Die Eindringtiefe dieses Feldes hängt von Größen wie den Brechungsindizes der Medien sowie der Wellenlänge und dem

Einfallswinkel des Lichts ab. Der Resonanzwinkel θ_R wird also von Veränderungen an der Oberfläche des metallischen Mediums beeinflusst.^[156]

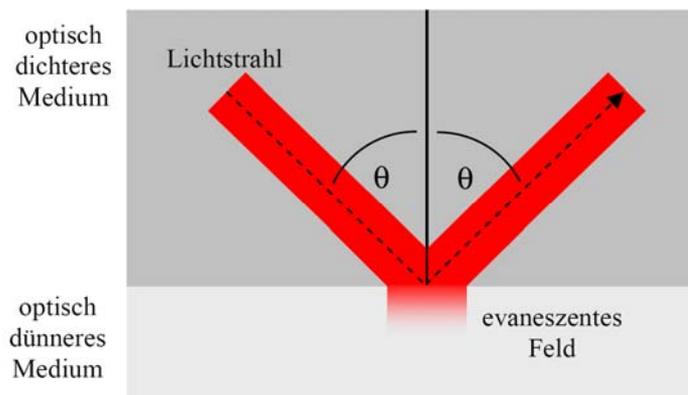


Abbildung 76: Evaneszentes Feld

Das physikalische Prinzip wurde Mitte des 20. Jahrhunderts von Turbadar beschrieben^[157] und später von Otto^[158,159] und Kretschmann^[160] weiterentwickelt. Anfang der neunziger Jahre wurde von der schwedischen Firma BIACORE ein kommerzielles System entwickelt, das SPR-Messungen in biologischen Zusammenhängen ohne großen Aufwand ermöglicht.^[161] Ein Sensor-Chip besteht aus einem Glas-Träger mit einer dünnen Goldschicht (das optisch dichtere Medium), auf dem über Thiol-Anker eine mit geeigneten funktionellen Gruppen terminierte Matrix aufgetragen ist.^[162] Um Wechselwirkungen zu messen, wird ein Bindungspartner auf dem Sensor-Chip immobilisiert, was z. B. über Aktivierung von Carboxylgruppen als NHS-Aktivester und anschließende Reaktion mit Aminofunktionen des Proteins geschehen kann. Das optisch dünnere Medium ist in diesem Fall eine Flußzelle, in der Pufferlösungen der Analyten über den Chip geleitet werden. Durch Vergleich mit einer Referenzzelle (nicht belegte Flußzelle) erhält man ein Differenz-Sensorgramm. Die Messungen werden über eine Software gesteuert und damit automatisiert durchgeführt.

Eine typische SPR-Kurve ist in Abbildung 77 gezeigt. Die Antwort (in RU: *response units*) steigt mit dem Durchleiten des Analyten durch die Flußzelle an (Assoziation), bis ein Gleichgewicht erreicht ist (Assoziationsrate = Dissoziationsrate). Ein Anstieg von 1 RU entspricht dabei etwa einer Massenzunahme von 1 Pikogramm. Danach wird mit Puffer gespült, und es findet die Dissoziation des Analyten statt. Durch einen Waschschrift (Regeneration) wird der Ausgangszustand wieder hergestellt.

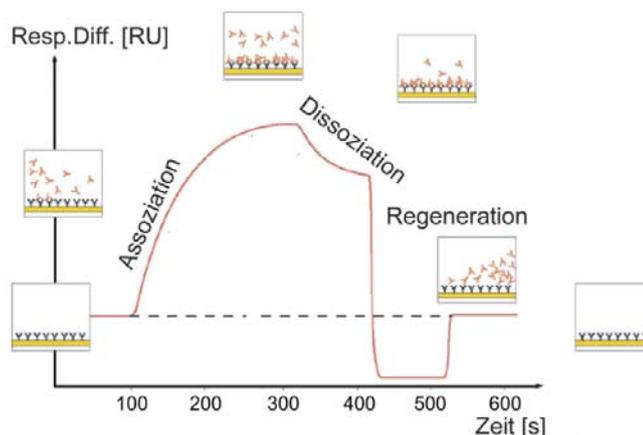


Abbildung 77: Verlauf einer SPR-Messung mit Assoziations- und Dissoziationschritt sowie einem Waschschrift zur Regeneration der Oberfläche

Diese Methode eignet sich im Gegensatz zu anderen Verfahren auch für Messungen von schwachen Wechselwirkungen ($K_D > 0.1 \text{ mM}$), wie sie bei Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen vorliegen.^[163] Dadurch ist es beispielsweise möglich, Lectin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen zu untersuchen,^[18,164] oder durch Lectin-Interaktion die Art der Glycosylierung von Glycoproteinen aufzuklären.^[165,166] Auch *high throughput* Messungen unter Anwendung von Microarrays sind möglich.^[167]

5.1.2 Messungen mit den synthetisierten Liganden

Rekombinant in *E. coli* exprimierte Trans-sialidase^[68] wurde auf einem kommerziell erhältlichen CM5-Sensor-Chip der Firma GE Healthcare (bis 2006: Biacore AB Corporation) unter Verwendung der vom Hersteller beschriebenen^[162] EDC/NHS Amid-Kupplungsmethode immobilisiert (siehe 8.4.1). Der Anstieg der SPR-Antwort betrug dabei 10679 RU. Bei einer Massenzunahme von 1 pg/RU und einer Masse des Enzyms von 70 kDa ergibt sich daraus eine immobilisierte Menge von 153 fmol (10^{-15} mol) Enzym.

Die Messungen fanden unter Verwendung dieses Chips auf einem BIACORE T100 Gerät statt.^[65] Von den Liganden wurden Verdünnungsreihen (7-10 Konzentrationen, bis höchstens 5 mM) in TRIS-HCl-Puffer (100 mM, pH 7.46) angesetzt. Die Lösungen wurden in der Flusszelle über den Chip geleitet und die SPR-Antworten als Differenz zu einer nicht mit Enzym belegten Referenz-Flusszelle erhalten (Abbildung 78).

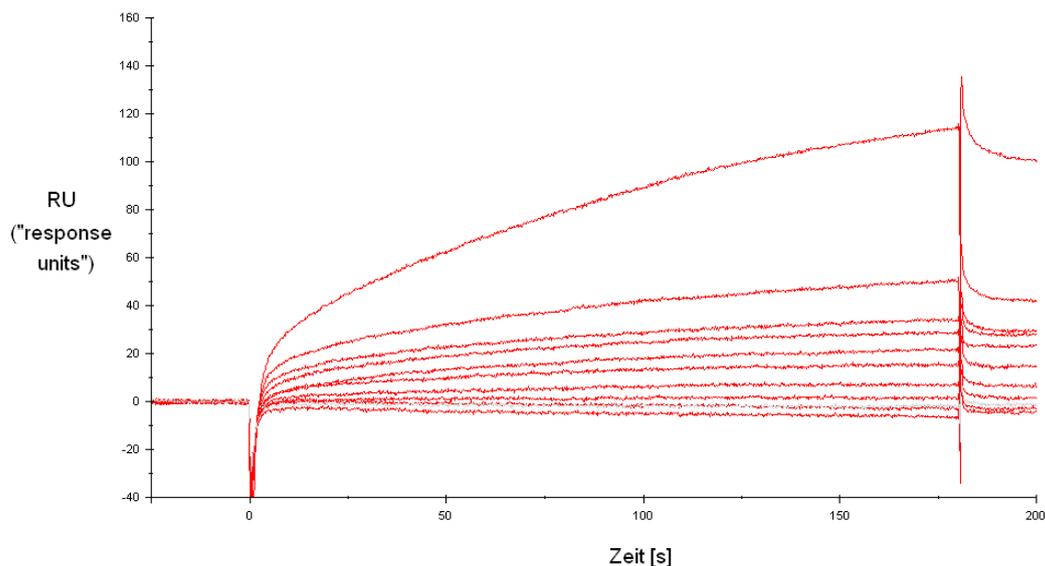


Abbildung 78: SPR-Antwort-Kurven für den Liganden 59

Nach Auftragung der Gleichgewichts-SPR-Antworten über die Konzentrationen desselben Liganden erhält man im Fall einer Bindung an das immobilisierte Enzym eine Sättigungskurve (Abbildung 79).

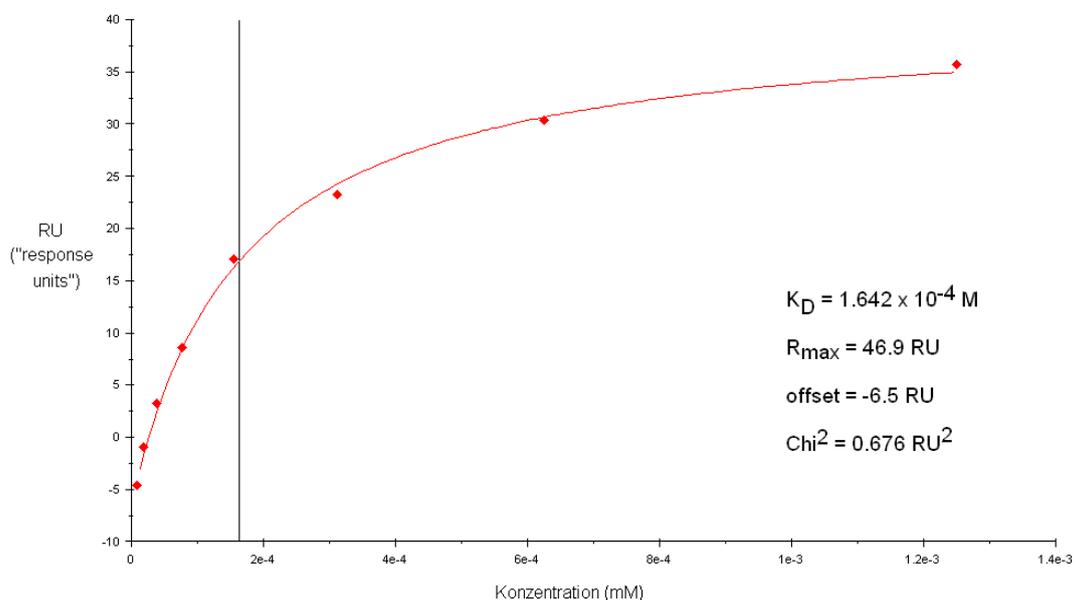


Abbildung 79: Kurven-Fit über die Gleichgewichts-SPR-Antworten der Verdünnungsreihe von Verbindung 59

Mit Hilfe der mit dem Gerät gelieferten Auswertungs-Software kann ein Kurven-Fit die Parameter der zugrunde liegenden Formel^[168] (Formel 1) berechnen. Damit sind die

thermodynamischen Dissoziationskonstanten (K_D) der Ligand-Enzym-Komplexe zugänglich (*steady state affinity*).

$$R = \frac{c(\text{Ligand}) \cdot R_{\max}}{c(\text{Ligand}) + K_D} + \text{offset}$$

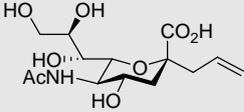
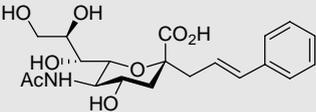
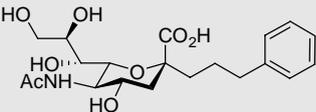
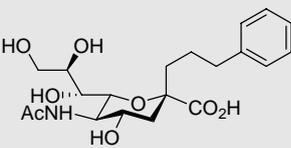
Formel 1: Formel für den Kurven-Fit über die Gleichgewichts-SPR-Antworten (R) bei verschiedenen Ligand-Konzentrationen; R_{\max} : maximaler RU-Wert, K_D : Dissoziationskonstante des Liganden, *offset*: Verschiebung der Kurve auf der Ordinate

Die Theorie, die dieser Berechnung zugrunde liegt, geht von einem 1:1 Enzym-Ligand-Komplex aus (*one site binding model*); das entspricht einer Langmuir-Isotherme.^[169] Die Werte für R_{\max} können daher theoretisch bei vollständiger Besetzung der aktiven Zentren einen bestimmten Wert nicht überschreiten. Dieser ergibt sich aus der Menge des immobilisierten Enzyms (153 fmol) und der Masse des Liganden. Bei einer durchschnittlichen Molmasse von ca. 400 g/mol ergibt sich ein theoretischer R_{\max} -Wert von ungefähr 60 RU (~60 pg, entspricht 153 fmol Ligand). Ein deutliches Überschreiten dieses Wertes deutet auf unspezifische Wechselwirkungen hin.

Bei der Betrachtung der Werte muß beachtet werden, dass diese im Gegensatz zu den Ergebnissen kinetischer Messungen (vgl. Kap. 3.1), die in der Regel homogen in Lösung stattfinden, den Fall eines auf einer Oberfläche kovalent gebundenen Enzyms widerspiegeln. Tatsächlich ist die Trans-sialidase als membranständiges Enzym *in vivo* auch auf einer Oberfläche gebunden. Die so gewonnenen Ergebnisse ergänzen daher solche, die durch Messungen in Lösung erhalten wurden, sind aber nicht ohne weiteres zu vergleichen.

Die erhaltenen K_D -Werte liegen zwischen 0.16 und 14 mM und daher in der Größenordnung bekannter monovalenter Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen.^[163,170,171] Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse im folgenden in drei Tabellen aufgeführt, die jeweils bestimmte Aspekte der Bindung zwischen Ligand und Enzym ansprechen.

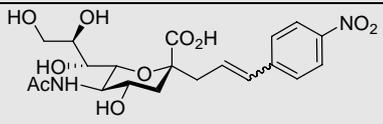
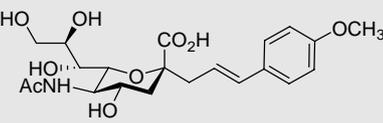
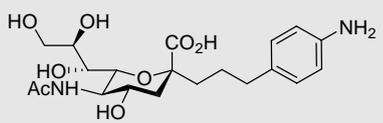
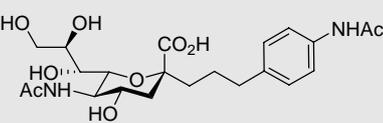
Tabelle 3: Dissoziationskonstanten der aromatischen und nichtaromatischen C-Glycoside

	Verbindung	K_D (mM)
42		>100
56		3.6
59		0.16
60		>100

Die Ergebnisse in Tabelle 3 zeigen deutlich, dass ein aromatischer Rest am Liganden eine Bindung zum Enzym ermöglicht. Es kann angenommen werden, dass dieser Rest in der *acceptor binding site* zwischen Tyr₁₁₉ und Trp₃₁₂ durch π - π -Wechselwirkung bindet und damit den Kohlenhydratrest des natürlichen Substrats mimikriert. Das α -konfigurierte C-Glycosid **42** enthält keinen Aromaten und bindet im SPR-Experiment nicht nachweisbar an die immobilisierte Trans-sialidase. Die Anwesenheit eines Aromaten im Liganden mit β -Konfiguration **60** führt ebenfalls zu keiner Bindung, was ein zusätzliches Indiz für eine spezifische Wechselwirkung im aktiven Zentrum des Enzyms ist und unspezifische unpolare Wechselwirkungen mit dem Protein ausschließt.

Wie der Unterschied zwischen den Dissoziationskonstanten von **56** und **59** zeigt, führt eine höhere Flexibilität des Linkers am Aromaten zu einer stärkeren Bindung. Vermutlich kann sich der aromatische Rest so besser in der *acceptor binding site* ausrichten. Ligand **59** zeigt mit einer Dissoziationskonstante von 0.16 mM die beste Bindung aller in der vorliegenden Arbeit neu beschriebenen Sialinsäure-C-glycoside. Die R_{max} -Werte liegen mit 85.5 RU (**56**) und 46.9 RU (**59**) im Bereich der Theorie, so dass eine unspezifische Wechselwirkung dieser beiden Liganden ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 4: Einfluß der *para*-Substituenten auf die Bindung

	Verbindung	K_D (mM)
70		11.5
71		5.0
73		0.35
76		3.9

In Tabelle 4 sind C-Glycoside mit zusätzlichen Substituenten am aromatischen Ring aufgeführt. Damit sollte der Einfluß elektronenziehender oder –schiebender Substituenten auf die Bindung untersucht werden. Eine Verbesserung der Bindung wurde nicht erreicht. Verbindung **73** zeigt mit einer hydrophilen Aminogruppe eine ähnlich gute Bindung zum Enzym wie Verbindung **59**, was die Möglichkeit einer rein hydrophoben Grundlage für die Bindung von **59** unwahrscheinlich erscheinen läßt. Der R_{max} -Wert von 141.5 für **73** ist aber schon relativ hoch, so dass von einem Anteil an unspezifischer Wechselwirkung ausgegangen werden muß.

Die ungewöhnlich hohe Dissoziationskonstante der Nitroverbindung **70** (11.5 mM) kann einerseits darauf zurückzuführen sein, dass die Verbindung als *cis/trans*-Gemisch eingesetzt wurde. Da der Anteil des vermutlich schlechter bindenden *cis*-Isomers andererseits aber klein ist (1:10), muß wohl von einer generell schlechteren Bindung des Liganden ausgegangen werden. Der R_{max} -Wert liegt hier bei 303.2 RU, was zusätzlich auf unspezifische Wechselwirkungen schließen läßt.

Ein elektronenreicherer Methoxy-substituierter Aromat wie in Verbindung **71** führt zu einer Bindung in der gleichen Größenordnung wie bei **56** und ist deshalb vermutlich ohne Einfluß auf die Bindung. Auch hier ist der R_{max} -Wert (249.5 RU) wieder relativ hoch, der elektronenreichere Aromat geht also eventuell auch unspezifische Wechselwirkungen mit dem Enzym ein.

Die Acetylierung der aromatischen Aminogruppe führt ebenfalls zu einer schwächeren Bindung (Verbindung **76**). Der R_{\max} -Wert von 75.5 RU liegt aber wieder gut im theoretischen Bereich.

In Tabelle 5 sind verschiedene weitere Liganden aufgeführt, die die Eigenschaften des aus der Kristallstruktur^[58] bekannten aktiven Zentrums des Enzyms durch synthetische Variation am Neuraminsäure-Grundgerüst ausnutzen sollten (siehe Kapitel 2).

Tabelle 5: Andere C-glycosidische Derivate

	Verbindung	K_D (mM)
82		14
95		0.37
99		2.0
105		3.5
20		0.65

Zunächst zeigt sich, dass ein C-glycosidisches Disaccharid-Mimetikum wie Verbindung **82** eher schlecht an die Trans-sialidase bindet. Die Trans-sialidase spaltet und knüpft bekanntermaßen selektiv $\alpha,2$ -3-Sialylgalactoside.^[50] Auch von Itzstein berichtet, dass ein 6'-Sialyl-methylactosid von der Trans-sialidase nicht umgesetzt wird.^[78] Die schlechtere Bindung des $\alpha,2$ -6-Sialylgalactose-Mimetikums gegenüber den Verbindungen **56**, **59** und **73** läßt vermuten, dass der Kohlenhydratrest des natürlichen Substrates in ein komplexes System von Wasserstoffbrückenbindungen eingebunden ist, das durch die falsche Konfiguration gestört wird. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Messung eines C-glycosidischen $\alpha,2$ -3-Mimetikums, das aber synthetisch über die hier angewandte Methode nicht darstellbar

war (siehe Kapitel 4.4.5). Dieses würde aufgrund seiner Ähnlichkeit mit dem natürlichen Substrat sehr wahrscheinlich stärker binden. Eine ähnliche Abschwächung der Bindung eines α ,2-6-Sialylgalactose-Analogons, das eine Phosphonatgruppe enthielt, im Vergleich mit dem α ,2-3-Isomer wurde von Streicher *et al.*^[82,83] beobachtet. Auch der R_{\max} -Wert von 470.5 RU spricht eher für einen großen Anteil unspezifischer Wechselwirkungen.

Eine erstaunlich gute Bindung zeigt Ligand **95**, der sich vom nicht-bindenden Liganden **42** nur durch die *O*-Benzyl-Gruppe an Position 9 unterscheidet. Diese war dazu gedacht, eine Wechselwirkung mit Trp₁₂₀ des Enzyms einzugehen (siehe Kapitel 4.1.2 und Abbildung 27). Eine Arbeit aus der Gruppe von Withers^[84] legt jedoch nahe, dass die Bindung des aromatischen Restes an der 9-Position sehr wahrscheinlich auch in der *acceptor binding site* lokalisiert ist. Withers *et al.* konnten dies in ihrem Fall durch Röntgenstrukturanalyse bestätigen. Dafür spricht auch, dass Ligand **99** mit zwei aromatische Resten nicht besser bindet als Ligand **56** mit nur einem aromatischen Rest, was bei einer zusätzlichen Wechselwirkung zu erwarten wäre. Die R_{\max} -Werte liegen hier bei 175.5 RU (**95**) und 282.1 RU (**99**). Damit kann bei beiden Liganden ein Anteil von unspezifischer Bindung vermutet werden, der bei **99** durch zwei aromatische Reste auch erwartungsgemäß höher ist.

Eine zusätzliche Carboxylgruppe in Ligand **105** wird toleriert, führt aber zu einer Abschwächung der Bindung. Die Einführung der zusätzlichen Carboxylgruppe war der Tatsache geschuldet, dass im aktiven Zentrum des Enzyms mehrere Arginin-Seitenketten für Wasserstoff-Brückenbindungen verantwortlich sind, unter anderem auch zur 4-OH-Gruppe (siehe Kapitel 4.1.3 und Abbildung 29). Eventuell ist der sterische Anspruch des Substituenten an der 4-Position in **105** bereits zu groß. Der R_{\max} -Wert liegt aber auch hier mit 235.6 RU relativ hoch, so dass auch unspezifische Wechselwirkungen eventuell mit basischen Epitopen im Enzym eine Rolle spielen könnten.

Als Referenz-Substanz dieser neuen Liganden ist das bekannte Glycal der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac2en, **20**) unter den gleichen Bedingungen untersucht worden. Das Glycal **20** ist ein bekannter Inhibitor viraler und bakterieller Sialidasen,^[81] zeigt aber nur schwache inhibitorische Wirkung gegenüber TcTS.^[62,85] Da der Mechanismus der Trans-sialidase ähnlich dem der Sialidasen ist,^[57,58] ist **20** auch als Übergangszustands-Analogon der Trans-sialidase anzusehen und sollte daher eine Affinität zu dem immobilisierten Enzym zeigen. Die Dissoziationskonstante liegt im submillimolaren Bereich und damit in der gleichen Größenordnung wie die besten hier gezeigten Liganden **59**, **73** und **95**. Der R_{\max} -Wert ist erstaunlich niedrig (6.3 RU), was auf eine unterdurchschnittliche Belegung der Bindungsstellen schließen lässt. Da die RU-Antworten beim Gleichgewicht von

Assoziations- und Dissoziationsrate gemessen werden, kann die geringe Belegung der Bindungsstellen auf eine hohe Dissoziationsgeschwindigkeit des Liganden **20** hindeuten, womit auch die geringe inhibitorische Wirkung von **20** erklärbar ist. Die Inhibitionskonstante des Glycals **20** in der Literatur liegt bei 12.3 mM und ist damit relativ schwach.^[45]

Es kann vermutet werden, dass die hier gemessenen Affinitäten im millimolaren Bereich noch nicht ausreichend für eine Inhibition der Trans-sialidase sind. Zusätzlich zu diesen thermodynamischen Größen, die eine Affinität zur Trans-sialidase belegen, müssen deshalb kinetische Messungen zeigen, ob die Bindung an das Protein auch eine Inhibition oder Modulation der enzymatischen Aktivität mit sich bringt.

5.2 Reaktionsverfolgung der Trans-sialylierung mittels NMR-Spektroskopie

5.2.1 Die Methode

Wenn man die durch TcTS katalysierte Reaktion des *para*-Nitrophenylglycosids der Neuraminsäure (**15**) mit Methyl- α -allolactosid **16** im ¹H-NMR-Spektrum betrachtet, sieht man einen deutlichen Unterschied zwischen den Signalen des gebundenen und des freien *para*-Nitrophenols (Abbildung 80). Durch Integration der Signale kann das Verhältnis bestimmt werden. Die Hydrolyse von **15** kann wegen der bereits besprochenen Selektivität der enzymatischen Reaktion in Gegenwart eines Akzeptors vernachlässigt werden.^[50] Die enzymatische Reaktion wird in D₂O durchgeführt. Das Enzym und der Puffer (TRIS-HCl, 100 mM, pH = 7.46) wurden dafür gefriergetrocknet und in D₂O aufgenommen. Mit dieser Methode wurden von A. Schroven die relativen Transfer-Raten an der 5-Position unterschiedlich acylierter Derivate von **15** bestimmt.^[68]

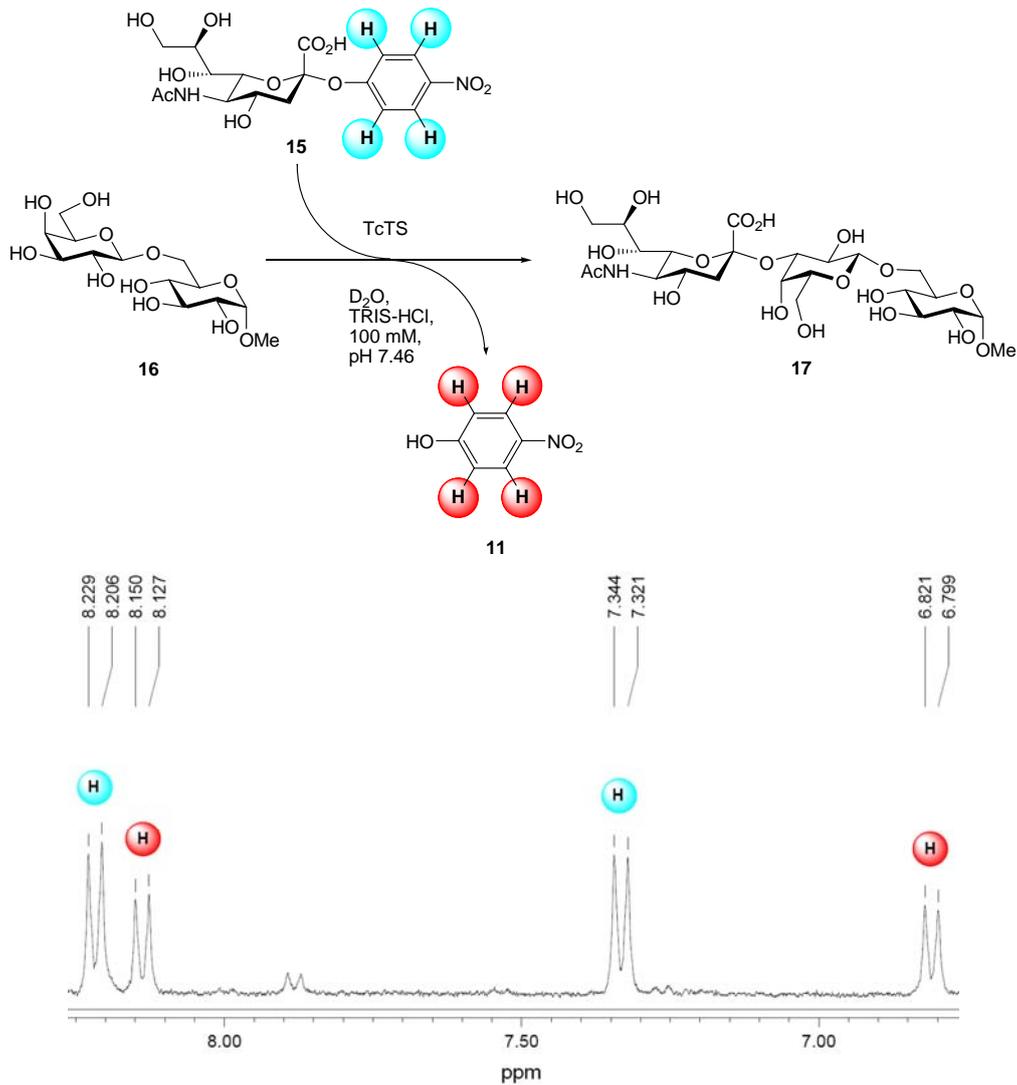


Abbildung 80: NMR-spektroskopische Verfolgung der enzymatischen Reaktion in D₂O

Ein Nachteil ist hier die nur bedingte Vergleichbarkeit der so gewonnenen Ergebnisse mit natürlichen Bedingungen. Die enzymatische Reaktion läuft einerseits viel langsamer ab als in Wasser und mit z. B. 3'-Sialyl-Lactose als Donor (siehe auch Kapitel 5.3). Das trägt andererseits aber zum Vorteil bei, dass die wiederholte Probennahme zeitlich gedehnt wird und damit der Messaufwand für die einzelnen Werte dem der normalen Spektrenaufnahme im Rahmen der Charakterisierung von Syntheseprodukten entspricht. Bisherige NMR-spektroskopische Messungen dieser Art wurden immer direkt im Probenröhrchen mittels wiederholter Spektrenaufnahme durchgeführt.^[67,77,78]

5.2.2 Synthese des Donors für die Trans-sialylierung

Der Donor für die Reaktionsverfolgung per NMR kann leicht durch Phasentransfer-Katalyse aus dem Chlorid **34** erhalten werden (Abbildung 81).^[172] Anschließende Deacetylierung und Verseifung liefert den Donor **15**.

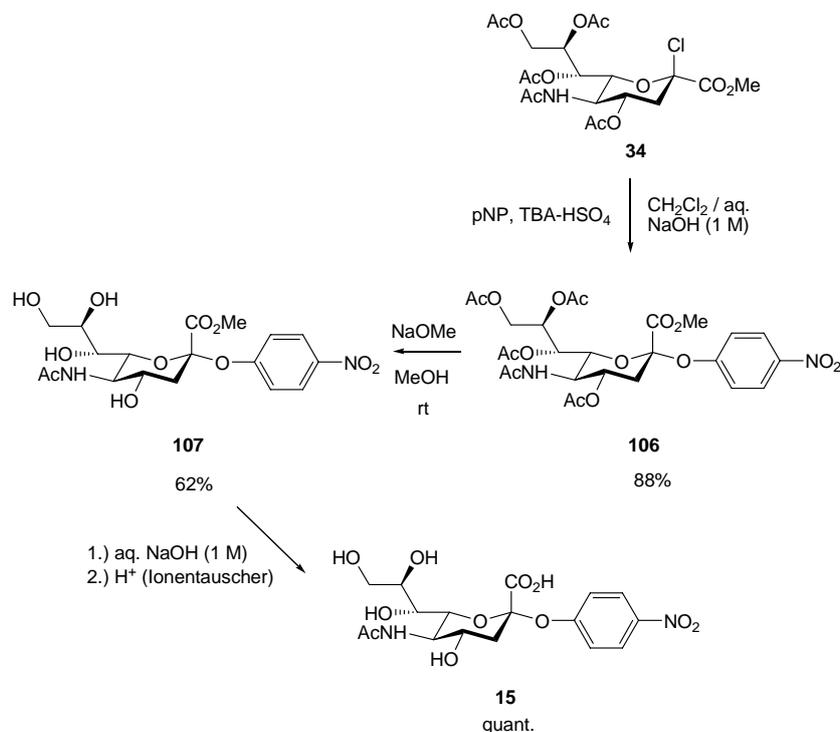


Abbildung 81: Synthese des *para*-Nitrophenol-sialosids **15**

Der Donor **15** ist im festen Zustand unter Ausschluß von Feuchtigkeit stabil, zersetzt sich jedoch in Lösung nach einigen Tagen. Die Lösung sollte daher frisch angesetzt werden.

5.2.3 Reaktionsverfolgung mit und ohne Zusatz von Ligand **59**

Die Verbindung **59** zeigte in den SPR-Messungen die beste Affinität zur Trans-sialidase. Daher wurde die Reaktionsverfolgung durch NMR einmal in Abwesenheit dieser Verbindung und einmal in Gegenwart einer 1 millimolaren Konzentration von **59** durchgeführt.

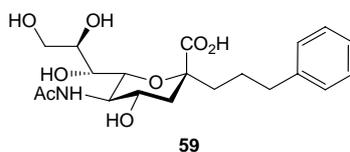


Abbildung 82: Der Ligand mit der besten Affinität aus den SPR-Messungen

In Abbildung 83 ist zu sehen, dass die Reaktion durch den Liganden signifikant beeinträchtigt wird. Sie läuft zwar immer noch ab, aber mit verminderter Geschwindigkeit. Dabei ist der Einfluß am Anfang des beobachteten Zeitraum am größten: zum Zeitpunkt $t = 10$ min beträgt die Inhibition (Verminderung der Aktivität von TcTS) ca. 44%. Mit zunehmender Zeit nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit aufgrund geringerer Substratkonzentration ab, und der Einfluß fällt weniger stark ins Gewicht.

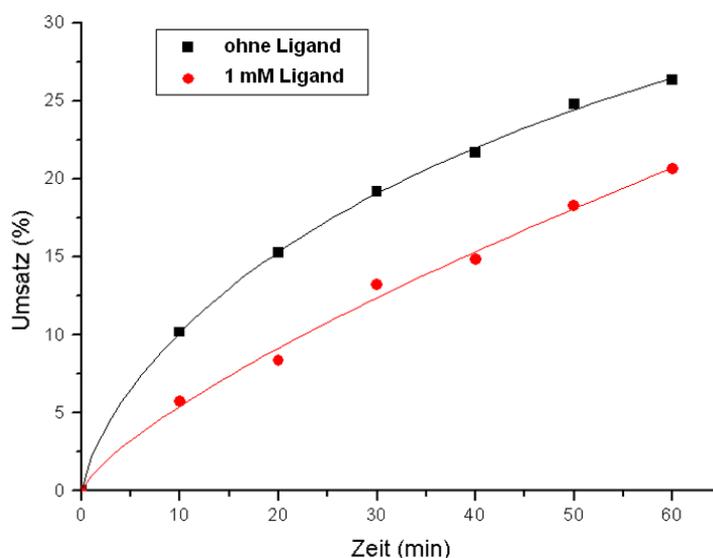


Abbildung 83: NMR-spektroskopische Reaktionsverfolgung der enzymatischen Reaktion unter Zusatz von Verbindung 59

Die Konzentrationen von Donor **15** (25 mM) und Akzeptor **16** (35 mM) sind dabei weit höher als die von **59** (1 mM) so dass aus dieser Beobachtung auf eine stärkere Bindung von **59** im Vergleich zu **15** geschlossen werden kann. Da die Reaktion, die dieser Messung zu Grunde liegt, aber vermutlich sensibler auf Störungen reagiert als die natürliche Reaktion von TcTS (**15** ist ein schlechterer Donor als 3'-Sialyllactose^[50]), kann aufgrund dieser Messung auch vermutet werden, dass eine Inhibition der natürlichen Reaktion von TcTS durch diesen Liganden in geringen Konzentrationen eher insignifikant ausfällt.

5.3 Messung des Umsatzes durch HPLC

5.3.1 Verwendung von Benzylgalactosid als Akzeptor

Der Umsatz der Transglycosylierung kann auch durch HPLC (*high performance liquid chromatography*) gemessen werden. Hier kann eine den *in vivo* auftretenden Reaktionen ähnlichere Substratkombination verwendet werden. Als Donor wird 3'-Sialyllactose verwendet, als Akzeptor ein β -Galactosid, das ein für den UV-Detektor der HPLC-Anlage geeignetes Chromophor trägt. Die ersten Versuche wurden mit dem einfachen Benzylgalactosid unternommen. Das Enzym überträgt die Neuraminsäure auf das Benzylgalactosid. Im Chromatogramm werden Akzeptor (Benzylgalactopyranosid) und Produkt (Benzyl-3-sialyl-galactopyranosid) detektiert. Die Verhältnisse werden durch Integration bestimmt.

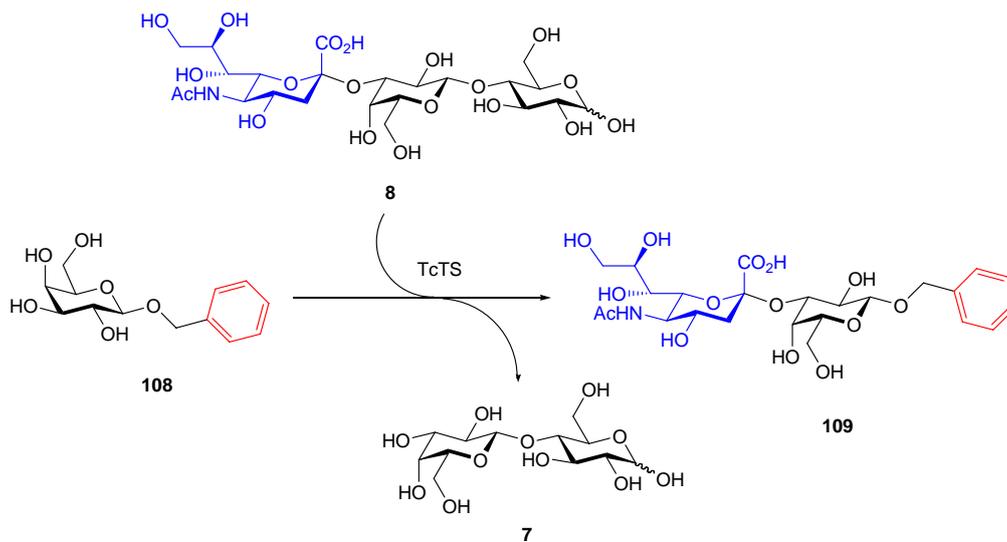


Abbildung 84: Enzymatische Reaktion für die HPLC-Messung mit Benzylgalactosid als Akzeptor

Die Synthese der Edukte erfolgte im Fall des Benzylgalactosids durch eine Bortrifluorid-katalysierte Glycosylierung ausgehend vom β -D-Galactose-peracetat. Die Ausbeuten wurde nicht optimiert, da es sich um leicht zu synthetisierende literaturbekannte Edukte handelt.

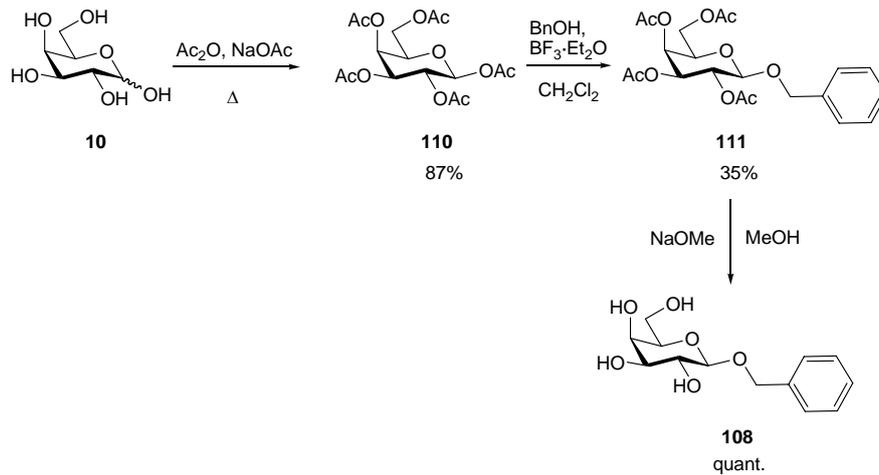


Abbildung 85: Synthese von Benzyl-β-D-galactopyranosid

Im Falle der 3'-Sialyllactose wurde die enzymatische Synthese mit der Trans-sialidase angewendet. Der Donor **15** wurde hier mit Lactose umgesetzt. Durch Größenausschlußchromatographie läßt sich das Trisaccharid von der Lactose trennen. Die Ausbeute betrug 58%.

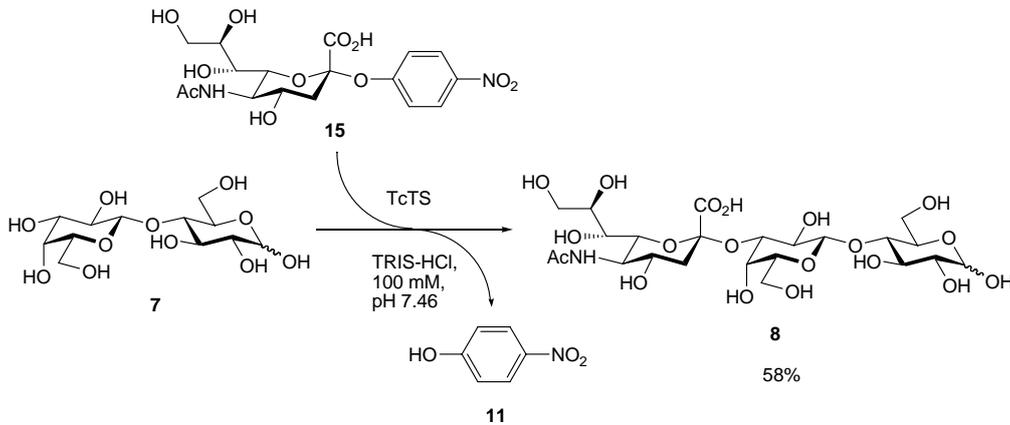


Abbildung 86: Enzymatische Synthese von 3'-Sialyllactose

Zur Überprüfung der Retentionszeiten von Akzeptor und Produkt in der HPLC-Messung wurde auch Benzylgalactosid enzymatisch sialyliert. Die Ausbeute betrug hier 67%, womit auch gleichzeitig gezeigt werden konnte, dass das Benzylgalactosid **108** vom Enzym als Akzeptor erkannt wird.

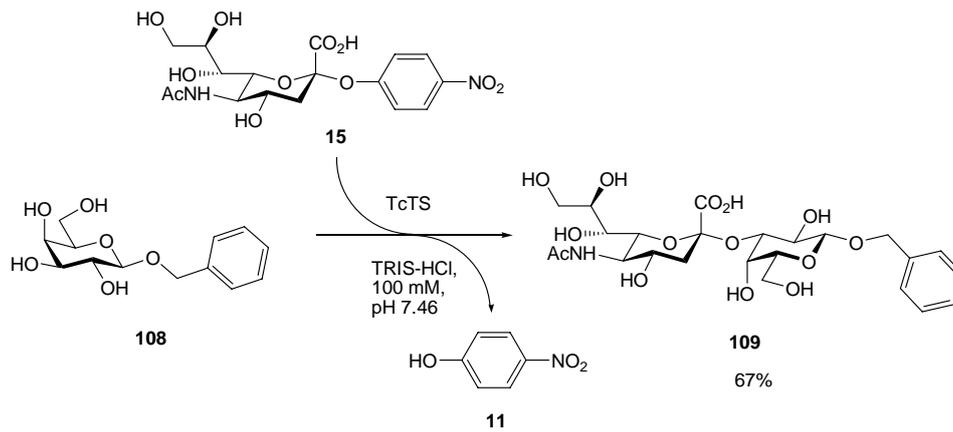


Abbildung 87: Enzymatische Synthese von Benzyl-3-sialyl-β-D-galactopyranosid

Die Retentionszeiten von Akzeptor und Produkt wurden einzeln und gemeinsam bestimmt. In diesen HPLC-Läufen wurden gleichzeitig die Bedingungen für die Trennung optimiert.

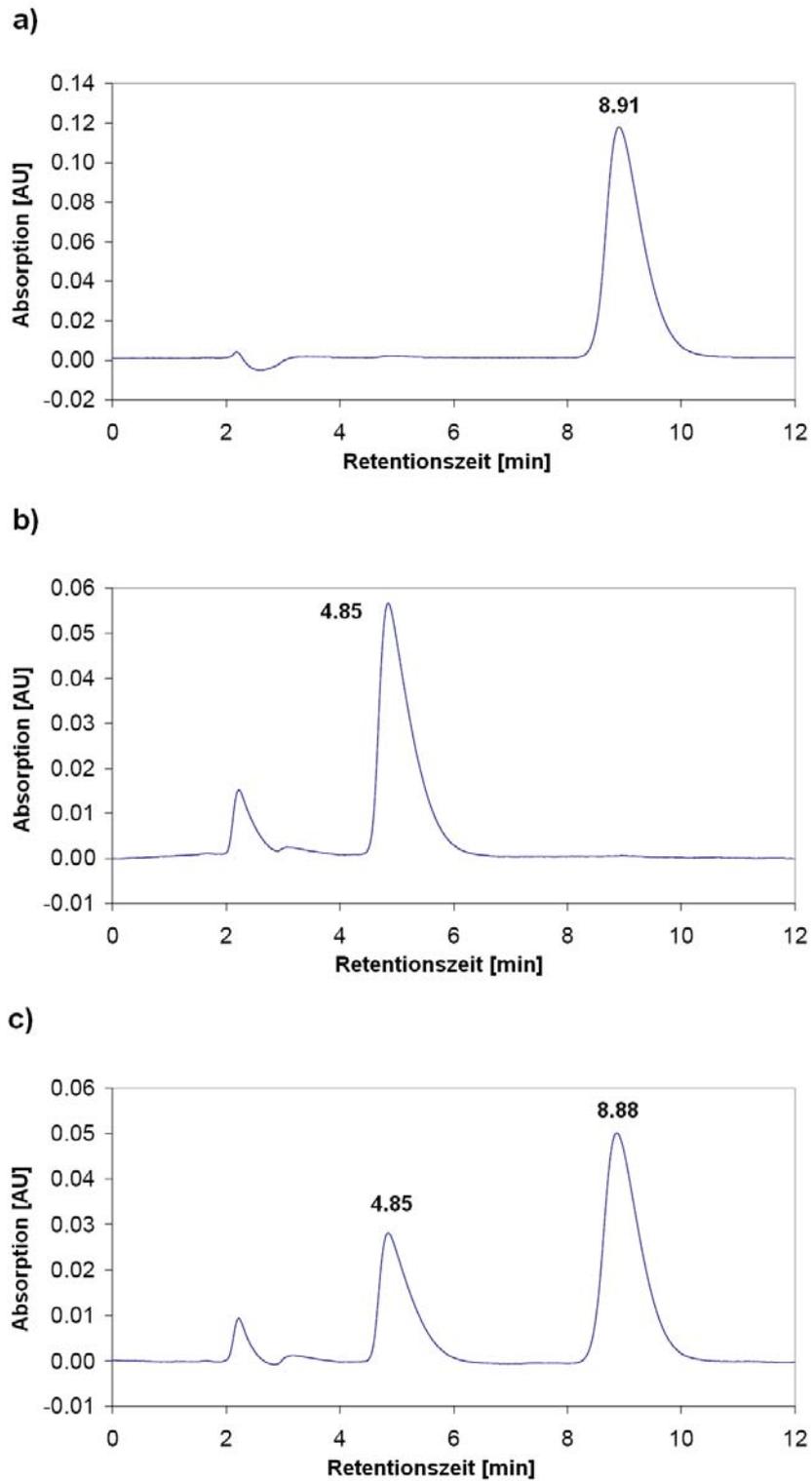


Abbildung 88: HPLC-Chromatogramme mit Retentionszeiten von Akzeptor (a), Produkt (b), und einem Akzeptor/Produkt-Gemisch (c); Absorption bei 200 nm

5.3.2 Verwendung von Methylumbelliferylgalactosid als Akzeptor

Da die zur Messung herangezogene UV-Absorption des Benzylgalactosids bei einer Wellenlänge von 200 nm liegt, ein Bereich, in dem das Signal-Rausch-Verhältnis durch signifikante Absorption eines Laufmittelbestandteils (Acetonitril) ungünstig ist und außerdem die *N*-Acetylgruppe der Neuraminsäure bereits Absorption zeigt, wurde das Benzylgalactosid durch Methylumbelliferylgalactosid (MuGal) ersetzt. Dieses hat ein Absorptionsmaximum bei ca. 318 nm und interferiert daher mit keinem anderen Chromophor im beschriebenen Versuchsaufbau.

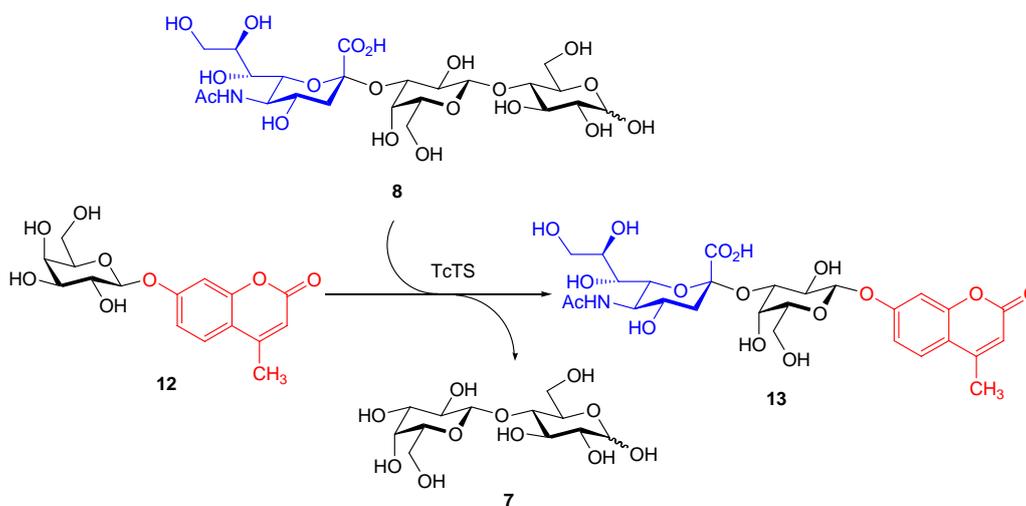


Abbildung 89: Enzymatische Reaktion für die HPLC-Messung mit MuGal als Akzeptor

Die Synthese des Akzeptors **12** erfolgte hier aus der Acetobromgalactose **112**, die nach Strachan *et al.*^[173] unter basischen Bedingungen mit der phenolischen Hydroxylgruppe des 4-Methylumbelliferons umgesetzt wurde.

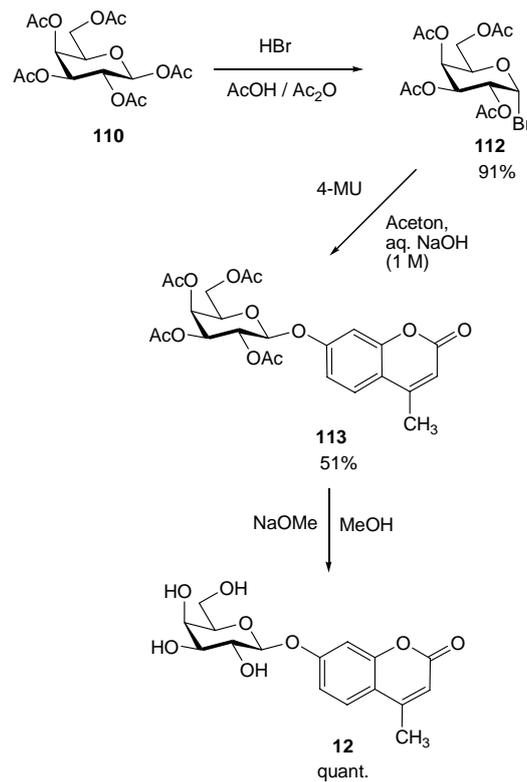


Abbildung 90: Synthese von 4-Methylumbelliferyl-β-D-galactopyranosid (MuGal)

Die Retentionszeiten von Akzeptor und Produkt sind hier (nach minimaler Änderung des Laufmittelverhältnisses) ähnlich wie bei der Verwendung von Benzylgalactosid.

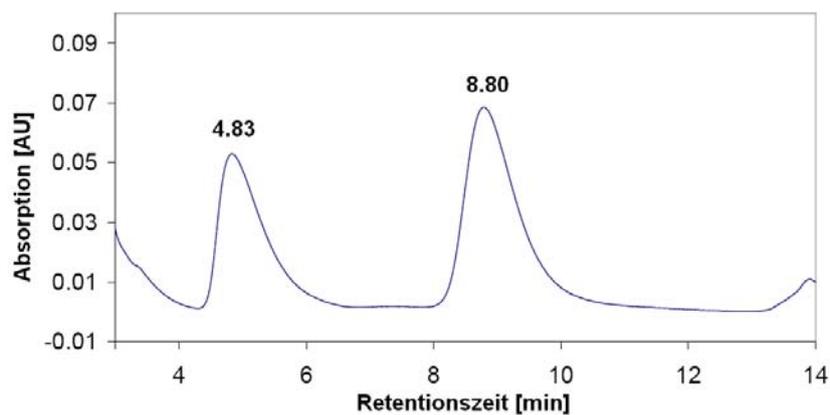


Abbildung 91: HPLC-Chromatogramm eines Reaktionsgemisches bei der Verwendung von Methylumbelliferylgalactosid als Akzeptor; Absorption bei 318 nm

Im Unterschied zur Reaktionsverfolgung per NMR (Kapitel 5.2) verlaufen die hier beschriebenen Reaktionen viel schneller. Daher kann realistischerweise nur das Verhältnis Akzeptor/Produkt zu einer bestimmten Zeit gemessen, und nicht die Produktbildung mit der

Zeit beobachtet werden. Bei Verwendung von verschiedenen Mengen Enzymlösung und der Messung des Umsatzes nach 20 Minuten ergibt sich eine Sättigungskurve, die sich ungefähr einem Akzeptor/Produkt-Verhältnis von 50% annähert (siehe Abbildung 92). Es handelt sich in diesem wie auch im natürlichen Fall um eine Gleichgewichtsreaktion, so dass das Produkt auch wieder Donor ist und die 3'-Sialyllactose zurückgebildet wird.

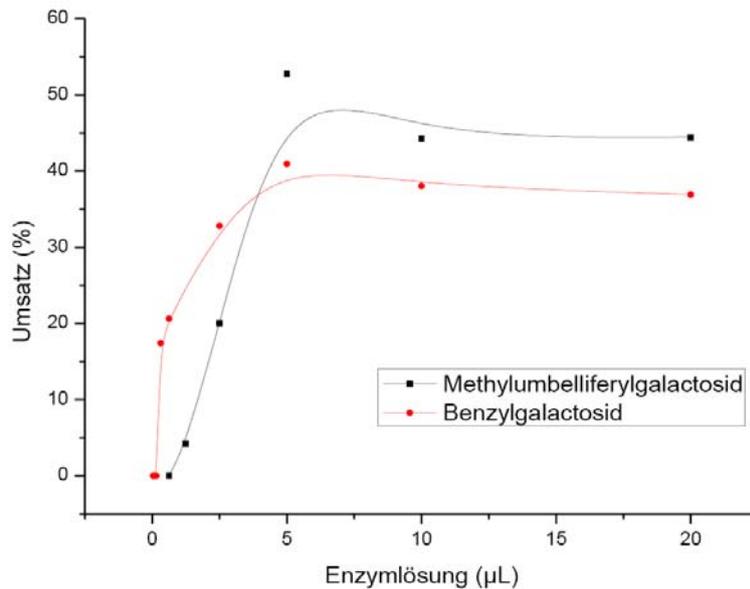


Abbildung 92: Umsatz bei variiertem Enzymvolumen; Reaktionszeit 20 min

Der geringere Umsatz bei kleinen Mengen Enzymlösung eröffnet aber die Möglichkeit, über Akzeptor/Produkt-Verhältnisse nach bestimmter Reaktionszeit bei variierten Ligand-Konzentrationen IC_{50} -Werte zu bestimmen. Um dies experimentell zu bestätigen, wurde Kupfersulfat als unspezifischer Inhibitor^[71] mit dem HPLC-Verfahren getestet. Es wurde eine Enzymmenge von 5 µL (0.9 mg/mL) gewählt, weil dort der Beginn der Sättigung in beiden Kurven lag.

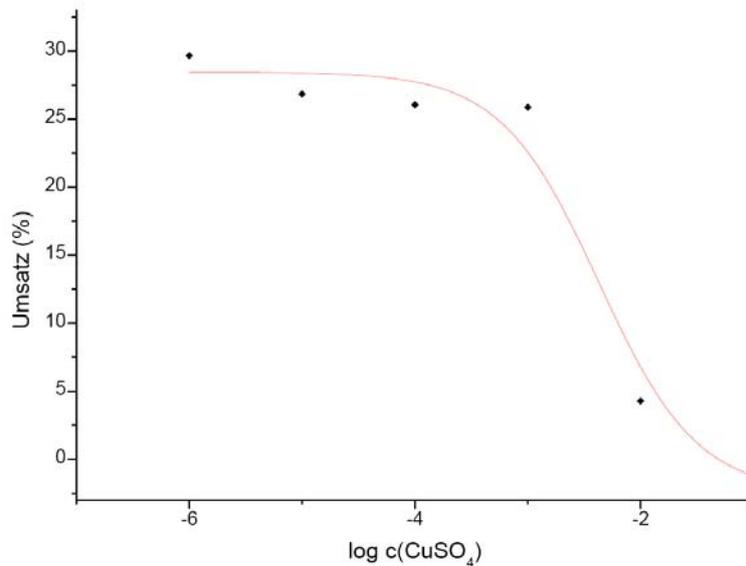


Abbildung 93: Inhibition der Trans-sialidase durch Kupfersulfat

Die in der Literatur beschriebene Inhibition bei einer Konzentration von 1 mM,^[71] die über ein ähnliches HPLC-basiertes Verfahren erhalten wurde, tritt bei dieser Messung erst bei etwa 10 mM ein. Ein Grund dafür ist der hier verwendete Puffer (TRIS-HCl, 100 mM, pH 7.46), der das Kupfer komplexiert und damit für eine geringere effektive Konzentration sorgt. Komplexe der TRIS-Base mit Kupferionen sind in der Literatur bekannt.^[174,175] Ein Kurven-Fit (Abbildung 93) liefert hier einen IC₅₀-Wert von 4.3 mM. Die Abhängigkeit dieses Wertes vom verwendeten Puffer zeigt, dass IC₅₀-Werte immer vom jeweiligen Versuchsaufbau abhängig sind.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Methylumbelliferylgalactosid als Akzeptor ist, dass die Reaktion dieselbe ist wie bei dem Fluoreszenz-basierten Assay von Schauer *et al.*,^[72] wodurch das hier beschriebene Verfahren durch eine weitere Methode evaluiert werden kann. Im Gegensatz zum fluorimetrischen Assay entfällt hier die vorher notwendige Trennung der Reaktionsprodukte über Ionenaustauschchromatographie sowie die Hydrolyse des Methylumbelliferylgalactosids. Dafür muß man allerdings eine geringere Empfindlichkeit der Methode in Kauf nehmen. Außerdem sind die Fehler der Einzelmessungen relativ groß, was eventuell durch Optimierung der Bedingungen verbessert werden kann.

6 Zusammenfassung

Die Trans-sialidase aus *Trypanosoma cruzi* (TcTS) ist ein Schlüsselenzym in der Pathogenese der südamerikanischen Trypanomiasis, der Chagas-Krankheit. Mithilfe dieses Enzyms übertragen die Erreger der Krankheit Sialinsäurereste von Wirtszellen auf ihre eigenen Zelloberflächenglycane. Dieser Vorgang ist für die Zellinvasion der Trypanosomen unerlässlich, weshalb TcTS ein geeigneter Ansatzpunkt für die Entwicklung von neuen Therapien für die Chagas-Krankheit ist.

In dieser Arbeit wurden aufgrund der bekannten Kristallstruktur von TcTS im Komplex mit 3'-Sialyllactose neue C-glycosidische N-Acetylneuraminsäurederivate als potentielle Inhibitoren bzw. Modulatoren der Enzymaktivität synthetisiert. Dabei spielte vor allem die Tatsache eine Rolle, dass die gegenüber der Hydrolyse von Sialosiden bevorzugte Trans-sialylierung bei TcTS auf das Vorhandensein einer aus zwei aromatischen Aminosäuren gebildeten Bindungsstelle für das Akzeptorsubstrat (*acceptor binding site*) zurückzuführen ist. Die Bindung an die *acceptor binding site* wurde in den neu synthetisierten Liganden durch aromatische Reste bewerkstelligt, die durch π -Wechselwirkungen die hydrophobe Interaktion der Galactoside mit den aromatischen Aminosäuren mimikrieren sollten. Dafür spielte als Synthese-Methode vor allem die Ruthenium-katalysierte Kreuzmetathese von Allyl-C-glycosiden mit Styrol-Derivaten aber auch mit olefinischen Kohlenhydratresten eine Rolle.

SPR-Bindungsstudien bestätigten die Wirksamkeit dieser Konzeption: Die Anwesenheit eines aromatischen Restes im C-Glycosid der N-Acetylneuraminsäure führt zu einer millimolaren Dissoziationskonstante, während das α -Allyl-C-glycosid ohne aromatischen Rest nicht bindet. Dabei ist die Flexibilität des Linkers von Bedeutung, da durch die Sättigung einer Doppelbindung eine Verbindung erreicht wurde, die die beste Bindung in dieser Arbeit zeigte ($K_D = 0.16$ mM). Weitere Derivatisierungen sowie Substituenten am aromatischen Rest konnten die Eigenschaften der Liganden nicht verbessern. Die Affinitäten liegen aber im Bereich der bisher bekannten Inhibitoren bzw. Substratanaloga von TcTS.

Eine NMR-basierte Reaktionsverfolgung der TcTS-katalysierten Sialylierung von Methylallolactosid mit *p*-Nitrophenylsialosid (pNP-Neu5Ac) zeigte den Einfluß des Liganden mit der höchsten Affinität auf die enzymatische Aktivität: eine 1 millimolare Konzentration des Liganden führte zu einer Verminderung der enzymatischen Aktivität von 44%. Dieses Ergebnis ist ebenfalls vergleichbar mit den besten bisher beschriebenen Inhibitoren von TcTS.

Die neue Struktur der Liganden und die mit guten Ausbeuten in wenigen Schritten durchführbare Synthese bietet einen Ansatz für weitere Untersuchungen. Insbesondere mit der Kreuzmetathese ist durch die Verwendung unterschiedlicher ungesättigter Reaktionspartner der Aufbau von Liganden-Bibliotheken möglich. Dabei kann die Verbesserung der Bindungseigenschaften und die Inhibition von TcTS ein Gesichtspunkt für weitere Untersuchungen sein. Wie die Synthese eines C-glycosidischen α ,2-6-Sialyllactose-Analogons in dieser Arbeit zeigt, ist die Anwendung der gezeigten Syntheseroute auf die Entwicklung von Liganden für andere Targets aber ohne weiteres möglich.

7 Summary

The trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* (TcTS) is a key enzyme in the pathogenesis of the South American trypanomiasis, Chagas disease. Utilizing this enzyme the pathogen transfers sialic acid from host cells to its own cell surface glycans. This process is essential for host cell invasion, thus TcTS is a convenient target for the development of new treatments for Chagas disease.

In this thesis new *C*-glycosidic derivatives of sialic acid were synthesized as potential inhibitors or modulators of enzyme activity, based on the known crystal structure of TcTS in complex with sialyl lactose. The main goal was to address the acceptor binding site, composed of two aromatic amino acid residues. This site is responsible for the trans-sialylation reaction in preference to simple hydrolysis of sialosides. Binding to the acceptor binding site was accomplished by including aromatic residues in the newly synthesized ligands. These residues should mimic the hydrophobic interaction between galactosides and the aromatic amino acid side chains by enabling aromatic π -stacking. The synthetic method of choice was primarily the ruthenium catalyzed cross metathesis of allyl *C*-glycosides with derivatives of styrene and sugar olefins.

Binding studies by SPR confirmed the efficacy of this approach: presence of an aromatic residue in the *C*-sialoside resulted in a millimolar dissociation constant whereas the α -allyl *C*-sialoside lacking an aromatic residue exhibited no binding at all. In addition, the flexibility of the linker region is of importance. Saturation of the double bond leads to compounds showing the highest affinity within this thesis ($K_D = 0.16$ mM). Further derivatisation as well as the addition of substituents to the aromatic residues were unsuccessful in terms of increasing ligand binding. However, the measured affinities were within the range of known inhibitors and substrate analogues, respectively.

A NMR based measurement of substrate conversion applying the TcTS catalyzed reaction of *p*-nitrophenyl sialoside with methyl allolactoside revealed the influence of the best ligand on enzymatic activity: presence of the ligand (1 mM) in the reaction mixture resulted in a 44% loss of enzyme activity. This result can compare with that obtained by previously reported inhibitors.

The new design of ligands and the facile synthesis featuring high yields in few steps present an attractive perspective for further investigations. Establishing a ligand library by applying the cross metathesis protocol to a variety of unsaturated reagents could be a straightforward

attempt to optimize ligands and find low concentration inhibitors for TcTS. As shown by the synthesis of a *C*-glycosidically linked α ,2-6-sialyl lactose analogue, the application of the synthetic pathway to the development of ligands for targets other than TcTS is also a promising task.

8 Experimenteller Teil

8.1 Methoden und Geräte

Kommerziell erhältliche Substanzen wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Lösungsmittel wurden, falls erforderlich, nach Standardvorschriften getrocknet.

8.1.1 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden kieselgelbeschichtete Aluminiumfolien (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck 5554) benutzt. Diese wurden auf ca. 10 cm Länge zugeschnitten. Die Entwicklung erfolgte in DC-Kammern von 12 x 12 x 5 cm Größe, befüllt mit jeweils 10 mL des angegebenen Laufmittelgemisches.

Die Substanzflecken wurden entweder unter UV-Licht (254 nm) oder durch Besprühen der Chromatogramme mit 10%iger Schwefelsäurelösung in Ethanol und anschließende Wärmebehandlung sichtbar gemacht.

8.1.2 Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (230-400 mesh, 40-63 µm) der Firma Merck benutzt.

8.1.3 NMR-Spektroskopie

¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur auf folgenden Geräten gemessen:

Bruker AMX-400 (400.14 MHz für ¹H-Spektren, 100.62 MHz für ¹³C-Spektren)

Bruker AV-400 (400.25 MHz, für ¹H-Spektren, 100.65 MHz für ¹³C-Spektren)

Bruker AV-2400 (400.13 MHz, für ¹H-Spektren, 100.61 MHz für ¹³C-Spektren)

Bruker DRX-500 (500.13 MHz für ¹H-Spektren, 125.76 MHz für ¹³C-Spektren)

Zur Vereinfachung wird in der Charakterisierung die Messfrequenz ohne Nachkommastellen angegeben.

Die chemischen Verschiebungen wurden auf Lösungsmittelrestsignale kalibriert.^[176] Die Zuordnung der Signale erfolgte durch 2D-Spektren (H,H-COSY, HSQC, HMBC und NOESY).

8.1.4 Polarimetrie

Die optische Rotation von enantiomerenreinen Verbindungen wurde bei Raumtemperatur auf folgenden Geräten gemessen:

Perkin Elmer 341 (546 nm, „grüne“ Hg-Linie)

Krüss Optronic P8000 (589 nm, Na-D-Linie)

8.1.5 Massenspektrometrie

MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einem Bruker Biflex III mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure oder 1,8,9-Trihydroxyanthracen als Matrizes im *positive reflector mode* gemessen (N₂-Laser, 337 nm).

ESI-Massenspektren wurden auf einem Thermo Finnigan MAT 95 XL Massenspektrometer oder einem Agilent-6224-TOF ESI/MS gemessen.

FAB-Massenspektren wurden auf einem doppeltfokussierenden Spektrometer VG/70-250 F der Firma VG Analytical gemessen. Als Matrix wurde *m*-Nitrobenzylalkohol verwendet.

EI-Massenspektren wurden an einem MS MAT 311A der Firma Varian MAT gemessen.

8.1.6 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Die Messungen der Affinität der synthetisierten Liganden zum immobilisierten Enzym (TcTS) wurden mit einem BIACORE T100 Gerät durchgeführt. Zur Immobilisierung diente ein kommerziell erhältlicher CM5-Sensor-Chip.

Die Auswertung erfolgte mit der Biacore T100 Evaluation Software, Version 1.1.1.

8.1.7 HPLC

Für die HPLC-Messungen wurde eine Merck LiChroCART[®] 250-4 HPLC-Cartridge mit LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 µm) als stationäre Phase benutzt.

Folgende Geräte wurden verwendet:

- Merck Hitachi L-7100 HPLC Pump
- Merck Hitachi L-7455 Diode Array Detector
- Merck Hitachi D-7000 Interface Module (Schnittstelle zum PC)

Verwendete Eluentien waren:

- A: Acetonitril
- B: wäßrige NaH_2PO_4 -Lösung (15 mM)
- C: bidest. Wasser

Die Auswertung fand mit dem Programm D-7000 HSM, Version 3.0 (Steuerungs- und Auswertungssoftware) auf einem PC mit dem Betriebssystem Windows NT 4.0 statt.

8.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

8.2.1 AAV 1: Acetylierung mit Acetanhydrid

Das Edukt wurde in Pyridin/Acetanhydrid 2:1 gelöst und bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz gerührt (DC-Kontrolle). Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand einige Male mit Toluol coevaporiert.

8.2.2 AAV 2: Deacetylierung nach Zemlén^[177,178]

Das Edukt wurde in trockenem Methanol gelöst und bis pH \approx 10 tropfenweise mit einer 1 molaren Natriummethanolatlösung in trockenem Methanol versetzt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz gerührt (DC-Kontrolle) und anschließend mit Dowex 50X8 (H⁺) oder Amberlite IR-120 (H⁺) neutralisiert. Nach Abfiltrieren des Ionentauschers wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

8.2.3 AAV 3: Verseifung des Methylesters der Neuraminsäurederivate

Das Edukt wurde in 0.1 molarer Natronlauge gelöst und bis zum vollständigen Umsatz (DC-Kontrolle) bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit Dowex 50X8 (H⁺) neutralisiert, der Ionentauscher abfiltriert und die Lösung gefriergetrocknet.

8.2.4 AAV 4: Kreuzmetathese

Die Reaktion wurde unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluß unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

Das Edukt wurde in soviel absolutem Dichlormethan gelöst, dass eine 2 mM Lösung resultierte. Nach Zugabe eines 8-10fachen Überschusses des Reaktionspartners und der jeweils angegebenen Menge des Rutheniumkatalysators wurde die Lösung bei Raumtemperatur oder unter Rückfluß für 24 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Toluol mit Aceton-Gradient oder Ethylacetat).

8.2.5 AAV 5: Hydrierung

Das Edukt wurde in Methanol gelöst, die Lösung durch Anlegen eines Vakuums entgast und der Kolben mit Stickstoff geflutet. Nach Zugabe einer Spatelspitze Palladium auf Aktivkohle (5%, wassernass) wurde die Lösung erneut entgast und der Kolben mit Wasserstoff aus einem Ballon geflutet. Die Reaktion wurde bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

8.2.6 AAV 6: Chemoenzymatische Synthese von 3'-Sialyllactose (8) zur Überprüfung der Enzymaktivität mittel DC

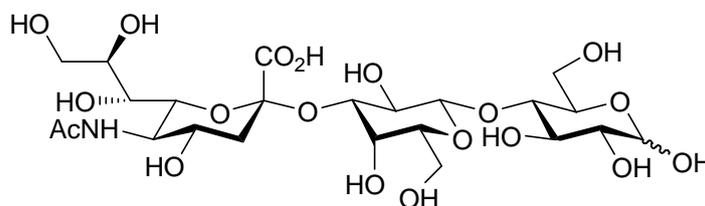
Es wurden ca. 25 μmol **15** und 35 μmol **7** im Eppendorf Tube in 1 mL Tris-HCl Puffer (100 mM, pH 7.46) gelöst und mit einer Lösung von ca. 70 μg TcTS (Volumen je nach Konzentration der Lösung) versetzt. Die Lösung wurde bei 23 °C für 24 h im Thermomixer geschüttelt (eppendorf Thermomixer comfort, 900 rpm). Die Anwesenheit des Produkts **8** wurde dünnschichtchromatographisch überprüft (R_f -Werte: 0.16 (**8**), 0.34 (**7**), 0.57 (**15**); Laufmittel: BuOH/AcOH/H₂O 5:2:2).

8.3 Synthesen der einzelnen Verbindungen

8.3.1 Literaturbekannte Substanzen

Die Verbindungen **12**,^[173] **15**,^[172] **63**,^[144] **64**,^[179] **77**,^[180] **78** und **79**,^[181] **85**,^[180] **86** und **87**,^[182] **89**,^[183] **106** und **107**,^[172] **108**,^[184] **110**,^[185] **111**,^[184] **112**^[186] und **113**^[173] wurden wie in Kapitel 4 und Kapitel 5 beschrieben dargestellt. Die analytischen Daten entsprachen den Literaturdaten in den zitierten Publikationen.

8.3.2 3'-Sialyllactose (**8**)



17.3 mg (43.2 μmol) **15** und 20.0 mg (55.5 μmol) **7** wurden mit 160 μL TcTS-Lösung (1.3 mg/mL) nach **AAV 6** umgesetzt.

Zur Isolierung des Produkts wurde das Enzym durch Verdünnung mit Ethanol (gleiches Volumen) denaturiert, die Lösung zentrifugiert und der Überstand gefriergetrocknet. Nach Aufnehmen in Wasser (bidest.) wurde das Reaktionsgemisch durch Größenausschlußchromatographie über Biogel P2 getrennt und das Produkt gefriergetrocknet.

Ausbeute: 16 mg (25 μmol ; 58%); farbloser Schaum

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{NO}_{19}$

Molmasse: 633.55 g/mol

R_f -Wert: 0.16 (BuOH/AcOH/H₂O 5:2:2)

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = +15.3^\circ$ (c = 0.4, H₂O)

Lit.: $[\alpha]_D^{25} = +16^\circ$ (H₂O)^[187]

MS (MALDI-TOF):

m/z = 656.2 ([M+Na]⁺), 672.2 ([M+K]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, α/β-Verhältnis 2:5):

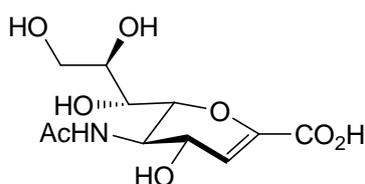
δ/ppm = 5.30 (d, $J_{1\alpha,2\alpha} = 3.6$ Hz, 0.4 H, **H-1α**), 4.74 (d, $J_{1\beta,2\beta} = 7.9$ Hz, 1 H, **H-1β**), 4.61 (d, $J_{1',2'} = 8.0$ Hz, 1.4 H, **H-1'**), 4.19 (dd, $J_{3',2'} = 10.1$ Hz, $J_{3',4'} = 2.9$ Hz, 1.4 H, **H-3'**), 4.10 (ddd, $J_{4'',3ax''} = 11.9$ Hz, $J_{4'',5''} = 9.6$ Hz, $J_{4'',3eq''} = 4.6$ Hz, 1.4 H, **H-4''**), 4.07-3.62 (m, 22.4 H, **H-2**, **H-3**, **H-4**, **H-5**, **H-6**, **H-1'**, **H-2'**, **H-4'**, **H-5'**, **H-6'**, **H-5''**, **H-7''**, **H-8''**, **H-9''**), 3.59 (dd, $J_{6'',5''} = 9.2$ Hz, $J_{6'',7''} = 1.4$ Hz, 1 H, **H-6''**), 2.84 (dd, $J_{3eq'',3ax''} = 12.6$ Hz, $J_{3eq'',4''} = 4.6$ Hz, 1.4 H, **H-3eq''**), 2.11 (s, 4.2 H, NHAcCH₃), 1.87 (dd, $J_{3ax'',3eq''} = 12.6$ Hz, $J_{3ax'',4''} = 11.9$ Hz, 1.4 H, **H-3ax''**).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, α/β-Verhältnis 2:5):

δ/ppm = 103.10 (**C-1'**), 99.81 (**C-2''**), 96.22 (**C-1β**), 92.27 (**C-1α**), 78.70 (**C-4**), 75.95, 75.62, 75.25 (**C-5β**, **C-3'** und **C-5'**), 74.79, 74.61 (**C-2β** und **C-3β**), 74.26 (**C-6''**), 73.33 (**C-8''**), 72.21 (**C-2α** und **C-3α**), 70.77 (**C-5α**), 69.82 (**C-2'**), 68.78, 68.57, 67.93 (**C-4'**, **C-4''** und **C-7''**), 63.05 (**C-9''**), 61.47 (**C-6'**), 60.55, 60.40 (**C-6α** und **C-6β**), 52.14 (**C-5''**), 40.10 (**C-3''**), 22.47 (NHAcCH₃).

Carbonyl-Kohlenstoffe wurden nicht detektiert.

8.3.3 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-enonsäure (20)



4 mg (0.01 μmol) **41** wurden nach **AAV 3** verseift. Das Rohprodukt wurde über Biogel P2 gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 4 mg (0.01 μmol; quant.); farbloser Feststoff

Summenformel: C₁₁H₁₇NO₈

Molmasse: 291.25 g/mol

R_f-Wert: 0.29 (BuOH/AcOH/H₂O 5:2:2)

Schmelzpunkt: 138-141 °C (Zers.); Lit.: 137-140 °C (Zers.)^[188]

Drehwert: $[\alpha]_D^{21} = +34.6^\circ$ (c = 1, H₂O);
 Lit.: $[\alpha]_D^{23} = +41.6^\circ$ (c = 0.25, H₂O)^[188]

MS (MALDI-TOF):

m/z = 314.1 ([M+Na]⁺)

HRMS (ESI):

m/z = 292.1026 ([M+H]⁺), ber. 292.1027;
 314.0845 ([M+Na]⁺), ber. 314.0846

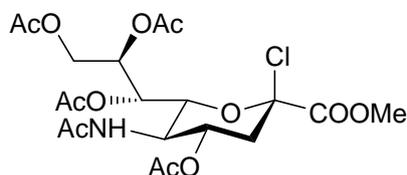
¹H-NMR (400 MHz, D₂O):

δ/ppm = 5.99 (d, $J_{3,4} = 2.4$ Hz, 1 H, **H-3**), 4.49 (dd, $J_{4,5} = 8.9$ Hz, $J_{4,3} = 2.4$ Hz, 1 H, **H-4**), 4.26 (dd, $J_{6,5} = 10.9$ Hz, $J_{6,7} = 1.0$ Hz, 1 H, **H-6**), 4.07 (dd, $J_{5,6} = 10.9$ Hz, $J_{5,4} = 8.9$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.90 (ddd, $J_{8,7} = 9.2$ Hz, $J_{8,9b} = 6.0$ Hz, $J_{8,9a} = 2.7$ Hz, 1 H, **H-8**), 3.86 (dd, $J_{9a,9b} = 11.9$ Hz, $J_{9a,8} = 2.7$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.63 (dd, $J_{9b,9a} = 11.9$ Hz, $J_{9b,8} = 6.0$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.62 (dd, $J_{7,8} = 9.2$ Hz, $J_{7,6} = 1.0$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.05 (s, 3 H, NHAcCH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O):

δ/ppm = 174.89 (NHAcC=O), 166.12 (C-1), 144.30 (C-2), 111.92 (C-3), 76.00 (C-6), 69.93 (C-8), 68.11 (C-7), 67.19 (C-4), 63.12 (C-9), 49.74 (C-5), 22.17 (NHAcCH₃).

8.3.4 Methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2,3,5-tridesoxy-β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylchlorid)onat (34)



2.361 g (7.303 mmol) **38** wurden mit 40 mL (44 g, 0.56 mol) Acetylchlorid versetzt und die resultierende Suspension wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das überschüssige Acetylchlorid im Vakuum entfernt und der Rückstand dreimal mit Toluol koevaporiert.

Ausbeute: 3.649 g (7.157 mmol, 98%); farbloser Schaum
 Summenformel: C₂₀H₂₈ClNO₁₂
 Molmasse: 509.89 g/mol
 R_f-Wert: 0.47 (EE)
 Drehwert: $[\alpha]_{546}^{25} = -63^\circ$ (c = 1, CHCl₃)
 Lit.: $[\alpha]_D^{21} = -64.2^\circ$ (c = 1, CHCl₃)^[100]

MS (MALDI-TOF):

m/z = 510.3 ([M+H]⁺), 548.3 ([M+K]⁺)

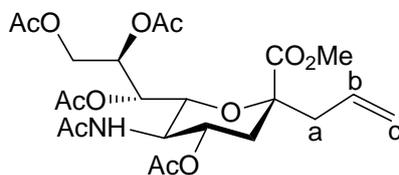
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ/ppm = 5.71 (d, J_{NH,5} = 10.1 Hz, 1 H, NH), 5.47 (dd, J_{7,8} = 6.8 Hz, J_{7,6} = 2.4 Hz, 1 H, H-7), 5.39 (ddd, J_{4,3ax} = 11.2 Hz, J_{4,5} = 10.5 Hz, J_{4,3eq} = 4.8 Hz, 1 H, H-4), 5.16 (ddd, J_{8,7} = 6.8 Hz, J_{8,9b} = 6.0 Hz, J_{8,9a} = 2.7 Hz, 1 H, H-8), 4.43 (dd, J_{9a,9b} = 12.5 Hz, J_{9a,8} = 2.7 Hz, 1 H, H-9a), 4.36 (dd, J_{6,5} = 10.8 Hz, J_{6,7} = 2.4 Hz, 1 H, H-6), 4.20 (ddd, J_{5,6} = 10.8 Hz, J_{5,4} = 10.5 Hz, J_{5,NH} = 10.1 Hz, 1 H, H-5), 4.06 (dd, J_{9b,9a} = 12.5 Hz, J_{9b,8} = 6.0 Hz, 1 H, H-9b), 3.86 (s, 3 H, OCH₃), 2.77 (dd, J_{3eq,3ax} = 13.9 Hz, J_{3eq,4} = 4.8 Hz, 1 H, H-3_{eq}), 2.26 (dd, J_{3ax,3eq} = 13.9 Hz, J_{3ax,4} = 11.2 Hz, 1 H, H-3_{ax}), 2.11, 2.07, 2.05, 2.04 (4x s, 4x 3 H, 4x AcCH₃), 1.90 (s, 3 H, NHAcCH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ/ppm = 171.10, 170.50, 170.10 (C=O), 96.77 (C-2), 74.06 (C-6), 70.05 (C-8), 68.90 (C-4), 67.04 (C-7), 62.21 (C-9), 53.8 (OCH₃), 49.00 (C-5), 40.82 (C-3), 23.27 (NHAcCH₃), 21.05, 20.94, 20.90, 20.87 (4x AcCH₃).

8.3.6 Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-*C*-(prop-2-enyl)-*D*-erythro-*L*-manno-nononat (**35**)



63 mg (0.18 mmol) **39** wurden nach **AAV 1** acetyliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Ethylacetat).

Ausbeute: 93 mg (0.18 mmol, quant.); farbloser Schaum

Summenformel: $C_{23}H_{33}NO_{12}$

Molmasse: 515.51 g/mol

R_f -Wert: 0.44 (Toluol/Aceton 1:1)

Drehwert: $[\alpha]_{546}^{20} = -8.5^\circ$ (c = 0.5, $CHCl_3$);

Lit.: $[\alpha]_D^{20} = -2.8^\circ$ (c = 1, $CHCl_3$)^[100]

MS (FAB):

m/z = 516.1 ($[M+H]^+$)

HRMS (FAB):

m/z = 516.208493 ($[M+H]^+$), ber. 516.208101

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz):

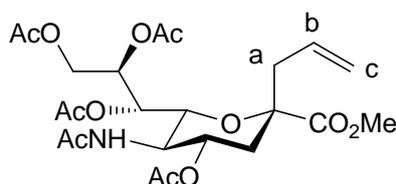
$\delta/ppm = 5.73$ (dddd, $J_{H-b,H-c-trans} = 17.1$ Hz, $J_{H-b,H-c-cis} = 10.2$ Hz, $J_{H-b,H-a} = 7.3$ Hz, 1 H, **H-b**), 5.34 (ddd, $J_{8,7} = 6.7$ Hz, $J_{8,9b} = 5.8$ Hz, $J_{8,9a} = 2.3$ Hz, 1 H, **H-8**), 5.31 (dd, $J_{7,8} = 6.7$ Hz, $J_{7,6} = 1.7$ Hz, 1 H, **H-7**), 5.23 (d, $J_{NH,5} = 9.6$ Hz, 1 H, **NH**), 5.10 (dd, $J_{H-c-cis,H-b} = 10.2$ Hz, $J_{H-c-cis,H-c-trans} = 1.4$ Hz, 1 H, **H-c-cis**), 5.05 (dd, $J_{H-c-trans,H-b} = 17.1$ Hz, $J_{H-c-trans,H-c-cis} = 1.4$ Hz, 1 H, **H-c-trans**), 4.82 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.9$ Hz, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-4**), 4.40 (dd, $J_{9a,9b} = 12.4$ Hz, $J_{9a,8} = 2.3$ Hz, 1 H, **H-9a**), 4.11 (dd, $J_{9b,9a} = 12.4$ Hz, $J_{9b,8} = 5.8$ Hz, 1 H, **H-9b**), 4.01 (ddd, $J_{5,6} = 10.4$ Hz, $J_{5,4} = 9.9$ Hz, $J_{5,NH} = 9.6$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.97 (dd, $J_{6,5} = 10.4$ Hz, $J_{6,7} = 1.7$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.72 (s, 3 H, OCH_3), 2.47 (d, $J_{H-a,H-b} = 7.3$ Hz, 2 H, **H-a**), 2.46 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12.9$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-3eq**), 2.12, 2.11 (2x s, 2x 3 H,

7-AcCH₃, 8-AcCH₃), 2.04 (s, 3 H, 9-AcCH₃), 2.01 (s, 3 H, 4-AcCH₃), 1.86 (s, 3 H, NHAcCH₃), 1.78 (dd, $J_{3ax,3eq} = 12.9$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.9$ Hz, 1 H, H-3_{ax}).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz):

δ/ppm = 171.79 (C-1), 171.20 (4-AcC=O), 170.81 (9-AcC=O), 170.40 (NHAcC=O), 170.34, 170.24 (7-AcC=O, 8-AcC=O), 131.35 (C-b), 119.40 (C-c), 80.52 (C-2), 73.68 (C-6), 70.37 (C-4), 70.10 (C-8), 68.16 (C-7), 62.59 (C-9), 52.45 (OCH₃), 49.83 (C-5), 44.35 (C-a), 37.33 (C-3), 23.32 (NHAcCH₃), 21.23 (AcCH₃), 21.02 (AcCH₃), 20.91 (AcCH₃).

8.3.7 Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(prop-2-enyl)-D-erythro-L-gluco-nononat (36)



96 mg (0.28 mmol) **40** wurden nach **AAV 1** acetyliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Ethylacetat).

Ausbeute: 142 mg (0.275 mmol; quant.); farbloses Öl

Summenformel: C₂₃H₃₃NO₁₂

Molmasse: 515.51 g/mol

R_f-Wert: 0.38 (EE)

Drehwert: $[\alpha]_{546}^{20} = +13.8^\circ$ (c = 1, CHCl₃);

Lit.: $[\alpha]_D^{20} = +1.3^\circ$ (c = 1, CHCl₃)^[100]

Der hier angegebene Literatur-Drehwert ist kritisch zu sehen; die Drehwerte der β-Allyl-C-glycoside liegen sonst alle im zweistelligen Bereich, während die der α-Allyl-C-glycoside deutlich kleiner sind. Es ist auffällig, dass er fast zehnfach kleiner ist, was eventuell auf einen Tippfehler schließen läßt.

MS (MALDI-TOF):

m/z = 516.2 [M+H]⁺.

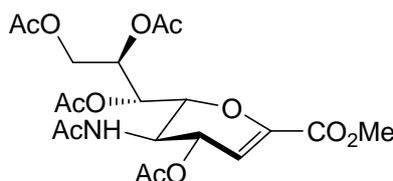
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz):

δ/ppm = 5.66-5.55 (m, 1 H, **H-b**), 5.42 (d, $J_{\text{NH},5} = 9.6$ Hz, 1 H, **NH**), 5.36 (dd, $J_{7,8} = 3.5$ Hz, $J_{7,6} = 2.2$ Hz, 1 H, **H-7**), 5.26 (ddd, $J_{4,3\text{ax}} = 11.6$ Hz, $J_{4,5} = 10.4$ Hz, $J_{4,3\text{eq}} = 4.9$ Hz, 1 H, **H-4**), 5.20-5.11 (m, 3 H, **H-c**, **H-8**), 4.75 (dd, $J_{9\text{a},9\text{b}} = 12.4$ Hz, $J_{9\text{a},8} = 2.3$ Hz, 1 H, **H-9a**), 4.16 (dd, $J_{9\text{b},9\text{a}} = 12.4$ Hz, $J_{9\text{b},8} = 7.6$ Hz, 1 H, **H-9b**), 4.01 (dd, $J_{6,5} = 10.6$ Hz, $J_{6,7} = 2.2$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.85 (ddd, $J_{5,6} = 10.6$ Hz, $J_{5,4} = 10.4$ Hz, $J_{5,\text{NH}} = 9.6$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.75 (s, 3 H, OCH₃), 2.80 (dd, $J_{\text{H-ai},\text{H-aII}} = 14.8$ Hz, $J_{\text{H-ai},\text{H-b}} = 7.3$ Hz, 1 H, **H-a^I**), 2.62 (dd, $J_{\text{H-aII},\text{H-ai}} = 14.8$ Hz, $J_{\text{H-aII},\text{H-b}} = 6.7$ Hz, 1 H, **H-a^{II}**), 2.32 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.3$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.9$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.14, 2.06, 2.04, 2.02 (4x s, 12 H, 4x AcCH₃), 1.91 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.3$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 11.6$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**), 1.89 (s, 3 H, NHAcCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz):

δ/ppm = 171.59 (**C-1**), 171.09 (AcC=O), 170.94 (AcC=O), 170.68 (AcC=O), 170.66 (AcC=O), 170.50 (NHAcC=O), 131.00 (**C-b**), 119.61 (**C-c**), 79.27 (**C-2**), 72.73 (**C-8**), 71.64 (**C-6**), 69.16 (**C-7**), 69.09 (**C-4**), 62.73 (**C-9**), 52.58 (OCH₃), 50.43 (**C-5**), 36.88 (**C-a**), 35.93 (**C-3**), 23.35 (NHAcCH₃), 21.16 (AcCH₃), 21.03 (AcCH₃), 20.93 (AcCH₃), 20.90 (AcCH₃).

8.3.8 Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-enonat (**37**)



1.19 g (2.33 mmol) **34** wurden in 15 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit 0.53 mL DBU (0.54 g, 3.5 mmol) versetzt. Anschließend wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC) wurde die Reaktionslösung mit 1 N HCl, dann mit Wasser und schließlich mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Toluol/Aceton 1:1).

Ausbeute: 701 mg (1.48 mmol; 64%); farbloser Schaum

Summenformel: C₂₀H₂₇NO₁₂

Molmasse: 473.43 g/mol
 R_f-Wert 0.44 (Toluol/Aceton 1:1)
 Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = +65.4^\circ$ (c = 2.0, CHCl₃);
 Lit.: $[\alpha]_D^{20} = +56.6^\circ$ (c = 1.3, CHCl₃)^[189]

MS (MALDI-TOF):

m/z = 496.1 ([M+Na]⁺), 512.0 ([M+K]⁺)

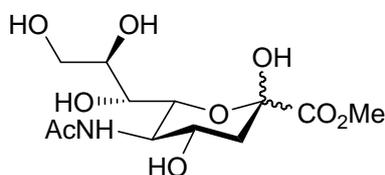
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ/ppm = 6.01 (d, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 1 H, **H-3**), 5.54 (d, $J_{NH,5} = 8.5$ Hz, 1 H, **NH**), 5.52-5.47 (m, 2 H, **H-4**, **H-7**), 5.36 (ddd, $J_{8,9b} = 6.9$ Hz, $J_{8,7} = 4.7$ Hz, $J_{8,9a} = 3.3$ Hz, **H-8**), 4.59 (dd, $J_{9a,9b} = 12.3$ Hz, $J_{9a,8} = 3.3$ Hz, 1 H, **H-9a**), 4.41-4.36 (m, 2 H, **H-6**, **H-5**), 4.19 (dd, $J_{9b,9a} = 12.3$ Hz, $J_{9b,8} = 6.9$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.80 (s, 3 H, OCH₃), 2.12, 2.08, 2.06, 2.05 (4x s, 12 H, 4x AcCH₃), 1.93 (s, 3 H, NHAcCH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ/ppm = 170.82, 170.69, 170.29, 170.16, 170.13 (5x AcC=O), 161.74 (C-1), 145.25 (C-2), 107.95 (C-3), 76.72 (C-6), 70.64 (C-8), 67.81, 67.79 (C-4 und C-7), 62.03 (C-9), 52.73 (OCH₃), 46.90 (C-5), 23.33 (NHAcCH₃), 20.98, 20.86 (AcCH₃).

8.3.9 Methyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)onat (38)



3.294 g (10.06 mmol) **1** wurden in 100 mL trockenem Methanol suspendiert und mit 3.426 g gewaschenem Ionentauscher Dowex 50X8 versetzt. Die Reaktion wurde 27 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion durch Abfiltrieren des Ionentauschers abgebrochen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 2.911 g (9.060 mmol; 90%); farbloser Feststoff

Summenformel:	$C_{13}H_{23}NO_8$
Molmasse:	323.30 g/mol
R_f -Wert:	0.73 (EtOH/AcOH/H ₂ O 4:1:1) 0.42 (DCM/MeOH 3:1)
Schmelzpunkt:	171-173 °C (Zers.); Lit.: 179-180 °C (Zers.) ^[190]
Drehwert:	$[\alpha]_D^{25} = -25.2^\circ$ (c = 0.5, MeOH); Lit.: $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$ (c = 1, MeOH) ^[190]

MS (ESI+):

m/z = 346 [M+Na]⁺

HRMS (ESI+):

m/z = 346.11239 [M+Na]⁺, ber.: 346.11085

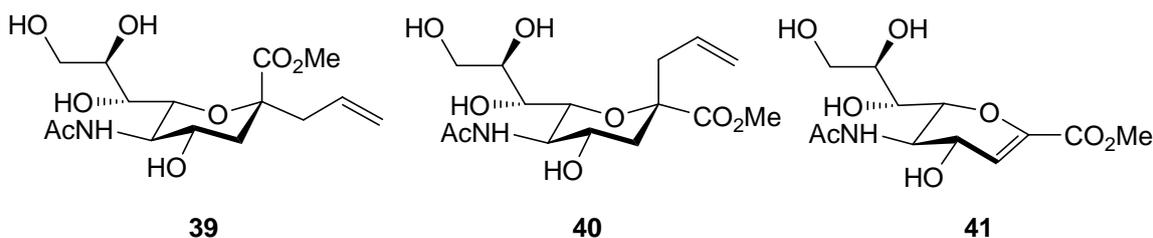
¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, α/β-Gemisch 1:10, nur β detektiert):

δ/ppm = 4.04 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.4$ Hz, $J_{4,5} = 10.4$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-4**), 4.00 (dd, $J_{6,5} = 10.4$ Hz, $J_{6,7} = 1.3$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.81 (dd, $J_{5,6} = 10.4$ Hz, $J_{5,4} = 10.4$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.79 (dd, $J_{9a,9b} = 11.4$ Hz, $J_{9a,8} = 2.8$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.78 (s, 3 H, OCH₃), 3.70 (ddd, $J_{8,7} = 9.1$ Hz, $J_{8,9b} = 5.7$ Hz, $J_{8,9a} = 2.8$ Hz, 1 H, **H-8**), 3.62 (dd, $J_{9b,9a} = 11.4$ Hz, $J_{9b,8} = 5.7$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.48 (dd, $J_{7,8} = 9.1$ Hz, $J_{7,6} = 1.3$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.22 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12.9$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.01 (s, 3H, AcCH₃), 1.90 (dd, $J_{3ax,3eq} = 12.9$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.4$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-d₄, α/β-Gemisch 1:10, nur β detektiert):

δ/ppm = 175.12 (**C-1**), 170.72 (AcCONH), 96.69 (**C-2**), 72.12 (**C-6**), 71.67 (**C-8**), 70.24 (**C-7**), 67.87 (**C-4**), 64.87 (**C-9**), 54.3 (**C-5**), 53.12 (OCH₃), 40.73 (**C-3**), 22.63 (AcCH₃)

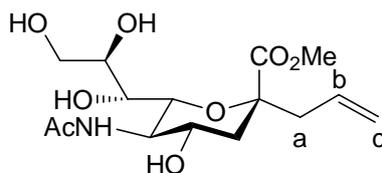
8.3.10 Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-didesoxy-2-C-(prop-2-enyl)-D-erythro-L-manno-nononat (39), Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(prop-2-enyl)-D-erythro-L-gluco-nononat (40) und Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactonon-2-enonat (41)



3.412 g (6.619 mmol) **35**, **36** und **37** (Produktgemisch der radikalischen Allylierung) wurden nach **AAV 2** deacetyliert.

Das Produktgemisch wurde säulenchromatographisch getrennt (Kieselgel, CH₂Cl₂ mit Methanol-Gradient 12% bis 33%).

Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(prop-2-enyl)-D-erythro-L-manno-nononat (39):



Ausbeute: 499 mg (1.44 mmol; 22%); farbloser Schaum

Summenformel: C₁₅H₂₅NO₈

Molmasse: 347.36 g/mol

R_f-Wert: 0.51 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1)

Drehwert: $[\alpha]_{546}^{25} = +6.7^\circ$ (c = 1.0, MeOH);

Lit.: $[\alpha]_D^{22} = +6.8^\circ$ (c = 1.0, H₂O)^[100]

MS (MALDI-TOF):

$m/z = 348.5 [M+H]^+$, $370.4 [M+Na]^+$, $386.3 [M+K]^+$.

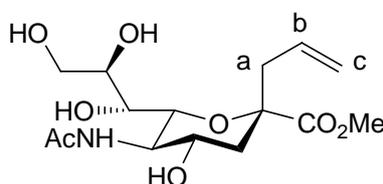
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH- d_4):

$\delta/\text{ppm} = 5.87\text{-}5.75$ (m, 1 H, **H-b**), $5.12\text{-}5.06$ (m, 2 H, **H-c**), $3.86\text{-}3.80$ (m, 2 H, **H-8** und **H-9a**), 3.76 (s, 3 H, **OCH₃**), 3.70 (dd, $J_{5,6} = 10.2$ Hz, $J_{5,4} = 10.1$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.63 (dd, $J_{9b,9a} = 12.0$ Hz, $J_{9b,8} = 6.4$ Hz, **H-9b**) $3.65\text{-}3.58$ (m, 1 H, **H-4**), 3.51 (dd, $J_{6,5} = 10.2$ Hz, $J_{6,7} = 1.7$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.49 (dd, $J_{7,8} = 8.6$ Hz, $J_{7,6} = 1.7$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.58 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.2$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), $2.55\text{-}2.44$ (m, 2 H, **H-a**), 2.00 (s, 3 H, **AcCH₃**), 1.59 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.2$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 11.4$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOH- d_4):

$\delta/\text{ppm} = 175.26$, 175.04 (**C-1**, **AcC=O**), 132.94 (**C-b**), 119.37 (**C-c**), 81.71 (**C-2**), 75.84 (**C-6**), 72.83 (**C-8**), 70.14 (**C-7**), 69.03 (**C-4**), 64.58 (**C-9**), 54.11 (**C-5**), 53.00 (**OCH₃**), 45.74 (**C-a**), 41.47 (**C-3**), 22.63 (**NHAcCH₃**).

Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(prop-2-enyl)-D-erythro-L-gluco-nononat (**40**):



Ausbeute: 682 mg (1.96 mmol; 30%); farbloser Schaum

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_8$

Molmasse: 347.36 g/mol

R_f -Wert: 0.39 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3:1)

Drehwert: $[\alpha]_{546}^{25} = -40.5^\circ$ (c = 1.0, MeOH);

Lit.: $[\alpha]_D^{22} = -42.8^\circ$ (c = 1.0, H_2O)^[100]

MS (MALDI-TOF):

$m/z = 348.5 [M+H]^+$; $370.3 [M+Na]^+$; $386.3 [M+K]^+$.

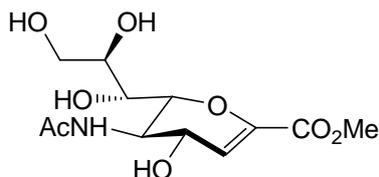
¹H-NMR (400 MHz, MeOH-d₄):

$\delta/\text{ppm} = 5.81$ (dddd, $J_{\text{H-b,H-c-trans}} = 17.0$ Hz, $J_{\text{H-b,H-c-cis}} = 10.2$ Hz, $J_{\text{H-b,H-all}} = 8.7$ Hz, $J_{\text{H-b,H-al}} = 5.7$ Hz, 1 H, **H-b**), 5.11 (dd, $J_{\text{H-c-trans,H-b}} = 17.0$ Hz, $J_{\text{H-c-trans,H-c-cis}} = 1.7$ Hz, 1 H, **H-c_{trans}**), 5.07 (dd, $J_{\text{H-c-cis,H-b}} = 10.2$ Hz, $J_{\text{H-c-cis,H-c-trans}} = 1.7$ Hz, 1 H, **H-c_{cis}**), 4.01 (ddd, $J_{4,3\text{ax}} = 11.4$ Hz, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, $J_{4,3\text{eq}} = 4.9$ Hz, 1 H, **H-4**), 3.90 (dd, $J_{6,5} = 10.6$ Hz, $J_{6,7} = 1.2$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.80 (dd, $J_{9\text{a},9\text{b}} = 11.1$ Hz, $J_{9\text{a},8} = 3.2$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.77 (ddd, $J_{8,7} = 9.0$ Hz, $J_{8,9\text{b}} = 5.2$ Hz, $J_{8,9\text{a}} = 3.2$ Hz, **H-8**), 3.74 (dd, $J_{5,6} = 10.6$ Hz, $J_{5,4} = 9.9$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.73 (s, 3 H, **OCH₃**), 3.64 (dd, $J_{9\text{b},9\text{a}} = 11.1$ Hz, $J_{9\text{b},8} = 5.2$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.47 (dd, $J_{7,8} = 9.0$ Hz, $J_{7,6} = 1.2$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.92 (dd, $J_{\text{H-all,H-all}} = 14.5$ Hz, $J_{\text{H-all,H-b}} = 5.7$ Hz, 1 H, **H-a^I**), 2.52 (dd, $J_{\text{H-all,H-all}} = 14.5$ Hz, $J_{\text{H-all,H-b}} = 8.7$ Hz, 1 H, **H-a^{II}**), 2.28 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.2$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.9$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.00 (s, 3 H, **NHAcCH₃**), 1.68 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.2$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 11.4$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-d₄):

$\delta/\text{ppm} = 175.00$, 174.45 (**C-1** und **NHAcC=O**), 133.48 (**C-b**), 119.03 (**C-c**), 81.04 (**C-2**), 72.12 , 71.01 (**C-8** und **C-6**), 70.48 (**C-7**), 67.88 (**C-4**), 65.14 (**C-9**), 54.64 (**C-5**), 52.93 (**OCH₃**), 40.59 (**C-a**), 37.49 (**C-3**), 22.90 (**NHAcCH₃**).

Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-enonat (41):



Ausbeute: 162 mg (0.531 mmol; 8%); farbloser Feststoff

Summenformel: C₁₂H₁₉NO₈

Molmasse: 305.28 g/mol

R_f-Wert: 0.27 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1)

Schmelzpunkt: 190-192 °C (Zers.);

Lit.: 223 °C (Zers.)^[191]

Drehwert: $[\alpha]_D^{21} = +53.2^\circ$ (c = 0.25, H₂O);

Lit.: $[\alpha]_D^{25} = +42.3^\circ$ (c = 5.5, H₂O)^[188]

MS (MALDI-TOF):

$m/z = 306.1 [M+H]^+$

HRMS (ESI):

$m/z = 306.1179 ([M+H]^+)$, ber. 306.1183;

328.1004 ($[M+Na]^+$), ber. 328.1003

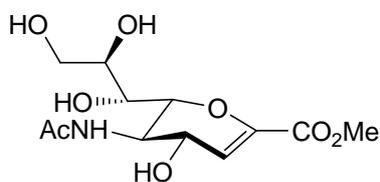
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O):

$\delta/\text{ppm} = 6.04$ (d, $J_{3,4} = 2.4$ Hz, 1 H, **H-3**), 4.50 (dd, $J_{4,5} = 8.9$ Hz, $J_{4,3} = 2.4$ Hz, 1 H, **H-4**), 4.27 (dd, $J_{6,5} = 10.9$ Hz, $J_{6,7} = 0.9$ Hz, 1 H, **H-6**), 4.08 (dd, $J_{5,6} = 10.9$ Hz, $J_{5,4} = 8.9$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.91 (ddd, $J_{8,7} = 9.3$ Hz, $J_{8,9b} = 6.1$ Hz, $J_{8,9a} = 2.7$ Hz, 1 H, **H-8**), 3.86 (dd, $J_{9a,9b} = 12.0$ Hz, $J_{9a,8} = 2.7$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.81 (s, 3 H, OCH_3), 3.64 (dd, $J_{9b,9a} = 12.0$ Hz, $J_{9b,8} = 6.1$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.63 (dd, $J_{7,8} = 9.3$ Hz, $J_{7,6} = 0.9$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.05 (s, 3 H, NHAcCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O):

$\delta/\text{ppm} = 174.90$ (NHAcC=O), 164.40 (C-1), 143.48 (C-2), 112.63 (C-3), 76.20 (C-6), 69.96 (C-8), 68.04 (C-7), 67.08 (C-4), 63.08 (C-9), 53.00 (OCH_3), 49.70 (C-5), 22.15 (NHAcCH_3).

8.3.11 Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactonon-2-enonate (41)

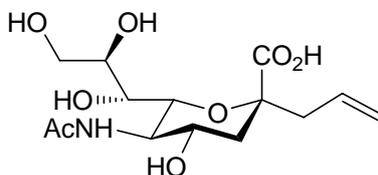


687 mg (1.46 mmol) **37** wurden nach **AAV 2** deacetyliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 443 mg (1.45 mmol; quant.); farbloser Feststoff

Charakterisierung siehe Abschnitt 8.3.10.

8.3.12 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(prop-2-enyl)-D-erythro-L-manno-nononsäure (42)



12.6 mg (24 μ mol) **35** wurden nach **AAV 3** unter gleichzeitiger Deacetylierung verseift.

Ausbeute: 6.0 mg (18 μ mol; 75%); farbloser Feststoff

Summenformel: $C_{14}H_{23}NO_8$

Molmasse: 333.33 g/mol

R_f -Wert: 0.42 (BuOH/AcOH/H₂O 5:2:2)

Schmelzpunkt: 132 °C

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = -2.8^\circ$ (c = 0.5, H₂O);

Lit.: $[\alpha]_D^{22} = -20.1^\circ$ (c = 1, H₂O)^[100]

Der hier angegebene Literatur-Drehwert ist kritisch zu sehen; die Drehwerte der α -Allyl-C-glycoside liegen sonst alle im einstelligen Bereich, während die der β -Allyl-C-glycoside deutlich größer sind. Es ist auffällig, dass er fast zehnfach größer ist, was eventuell auf einen Tippfehler schließen lässt.

HRMS (ESI):

m/z = 334.1499 ($[M+H]^+$), ber. 334.1496;

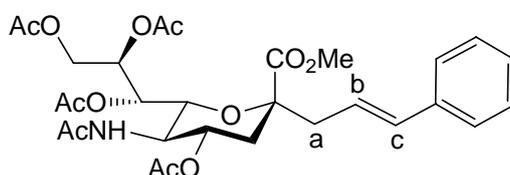
¹H-NMR (400 MHz, D₂O):

δ /ppm = 5.86-5.75 (m, 1 H, **H-b**), 5.16-5.11 (m, 2 H, **H-c**), 3.88-3.80 (m, 2 H, **H-8** und **H-9a**), 3.78 (dd, $J_{5,4} = 10.3$ Hz, $J_{5,6} = 10.0$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.68 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.6$ Hz, $J_{4,5} = 10.3$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-4**), 3.61 (dd, $J_{9b,9a} = 12.8$ Hz, $J_{9b,8} = 6.7$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.61 (dd, $J_{6,5} = 10.0$ Hz, $J_{6,7} = 1.5$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.53 (dd, $J_{7,8} = 8.4$ Hz, $J_{7,6} = 1.5$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.59 (dd, $J_{3eq,3ax} = 13.0$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.52-2.48 (m, 2 H, **H-a**), 2.01 (s, 3 H, NHAcCH₃), 2.59 (dd, $J_{3ax,3eq} = 13.0$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.6$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O):

δ/ppm = 177.47 (C-1), 174.99 (NHAcC=O), 132.12 (C-b), 118.70 (C-c), 81.24 (C-2), 73.54 (C-6), 71.77 (C-8), 68.50 (C-4), 68.29 (C-7), 62.73 (C-9), 52.21 (C-5), 44.05 (C-a), 39.87 (C-3), 22.01 (NHAcCH₃).

8.3.13 (*E*)-Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2,6-anhydro-3,5-didesoxy-2-*C*-(3-phenylprop-2-enyl)-*D*-erythro-*L*-manno-nononat (53)



a) 180 mg (349 μmol) **35** wurden mit 24 mg (28 μmol , 8 mol%) Katalysator **51** und 0.4 mL (0.4 g, 3 mmol) Styrol nach **AAV 4**, aber bei Raumtemperatur statt unter Rückfluß, umgesetzt. Es wurde ein Gemisch aus Edukt und Produkt erhalten.

Ausbeute: 70.2 mg (119 μmol ; 34%; berechnet aus NMR); farbloser Schaum

b) 209 mg (405 μmol) **35** wurden mit 18 mg (21 μmol , 5 mol%) Katalysator **51** und 0.5 mL (0.6 g, 5 mmol) Styrol nach **AAV 4** umgesetzt.

Ausbeute: 220 mg (372 μmol ; 92%); farbloser Schaum

c) 48 mg (93 μmol) **35** wurden mit 10 mg (16 μmol , 17 mol%) Katalysator **52** und 0.11 mL (0.12 g, 0.93 mmol) Styrol nach **AAV 4**, aber bei Raumtemperatur statt unter Rückfluß, umgesetzt. Es wurde ein Gemisch aus Edukt und Produkt erhalten.

Ausbeute: 16 mg (27 μmol ; 29%; berechnet aus NMR); farbloser Schaum

d) 100 mg (194 μmol) **35** wurden mit 29 mg (47 μmol , 24 mol%) Katalysator **52** und 0.18 mL (0.20 g, 1.9 mmol) Styrol nach **AAV 4** umgesetzt.

Ausbeute: 108 mg (182 μmol ; 94%); farbloser Schaum

Summenformel: $C_{29}H_{37}NO_{12}$
 Molmasse: 591.60 g/mol
 R_f -Wert: 0.48 (Toluol/Aceton 1:1)
 Drehwert: $[\alpha]_{546}^{20} = -8.8$ (c = 1.0, $CHCl_3$)

MS (MALDI-TOF):

m/z = 592.4 [M+H]⁺, 614.3 [M+Na]⁺, 630.3 [M+K]⁺

MS (ESI⁺):

m/z = 614.2189 [M+Na]⁺, ber. 614.2213.

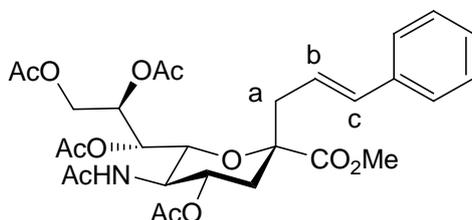
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz):

δ /ppm = 7.39-7.19 (m, 5 H, arom. **H**), 6.38 (d, $J_{H-c,H-b} = 16.1$ Hz, 1 H, **H-c**), 6.19-6.11 (m, 1 H, **H-b**), 5.41 (ddd, $J_{8,7} = 6.9$ Hz, $J_{8,9b} = 6.1$ Hz, $J_{8,9a} = 2.6$ Hz, 1 H, **H-8**), 5.34 (dd, $J_{7,8} = 6.9$ Hz, $J_{7,6} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-7**), 5.19 (br d, $J_{NH,5} = 9.9$ Hz, 1 H, **NH**), 4.84 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.9$ Hz, $J_{4,5} = 10.1$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-4**), 4.43 (dd, $J_{9a,9b} = 12.4$ Hz, $J_{9a,8} = 2.6$ Hz, 1 H, **H-9a**), 4.15 (dd, $J_{9b,9a} = 12.4$ Hz, $J_{9b,8} = 6.1$ Hz, 1 H, **H-9b**), 4.08-3.98 (m, 2 H, **H-5**, **H-6**), 3.72 (s, 3 H, **OCH₃**), 2.69-2.57 (m, 2 H, **H-a**), 2.52 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12.9$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.12 (s, 3 H, **AcCH₃**), 2.11 (s, 3 H, **AcCH₃**), 2.01 (s, 3 H, **AcCH₃**), 2.00 (s, 3 H, **AcCH₃**), 1.87 (s, 3 H, **AcCH₃**), 1.84 (dd, $J_{3ax,3eq} = 12.9$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.9$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz):

δ /ppm = 171.72, 171.20, 170.85, 170.44, 170.34, 170.22 (**C=O**), 137.06 (quart. arom. **C**), 134.27 (**C-c**), 128.61, 127.60, 126.51 (arom. **C**), 122.76 (**C-b**), 80.84 (**C-2**), 73.69 (**C-6**), 70.31 (**C-4**), 69.93 (**C-8**), 68.09 (**C-7**), 62.56 (**C-9**), 52.55 (**OCH₃**), 49.75 (**C-5**), 43.66 (**C-a**), 37.52 (**C-3**), 23.32, 21.24, 21.03, 20.92, 20.90 (5 x **AcCH₃**).

8.3.14 (E)-Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(3-phenylprop-2-enyl)-D-erythro-L-gluco-nononat (54)



Verbindung **36** (250 mg; 485 μmol) wurde mit Styrol (0.5 mL; 4 mmol) und Katalysator **51** (50 mg 59 μmol ; 12 mol %) nach **AAV 4** umgesetzt.

Ausbeute: 287 mg (485 μmol ; quant.); farbloses Öl
 Summenformel: $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_{12}$
 Molmasse: 591.60 g/mol
 R_f -Wert: 0.38 (Toluol/Aceton 1:1)
 Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$ (c = 1, CHCl_3)

MS (MALDI-TOF):

$m/z = 592.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 614.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 630.1 $[\text{M}+\text{K}]^+$

HRMS (ESI+):

$m/z = 614.2207$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber. 614.2213.

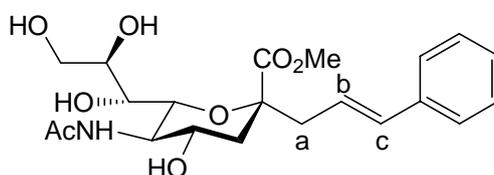
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

$\delta/\text{ppm} = 7.33\text{-}7.15$ (m, 5 H, arom. **H**), 6.51 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 15.8$ Hz, 1 H, **H-c**), 5.99-5.92 (m, 1 H, **H-b**), 5.38-5.37 (dd, $J_{7,8} = 2.5$ Hz, $J_{7,6} = 2.2$ Hz, 1 H, **H-7**), 5.34-5.28 (m, 2 H, **H-4**, **NH**), 5.11 (ddd, $J_{8,9b} = 7.9$ Hz, $J_{8,7} = 2.5$ Hz, $J_{8,9a} = 2.2$ Hz, 1 H, **H-8**), 4.76 (dd, $J_{9a,9b} = 12.3$ Hz, $J_{9a,8} = 2.2$ Hz, 1 H, **H-9a**), 4.13 (dd, $J_{9b,9a} = 12.3$ Hz, $J_{9b,8} = 7.9$ Hz, 1 H, **H-9b**), 4.10 (dd, $J_{6,5} = 10.7$ Hz, $J_{6,7} = 2.2$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.87 (m, 1 H, **H-5**), 3.76 (s, 3 H, OCH_3), 3.00-2.94 (m, 1 H, **H-a^I**), 2.77-2.72 (m, 1 H, **H-a^{II}**), 2.38 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.2$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 5.1$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.14 (s, 3 H, AcCH_3), 2.03 (s, 3 H, AcCH_3), 2.02 (s, 3 H, AcCH_3), 1.96 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.2$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 11.9$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**), 1.90 (s, 3 H, AcCH_3), 1.85 (s, 3 H, AcCH_3).

^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz):

δ/ppm = 171.65, 171.10, 170.95, 170.69, 170.64, 170.41 (C-1 und 5x AcC=O), 136.79 (quart. arom. C), 134.68 (C-c), 128.62, 127.75, 126.49 (arom. C), 122.14 (C-b), 79.65 (C-2), 73.13 (C-6), 72.00 (C-8), 69.21 (C-7), 69.26 (C-4), 62.75 (C-9), 52.71 (OCH₃), 50.51 (C-5), 36.16, 36.13 (C-3, C-a), 23.45, 21.12, 21.07, 20.96, 20.75 (5 x AcCH₃).

8.3.15 (*E*)-Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(3-phenylprop-2-enyl)-D-erythro-L-manno-nononat (55)



53 mg (90 μmol) **53** wurden nach **AAV 2** deacetyliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂ mit Methanol-Gradient).

Ausbeute: 38 mg, (90 μmol , quant.); farbloser Schaum

Summenformel: C₂₁H₂₉NO₈

Molmasse: 423.46 g/mol

R_f-Wert: 0.55 (CH₂Cl₂/MeOH 4:1)

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +6.8^\circ$ (c = 1, MeOH)

MS (FAB):

m/z = 424.2 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

m/z = 424.197289 ([M+H]⁺), ber. 424.197141

^1H -NMR (500 MHz, MeOH-d₄):

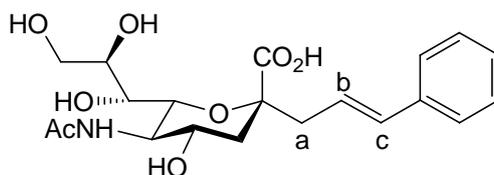
δ/ppm = 7.36-7.34 (m, 2 H, arom. **H**_{ortho}), 7.30-7.26 (m, 2 H, arom. **H**_{meta}), 7.22-7.18 (m, 1 H, **H**_{para}), 6.45 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 15.8$ Hz, 1 H, **H**-c), 6.21 (ddd, $J_{\text{H-b,H-c}} = 15.8$ Hz, $J_{\text{H-b,H-a}} = 7.5$ Hz, 1 H, **H**-b), 3.89 (ddd, $J_{8,7} = 8.8$ Hz, $J_{8,9b} = 5.6$ Hz, $J_{8,9a} = 2.7$ Hz, 1 H, **H**-8), 3.85 (dd, $J_{9a,9b} = 11.4$ Hz, $J_{9a,8} = 2.7$ Hz, 1 H, **H**-9a), 3.76 (s, 3 H, OCH₃), 3.73 (dd, $J_{5,6} = 10.4$ Hz,

$J_{5,4} = 10.1$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.65 (dd, $J_{9b,9a} = 11.4$ Hz, $J_{9b,8} = 5.6$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.66-3.61 (m, 1 H, **H-4**), 3.53 (dd, $J_{6,5} = 10.4$ Hz, $J_{6,7} = 1.5$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.51 (dd, $J_{7,8} = 8.8$ Hz, $J_{7,6} = 1.5$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.69-2.64 (m, 2 H, **H-a**), 2.63 (dd, $J_{3eq,3ax} = 13.0$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.00 (s, 3 H, AcCH₃), 1.66 (dd, $J_{3ax,3eq} = 13.0$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.8$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-d₄):

δ /ppm = 175.26 (**C-1**), 138.57 (quart. arom. **C**), 135.27 (**C-c**), 129.55 (arom. **C_{meta}**), 128.48 (arom. **C_{para}**), 127.30 (arom. **C_{ortho}**), 124.10 (**C-b**), 82.11 (**C-2**), 75.93 (**C-6**), 72.86 (**C-8**), 70.20 (**C-7**), 69.12 (**C-4**), 64.64 (**C-9**), 54.15 (**C-5**), 53.09 (OCH₃), 44.84 (**C-a**), 41.48 (**C-3**), 22.63 (AcCH₃).

8.3.16 (*E*)-5-Acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(3-phenylprop-2-enyl)-D-erythro-L-manno-nononsäure (**56**)



24 mg (57 μ mol) **55** wurden nach **AAV 3** verseift. Das Rohprodukt wurde durch Größenausschlußchromatographie über Biogel P2 gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 23 mg (57 μ mol, quant.); farbloser Feststoff

Summenformel: C₂₀H₂₇NO₈

Molmasse: 409.43 g/mol

R_f-Wert: 0.50 (CH₂Cl₂/MeOH 3:2)

Schmelzpunkt: 154 °C

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -12.5^\circ$ (c = 1, H₂O)

MS (MALDI-TOF):

m/z: 410.1 ([M+H]⁺), 432.2 ([M+Na]⁺).

MS (FAB):

m/z = 410.2 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

$m/z = 410.182190$ ($[M+H]^+$), ber. 410.181492

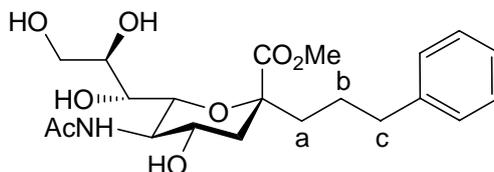
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH- d_4):

$\delta/\text{ppm} = 7.37\text{-}7.34$ (m, 2 H, arom. **H**_{ortho}), $7.27\text{-}7.23$ (m, 2 H, arom. **H**_{meta}), $7.17\text{-}7.13$ (m, 1 H, arom. **H**_{para}), 6.43 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 15.8$ Hz, 1 H, **H-c**), 6.37-6.30 (m, 1 H, **H-b**), 3.90 (ddd, $J_{8,7} = 9.1$ Hz, $J_{8,9b} = 5.7$ Hz, $J_{8,9a} = 2.5$ Hz, 1 H, **H-8**), 3.82 (dd, $J_{9a,9b} = 11.7$ Hz, $J_{9a,8} = 2.5$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.72 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.4$ Hz, $J_{4,5} = 9.8$ Hz, dd, $J_{4,3eq} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-4**), 3.64 (dd, $J_{5,6} = 10.1$ Hz, $J_{5,4} = 9.8$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.62 (dd, $J_{9b,9a} = 11.7$ Hz, $J_{9b,8} = 5.7$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.56 (dd, $J_{6,5} = 10.1$ Hz, $J_{6,7} = 1.9$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.49 (dd, $J_{7,8} = 9.1$ Hz, $J_{7,6} = 1.9$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.69 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12.6$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.64-2.53 (m, 2 H, **H-a**), 2.01 (s, 3 H, AcCH₃), 1.51 (dd, $J_{3ax,3eq} = 12.6$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.4$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOH- d_4):

$\delta/\text{ppm} = 178.44$ (C-1), 175.52 (NHAcC=O), 139.21 (quart. arom. C), 133.86 (C-c), 129.37 (arom. C_{meta}), 127.94 (arom. C_{para}), 127.27 (arom. C_{ortho}), 126.32 (C-b), 82.54 (C-2), 75.53 (C-6), 73.06 (C-8), 70.40 (C-7), 69.86 (C-4), 64.61 (C-9), 54.53 (C-5), 45.07 (C-a), 42.24 (C-3), 22.55 (NHAcCH₃).

8.3.17 Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(3-phenylpropyl)-D-erythro-L-manno-nononat (57)



83 mg (0.14 mmol) **53** wurden nach **AAV 2** deacetyliert und anschließend nach **AAV 5** hydriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan mit Methanol-Gradient).

Ausbeute: 60 mg (0.14 mmol; quant.); farbloser Feststoff

Summenformel: C₂₁H₃₁NO₈

Molmasse: 425.47 g/mol

R_f-Wert: 0.48 (CH₂Cl₂/MeOH 4:1)
 Schmelzpunkt: 96 °C
 Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -172.4^\circ$ (c = 0.5, MeOH)

MALDI-TOF:

m/z = 426.2 [M+H]⁺, 448.2 [M+Na]⁺, 464.2 [M+K]⁺;

HRMS (ESI):

m/z = 448.1943 [M+Na]⁺, berechnet 448.1947.

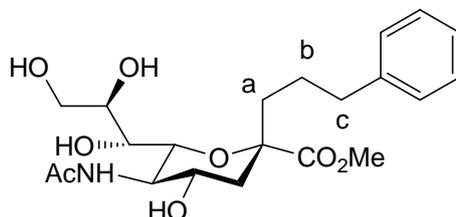
¹H-NMR (400 MHz, MeOH-d₄):

δ/ppm = 7.27-7.12 (m, 5 H, arom. **H**), 3.85-3.80 (m, 2 H, **H-8**, **H-9a**), 3.75 (s, 3 H, OCH₃), 3.68 (dd, $J_{5,6} = 10.3$ Hz, $J_{5,4} = 9.9$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.62 (dd, $J_{9b,9a} = 11.9$ Hz, $J_{9b,8} = 6.4$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.58 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.5$ Hz, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, dd, $J_{4,3eq} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-4**), 3.49 (dd, $J_{6,5} = 10.3$ Hz, $J_{6,7} = 1.5$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.47 (dd, $J_{7,8} = 8.5$ Hz, $J_{7,6} = 1.5$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.57 (dd, $J_{3eq,3ax} = 13.1$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.65-2.53 (m, 2 H, **H-c**), 1.99 (s, 3 H, NHAcCH₃), 1.81-1.68 (m, 3 H, **H-a** und **H-b^I**), 1.60-1.47 (m, 1 H, **H-b^{II}**) 1.55 (dd, $J_{3ax,3eq} = 13.1$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.5$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-d₄):

δ/ppm = 175.62, 175.28 (**C-1**, NHAcC=O), 143.10 (quart. arom. **C**), 129.42, 129.38, 126.90 (arom. **C**), 81.59 (**C-2**), 75.78 (**C-6**), 72.88 (**C-8**), 70.20 (**C-7**), 69.09 (**C-4**), 64.61 (**C-9**), 54.19 (**C-5**), 53.06 (OCH₃), 42.11 (**C-3**), 40.86 (**C-a**), 36.58 (**C-c**), 26.44 (**C-b**), 22.61 (NHAcCH₃);

8.3.18 Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(3-phenylpropyl)-D-erythro-L-gluco-nononat (58)



70 mg (0.12 mmol) **54** wurden nach **AAV 2** deacetyliert und anschließend nach **AAV 5** hydriert. Anschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan mit Methanol-Gradient).

Ausbeute: 46 mg (11 μ mol; 92%); farbloser Feststoff

Summenformel: $C_{21}H_{31}NO_8$

Molmasse: 425.47 g/mol

R_f -Wert: 0.36 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 4:1)

Schmelzpunkt: 116 °C

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -33.6^\circ$ (c = 1, MeOH)

MALDI-TOF:

$m/z = 426.2 [M+H]^+$, 448.2 $[M+Na]^+$, 464.2 $[M+K]^+$;

HRMS (ESI):

$m/z = 448.1948 [M+Na]^+$, ber. 448.1947.

1H -NMR (400 MHz, MeOH- d_4):

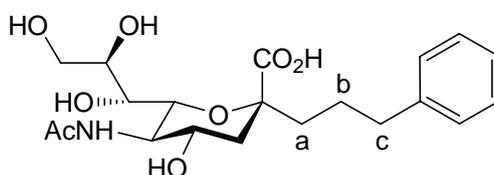
$\delta/ppm = 7.27-7.12$ (m, 5 H, arom. **H**), 3.93 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.3$ Hz, $J_{4,5} = 9.3$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.8$ Hz, 1 H, **H-4**), 3.85-3.71 (m, 4 H, **H-5**, **H-6**, **H-8**, **H-9a**), 3.70 (s, 3 H, OCH_3), 3.69-3.43 (m, 2 H, **H-7**, **H-9b**), 2.69-2.51 (m, 2 H, **H-c**), 2.19 (dd, $J_{3eq,3ax} = 13.1$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.8$ Hz, 1 H, **H-3eq**), 2.16-2.09 (m, 1 H, **H-a**), 1.99 (s, 3 H, $NHAcCH_3$), 1.95-1.85 (m, 1 H, **H-b**), 1.78-1.70 (m, 1 H, **H-a**), 1.62 (dd, $J_{3ax,3eq} = 13.1$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.3$ Hz, 1 H, **H-3ax**), 1.35-1.24 (m, 1 H, **H-b**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOH- d_4):

$\delta/\text{ppm} = 129.48, 129.35, 126.85$ (arom. C), 80.82 (C-2), 71.94, 71.75 (C-6, C-8), 70.60 (C-7), 68.12 (C-4), 65.24 (C-9), 54.48 (C-5), 52.96 (OCH₃), 41.38 (C-3), 36.56 (C-c), 32.42 (C-a), 25.90 (C-b), 22.84 (NHAcCH₃).

Carbonylgruppen konnten nicht detektiert werden.

8.3.19 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(3-phenylpropyl)-D-erythro-L-manno-nononsäure (59)



4.6 mg (11 μmol) **57** wurden nach **AAV 3** verseift. Das Rohprodukt wurde über Biogel P2 gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 4.5 mg (11 μmol ; quant.); farbloser Schaum

Summenformel: C₂₀H₂₉NO₈

Molmasse: 411.45 g/mol

R_f-Wert: 0.66 (BuOH/AcOH/H₂O 5:2:2)

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = +9.2^\circ$ (c = 0.5, MeOH)

MS (FAB):

m/z = 412.2 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

m/z = 412.198914 ([M+H]⁺), ber. 412.197142

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D₂O):

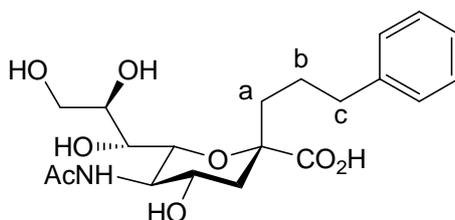
$\delta/\text{ppm} = 7.39\text{-}7.34$ (m, 2 H, arom. H), 7.30-7.24 (m, 3 H, arom. H), 3.88-3.82 (m, 2 H, H-8, H-9a), 3.75 (dd, $J_{5,4} = 10.2$ Hz, $J_{5,6} = 10.2$ Hz, 1 H, H-5), 3.67 (dd, $J_{4,3\text{ax}} = 11.7$ Hz, $J_{4,5} = 10.2$ Hz, $J_{4,3\text{eq}} = 4.6$ Hz, 1 H, H-4), 3.65-3.60 (m, 2 H, H-6, H-9b), 3.54 (dd, $J_{7,8} = 8.5$ Hz, $J_{7,6} = 1.6$ Hz, 1 H, H-7), 2.66-2.61 (m, 2 H, H-c), 2.58 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.1$ Hz,

$J_{3eq,4} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.03 (s, 3 H, NHAcCH₃), 1.79-1.69 (m, 3 H, **H-a**, **H-b^l**), 1.64-1.58 (m, 1 H, **H-b^l**), 1.54 (dd, $J_{3ax,3eq} = 13.1$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.7$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O):

δ /ppm = 178.11 (C-1), 175.36 (AcC=O), 142.96 (quart. arom. C), 129.00 (arom. C), 128.97 (arom. C), 126.38 (arom. C_{para}), 81.28 (C-2), 73.89 (C-6), 72.13 (C-8), 68.83 (C-4), 68.70 (C-7), 63.13 (C-9), 52.66 (C-5), 40.66 (C-3), 39.42 (C-a), 35.21 (C-c), 25.22 (C-b), 22.40 (AcCH₃).

8.3.20 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(3-phenylpropyl)-D-erythro-L-gluco-nononsäure (60)



10.4 mg **58** (24.4 μ mol) wurden nach **AAV 3** verseift. Das Rohprodukt wurde über Biogel P2 gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 7.2 mg (17.5 μ mol; 72%); farbloser Schaum

Summenformel: C₂₀H₂₉NO₈

Molmasse: 411.45 g/mol

R_f-Wert: 0.60 (BuOH/AcOH/H₂O 5:2:2)

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -3.3^\circ$ (c = 0.15, MeOH)

MS (FAB):

m/z = 412.2 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

m/z = 412.198639 ([M+H]⁺), ber. 412.197142

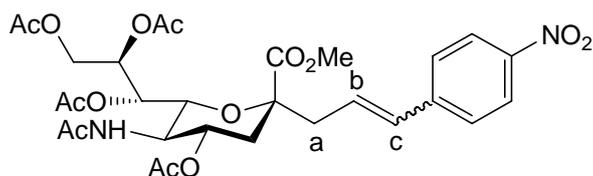
¹H-NMR (500 MHz, D₂O):

δ /ppm = 7.39-7.35 (m, 2 H, arom. **H**), 7.31-7.25 (m, 3 H, arom. **H**), 3.96 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.4$ Hz, $J_{4,5} = 10.2$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.9$ Hz, 1 H, **H-4**), 3.86 (ddd, $J_{8,7} = 8.6$ Hz, $J_{8,9b} = 5.6$ Hz, $J_{8,9a} = 2.9$ Hz, 1 H, **H-8**), 3.81 (dd, $J_{9a,9b} = 12.1$ Hz, $J_{9a,8} = 2.9$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.78 (dd, $J_{5,4} = 10.2$ Hz, $J_{5,6} = 10.2$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.68-3.62 (m, 2 H, **H-6**, **H-9b**), 3.52 (dd, $J_{7,8} = 8.6$ Hz, $J_{7,6} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.72-2.60 (m, 2 H, **H-c**), 2.25 (dd, $J_{3eq,3ax} = 13.1$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.9$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.10-2.04 (m, 1 H, **H-a**), 2.03 (s, 3 H, AcCH₃), 1.80-1.73 (m, 2 H, **H-a**, **H-b^I**), 1.70 (dd, $J_{3ax,3eq} = 13.1$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.4$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**), 1.48-1.39 (m, 1 H, **H-b^{II}**).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O):

δ /ppm = 178.23 (**C-1**), 175.18 (AcC=O), 142.66 (quart. arom. **C**), 129.06 (arom. **C**), 128.96 (arom. **C**), 126.41 (arom. **C_{para}**), 80.24 (**C-2**), 70.69 (**C-6**), 70.50 (**C-8**), 68.70 (**C-7**), 67.47 (**C-4**), 63.70 (**C-9**), 52.83 (**C-5**), 39.94 (**C-3**), 34.91 (**C-c**), 30.64 (**C-a**), 24.39 (**C-b**), 22.48 (AcCH₃).

8.3.21 (*E/Z*)-Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2,6-anhydro-3,5-didesoxy-2-*C*-(3-(4-nitrophenyl)-prop-2-enyl)-*D*-erythro-*L*-mannononat (**65**)



115 mg (223 μ mol) **35** wurden mit 298 mg (2.00 mmol) **63** und 17.1 mg (27.3 μ mol; 12 mol%) Katalysator **52** Nach **AAV 4** umgesetzt.

Ausbeute: 142 mg (223 μ mol; quant.); gelbliches Öl

Summenformel: C₂₉H₃₆N₂O₁₄

Molmasse: 636.60 g/mol

R_f-Wert: 0.57 (Toluol/Aceton 1:1); 0.30 (EE)

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -16.7^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

MS (MALDI-TOF):

$m/z = 637.2$ ($[M+H]^+$), 659.1 ($[M+Na]^+$), 675.1 ($[M+K]^+$)

HRMS (FAB):

$m/z = 637.226555$ $[M+H]^+$, ber. 637.224479.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , *cis/trans*-Gemisch 1:5):

$\delta/\text{ppm} = 8.17$ (d, $J_{\text{H-meta,H-ortho}} = 8.8$ Hz, 2 H, arom. **H_{meta}**), 7.56 (d, $J_{\text{H-ortho,H-meta}} = 8.8$ Hz, 2 H, arom. **H_{ortho}**), 6.43-6.41 (m, 2 H, **H-b** und **H-c**), 5.45 (ddd, $J_{8,7} = 8.2$ Hz, $J_{8,9b} = 6.0$ Hz, $J_{8,9a} = 2.5$ Hz, 1 H, **H-8**), 5.34 (dd, $J_{7,8} = 8.2$ Hz, $J_{7,6} = 2.1$ Hz, 1 H, **H-7**), 5.19 (d, $J_{\text{NH},5} = 9.8$ Hz, 1 H, **NH**), 4.83 (ddd, $J_{4,3ax} = 12.0$ Hz, $J_{4,5} = 10.1$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.4$ Hz, 1 H, **H-4**), 4.37 (dd, $J_{9a,9b} = 12.3$ Hz, $J_{9a,8} = 2.5$ Hz, 1 H, **H-9a**), 4.12-4.07 (m, 2 H, **H-6** und **H-9b**), 4.05 (ddd, $J_{5,6} = 10.4$ Hz, $J_{5,4} = 10.1$ Hz, $J_{5,\text{NH}} = 9.8$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.70 (s, 3 H, **OCH₃**), 2.73-2.62 (m, 2 H, **H-a**), 2.54 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12.9$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.4$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.12, 2.11, 2.03, 2.02 (4x s, 4x 3 H, **AcCH₃**), 1.88 (s, 3 H, **NHAcCH₃**), 1.84 (dd, $J_{3ax,3eq} = 12.9$ Hz, $J_{3ax,4} = 12.0$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , *cis/trans*-Gemisch 1:5):

$\delta/\text{ppm} = 171.34$, 171.18, 170.41, 170.20 (4x **AcC=O**), 147.02 (quart. arom. **C_{para}**), 143.49 (quart. arom. **C_{ipso}**), 132.06, 128.48 (**C-b** und **C-a**), 127.18 (arom. **C_{ortho}**), 124.07 (arom. **C_{meta}**), 80.50 (**C-2**), 73.35 (**C-6**), 70.13 (**C-4**), 68.95 (**C-8**), 67.80 (**C-7**), 62.63 (**C-9**), 52.65 (**OCH₃**), 49.71 (**C-5**), 43.73 (**C-a**), 37.98 (**C-3**), 23.34 (**NHAcCH₃**), 21.29 (**AcCH₃**), 21.23 (**AcCH₃**) 20.95 (2x **AcCH₃**).

In CDCl_3 ist nur *ein* Signalsatz zu erkennen. Zur Aufklärung des *cis/trans*-Verhältnisses wurden daher zusätzlich Spektren in deuteriertem Benzol aufgenommen:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, C_6D_6 , *cis/trans*-Gemisch 1:5):

trans-Isomer:

$\delta/\text{ppm} = 7.97$ (d, $J_{\text{H-meta,H-ortho}} = 8.8$ Hz, 2 H, arom. **H_{meta}**), 7.23 (d, $J_{\text{H-ortho,H-meta}} = 8.8$ Hz, 2 H, arom. **H_{ortho}**), 6.43 (ddd, $J_{\text{H-b,H-c}} = 15.7$ Hz, $J_{\text{H-b,H-all}} = 8.9$ Hz, $J_{\text{H-b,H-al}} = 5.7$ Hz, 1 H, **H-b**), 5.98 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 15.7$ Hz, 1 H, **H-c**), 5.84 (ddd, $J_{8,7} = 7.9$ Hz, $J_{8,9b} = 6.5$ Hz, $J_{8,9a} = 2.5$ Hz, 1 H, **H-8**), 5.49 (dd, $J_{7,8} = 7.9$ Hz, $J_{7,6} = 2.4$ Hz, 1 H, **H-7**), 4.76 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.8$ Hz, $J_{4,5} = 10.7$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.5$ Hz, 1 H, **H-4**), 4.72 (dd, $J_{9a,9b} = 12.3$ Hz, $J_{9a,8} = 2.5$ Hz, 1 H, **H-9a**), 4.38 (ddd, $J_{5,4} = 10.7$ Hz, $J_{5,6} = 10.7$ Hz, $J_{5,\text{NH}} = 10.6$ Hz, 1 H, **H-5**), 4.31 (dd, $J_{9b,9a} = 12.3$ Hz, $J_{9b,8} = 6.5$ Hz, 1 H, **H-9b**), 4.07 (dd, $J_{6,5} = 10.7$ Hz, $J_{6,7} = 2.4$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.28 (s, 3 H,

OCH₃), 2.46 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.7$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.5$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.41 (ddd, $J_{\text{H-al},\text{H-all}} = 14.4$ Hz, $J_{\text{H-al},\text{H-b}} = 5.7$ Hz, $J_{\text{H-al},\text{H-c}} = 1.4$ Hz, 1 H, **H-a^I**), 2.30 (br dd, $J_{\text{H-all},\text{H-al}} = 14.4$ Hz, $J_{\text{H-all},\text{H-b}} = 8.9$ Hz, 1 H, **H-a^{II}**), 2.07, 1.99, 1.76, 1.67 (4x s, 4x 3 H, AcCH₃), 1.62-1.55 (m, 1 H, **H-3_{ax}**), 1.60 (s, 3 H, NHAcCH₃).

cis-Isomer:

$\delta/\text{ppm} = 7.83$ (d, $J_{\text{H-meta},\text{H-ortho}} = 8.8$ Hz, 2 H, arom. **H_{meta}**), 6.80 (d, $J_{\text{H-ortho},\text{H-meta}} = 8.8$ Hz, 2 H, arom. **H_{ortho}**), 6.35 (d, $J_{\text{H-c},\text{H-b}} = 11.8$ Hz, 1 H, **H-c**), 6.02-5.96 (m, 1 H, **H-b**), 3.24 (s, 3 H, OCH₃), 2.61 (ddd, $J_{\text{H-al},\text{H-all}} = 15.6$ Hz, $J_{\text{H-al},\text{b}} = 8.0$ Hz, $J_{\text{H-al},\text{H-c}} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-a^I**), 2.50-2.44 (m, 1 H, **H-a^{II}**), 2.13, 1.97, 1.78, 1.64 (4x s, 4x 3 H, AcCH₃).

Die übrigen Protonen des *cis*-Isomers konnten nicht detektiert werden, da sie unter den Signalen des *trans*-Isomers verborgen waren.

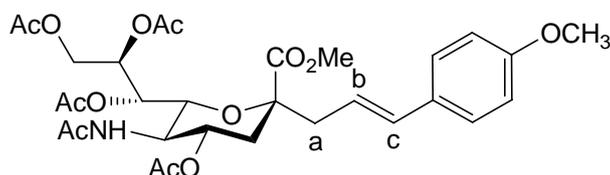
¹³C-NMR (125 MHz, C₆D₆, *cis/trans*-Gemisch 1:5):

trans-Isomer:

$\delta/\text{ppm} = 170.18, 170.11, 170.06, 169.98$ (4x AcC=O), 169.39 (NHAcC=O), 147.43 (quart. arom. **C_{para}**), 143.14 (quart. arom. **C_{ipso}**), 132.12 (**C-c**), 128.35 (**C-b**), 127.22 (arom. **C_{ortho}**), 124.02 (arom. **C_{meta}**), 80.72 (**C-2**), 73.84 (**C-6**), 70.09 (**C-4**), 69.70 (**C-8**), 67.93 (**C-7**), 63.04 (**C-9**), 51.91 (OCH₃), 49.30 (**C-5**), 43.93 (**C-a**), 38.61 (**C-3**), 24.82 (NHAcCH₃), 21.17 (AcCH₃), 20.78 (AcCH₃).

Die Kohlenstoffe des *cis*-Isomers konnten im ¹³C-Spektrum nicht detektiert werden.

8.3.22 (E)-Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2,6-anhydro-3,5-didesoxy-2-C-(3-(4-methoxyphenyl)-prop-2-enyl)-D-erythro-L-manno-nononat (66)



a) aus 35:

240 mg (466 μmol) **35** wurden mit 540 mg (4.02 mmol) **64** und 25 mg (40 μmol ; 9 mol%) Katalysator **52** nach **AAV 4** umgesetzt. Es wurde ein Gemisch aus Edukt und Produkt erhalten.

Ausbeute: 136 mg (219 μmol ; 47%; berechnet aus NMR)

b) aus 68:

13 mg (29 μmol) **68** wurden nach **AAV 1** acetyliert.

Ausbeute: 18 mg (29 μmol ; quant.); farbloses Öl

Summenformel: $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{NO}_{13}$

Molmasse: 621.63 g/mol

R_f -Wert: 0.27 (EE)

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -13.8^\circ$ (c = 1, CHCl_3)

MS (FAB):

m/z = 622.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

HRMS (FAB):

m/z = 622.250854 $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber. 622.249966.

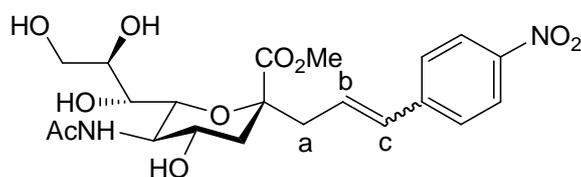
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ/ppm = 7.31 (d, $J_{\text{H-ortho,H-meta}} = 8.7$ Hz, 2 H, arom. **H**_{ortho}), 6.84 (d, $J_{\text{H-meta,H-ortho}} = 8.7$ Hz, 2 H, arom. **H**_{meta}), 6.31 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 15.8$ Hz, 1 H, **H-c**), 6.00 (ddd, $J_{\text{H-b,H-c}} = 15.8$ Hz, $J_{\text{H-b,H-all}} = 8.0$ Hz, $J_{\text{H-b,H-al}} = 6.8$ Hz, 1 H, **H-b**), 5.40 (ddd, $J_{8,7} = 6.9$ Hz, $J_{8,9b} = 6.0$ Hz, $J_{8,9a} = 2.6$ Hz, 1 H, **H-8**), 5.34 (dd, $J_{7,8} = 6.9$ Hz, $J_{7,6} = 1.1$ Hz, 1 H, **H-7**), 5.17 (d, $J_{\text{NH,5}} = 9.6$ Hz, 1 H, NH), 4.84 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.7$ Hz, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-4**), 4.42 (dd, $J_{9a,9b} = 12.4$ Hz, $J_{9a,8} = 2.6$ Hz, 1H, **H-9a**), 4.15 (dd, $J_{9b,9a} = 12.4$ Hz, $J_{9b,8} = 6.0$ Hz, 1 H, **H-9b**), 4.05-4.00 (m, 2H, **H-5**, **H-6**), 3.80 (s, 3 H, arom. OCH₃), 3.70 (s, 3 H, OCH₃), 2.65-2.50 (m, 2 H, **H-a**), 2.51 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12.9$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-3**_{eq}), 2.12, 2.11, 2.02, 2.01, (4x s, 4x 3 H, AcCH₃), 1.87 (s, 3 H, NHAcCH₃), 1.83 (dd, $J_{3ax,3eq} = 12.9$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.7$ Hz, 1 H, **H-3**_{ax}).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ/ppm = 171.77 (**C-1**), 171.23, 170.86, 170.43, 170.35, 170.24 (5x AcC=O), 159.26 (quart. arom. C_{para}), 133.63 (**C-c**), 129.96 (quart. arom. C_{ipso}), 127.69 (arom. C_{ortho}), 120.48 (**C-b**), 114.04 (arom. C_{meta}), 80.97 (**C-2**), 73.66 (**C-6**), 70.37 (**C-4**), 69.87 (**C-8**), 68.08 (**C-7**), 62.55 (**C-9**), 55.43 (arom. OCH₃), 52.52 (OCH₃), 49.81 (**C-5**), 43.74 (**C-a**), 37.52 (**C-3**), 23.35 (NHAcCH₃), 21.26 (AcCH₃), 21.04 (AcCH₃), 20.94 (2x AcCH₃).

8.3.23 (*E/Z*)-Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(3-(4-nitrophenyl)-prop-2-enyl)-D-erythro-L-manno-nononat (**68**)



79 mg (0.12 mmol) **65** wurden nach **AAV 2** deacetyliert.

Ausbeute: 49 mg (0.10 mmol; 84%); gelbliches Öl

Summenformel: C₂₁H₂₈N₂O₁₀

Molmasse: 468.45 g/mol

R_f-Wert: 0.18 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = +1.8^\circ$ ($c = 0.5$, MeOH)

MS (MALDI-TOF):

$m/z = 469.1$ ($[M+H]^+$), 491.1 ($[M+Na]^+$), 507.1 ($[M+K]^+$)

MS (FAB):

$m/z = 469.1$ ($[M+H]^+$), 491.1 ($[M+Na]^+$), 507.1 ($[M+K]^+$)

MS (ESI):

$m/z = 491.15$ ($[M+Na]^+$)

HRMS (ESI):

$m/z = 491.1625$ ($[M+Na]^+$), ber. 491.1636

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH- d_4 , *cis/trans*-Gemisch 1:5):

trans-Isomer:

$\delta/\text{ppm} = 8.17$ (d, $J_{\text{H-meta,H-ortho}} = 8.8$ Hz, 2 H, arom. **H**_{meta}), 7.60 (d, $J_{\text{H-ortho,H-meta}} = 8.8$ Hz, 2 H, arom. **H**_{ortho}), 6.59 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 15.8$ Hz, 1H, **H-c**), 6.50 (ddd, $J_{\text{H-b,H-c}} = 15.8$ Hz, $J_{\text{H-b,H-a}} = 7.3$ Hz, 1 H, **H-b**), 3.88 (ddd, $J_{8,7} = 8.8$ Hz, $J_{8,9b} = 5.7$ Hz, $J_{8,9a} = 2.5$ Hz, 1 H, **H-8**), 3.85 (dd, $J_{9a,9b} = 11.4$ Hz, $J_{9a,8} = 2.5$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.78 (s, 3 H, OCH₃), 3.74 (dd, $J_{5,6} = 10.4$ Hz, $J_{5,4} = 10.1$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.68 - 3.61 (m, 2 H, **H-4**, **H-9b**), 3.55 (dd, $J_{6,5} = 10.4$ Hz, $J_{6,7} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.51 (dd, $J_{7,8} = 8.8$ Hz, $J_{7,6} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.73 - 2.69 (m, 2 H, **H-a**), 2.64 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.2$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.00 (s, 3 H, AcCH₃), 1.67 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.2$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 11.7$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

cis-Isomer:

$\delta/\text{ppm} = 8.21$ (d, $J_{\text{H-meta,H-ortho}} = 8.8$ Hz, 2 H, arom. **H**_{meta}), 7.53 (d, $J_{\text{H-ortho,H-meta}} = 8.8$ Hz, 2 H, arom. **H**_{ortho}), 6.68 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 11.7$ Hz, 1 H, **H-c**), 5.94 (ddd, $J_{\text{H-b,H-c}} = 11.7$ Hz, $J_{\text{H-b,H-a}} = 7.6$ Hz, 1 H, **H-b**), 3.71 (s, 3 H, OCH₃), 2.81 - 2.78 (m, 2 H, **H-a**), 2.58 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.2$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.00 (s, 3 H, AcCH₃), 1.63 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.2$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 12.0$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

Die übrigen Protonen des *cis*-Isomers konnten nicht detektiert werden, da sie unter den Signalen des *trans*-Isomers verborgen waren.

^{13}C -NMR (125 MHz, MeOH- d_4 , *cis/trans*-Gemisch 1:5):

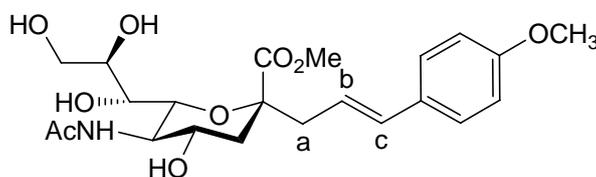
trans-Isomer:

δ/ppm = 175.22 (NHAcC=O), 175.00 (C-1), 148.21 (quart. arom. C_{para}), 145.10 (quart. arom. C_{ipso}), 133.30 (C-c), 129.79 (C-b), 128.08 (arom. C_{ortho}), 124.86 (arom. C_{meta}), 81.76 (C-2), 75.90 (C-6), 72.82 (C-8), 70.21 (C-7), 69.01 (C-4), 64.64 (C-9), 54.09 (C-5), 53.20 (OCH₃), 44.62 (C-a), 41.42 (C-3), 22.66 (AcCH₃).

cis-Isomer:

δ/ppm = 174.89 (C-1), 174.75 (NHAcC=O), 147.96 (quart. arom. C_{para}), 144.90 (quart. arom. C_{ipso}), 131.49 (C-c), 130.79 (arom. C_{ortho}), 129.38 (C-b), 124.51 (arom. C_{meta}), 81.22 (C-2), 75.90 (C-6), 72.73 (C-8), 70.21 (C-7), 68.89 (C-4), 62.21 (C-9), 54.65 (C-5), 53.10 (OCH₃), 41.66 (C-3), 39.81 (C-a), 22.66 (NHAcCH₃).

8.3.24 (*E*)-Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(3-(4-methoxyphenyl)-prop-2-enyl)-D-erythro-L-manno-nononat (69)



Ein Gemisch aus **35** und **64**, das laut NMR 136 mg (219 μmol) **64** enthielt, wurde nach **AAV 2** deacetyliert. Das Produktgemisch wurde säulenchromatographisch getrennt (Kieselgel, CH₂Cl₂ mit Methanol-Gradient).

Ausbeute: 97 mg (0.21 mmol, 98%); farbloses Öl

Summenformel: C₂₂H₃₁NO₉

Molmasse: 453.48 g/mol

R_f-Wert: 0.23 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = +4.2^\circ$ (c = 1, MeOH)

MS (ESI):

m/z = 476.13 ([M+Na]⁺)

HRMS (ESI):

$m/z = 476.1897$ ($[M+Na]^+$), ber. 476.1891

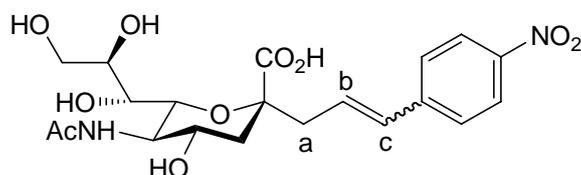
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH- d_4):

$\delta/\text{ppm} = 7.28$ (d, $J_{\text{H-ortho,H-meta}} = 8.8$ Hz, 2 H, arom. **H**_{ortho}), 6.84 (d, $J_{\text{H-meta,H-ortho}} = 8.8$ Hz, 2 H, arom. **H**_{meta}), 6.38 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 15.8$ Hz, 1 H, **H-c**), 6.05 (ddd, $J_{\text{H-b,H-c}} = 15.8$ Hz, $J_{\text{H-b,H-a}} = 7.5$ Hz, 1 H, **H-b**), 3.89 (ddd, $J_{8,7} = 8.9$ Hz, $J_{8,9b} = 5.7$ Hz, $J_{8,9a} = 2.8$ Hz, 1 H, **H-8**), 3.85 (dd, $J_{9a,9b} = 11.3$ Hz, $J_{9a,8} = 2.8$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.77 (s, 3 H, arom. OCH₃), 3.75 (s, 3 H, OCH₃), 3.73 (dd, $J_{5,6} = 10.2$ Hz, $J_{5,4} = 10.1$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.68-3.60 (m, 2 H, **H-4**, **H-9b**), 3.52 (dd, $J_{6,5} = 10.2$ Hz, $J_{6,7} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.51 (dd, $J_{7,8} = 8.9$ Hz, $J_{7,6} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.65-2.59 (m, 3 H, **H-a**, **H-3_{eq}**), 2.00 (s, 3 H, AcCH₃), 1.65 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.1$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 11.5$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOH- d_4):

$\delta/\text{ppm} = 175.24$ (2x C=O), 160.72 (quart. arom. C_{para}), 134.74 (C-c), 131.34 (quart. arom. C_{ipso}), 128.47 (arom. C_{ortho}), 121.66 (C-b), 114.96 (arom. C_{meta}), 82.19 (C-2), 75.95 (C-6), 72.91 (C-8), 70.26 (C-7), 69.14 (C-4), 64.67 (C-9), 55.71 (arom. OCH₃), 54.19 (C-5), 53.04 (OCH₃), 44.90 (C-a), 41.46 (C-3), 22.64 (AcCH₃).

8.3.25 (*E/Z*)-5-Acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(3-(4-nitrophenyl)-prop-2-enyl)-D-erythro-L-manno-nononsäure (70)



25 mg (53 μmol) **68** wurden nach **AAV 3** verseift. Das Rohprodukt wurde über Biogel P2 gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 21 mg (46 μmol ; 87%); gelblicher amorpher Feststoff
 Summenformel: C₂₀H₂₆N₂O₁₀
 Molmasse: 454.43 g/mol
 R_f-Wert: 0.68 (CH₂Cl₂/MeOH 3:2)

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -2.3^\circ$ (c = 0.3, MeOH)

MS (ESI-):

m/z = 453.25 ([M-H]⁻), 907.59 ([2M-H]⁻), 929.51 ([2M-2H+Na]⁻)

¹H-NMR (500 MHz, D₂O, *cis/trans*-Gemisch 1:10):

trans-Isomer:

δ /ppm = 8.18 (d, $J_{\text{H-meta,H-ortho}} = 8.0$ Hz, 2 H, arom. **H**_{meta}), 7.59 (d, $J_{\text{H-ortho,H-meta}} = 8.0$ Hz, 2 H, arom. **H**_{ortho}), 6.64 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 15.8$ Hz, 1 H, **H-c**), 6.48 (ddd, $J_{\text{H-b,H-c}} = 15.8$ Hz, $J_{\text{H-b,H-a}} = 7.4$ Hz, 1 H, **H-b**), 3.92-3.84 (m, 2 H, **H-8**, **H-9a**), 3.84 (dd, $J_{5,4} = 10.1$ Hz, $J_{5,6} = 9.9$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.75 (ddd, $J_{4,3\text{ax}} = 11.4$ Hz, $J_{4,5} = 10.1$ Hz, $J_{4,3\text{eq}} = 4.5$ Hz, 1 H, **H-4**), 3.68 (dd, $J_{6,5} = 9.9$ Hz, $J_{6,7} = 1.1$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.65 (dd, $J_{9\text{b},9\text{a}} = 12.1$ Hz, $J_{9\text{b},8} = 6.5$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.59 (dd, $J_{7,8} = 8.7$ Hz, $J_{7,6} = 1.1$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.74 (d, $J_{\text{H-a,H-b}} = 7.4$ Hz, 2 H, **H-a**), 2.68 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.1$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.5$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.05 (s, 3 H, NHAcCH₃), 1.71 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.1$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 11.4$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

cis-Isomer:

δ /ppm = 8.22 (d, $J_{\text{H-meta,H-ortho}} = 8.5$ Hz, 2 H, arom. **H**_{meta}), 7.51 (d, $J_{\text{H-ortho,H-meta}} = 8.5$ Hz, 2 H, arom. **H**_{ortho}), 6.74 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 12.0$ Hz, 1 H, **H-c**), 5.98 (ddd, $J_{\text{H-b,H-c}} = 12.0$ Hz, $J_{\text{H-b,H-a}} = 7.6$ Hz, 1 H, **H-b**), 2.90-2.69 (m, 2 H, **H-a**), 2.60 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.2$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.5$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.04 (s, 3 H, AcCH₃), 1.69-1.62 (m, 1 H, **H-3_{ax}**).

Die übrigen Protonen des *cis*-Isomers konnten nicht detektiert werden, da sie unter den Signalen des *trans*-Isomers verborgen waren.

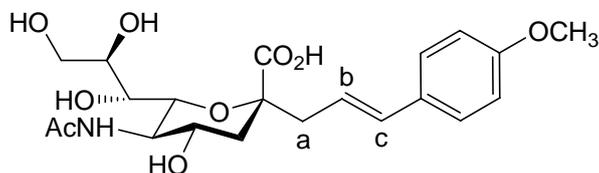
¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, *cis/trans*-Gemisch 1:10):

trans-Isomer:

δ /ppm = 132.17 (**C-c**), 128.63 (**C-b**), 126.88 (arom. **C**_{ortho}), 124.06 (arom. **C**_{meta}), 73.73 (**C-6**), 71.82 (**C-8**), 68.32 (**C-7**), 68.22 (**C-4**), 62.75 (**C-9**), 52.17 (**C-5**), 43.03 (**C-a**), 39.70 (**C-3**), 22.04 (NHAcCH₃).

Die quartären Kohlenstoffe sowie die Kohlenstoffe des *cis*-Isomers konnten nicht detektiert werden.

8.3.26 (E)-5-Acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(3-(4-methoxyphenyl)-prop-2-enyl)-D-erythro-L-manno-nononsäure (71)



12 mg (26 μmol) **69** wurden nach AAV 3 verseift. Das Rohprodukt wurde über Biogel P2 gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute:	11 mg (26 μmol ; quant.); farbloser Feststoff
Summenformel:	$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NO}_9$
Molmasse:	439.46 g/mol
R_f -Wert:	0.56 (BuOH/AcOH/ H_2O 5:2:2)
Schmelzpunkt:	145 $^\circ\text{C}$ (Zers.)
Drehwert:	$[\alpha]_D^{20} = +7.0^\circ$ (c = 0.5, MeOH)

MS (MALDI-TOF):

$m/z = 440.5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 462.4 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 478.4 ($[\text{M}+\text{K}]^+$)

MS (FAB):

$m/z = 440.3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 462.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 478.3 ($[\text{M}+\text{K}]^+$)

HRMS (FAB):

$m/z = 440.191040$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), ber. 440.192057

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O):

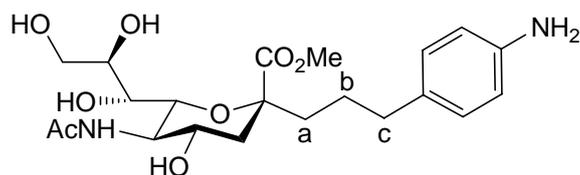
$\delta/\text{ppm} = 7.41$ (d, $J_{\text{H-ortho,H-meta}} = 8.8$ Hz, 2 H, arom. H_{ortho}), 6.97 (d, $J_{\text{H-meta,H-ortho}} = 8.8$ Hz, 2 H, arom. H_{meta}), 6.49 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 15.9$ Hz, 1 H, **H-c**), 6.12 (ddd, $J_{\text{H-b,H-c}} = 15.9$ Hz, $J_{\text{H-b,H-a}} = 7.5$ Hz, 1 H, **H-b**), 3.89 (ddd, $J_{8,7} = 8.6$ Hz, $J_{8,9b} = 6.2$ Hz, $J_{8,9a} = 2.7$ Hz, 1 H, **H-8**), 3.90 - 3.84 (m, 1 H, **H-9a**), 3.83 (s, 3 H, arom. OCH_3), 3.83 - 3.78 (m, 1 H, **H-5**), 3.74 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.7$ Hz, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-4**), 3.66 (dd, $J_{6,5} = 10.2$ Hz, $J_{6,7} = 1.5$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.66 - 3.62 (m, 1 H, **H-9b**), 3.59 (dd, $J_{7,8} = 8.6$ Hz, $J_{7,6} = 1.5$ Hz, 1 H,

H-7), 2.66 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.0$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.65-2.64 (m, 2 H, **H-a**), 2.05 (s, 3 H, AcCH₃), 1.69 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.0$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 11.7$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O):

δ/ppm = 176.75 (C=O), 132.95 (C-c), 130.37 (quart. arom. C_{ipso}), 127.58 (arom. C_{ortho}), 121.67 (C-b), 114.32 (arom. C_{meta}), 81.01 (C-2), 73.76 (C-6), 71.90 (C-8), 68.38, 68.35 (C-4, C-7), 62.80 (C-9), 55.43 (arom. OCH₃), 52.24 (C-5), 43.05 (C-a), 39.71 (C-3), 22.06 (NHAcCH₃).

8.3.27 Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(3-(4-aminophenyl)-propyl)-D-erythro-L-manno-nononat (72)



49 mg (0.10 mmol) **68** wurden nach **AAV 5** hydriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan mit Methanol-Gradient).

Ausbeute: 46 mg (0.10 mmol; quant.); farbloses Öl

Summenformel: C₂₁H₃₂N₂O₈

Molmasse: 440.49 g/mol

R_f-Wert: 0.38 (CH₂Cl₂/MeOH 4:1)

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = +2.4^\circ$ (c = 0.5, MeOH)

MS (MALDI-TOF):

m/z = 463.8 ([M+Na]⁺), 479.7 ([M+K]⁺)

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄)

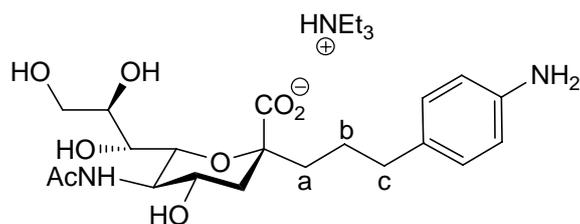
δ/ppm = 6.90 (d, $J_{\text{H-ortho},\text{H-meta}} = 8.3$ Hz, 2 H, arom. **H_{ortho}**), 6.67 (d, $J_{\text{H-meta},\text{H-ortho}} = 8.3$ Hz, 2 H, arom. **H_{meta}**), 3.85-3.80 (m, 2 H, **H-8**, **H-9a**), 3.75 (s, 3 H, OCH₃), 3.68 (dd, $J_{5,6} = 10.1$ Hz, $J_{5,4} = 10.1$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.62 (dd, $J_{9b,9a} = 12.0$ Hz, $J_{9b,8} = 6.3$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.58 (ddd, $J_{4,3\text{ax}} = 11.7$ Hz, $J_{4,5} = 10.1$ Hz, $J_{4,3\text{eq}} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-4**), 3.48 (dd, $J_{6,5} = 10.1$ Hz,

$J_{6,7} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.47 (dd, $J_{7,8} = 8.7$ Hz, $J_{7,6} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.56 (dd, $J_{3_{\text{eq}},3_{\text{ax}}} = 13.1$ Hz, $J_{3_{\text{eq}},4} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.52-2.40 (m, 2 H, **H-c**), 1.99 (s, 3 H, AcCH₃), 1.79-1.63 (m, 3 H, **H-a**, **H-b^I**), 1.54 (dd, $J_{3_{\text{ax}},3_{\text{eq}}} = 13.1$ Hz, $J_{3_{\text{ax}},4} = 11.7$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**), 1.49-1.38 (m, 1 H, **H-b^{II}**).

¹³C-NMR (125 MHz, MeOH-d₄):

$\delta/\text{ppm} = 175.65$ (C-1), 175.27 (AcC=O), 146.05 (quart. arom. C_{para}), 133.09 (quart. arom. C_{ipso}), 130.01 (arom. C_{ortho}), 117.06 (arom. C_{meta}), 81.63 (C-2), 75.75 (C-6), 72.87 (C-8), 70.19 (C-7), 69.08 (C-4), 64.59 (C-9), 54.19 (C-5), 53.06 (OCH₃), 42.10 (C-3), 40.82 (C-a), 35.77 (C-c), 26.64 (C-b), 22.62 (AcCH₃).

8.3.28 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(3-(4-aminophenyl)-propyl)-D-erythro-L-manno-nononsäure (73)



8 mg (0.02 mmol) **72** wurden in 2 mL Wasser (bidest.) gelöst, mit ein paar Tropfen Triethylamin versetzt und bis zur vollständigen Verseifung bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 2 mL Ethanol versetzt, im Vakuum auf die Hälfte des Volumens eingengt und gefriergetrocknet. Das Produkt wurde als Triethylammoniumsalz erhalten.

Ausbeute: 9 mg (0.02 mmol; quant.); farbloser Schaum

Summenformel: C₂₀H₃₀N₂O₈

Molmasse: 426.46 g/mol

R_f-Wert: 0.41 (BuOH/AcOH/H₂O 5:2:2)

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = +26.8^\circ$ (c = 0.5, MeOH)

MS (FAB):

m/z = 427.2 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

$m/z = 427.207977$ ($[M+H]^+$), ber. 427.208041

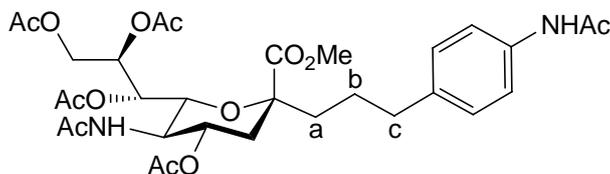
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , Triethylammoniumsalz):

$\delta/\text{ppm} = 7.13$ (d, $J_{\text{H-ortho,H-meta}} = 8.3$ Hz, 2 H, arom. H_{ortho}), 6.85 (d, $J_{\text{H-meta,H-ortho}} = 8.3$ Hz, 2 H, arom. H_{meta}), $3.88\text{-}3.82$ (m, 2 H, **H-8**, **H-9a**), 3.72 (dd, $J_{5,4} = 9.8$ Hz, $J_{5,6} = 9.8$ Hz, 1 H, **H-5**), $3.68\text{-}3.60$ (m, 2 H, **H-4**, **H-9b**), 3.57 (dd, $J_{6,5} = 9.8$ Hz, $J_{6,7} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.55 (dd, $J_{7,8} = 8.6$ Hz, $J_{7,6} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-7**), 3.21 (q, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.3$ Hz, 6 H, NCH_2CH_3), 2.58 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.8$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), $2.58\text{-}2.53$ (m, 2 H, **H-c**), 2.04 (s, 3 H, AcCH_3), $1.73\text{-}1.52$ (m, 3 H, **H-a**, **H-b^I**), 1.48 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.8$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 11.4$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**), $1.34\text{-}1.26$ (m, 1 H, **H-b^{II}**), 1.29 (t, $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7.3$ Hz, 9 H, NCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O , Triethylammoniumsalz):

$\delta/\text{ppm} = 129.41$ (arom. C_{ortho}), 116.75 (arom. C_{meta}), 81.89 (**C-2**), 73.43 (**C-6**), 72.04 (**C-8**), 69.01 (**C-7**), 68.36 (**C-4**), 62.69 (**C-9**), 52.44 (**C-5**), 46.74 (NCH_2CH_3), 41.02 (**C-3**), 39.34 (**C-a**), 34.19 (**C-c**), 25.37 (**C-b**), 22.01 (NHAcCH_3), 8.26 (NCH_2CH_3).

8.3.29 Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2,6-anhydro-3,5-didesoxy-2-*C*-(3-(4-acetamidophenyl)-propyl)-*D*-erythro-*L*-mannononat (74)



13 mg (30 μmol) **72** wurden nach **AAV 1** acetyliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Ethylacetat).

Ausbeute: 20 mg (30 μmol ; quant.); leicht gelbliches Öl
 Summenformel: $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{13}$
 Molmasse: 650.67 g/mol
 R_f -Wert: 0.42 (EE/MeOH 9:1)

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -14.7^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

MS (FAB):

m/z = 651.2 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

m/z = 651.275387 ([M+H]⁺), ber. 651.276515

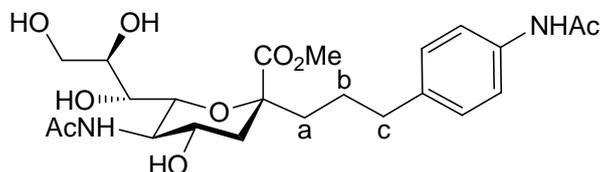
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ/ppm = 7.39 (d, $J_{\text{H-meta,H-ortho}} = 8.3$ Hz, 2 H, arom. **H**_{meta}), 7.10 (d, $J_{\text{H-ortho,H-meta}} = 8.3$ Hz, 2 H, arom. **H**_{ortho}), 5.35 (ddd, $J_{8,7} = 8.3$ Hz, $J_{8,9b} = 5.9$ Hz, $J_{8,9a} = 2.4$ Hz, 1 H, **H**-8), 5.31-5.29 (m, 1 H, **H**-7), 5.21 (br d, $J_{5\text{-NH},5} = 9.7$ Hz, 1 H, 5-NH), 4.78 (ddd, $J_{4,3\text{ax}} = 11.8$ Hz, $J_{4,5} = 10.1$ Hz, $J_{4,3\text{eq}} = 4.5$ Hz, 1 H, **H**-4), 4.38 (dd, $J_{9a,9b} = 12.4$ Hz, $J_{9a,8} = 2.4$ Hz, 1 H, **H**-9a), 4.10 (dd, $J_{9b,9a} = 12.4$ Hz, $J_{9b,8} = 5.9$ Hz, 1 H, **H**-9b), 4.02-3.96 (m, 2 H, **H**-5, **H**-6), 3.71 (s, 3 H, OCH₃), 2.63-2.48 (m, 2 H, **H**-c), 2.44 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.9$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.5$ Hz, 1 H, **H**-3_{eq}), 2.16 (s, 3 H, AcCH₃), 2.12 (s, 3 H, AcCH₃), 2.11 (s, 3 H, arom. NHAcCH₃), 2.02 (s, 3 H, AcCH₃), 2.00 (s, 3 H, AcCH₃), 1.86 (5-NHAcCH₃), 1.77-1.67 (m, 4 H, 2x **H**-a, **H**-b^I, **H**-3_{ax}), 1.45-1.35 (m, 1 H, **H**-b^{II}).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ/ppm = 172.13 (**C**-1), 171.22, 170.89, 170.37, 170.24 (AcC=O), 137.78, (arom. **C**_{ipso}), 135.91 (arom. **C**_{para}), 129.02 (arom. **C**_{ortho}), 120.16 (arom. **C**_{meta}), 80.38 (**C**-2), 73.46 (**C**-6), 70.34 (**C**-4), 69.79 (**C**-8), 68.08 (**C**-7), 62.60 (**C**-9), 52.49 (OCH₃), 49.87 (**C**-5), 39.41 (**C**-c), 38.03 (**C**-3), 34.94 (**C**-a), 24.65 (**C**-b), 23.33 (NHAcCH₃), 21.27, 21.04, 20.94 (AcCH₃).

8.3.30 Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-didesoxy-2-C-(3-(4-acetamidophenyl)-propyl)-D-erythro-L-manno-nononat (75)



a) 15 mg (23 μmol) **74** wurden nach **AAV 2** deacetyliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Ethylacetat mit Methanol-Gradient).

Ausbeute: 6.0 mg (12 μmol ; 54%); farbloses Öl

b) 11 mg (17 μmol) **74** wurden in 2 mL trockenem Methanol gelöst und mit 0.2 mL Triethylamin (frisch über basisches Aluminiumoxid filtriert) versetzt. Die Lösung wurde für 17 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum von Lösungsmittel befreit.

Ausbeute: 8.0 mg (17 μmol ; 98%); farbloses Öl

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_9$

Molmasse: 482.52 g/mol

R_f -Wert: 0.31 (EE/MeOH 7:3)

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = +0.7^\circ$ (c = 1, MeOH)

MS (MALDI-TOF):

m/z = 483.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 505.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 521.1 ($[\text{M}+\text{K}]^+$)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH- d_4)

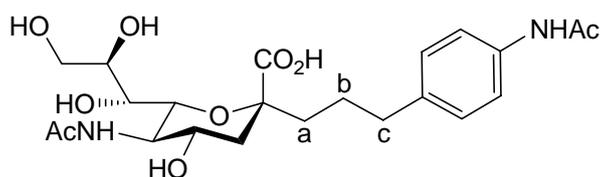
δ/ppm = 7.44 (d, $J_{\text{H-meta,H-ortho}} = 8.5$ Hz, 2 H, arom. **H**_{meta}), 7.12 (d, $J_{\text{H-ortho,H-meta}} = 8.5$ Hz, 2 H, arom. **H**_{ortho}), 3.87-3.82 (m, 2 H, **H**-8, **H**-9a), 3.77 (s, 3 H, OCH₃), 3.70 (dd, $J_{5,4} = 10.1$ Hz, $J_{5,6} = 10.1$ Hz, 1 H, **H**-5), 3.64 (dd, $J_{9b,9a} = 12.1$ Hz, $J_{9b,8} = 6.5$ Hz, 1 H, **H**-9b), 3.63-3.57 (m, 1 H, **H**-4), 3.51 (dd, $J_{6,5} = 10.1$ Hz, $J_{6,7} = 1.7$ Hz, 1 H, **H**-6), 3.49 (dd, $J_{7,8} = 8.8$ Hz, $J_{7,6} = 1.7$ Hz, 1 H, **H**-7), 2.59 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.1$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.6$ Hz, 1 H, **H**-3_{eq}), 2.63-2.53 (m, 2 H, 2x **H**-c), 2.11 (s, 3 H, arom. NHAcCH₃), 2.01 (s, 3 H, NHAcCH₃), 1.82-1.71 (m, 3 H,

2x **H-a**, **H-b^I**), 1.57 (dd, $J_{3ax,3eq} = 13.1$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.6$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**), 1.59-1.48 (m, 1 H, **H-b^{II}**).

¹³C-NMR (125 MHz, MeOH-d₄):

δ/ppm = 174.51 (C=O), 139.03 (arom. C_{ipso}), 137.74 (arom. C_{para}), 129.70 (arom. C_{ortho}), 121.41 (arom. C_{meta}), 81.60 (C-2), 75.79 (C-6), 72.88 (C-8), 70.25 (C-7), 69.08 (C-4), 64.64 (C-9), 54.21 (C-5), 53.06 (OCH₃), 42.09 (C-3), 40.78 (C-a), 35.96 (C-c), 26.38 (C-b), 23.71 (arom. NHAcCH₃), 22.61 (NHAcCH₃).

8.3.31 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-2-C-(3-(4-acetamidophenyl)-propyl)-D-erythro-L-manno-nononsäure (76)



6.0 mg (12 μmol) **75** wurden nach **AAV 3** verseift. Das Rohprodukt wurde über Biogel P2 gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 4 mg (9 μmol; 69%); farbloser amorpher Feststoff

Summenformel: C₂₂H₃₂N₂O₉

Molmasse: 468.50 g/mol

R_f-Wert: 0.48 (BuOH/AcOH/H₂O 5:2:2)

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = +14.5^\circ$ (c = 1, MeOH)

MS (FAB):

m/z = 469.2 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

m/z = 469.218689 ([M+H]⁺), ber. 469.218606

¹H-NMR (500 MHz, D₂O)

δ/ppm = 7.37 (d, $J_{H-meta,H-ortho} = 8.4$ Hz, 2 H, arom. **H_{meta}**), 7.29 (d, $J_{H-ortho,H-meta} = 8.4$ Hz, 2 H, arom. **H_{ortho}**), 3.92-3.85 (m, 2 H, **H-8**, **H-9a**), 3.81 (dd, $J_{5,4} = 10.4$ Hz, $J_{5,6} = 10.2$ Hz, 1 H,

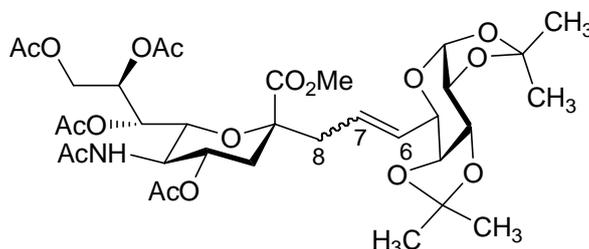
H-5), 3.73 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.6$ Hz, $J_{4,5} = 10.4$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-4**), 3.69-3.64 (m, 2 H, **H-6**, **H-9b**), 3.58 (dd, $J_{7,8} = 8.5$ Hz, $J_{7,6} = 1.3$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.68-2.64 (m, 2 H, 2x **H-c**), 2.61 (dd, $J_{3eq,3ax} = 13.3$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.19 (s, 3 H, arom. NHAcCH₃), 2.06 (s, 3 H, NHAcCH₃), 1.86-1.72 (m, 3 H, 2x **H-a**, **H-b**), 1.68-1.60 (m, 1 H, **H-b^l**), 1.62 (dd, $J_{3ax,3eq} = 13.3$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.6$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O):

δ /ppm = 132.09 (arom. C_{ortho}), 125.23 (arom. C_{meta}), 83.32 (C-2), 76.57 (C-6), 74.59 (C-8), 71.35 (C-7), 71.10 (C-4), 65.83 (C-9), 55.20 (C-5), 41.75 (C-3), 41.40 (C-a), 37.15 (C-c), 27.50 (C-b), 25.04 (2x NHAcCH₃).

Carbonyl-Kohlenstoffe wurden nicht detektiert.

8.3.32 (*E/Z*)-Methyl-5'-acetamido-4',7',8',9'-tetra-*O*-acetyl-2',6'-anhydro-3',5'-dideoxy-2'-*C*-(6,7,8-trideoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galacto-oct-6-enopyranos-8-yl)-D-erythro-L-manno-nononat (**80**)



75 mg (0.15 mmol) **35** wurden mit **79**^[181] (240 mg; 0.936 mmol) unter Verwendung von Katalysator **51** (29 mg, 34 μ mol; 23 mol%) nach **AAV 4** umgesetzt.

Ausbeute: 106 mg (143 μ mol, 95%); farbloses Öl

Summenformel: C₃₄H₄₉NO₁₇

Molmasse: 743.75 g/mol

R_f-Wert: 0.40 (Toluol/Aceton 1:1)

Drehwert: $[\alpha]_{546}^{20} = -45^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

MS (MALDI-TOF):

m/z = 766.3 [M+Na]⁺, 782.3 [M+K]⁺

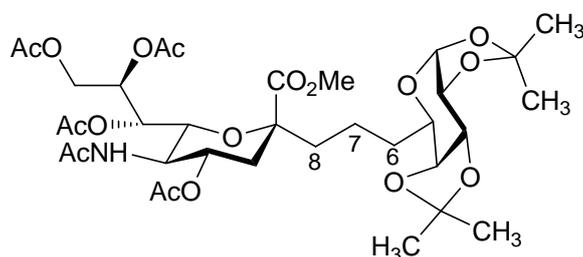
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃; *E/Z*-Gemisch 2:1, Überschußisomer charakterisiert):

δ/ppm = 5.73-5.59 (m, 2 H, **H-6**, **H-7**), 5.52 (d, $J_{1,2} = 5.1$ Hz, 1 H, **H-1**), 5.37-5.30 (m, 2 H, **H-8'**, **H-7'**), 5.18 (br d, 1 H, NH), 4.85-4.77 (m, 1 H, **H-4'**), 4.59 (dd, $J_{3,4} = 7.9$ Hz, $J_{3,2} = 2.3$ Hz, 1 H, **H-3**), 4.34 (dd, $J_{9a',9b'} = 12.4$ Hz, $J_{9a',8'} = 2.6$ Hz, 1 H, **H-9a'**), 4.31-4.24 (m, 2 H, **H-2**, **H-5**), 4.20 (dd, $J_{4,3} = 7.9$ Hz, $J_{4,5} = 1.9$ Hz, 1 H, **H-4**), 4.08 (dd, 1 H, $J_{9b',9a'} = 12.4$ Hz, $J_{9b',8'} = 5.6$ Hz, **H-9b'**), 4.01-3.97 (m, 2 H, **H-5'**, **H-6'**), 3.71 (s, 3 H, OCH₃), 2.52-2.43 (m, 3 H, **H-3'**_{eq}, **H-8**), 2.11 (s, 6 H, 2x AcCH₃), 2.03 (s, 3 H, AcCH₃), 2.00 (s, 3 H, AcCH₃), 1.86 (s, 3 H, AcCH₃), 1.77 (dd, 1 H, $J_{3'ax,3'eq} = 12.5$ Hz, $J_{3'ax,4'} = 12.2$ Hz, **H-3'**_{ax}), 1.57 (s, 3 H, CH₃), 1.45 (s, 3 H, CH₃), 1.33 (s, 3 H, CH₃), 1.32 (s, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ/ppm = 171.58, 171.18, 170.80, 170.32 170.07 (AcC=O), 130.91, 126.91 (C-6, C-7), 109.14, 108.55 (C(CH₃)₂), 96.51 (C-1), 80.45 (C-2'), 73.76 (C-6'), 73.31 (C-4), 70.94, 70.43 (C-2, C-3), 70.37 (C-4'), 69.12 (C-8'), 68.70 (C-7'), 67.80 (C-5), 62.45 (C-9'), 52.54 (OCH₃), 49.73 (C-5'), 42.95 (C-8), 37.49 (C-3'), 26.18 (CH₃), 26.10 (CH₃), 25.05 (CH₃), 24.45 (CH₃), 23.32 (AcCH₃), 21.19 (AcCH₃), 21.02 (AcCH₃), 20.93 (2x AcCH₃).

8.3.33 Methyl-5'-acetamido-4',7',8',9'-tetra-*O*-acetyl-2',6'-anhydro-3',5'-didesoxy-2'-*C*-(6,7,8-tridesoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -*D*-galacto-octopyranos-8-yl)-*D*-erythro-*L*-manno-nononat (**81**)



65 mg (87 μ mol) **80** wurden nach **AAV 5** hydriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Toluol/Aceton).

Ausbeute: 62 mg (83 μ mol, 95%); farbloses Öl

Summenformel: C₃₄H₅₁NO₁₇

Molmasse: 745.77 g/mol
 R_f-Wert: 0.44 (Toluol/Aceton 1:1)
 Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -50^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)

MS (MALDI-TOF):

m/z = 746.3 [M+H]⁺, 768.3 [M+Na]⁺, 784.3 [M+K]⁺

HRMS (ESI):

m/z = 768.3065 [M+Na]⁺; ber.: 768.3055.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

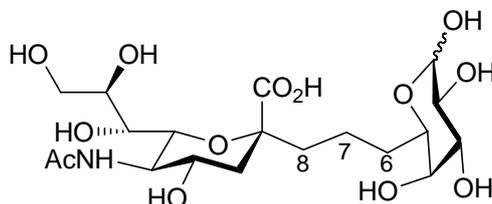
δ/ppm = 5.50 (d, J_{1,2} = 5.1 Hz, 1 H, **H-1**), 5.36-5.29 (m, 2 H, **H-8'**, **H-7'**), 5.13 (br d, 1 H, **NH**), 4.84-4.77 (m, 1 H, **H-4'**), 4.57 (dd, J_{3,4} = 7.9 Hz, J_{3,2} = 2.0 Hz, 1 H, **H-3**), 4.35 (dd, J_{9a',9b'} = 12.2 Hz, J_{9a',8'} = 2.5 Hz, 1 H, **H-9a'**), 4.27 (dd, J_{2,1} = 5.1 Hz, J_{2,3} = 2.0 Hz, 1 H, **H-2**), 4.14 (dd, J_{4,3} = 7.9 Hz, J_{4,5} = 1.8 Hz, 1 H, **H-4**), 4.11 (dd, J_{9b',9a'} = 12.2 Hz, J_{9b',8'} = 5.4 Hz, 1 H, **H-9b'**), 4.02-3.94 (m, 2 H, **H-5'**, **H-6'**), 3.74 (s, 3 H, **OCH₃**), 3.70-3.65 (m, 1 H, **H-5**), 2.49 (dd, J_{3'eq,3'ax} = 12.7 Hz, J_{3'eq,4'} = 4.6 Hz, 1 H, **H-3'eq**), 2.12 (s, 6 H, 2x **AcCH₃**), 2.03 (s, 3 H, **AcCH₃**), 2.02 (s, 3 H, **AcCH₃**), 1.87 (s, 3 H, **NHAcCH₃**), 1.79-1.62 (m, 7 H, **H-3'ax**, **H-6**, **H-7**, **H-8**), 1.53 (s, 3 H, **CH₃**), 1.45 (s, 3 H, **CH₃**), 1.34 (s, 3 H, **CH₃**), 1.32 (s, 3 H, **CH₃**).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ/ppm = 109.04, 108.39 (**C(CH₃)₂**), 96.63 (**C-1**), 80.49 (**C-2'**), 73.34 (**C-6'**), 72.76 (**C-4**), 71.03 (**C-3**), 70.75 (**C-2**), 70.44 (**C-4'**), 69.41 (**C-8'**), 67.92 (**C-7'**), 67.29 (**C-5**), 62.40 (**C-9'**), 52.49 (**OCH₃**), 49.94 (**C-5'**), 39.83, 38.00, 30.20 (**C-3'**, **C-6**, **C-8**), 26.20 (**CH₃**), 26.16 (**CH₃**), 25.12 (**CH₃**), 24.42 (**CH₃**), 23.39 (**AcCH₃**), 22.09 (**AcCH₃**), 21.07 (**AcCH₃**), 20.98 (**AcCH₃**), 20.96 (**AcCH₃**), 19.56 (**C-7**).

Carbonyl-Kohlenstoffe wurden nicht detektiert.

8.3.34 5'-Acetamido-2',6'-anhydro-3',5'-dideoxy-2'-C-(6,7,8-trideoxy-D-galacto-octopyranos-8-yl)-D-erythro-L-manno-nonulosensäure (82)



62 mg (83 μmol) **81** wurden in methanolischer Natriummethanolat-Lösung (20 mL, 0.1 M) gelöst und für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC) wurde die Lösung mit Ionentauscher (Dowex 50X8, H^+) neutralisiert, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und mit einer Spatelspitze Ionentauscher (Dowex 50X8, H^+) für 24 h bei 60 °C gerührt. Nach Filtration wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen an 0.1 molarer Natronlauge versetzt und erneut für 2 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC) wurde wieder mit Ionentauscher (Dowex 50X8, H^+) neutralisiert, filtriert, durch Größenausschlußchromatographie über Biogel P2 gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute:	24 mg (50 μmol ; 60%); farbloser Feststoff
Summenformel:	$\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{NO}_{13}$
Molmasse:	483.46 g/mol
R_f -Wert:	0.14 (EE/MeOH/ H_2O 7:3:1)
Schmelzpunkt:	162-164 °C (Zers.)
Drehwert:	$[\alpha]_D^{20} = +12.4^\circ$ (c = 1, D_2O)

MS (MALDI-TOF):

$m/z = 484.4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 506.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 522.3 $[\text{M}+\text{K}]^+$

HRMS (ESI):

$m/z = 506.1849$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ber.: 506.1850.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O ; α/β -Gemisch 1:2):

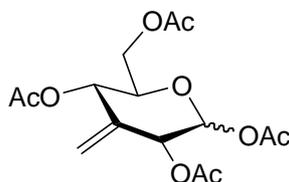
$\delta/\text{ppm} = 5.22$ (d, $J_{1\alpha,2\alpha} = 3.8$ Hz, 0.3 H, **H-1 α**), 4.55 (d, $J_{1\beta,2\beta} = 7.8$ Hz, 0.7 H, **H-1 β**), 4.06 - 3.56 (m, 10.3 H, **H-2 α** , **H-3**, **H-4**, **H-5**, **H-4'**, **H-5'**, **H-6'**, **H-7'**, **H-8'**, **H-9'**) 3.47 (dd,

$J_{2\beta,3\beta} = 9.8$ Hz, $J_{2\beta,1\beta} = 7.8$ Hz, 0.7 H, **H-2 β**), 2.63 (dd, $J_{3'_{\text{eq}},3'_{\text{ax}}} = 12.8$ Hz, $J_{3'_{\text{eq}},4'} = 4.5$ Hz, 1 H, **H-3' $_{\text{eq}}$**), 2.06 (s, 3 H, NHAcCH₃), 1.80-1.32 (m, 7 H, **H-3' $_{\text{ax}}$** , **H-6**, **H-7**, **H-8**).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O; α/β -Gemisch 1:2):

$\delta/\text{ppm} = 175.45$ (C=O), 96.68 (C-1 β), 92.54 (C-1 α), 82.21 (C-2'), 74.78, 73.81, 73.44, 72.42, 72.27, 71.05, 70.46, 69.80, 69.33, 68.69 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-4', C-6', C-7', C-8'), 63.07 (C-9'), 52.78 (C-5'), 41.34 (C-3'), 39.87, 30.08 (C-6, C-8), 22.36 (NHAcCH₃), 19.97 (C-7).

8.3.35 1,2,4,6-Tetra-*O*-acetyl-3-desoxy-3-methylen-*D*-ribo-hexopyranose (90)



645 mg (3.66 mmol) **89**^[183] wurden nach **AAV 2** deacetyliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, PE/EE 2:1).

Ausbeute: 1.16 g (3.37 mmol; 92%) farbloses Öl

Summenformel: C₁₅H₂₀O₉

Molmasse: 344.31 g/mol

R_f-Wert: 0.70 (PE/EE 1:1)

MS (MALDI-TOF):

$m/z = 345.0$ ([M+H]⁺), 368.0 ([M+Na]⁺), 384.0 ([M+K]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, α/β -Gemisch 2:3):

$\delta/\text{ppm} = 6.30$ (d, $J_{1\alpha,2\alpha} = 3.7$ Hz, 0.4 H, **H-1 α**), 5.62 (d, $J_{1\beta,2\beta} = 7.5$ Hz, 0.6 H, **H-1 β**), 5.54-5.51 (m, 0.4 H, **H-2 α**), 5.41-5.34 (m, 1.6 H, **H-2 β** , **H-4 α** , **H-4 β**), 5.14-5.12 (m, 1 H, CH₂a α und CH₂a β), 5.11-5.09 (m, 0.6 H, CH₂b β), 5.05-5.03 (m, 0.4 H, CH₂b α), 4.32 (dd, $J_{6a\alpha,6b\alpha} = 12.4$ Hz, $J_{6a\alpha,5\alpha} = 4.1$ Hz, 0.4 H, **H-6a α**), 4.31 (dd, $J_{6a\beta,6b\beta} = 12.3$ Hz, $J_{6a\beta,5\beta} = 4.7$ Hz, 0.6 H, **H-6a β**), 4.13 (dd, $J_{6b\beta,6a\beta} = 12.3$ Hz, $J_{6b\beta,5\beta} = 2.8$ Hz, 0.6 H, **H-6b β**), 4.11 (dd, $J_{6b\alpha,6a\alpha} = 12.4$ Hz, $J_{6b\alpha,5\alpha} = 2.2$ Hz, 0.6 H, **H-6b α**), 3.98 (ddd, $J_{5\alpha,4\alpha} = 10.1$ Hz,

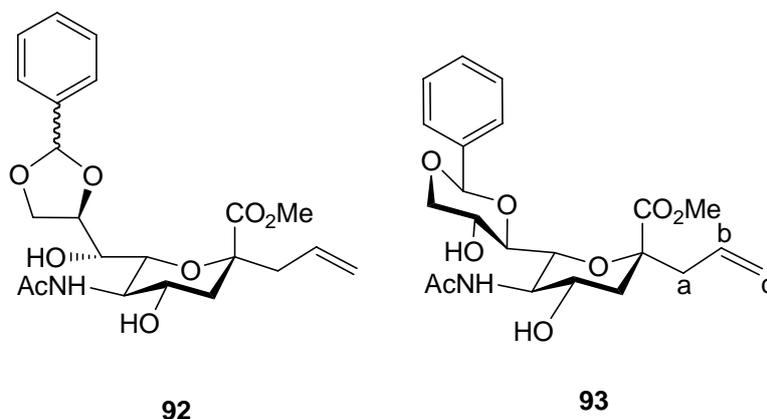
$J_{5\alpha,6\alpha\alpha} = 4.1$ Hz, $J_{5\alpha,6b\alpha} = 2.2$ Hz, 0.4 H, **H-5 α**), 3.77 (ddd, $J_{5\beta,4\beta} = 8.9$ Hz, $J_{5\beta,6a\beta} = 4.7$ Hz, $J_{5\beta,6b\beta} = 2.8$ Hz, 0.6 H, **H-5 β**), 2.17 (s, 1.2 H, AcCH₃ α), 2.15, 2.14, 2.12 (3x s, 3x 1.8 H, AcCH₃ β), 2.11 (s, 1.2 H, AcCH₃ α), 2.11 (s, 1.8 H, AcCH₃ β), 2.09, 2.08 (2x s, 2x 1.2 H, AcCH₃ α).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, α/β -Gemisch 2:3):

$\delta/\text{ppm} = 137.61$ (C-3 β), 136.41 (C-3 α), 109.98 (CH₂ β), 107.05 (CH₂ α), 93.53 (C-1 β), 89.67 (C-1 α), 75.95 (C-5 β), 72.30 (C-5 α), 70.66 (C-2 β), 69.32 (C-2 α), 68.11 (C-4 β), 67.68 (C-4 α), 62.28 (C-6 β), 62.16 (C-6 α), 21.06, 20.94, 20.86, 20.85, 20.78, 20.75, 20.70, 20.63 (8x AcCH₃).

Carbonylgruppen wurden nicht detektiert.

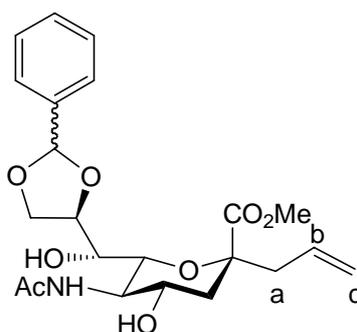
8.3.36 Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-8,9-*O*-benzyliden-3,5-didesoxy-2-*C*-(prop-2-enyl)-*D*-erythro-*L*-manno-nononat (**92**) und Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-7,9-*O*-benzyliden-3,5-didesoxy-2-*C*-(prop-2-enyl)-*D*-erythro-*L*-manno-nononat (**93**)



39 (200 mg, 0.576 mmol) und Benzaldehyd-Dimethylacetal (173 μL , 1.15 mmol) wurden in trockenem Acetonitril gelöst. Nach Kühlen der Lösung auf 0 °C wurde eine katalytische Menge (8 mg, 0.04 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure hinzugegeben. Die Reaktion wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt bis das Edukt nicht mehr detektiert wurde (DC). Anschließend wurde einige Tropfen Triethylamin neutralisiert und das Lösungsmittel im

Vakuum entfernt. Die Produkte wurden säulenchromatographisch getrennt (Kieselgel, CH₂Cl₂/MeOH).

Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-8,9-*O*-benzyliden-3,5-dideoxy-2-*C*-(prop-2-enyl)-*D*-erythro-*L*-manno-nononat (**92**)



Ausbeute: 143 mg (0.328 mmol, 57%) farbloser Feststoff

Summenformel: C₂₂H₂₉NO₈

Molmasse: 435.47 g/mol

R_f-Wert: 0.25 (Toluol/Aceton 1:1)

Schmelzpunkt: 112 °C

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = +83^\circ$ (c = 0.1, CH₂Cl₂)

MS (FAB):

m/z = 436.2 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

m/z = 436.197968 ([M+H]⁺), ber. 436.197142

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, Diastereomerenmischung 1:1):

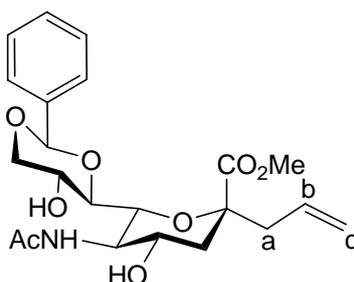
δ/ppm = 7.50-7.46 (m, 2 H, arom. **H**), 7.38-7.35 (m, 3 H, arom. **H**), 5.87 (s, 0.5 H, PhCH^I), 5.85-5.74 (m, 1 H, **H**-b), 5.76 (s, 0.5 H, PhCH^{II}), 5.12-5.06 (m, 2 H, **H**-c), 4.40-4.34 (m, 1 H, **H**-8), 4.27 (dd, $J_{9aI,9bI} = 8.5$ Hz, $J_{9aI,8I} = 6.7$ Hz, 0.5 H, **H**-9a^I), 4.24 (dd, $J_{9aII,9bII} = 8.3$ Hz, $J_{9aII,8II} = 5.2$ Hz, 0.5 H, **H**-9a^{II}), 4.11 (dd, $J_{9bI,9aI} = 8.5$ Hz, $J_{9bI,8I} = 7.6$ Hz, 0.5 H, **H**-9b^I), 4.09 (dd, $J_{9bII,9aII} = 8.3$ Hz, $J_{9bII,8II} = 7.3$ Hz, 0.5 H, **H**-9b^{II}), 3.82 (dd, $J_{7I,8I} = 5.2$ Hz, $J_{7I,6I} = 1.1$ Hz, 0.5 H, **H**-7^I), 3.75 (dd, $J_{5I,4I} = 10.2$ Hz, $J_{5I,6I} = 10.2$ Hz, 0.5 H, **H**-5^I), 3.74 (dd, $J_{5II,4II} = 10.2$ Hz, $J_{5II,6II} = 10.2$ Hz, 0.5 H, **H**-5^{II}), 3.69-3.59 (m, 1.5 H, **H**-7^{II}, **H**-4), 3.66 (s,

1.5 H, OCH₃), 3.65 (s, 1.5 H, OCH₃), 3.50 (dd, $J_{6\text{II},5\text{II}} = 10.2$ Hz, $J_{6\text{II},7\text{II}} = 1.1$ Hz, 0.5 H, H-6^{II}), 3.47 (dd, $J_{6\text{II},5\text{II}} = 10.2$ Hz, $J_{6\text{II},7\text{II}} = 1.1$ Hz, 0.5 H, H-6^I), 2.56-2.44 (m, 3 H, H-a, H-3_{eq}), 2.01 (s, 1.5 H, AcCH₃), 1.98 (s, 1.5 H, AcCH₃), 1.54 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.8$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 11.7$ Hz, 0.5 H, H-3_{ax}), 1.53 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.8$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 11.7$ Hz, 0.5 H, H-3_{ax}).

¹³C-NMR (125 MHz, MeOH-d₄):

δ/ppm = 139.59 (quart. arom. C), 133.21, 133.16 (C-b), 130.31, 130.14, 129.23, 127.97, 127.68 (arom. C), 119.26, 119.17 (C-c), 105.08 (PhCH^{II}), 104.84 (PhCH^I), 81.99, 81.88 (C-2), 78.11, 77.92 (C-8), 76.72, 76.31 (C-6), 70.93, 70.89 (C-7), 69.07, 68.92 (C-4), 68.59, 68.48 (C-9), 54.11 (C-5), 52.46, 52.43 (OCH₃), 45.64, 45.61 (C-a), 41.27 (C-3), 22.72 (AcCH₃).

Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-7,9-O-benzyliden-3,5-dideoxy-2-C-(prop-2-enyl)-D-erythro-L-manno-nononat (93)



Ausbeute: 88 mg (0.20 mmol, 35%); farbloser Feststoff

Summenformel: C₂₂H₂₉NO₈

Molmasse: 435.47 g/mol

R_f-Wert: 0.13 (Toluol/Aceton 1:1)

Schmelzpunkt: 83-84 °C

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -21.4^\circ$ (c = 0.5, MeOH)

MS (FAB):

m/z = 436.2 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

m/z = 436.197968 ([M+H]⁺), ber. 436.197142

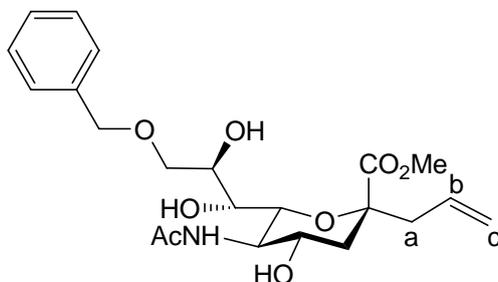
¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄):

δ/ppm = 7.59-7.56 (m, 2 H, arom. **H**), 7.37-7.30 (m, 3 H, arom. **H**), 5.88-5.75 (m, 1 H, **H-b**), 5.43 (s, 1 H, PhCH), 5.07-5.03 (m, 2 H, **H-c**), 4.27 (dd, $J_{9a,9b} = 10.6$ Hz, $J_{9a,8} = 5.4$ Hz, 1 H, **H-9a**), 4.04 (ddd, $J_{8,9b} = 10.0$ Hz, $J_{8,7} = 9.7$ Hz, $J_{8,9a} = 5.4$ Hz, 1 H, **H-8**), 4.02 (dd, $J_{5,6} = 10.5$ Hz, $J_{5,4} = 10.3$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.87 (dd, $J_{6,5} = 10.5$ Hz, $J_{6,7} = 1.1$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.74 (s, 3 H, OCH₃), 3.60 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.9$ Hz, $J_{4,5} = 10.3$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-4**), 3.56 (dd, $J_{9b,9a} = 10.6$ Hz, $J_{9b,8} = 10.0$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.55 (dd, $J_{7,8} = 9.7$ Hz, $J_{7,6} = 1.1$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.54-2.42 (m, 3 H, **H-a**, **H-3_{eq}**), 1.99 (s, 3 H, AcCH₃), 1.54 (dd, $J_{3ax,3eq} = 12.8$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.9$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

¹³C-NMR (125 MHz, MeOH-d₄):

δ/ppm = 133.41 (**C-b**), 129.50, 128.84, 127.50 (arom. **C**), 118.89 (**C-c**), 102.24 (PhCH), 81.77 (**C-2**), 80.78 (**C-7**), 73.16 (**C-6**), 72.62 (**C-9**), 69.76 (**C-4**), 61.36 (**C-8**), 52.75 (**C-5**), 52.55 (OCH₃), 45.58 (**C-a**), 41.11 (**C-3**), 22.93 (AcCH₃).

8.3.37 Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-9-*O*-benzyl-3,5-dideoxy-2-*C*-(prop-2-enyl)-*D*-erythro-*L*-manno-nononat (**94**)



92 (160 mg, 0.367 mmol), Boran-Trimethylamin-Komplex (0.11 g, 1.5 mmol) und Aluminiumchlorid (294 mg, 2.20 mmol) wurden zusammen in 8.4 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Nach 5 min Rühren wurde Wasser (9.9 µL, 0.55 mmol) dazugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur für 4 h gerührt. Nach DC-Kontrolle wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser (4.2 mL) und 0.1 molarer Salzsäure (4.2 mL) abgebrochen. Die Lösung wurde mit Dichlormethan (42 mL) verdünnt und zweimal mit 20 mL 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit Wasser (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum vom

Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol).

Ausbeute: 82 mg (0.19 mmol, 51%); farbloser Feststoff
 Summenformel: C₂₂H₃₁NO₈
 Molmasse: 437.48 g/mol
 R_f-Wert: 0.24 (CHCl₂/MeOH 10:1)
 Schmelzpunkt: 101 °C
 Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -104^\circ$ (c = 0.2, CH₂Cl₂)

MS (FAB):

m/z = 438.3 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

m/z = 438.211823 ([M+H]⁺), ber. 438.212792

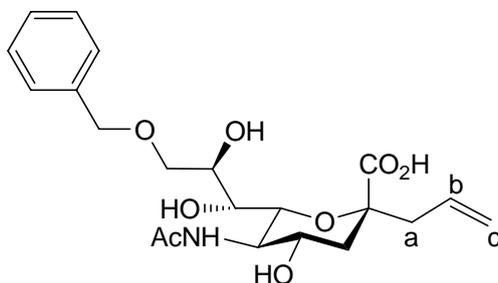
¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄):

δ/ppm = 7.38-7.31 (m, 5 H, arom. **H**), 5.84-5.74 (m, 1 H, **H-b**), 5.11-5.06 (m, 2 H, **H-c**), 4.59-4.57 (m, 2 H, PhCH₂), 3.97 (ddd, $J_{8,7} = 8.8$ Hz, $J_{8,9b} = 5.7$ Hz, $J_{8,9a} = 2.3$ Hz, 1 H, **H-8**), 3.78 (dd, $J_{9a,9b} = 10.3$ Hz, $J_{9a,8} = 2.3$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.75 (s, 3 H, OCH₃), 3.70 (dd, $J_{5,4} = 10.2$ Hz, $J_{5,6} = 10.2$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.65-3.58 (m, 1 H, **H-4**), 3.62 (dd, $J_{9b,9a} = 10.3$ Hz, $J_{9b,8} = 5.7$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.55 (dd, $J_{7,8} = 8.8$ Hz, $J_{7,6} = 1.4$ Hz, 1 H, **H-7**), 3.51 (dd, $J_{6,5} = 10.2$ Hz, $J_{6,7} = 1.4$ Hz, 1 H, **H-6**), 2.57 (dd, $J_{3eq,3ax} = 13.2$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.54-2.44 (m, 2 H, **H-a**), 1.98 (s, 3 H, AcCH₃), 1.45 (dd, $J_{3ax,3eq} = 13.2$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.4$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-d₄):

δ/ppm = 175.22 (**C-1**), 139.85 (quart. arom **C**), 132.94 (**C-b**), 129.33 (arom. **C**), 128.84 (arom. **C**), 128.59 (arom. **C**), 119.37 (**C-c**), 81.75 (**C-2**), 75.78 (**C-6**), 74.41 (PhCH₂), 72.90 (**C-9**), 71.82 (**C-8**), 70.16 (**C-7**), 69.04 (**C-4**), 54.17 (**C-5**), 52.95 (OCH₃), 45.71 (**C-a**), 41.45 (**C-3**), 22.63 (NHAcCH₃).

8.3.38 5-Acetamido-2,6-anhydro-9-*O*-benzyl-3,5-dideoxy-2-*C*-(prop-2-enyl)-*D*-erythro-*L*-manno-nononsäure (95)



62 mg (0.14 mmol) **94** wurden nach **AAV 3** verseift. Das Rohprodukt wurde durch Größenausschlußchromatographie (Biogel P2) gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 60 mg (0.14 mmol, quant.); farbloser Feststoff

Summenformel: C₂₁H₂₉NO₈

Molmasse: 423.46 g/mol

R_f-Wert: 0.69 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10:10:1)

Schmelzpunkt: 147 °C

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -22^\circ$ (c = 0.1, H₂O)

MS (FAB):

m/z = 424.2 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

m/z = 424.196808 ([M+H]⁺), ber. 424.197142

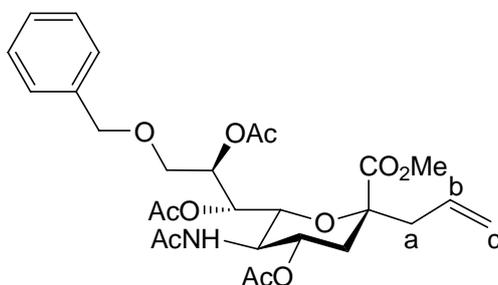
¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄):

δ/ppm = 7.37-7.23 (m, 5 H, arom. **H**), 5.94-5.85 (m, 1 H, **H-b**), 5.08-4.99 (m, 2 H, **H-c**), 4.59 (d, $J_{\text{CH2a,CH2b}} = 12.3$ Hz, 1 H, PhCH₂a), 4.54 (d, $J_{\text{CH2b,CH2a}} = 12.3$ Hz, 1 H, PhCH₂b), 3.99 (ddd, $J_{8,7} = 8.8$ Hz, $J_{8,9b} = 5.7$ Hz, $J_{8,9a} = 2.2$ Hz, 1 H, **H-8**), 3.76 (dd, $J_{9a,9b} = 10.4$ Hz, $J_{9a,8} = 2.2$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.70 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.4$ Hz, $J_{4,5} = 9.8$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-4**), 3.61 (dd, $J_{5,6} = 10.4$ Hz, $J_{5,4} = 9.8$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.60 (dd, $J_{9b,9a} = 10.4$ Hz, $J_{9b,8} = 5.7$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.54 (dd, $J_{6,5} = 10.4$ Hz, $J_{6,7} = 1.9$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.52 (dd, $J_{7,8} = 8.8$ Hz, $J_{7,6} = 1.9$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.63 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12.6$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.48-2.38 (m, 2 H, **H-a**), 1.99 (s, 3 H, AcCH₃), 1.45 (dd, $J_{3ax,3eq} = 12.6$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.4$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOH-d_4):

δ/ppm = 175.47, 172.39 (C-1 und NHAcC=O), 134.62 (C-b), 129.29 (arom. C), 128.80 (arom. C), 128.51 (arom. C_{para}), 117.87 (C-c), 82.42 (C-2), 75.31 (C-6), 74.30 (PhCH_2), 72.75 (C-9), 71.98 (C-8), 70.34 (C-7), 69.78 (C-4), 54.47 (C-5), 45.95 (C-a), 42.16 (C-3), 22.54 (NHAcCH_3).

8.3.39 Methyl-5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-2,6-anhydro-9-*O*-benzyl-3,5-didesoxy-2-*C*-(prop-2-enyl)-*D*-erythro-*L*-manno-nononat (**96**)



17 mg (39 μmol) **94** wurden nach **AAV 1** acetyliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Ethylacetat).

Ausbeute: 22 mg (39 μmol ; quant.); farbloser Feststoff

Summenformel: $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{NO}_{11}$

Molmasse: 563.59 g/mol

R_f -Wert: 0.31 (Toluol/Aceton 1:1)

Schmelzpunkt: 242 $^{\circ}\text{C}$

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = +106^{\circ}$ (c = 0.1, CHCl_3)

MS (FAB):

$m/z = 564.2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

HRMS (FAB):

$m/z = 564.243652$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), ber. 564.244487

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

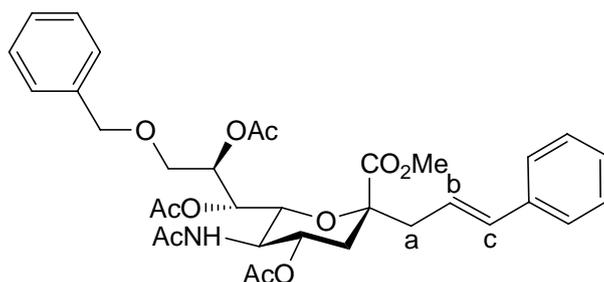
δ/ppm = 7.42-7.31 (m, 5 H, arom. **H**), 5.79-5.68 (m, 1 H, **H-b**), 5.37-5.32 (m, 2 H, **H-7**, **H-8**), 5.09 (dd, $J_{\text{H-c-cis,H-b}} = 10.3$ Hz, $J_{\text{H-c-cis,H-c-trans}} = 1.5$ Hz, 1 H, **H-c_{cis}**), 5.04 (dd, $J_{\text{H-c-trans,H-b}} = 16.9$ Hz, $J_{\text{H-c-trans,H-c-cis}} = 1.5$ Hz, 1 H, **H-c_{trans}**), 4.88-4.81 (m, 1 H, **H-4**), 4.54-4.46 (m, 2 H, OCH₂Ph), 4.00-3.96 (m, 2 H, **H-5**, **H-6**), 3.78 (dd, $J_{9a,9b} = 11.0$ Hz, $J_{9a,8} = 2.3$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.73 (s, 3 H, OCH₃), 3.50 (dd, $J_{9b,9a} = 11.0$ Hz, $J_{9b,8} = 5.3$ Hz, 1 H, **H-9b**), 2.46 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.9$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.45-2.42 (m, 2 H, **H-a**), 2.13 (s, 3 H, AcCH₃), 2.05 (s, 3 H, AcCH₃), 2.01 (s, 3 H, AcCH₃), 1.87 (s, 3 H, NHAcCH₃), 1.76 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.9$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 11.9$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ/ppm = 131.51 (**C-b**), 128.49, 128.01 (arom. **C**), 119.29 (**C-c**), 80.77 (**C-2**), 73.72 (**C-6**), 73.34 (OCH₂Ph), 70.50 (**C-4**), 70.39 (**C-8**), 68.76 (**C-9**), 68.63 (**C-7**), 52.40 (OCH₃), 49.88 (**C-5**), 44.34 (**C-a**), 37.26 (**C-3**), 23.40 (NHAcCH₃), 21.07 (AcCH₃), 20.97 (AcCH₃), 20.79 (AcCH₃).

Carbonyl-Kohlenstoffe wurden nicht detektiert.

8.3.40 (*E*)-Methyl-5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-2,6-anhydro-9-*O*-benzyl-3,5-dideoxy-2-*C*-(3-phenylprop-2-enyl)-*D*-erythro-*L*-manno-nononat (97)



96 (18 mg, 32 μmol) wurde nach **AAV 4** mit Styrol (36 μl, 0.31 mmol) unter Verwendung von Katalysator **51** (3.6 mg, 4.2 μmol; 13 mol%) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Ethylacetat).

Ausbeute: 16 mg (25 μmol, 78%); farbloser Feststoff

Summenformel: C₃₄H₄₁NO₁₁

Molmasse: 639.69 g/mol
 R_f-Wert: 0.39 (Toluol/Aceton 1:1)
 Schmelzpunkt: 72 °C
 Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = +37^\circ$ (c = 0.1, CH₂Cl₂)

MS (FAB):

m/z = 640.0 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

m/z = 640.277527 ([M+H]⁺), ber. 640.275787

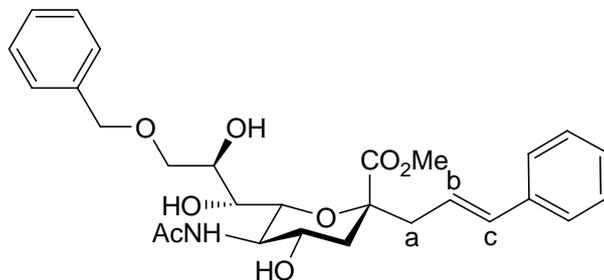
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ/ppm = 7.40-7.19 (m, 10 H, arom. **H**), 6.36 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 15.9$ Hz, 1 H, **H-c**), 6.22-6.14 (m, 1 H, **H-b**), 5.43-5.37 (m, 1 H, **H-8**), 5.38 (dd, $J_{7,8} = 7.3$ Hz, $J_{7,6} = 1.8$ Hz, 1 H, **H-7**), 5.12 (d, $J_{\text{NH,5}} = 11.9$ Hz, 1 H, **NH**), 4.85 (ddd, $J_{4,3\text{ax}} = 11.9$ Hz, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, $J_{4,3\text{eq}} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-4**), 4.53-4.45 (m, 2 H, OCH₂Ph), 4.04 (dd, $J_{6,5} = 10.8$ Hz, $J_{6,7} = 1.8$ Hz, 1 H, **H-6**), 4.01 (dd, $J_{5,6} = 10.8$ Hz, $J_{5,4} = 9.9$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.79 (dd, $J_{9\text{a},9\text{b}} = 10.9$ Hz, $J_{9\text{a},8} = 3.0$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.71 (s, 3 H, OCH₃), 3.51 (dd, $J_{9\text{b},9\text{a}} = 10.9$ Hz, $J_{9\text{b},8} = 5.4$ Hz, 1 H, **H-9b**), 2.67-2.54 (m, 2 H, **H-a**), 2.51 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 12.9$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.12 (AcCH₃), 2.05 (AcCH₃), 2.01 (AcCH₃), 1.87 (NHAcCH₃), 2.51 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.9$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 11.9$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ/ppm = 171.78, 171.15, 170.54, 170.21 (AcC=O), 134.19 (**C-c**), 128.66, 128.47, 128.02, 127.77, 127.62, 126.52 (arom. **C**), 122.97 (**C-b**), 80.76 (**C-2**), 73.76 (**C-6**), 73.38 (OCH₂Ph), 70.39 (**C-4**), 70.36 (**C-8**), 68.86 (**C-9**), 68.67 (**C-7**), 52.51 (OCH₃), 49.91 (**C-5**), 43.64 (**C-a**), 37.47 (**C-3**), 23.39 (NHAcCH₃), 21.40 (AcCH₃), 21.05 (AcCH₃), 20.95 (AcCH₃).

8.3.41 (E)-Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-9-O-benzyl-3,5-dideoxy-2-C-(3-phenylprop-2-enyl)-D-erythro-L-manno-nononat (98)



12 mg (19 μ mol) **97** wurden nach **AAV 2** deacetyliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Ethylacetat).

Ausbeute: 10 mg (19 μ mol; quant.); farbloser Feststoff

Summenformel: $C_{28}H_{35}NO_8$

Molmasse: 513.58 g/mol

R_f -Wert: 0.72 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 5:1)

Schmelzpunkt: 108 °C

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -42^\circ$ (c = 0.2, MeOH)

MS (MALDI-TOF):

m/z = 514.5 ($[M+H]^+$), 536.5 ($[M+Na]^+$), 552.4 ($[M+K]^+$)

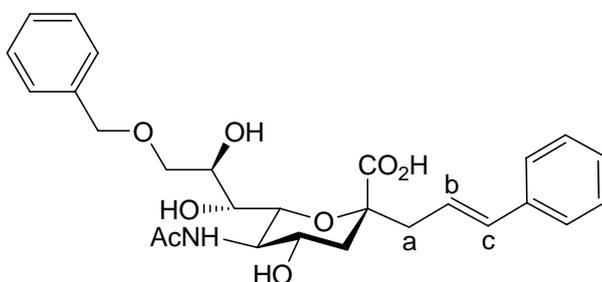
1H -NMR (500 MHz, MeOH- d_4):

δ/ppm = 7.36-7.30 (m, 6 H, arom. **H**), 7.28-7.24 (m, 3 H, arom. **H**), 7.20-7.17 (m, 1 H, arom. **H**), 6.45 (d, $J_{H-c,H-b} = 15.8$ Hz, 1 H, **H-c**), 6.20 (ddd, $J_{H-b,H-c} = 15.8$ Hz, $J_{H-b,H-a} = 7.5$ Hz, 1 H, **H-b**), 4.56-4.53 (m, 2 H, OCH_2Ph), 4.03 (ddd, $J_{8,7} = 8.4$ Hz, $J_{8,9b} = 5.9$ Hz, $J_{8,9a} = 2.3$ Hz, 1 H, **H-8**), 3.81 (dd, $J_{9a,9b} = 10.3$ Hz, $J_{9a,8} = 2.3$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.76 (s, 3 H, OCH_3), 3.73 (dd, $J_{5,4} = 10.1$ Hz, $J_{5,6} = 10.1$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.67-3.61 (m, 1 H, **H-4**), 3.63 (dd, $J_{9b,9a} = 10.3$ Hz, $J_{9b,8} = 5.9$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.56 (dd, $J_{7,8} = 8.4$ Hz, $J_{7,6} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-7**), 3.54 (dd, $J_{6,5} = 10.1$ Hz, $J_{6,7} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-6**), 2.66-2.63 (m, 2 H, **H-a**), 2.62 (dd, $J_{3eq,3ax} = 13.0$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 1.99 (s, 3 H, $AcCH_3$), 1.66 (dd, $J_{3ax,3eq} = 13.0$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.6$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

^{13}C -NMR (125 MHz, MeOH- d_4):

δ/ppm = 175.19 (AcC=O), 175.14 (C-1), 139.84 (quart. arom. C), 138.58 (quart. arom. C), 135.29 (C-c), 129.55 (arom. C), 129.33 (arom. C), 128.84 (arom. C), 128.58 (arom. C), 128.45 (arom. C), 127.29 (arom. C), 124.12 (C-b), 82.05 (C-2), 75.81 (C-6), 74.34 (OCH₂Ph), 72.92 (C-9), 71.79 (C-8), 70.24 (C-7), 69.10 (C-4), 54.15 (C-5), 53.07 (OCH₃), 44.78 (C-a), 41.50 (C-3), 22.64 (AcCH₃).

8.3.42 (*E*)-5-Acetamido-2,6-anhydro-9-*O*-benzyl-3,5-dideoxy-2-*C*-(3-phenylprop-2-enyl)-*D*-erythro-*L*-manno-nononsäure (99)



3.7 mg (7.2 μmol) **98** wurden nach **AAV 3** verseift. Das Rohprodukt wurde durch Größenausschlußchromatographie (Biogel P2) gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 3.6 mg (7.2 μmol ; quant.); farbloser Feststoff

Summenformel: C₂₇H₃₃NO₈

Molmasse: 499.55 g/mol

R_f-Wert: 0.67 (CHCl₃/MeOH/H₂O 10:10:1)

Schmelzpunkt: 129-130 °C

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -33^\circ$ (c = 0.1, H₂O)

MS (MALDI-TOF):

m/z = 500.4 ([M+H]⁺), 522.4 ([M+Na]⁺), 538.4 ([M+K]⁺)

^1H -NMR (500 MHz, MeOH- d_4):

δ/ppm = 7.37-7.29 (m, 6 H, arom. H), 7.27-7.21 (m, 3 H, arom. H), 7.18-7.13 (m, 1 H, arom. H), 6.44 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 15.9$ Hz, 1 H, H-c), 6.36-6.28 (m, 1 H, H-b), 4.59-4.51 (m, 2 H, OCH₂Ph), 4.05 (ddd, $J_{8,7} = 8.9$ Hz, $J_{8,9b} = 5.8$ Hz, $J_{8,9a} = 2.0$ Hz, 1 H, H-8), 3.77 (dd,

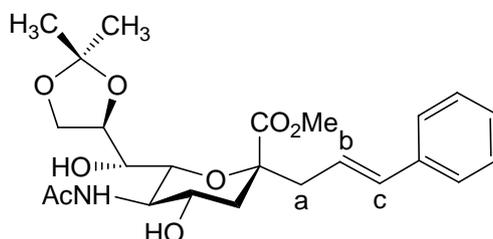
$J_{9a,9b} = 10.4$ Hz, $J_{9a,8} = 2.0$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.72 (ddd, $J_{4,3ax} = 11.9$ Hz, $J_{4,5} = 10.3$ Hz, $J_{4,3eq} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-4**), 3.65 (dd, $J_{5,4} = 10.3$ Hz, $J_{5,6} = 9.9$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.61 (dd, $J_{9b,9a} = 10.4$ Hz, $J_{9b,8} = 5.8$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.58 (dd, $J_{6,5} = 9.9$ Hz, $J_{6,7} = 1.8$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.54 (dd, $J_{7,8} = 8.9$ Hz, $J_{7,6} = 1.8$ Hz, 1 H, **H-7**), 2.68 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12.8$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.7$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.65-2.55 (m, 2 H, **H-a**), 2.00 (s, 3 H, AcCH₃), 1.53 (dd, $J_{3ax,3eq} = 12.8$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.9$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-d₄):

δ /ppm = 134.14 (C-c), 129.39, 129.27, 128.80, 128.48, 127.99, 127.27 (arom. C), 125.98 (C-b), 82.29 (C-2), 75.45 (C-6), 74.23 (OCH₂Ph), 72.81 (C-9), 71.99 (C-8), 70.43 (C-7), 69.78 (C-4), 54.48 (C-5), 44.99 (C-a), 42.21 (C-3), 22.55 (NHAcCH₃).

Carbonyl-Kohlenstoffe wurden nicht detektiert.

8.3.43 (*E*)-Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-8,9-*O*-isopropyliden-2-*C*-(3-phenylprop-2-enyl)-*D*-erythro-*L*-mannononat (100)



Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluß unter Argon als Schutzgas durchgeführt.

80 mg (0.19 mmol) **55** wurden in trockenem Aceton (27 ml) gelöst. Nach Zugabe von 2,2-Dimethoxypropan (240 μ l, 1.95 mmol) und saurem Ionentauscher (DOWEX 50X8, H⁺, 80 mg) wurde die Lösung für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach DC-Kontrolle wurde die gelbe Lösung filtriert und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol mit 0.5% Triethylamin).

Ausbeute: 70 mg (0.15 mmol; 80%); farbloser Feststoff

Summenformel: C₂₄H₃₃NO₈

Molmasse: 463.52 g/mol

R_f-Wert: 0.53 (EE/MeOH 4:1)
 Schmelzpunkt: 178 °C
 Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +47^\circ$ (c = 0.15, CH₂Cl₂)

MS (FAB):

m/z = 464.1 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

m/z = 464.228058 ([M+H]⁺), ber. 464.228442

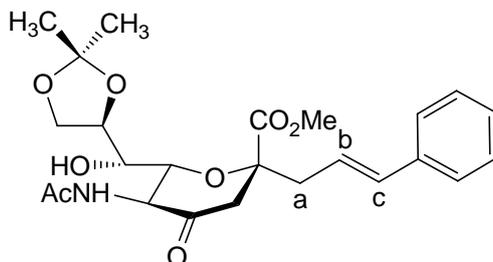
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ/ppm = 7.34-7.26 (m, 4 H, arom. **H**), 7.24-7.19 (m, 1 H, arom. **H**), 6.41 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 15.9$ Hz, 1 H, **H-c**), 6.08 (ddd, $J_{\text{H-b,H-c}} = 15.9$ Hz, $J_{\text{H-b,H-a}} = 7.5$ Hz, 1 H, **H-b**), 5.62 (d, $J_{\text{NH,5}} = 7.7$ Hz, 1 H, **NH**), 4.32 (ddd, $J_{8,7} = 6.4$ Hz, $J_{8,9b} = 6.3$ Hz, $J_{8,9a} = 6.3$ Hz, 1 H, **H-8**), 4.14 (dd, $J_{9a,9b} = 8.6$ Hz, $J_{9a,8} = 6.3$ Hz, 1 H, **H-9a**), 4.07 (dd, $J_{9b,9a} = 8.6$ Hz, $J_{9b,8} = 6.3$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.80 (ddd, $J_{5,6} = 10.1$ Hz, $J_{5,4} = 10.0$ Hz, $J_{5,\text{NH}} = 7.7$ Hz, 1 H, **H-5**), 3.75-3.66 (m, 1 H, **H-4**), 3.71 (s, 3 H, OCH₃), 3.58 (dd, $J_{7,8} = 6.4$ Hz, $J_{7,6} = 1.0$ Hz, 1 H, **H-7**), 3.37 (dd, $J_{6,5} = 10.1$ Hz, $J_{6,7} = 1.0$ Hz, 1 H, **H-6**), 2.73-2.60 (m, 3 H, **H-a**, **H-3_{eq}**), 2.05 (s, 3 H, AcCH₃), 1.62 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.0$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 11.0$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**), 1.40 (s, 3 H, C(CH₃)₂), 1.37 (s, 3 H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ/ppm = 173.10, 172.85 (**C-1** und AcC=O), 137.10 (quart. arom. **C**), 134.38 (**C-c**), 128.71, 127.69, 126.41 (arom. **C**), 122.79 (**C-b**), 108.71 (C(CH₃)₂), 81.11 (**C-2**), 75.74 (**C-8**), 75.55 (**C-6**), 70.16 (**C-7**), 79.11 (**C-4**), 66.89 (**C-9**), 53.86 (**C-5**), 52.29 (OCH₃), 43.64 (**C-a**), 40.50 (**C-3**), 26.98, 25.70 (C(CH₃)₂), 23.40 (AcCH₃).

8.3.44 (*E*)-Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,5-dideoxy-8,9-*O*-isopropyliden-2-*C*-(3-phenylprop-2-enyl)-*D*-glycero-*D*-galacto-non-4-ulosonat (**101**)



Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluß unter Argon als Schutzgas durchgeführt. 70 mg (0.15 mmol) **100** wurden in trockenem Dichlormethan (4 mL) gelöst. Nach Zugabe von pulverisiertem Molsieb (4 Å, 280 mg) und Pyridinium-Chlorochromat (130 mg, 603 µmol) wurde die Reaktion bis zum vollständigen Umsatz (DC) bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Diethylether verdünnt, filtriert und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol).

Ausbeute: 45 mg (98 µmol, 65%); farbloses Öl
 Summenformel: C₂₄H₃₁NO₈
 Molmasse: 461.50 g/mol
 R_f-Wert: 0.69 (EE/MeOH 4:1)
 Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +21^\circ$ (c = 0.2, CH₂Cl₂)

MS (FAB):

m/z = 462.0 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

m/z = 462.211456 ([M+H]⁺), ber. 462.212792

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

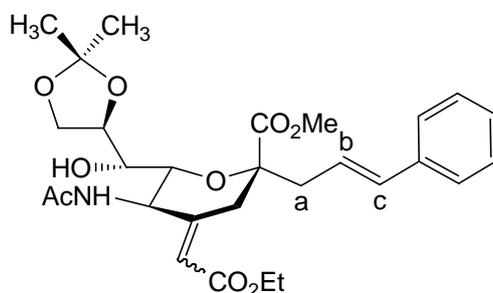
δ/ppm = 7.38-7.29 (m, 5 H, arom. **H**), 6.47 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 15.7$ Hz, 1 H, **H-c**), 6.47 (d, $J_{\text{NH,5}} = 6.8$ Hz, 1 H, **NH**), 6.15 (d, $J_{\text{H-b,H-c}} = 15.7$ Hz, $J_{\text{H-b,H-a}} = 7.5$ Hz, 1 H, **H-b**), 4.67 (dd,

$J_{5,6} = 10.7$ Hz, $J_{5,\text{NH}} = 6.8$ Hz, 1 H, **H-5**), 4.09 (ddd, $J_{8,7} = 9.0$ Hz, $J_{8,9b} = 5.2$ Hz, $J_{8,9a} = 3.7$ Hz, 1 H, **H-8**), 3.96 (dd, $J_{9a,9b} = 11.2$ Hz, $J_{9a,8} = 3.7$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.78 (dd, $J_{9b,9a} = 11.2$ Hz, $J_{9b,8} = 5.2$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.76 (s, 3 H, OCH₃), 3.63 (dd, $J_{6,5} = 10.7$ Hz, $J_{6,7} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.53 (dd, $J_{7,8} = 9.0$ Hz, $J_{7,6} = 1.6$ Hz, 1 H, **H-7**), 3.22 (d, $J_{3a,3b} = 14.0$ Hz, 1 H, **H-3a**), 2.84-2.76 (m, 3 H, **H-3b**, **H-a**), 2.09 (s, 3 H, AcCH₃), 1.37 (s, 3 H, C(CH₃)₂), 1.36 (s, 3 H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃):

$\delta/\text{ppm} = 201.96$ (C-4), 173.11 (NHAcC=O), 172.68 (C-1), 135.63 (C-c), 128.68, 127.97, 126.39 (arom. C), 121.21 (C-b), 111.89 (C(CH₃)₂), 83.47 (C-2), 78.54 (C-6), 70.62 (C-8), 70.10 (C-7), 64.56 (C-9), 56.95 (C-5), 53.36 (OCH₃), 46.63 (C-3), 44.04 (C-a), 27.74, 26.42 (C(CH₃)₂), 23.15 (NHAcCH₃).

8.3.45 Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-tridesoxy-4-[(*E*) oder (*Z*)]-ethoxycarbonylmethyliden-8,9-*O*-isopropyliden-2-*C*-((*E*)-3-phenylprop-2-enyl)-*D*-glycero-*D*-galacto-nononat (**102**)



Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluß unter Argon als Schutzgas durchgeführt.

36 mg **101** (78 μmol) wurden in trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Nach Zugabe von Ethoxycarbonylmethylen-triphenylphosphoran (54 mg, 0.16 mmol) wurde die Lösung für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach DC-Kontrolle wurde die Lösung filtriert und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol).

Ausbeute: 19 mg (36 μmol , 45%); farbloser Feststoff

Summenformel: C₂₈H₃₇NO₉

Molmasse: 531.59 g/mol

R_f-Wert: 0.59 (EE/MeOH 4:1)
 Schmelzpunkt: 122 °C
 Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -38^\circ$ (c = 0.15, MeOH)

MS (FAB):

m/z = 532.1 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

m/z = 532.253052 ([M+H]⁺), ber. 532.254657

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄):

δ/ppm = 7.37-7.35 (m, 2 H, arom. **H**), 7.30-7.26 (m, 2 H, arom. **H**), 7.22-7.18 (m, 1 H, arom. **H**), 6.47 (d, $J_{\text{H-c,H-b}} = 15.9$ Hz, 1 H, **H-c**), 6.23 (ddd, $J_{\text{H-b,H-c}} = 15.9$ Hz, $J_{\text{H-b,H-a}} = 7.5$ Hz, 1 H, **H-b**), 5.76 (dd, $J_{\text{=CHCO}_2\text{Et,3b}} = 1.3$ Hz, $J_{\text{=CHCO}_2\text{Et,5}} = 1.2$ Hz, 1 H, =**HC**-CO₂Et), 4.72 (dd, $J_{5,6} = 10.4$ Hz, $J_{5,\text{=CHCO}_2\text{Et}} = 1.2$ Hz, 1 H, **H-5**), 4.46 (d, $J_{3a,3b} = 13.9$ Hz, 1 H, **H-3a**), 4.26 (ddd, $J_{8,9b} = 7.0$ Hz, $J_{8,9a} = 6.5$ Hz, $J_{8,7} = 5.2$ Hz, 1 H, **H-8**), 4.19-4.13 (m, 2 H, OCH₂), 4.09 (dd, $J_{9a,9b} = 8.4$ Hz, $J_{9a,8} = 6.5$ Hz, 1 H, **H-9a**), 4.04 (dd, $J_{9b,9a} = 8.4$ Hz, $J_{9b,8} = 7.0$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.82 (dd, $J_{6,5} = 10.4$ Hz, $J_{6,7} = 1.2$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.76 (dd, $J_{7,8} = 5.2$ Hz, $J_{7,6} = 1.2$ Hz, 1 H, **H-7**), 3.62 (s, 3 H, OCH₃), 2.71 (d, $J_{\text{H-a,H-b}} = 7.5$ Hz, 2 H, **H-a**), 2.30 (dd, $J_{3b,3a} = 13.9$ Hz, $J_{3b,\text{=CHCO}_2\text{Et}} = 1.3$ Hz, 1 H, **H-3b**), 2.03 (s, 3 H, AcCH₃), 1.39 (s, 3 H, C(CH₃)₂), 1.33 (s, 3 H, C(CH₃)₂), 1.26 (t, $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7.1$ Hz, 3 H, OCH₂CH₃).

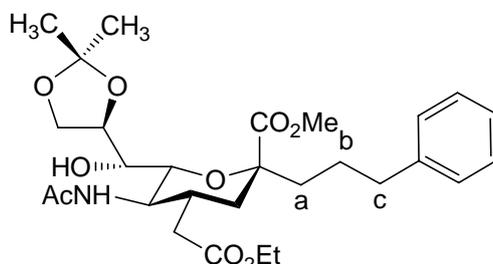
Es liegt nur eine Konfiguration bezüglich der Doppelbindung an der 4-Position vor. Diese konnte aber aus den vorliegenden Daten nicht bestimmt werden.

¹³C-NMR (125 MHz, MeOH-d₄):

δ/ppm = 154.62 (C-4), 135.19 (C-c), 129.55, 128.44, 127.27 (arom. C), 124.43 (C-b), 114.90 (=HC-CO₂), 84.66 (C-2), 78.25 (C-6), 78.23 (C-8), 70.74 (C-7), 67.17 (C-9), 61.21 (OCH₂), 52.35 (OCH₃), 51.81 (C-5), 44.45 (C-a), 36.92 (C-3), 26.92, 25.78 (C(CH₃)₂), 22.73 (NHAcCH₃), 14.56 (OCH₂CH₃).

Carbonyl-Kohlenstoffe wurden nicht detektiert.

8.3.46 Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-tridesoxy-4-ethoxycarbonylmethyl-8,9-*O*-isopropyliden-2-*C*-(3-phenylpropyl)-*D*-erythro-*L*-manno-nononat (103)



60 mg (0.11 mmol) **102** wurden nach **AAV 5** hydriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol).

Ausbeute: 60 mg (0.11 mmol, 100%); farbloser Feststoff

Summenformel: C₂₈H₄₁NO₉

Molmasse: 535.63 g/mol

R_f-Wert: 0.61 (EE/MeOH 4:1)

Schmelzpunkt: 115 °C

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -73^\circ$ (c = 0.1, MeOH)

MS (FAB):

m/z = 536.1 ([M+H]⁺)

HRMS (FAB):

m/z = 536.286560 ([M+H]⁺), ber. 536.285957

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄):

δ/ppm = 7.27-7.22 (m, 2 H, arom. **H**), 7.18-7.13 (m, 3 H, arom. **H**), 4.22 (ddd, $J_{8,7} = 7.0$ Hz, $J_{8,9b} = 6.9$ Hz, $J_{8,9a} = 6.5$ Hz, 1 H, **H-8**), 4.15-4.08 (m, 2 H, OCH₂), 4.04 (dd, $J_{9a,9b} = 8.4$ Hz, $J_{9a,8} = 6.5$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.97 (dd, $J_{9b,9a} = 8.4$ Hz, $J_{9b,8} = 6.9$ Hz, 1 H, **H-9b**), 3.73-3.67 (m, 1 H, **H-5**), 3.71 (s, 3 H, OCH₃), 3.61 (dd, $J_{7,8} = 7.0$ Hz, $J_{7,6} = 1.5$ Hz, 1 H, **H-7**), 3.54 (dd, $J_{6,5} = 9.9$ Hz, $J_{6,7} = 1.5$ Hz, 1 H, **H-6**), 2.65-2.51 (m, 2 H, **H-c**), 2.49 (dd, $J_{CH2-a,CH2-b} = 15.4$ Hz, $J_{CH2-a,4} = 4.3$ Hz, 1 H, CH₂CO₂Et-a), 2.33 (dd, $J_{3eq,3ax} = 13.4$ Hz, $J_{3eq,4} = 3.6$ Hz, 1 H, **H-3eq**), 2.11 (dd, $J_{CH2-b,CH2-a} = 15.4$ Hz, $J_{CH2-b,4} = 8.7$ Hz, 1 H,

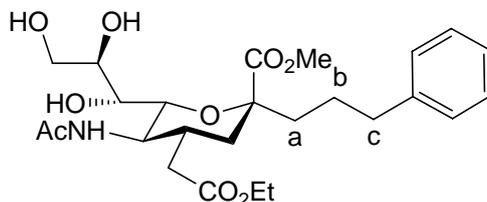
CH₂CO₂Et-b), 2.03-1.96 (m, 1 H, **H-4**), 1.94 (s, 3 H, AcCH₃), 1.73-1.68 (m, 3 H, **H-a**, **H-b**), 1.54-1.46 (m, 1 H, **H-b**), 1.41-1.33 (m, 1 H, **H-3_{ax}**), 1.37 (s, 3 H, C(CH₃)₂), 1.33 (s, 3 H, C(CH₃)₂), 1.25 (t, $J_{\text{CH}_3, \text{CH}_2} = 7.1 \text{ Hz}$, 3 H, OCH₂CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, MeOH-d₄):

$\delta/\text{ppm} = 129.41$ (arom. C), 129.35 (arom. C), 126.87 (arom. C_{para}), 109.54 (C(CH₃)₂), 81.61 (C-2), 78.05 (C-8), 77.04 (C-6), 70.55 (C-7), 67.09 (C-9), 61.64 (OCH₂CH₃), 52.40 (C-5), 50.52 (OCH₃), 40.67 (C-a), 38.88 (C-3), 38.77 (CH₂CO₂Et), 36.69 (C-c), 36.28 (C-4), 26.96 (C(CH₃)₂), 26.62 (C-b), 25.81 (C(CH₃)₂), 22.55 (AcCH₃), 14.54 (OCH₂CH₃).

Carbonyl-Kohlenstoffe wurden nicht detektiert.

8.3.47 Methyl-5-acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-tridesoxy-4-ethoxycarbonylmethyl-2-C-(3-phenylpropyl)-D-erythro-L-mannononat (104)



58 mg (0.11 mmol) **103** wurden in Wasser suspendiert und eine katalytische Menge Ionentauscher (Dowex 50X8, H⁺) wurde dazugegeben. Die Suspension wurde für 24 h bei 60 °C gerührt, wobei der Feststoff in Lösung ging. Nach DC-Kontrolle wurde die Lösung filtriert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol).

Ausbeute: 40 mg (81 μmol , 75%); farbloser Feststoff

Summenformel: C₂₅H₃₇NO₉

Molmasse: 495.56 g/mol

R_f-Wert: 0.42 (EE/MeOH 4:1)

Schmelzpunkt: 62 °C

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ$ (c = 0.1, MeOH)

MS (MALDI-TOF):

$m/z = 496.5$ ($[M+H]^+$), 518.5 ($[M+Na]^+$), 534.4 ($[M+K]^+$).

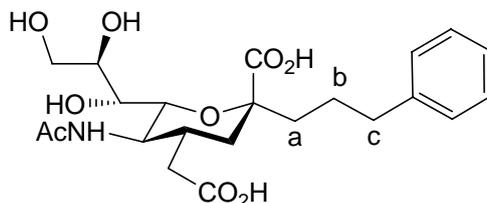
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOH- d_4):

$\delta/\text{ppm} = 7.26\text{-}7.22$ (m, 2 H, arom. **H**), $7.16\text{-}7.13$ (m, 3 H, arom. **H**), $4.18\text{-}4.08$ (m, 2 H, OCH_2CH_3), $3.86\text{-}3.80$ (m, 2 H, **H-8**, **H-9a**), 3.79 (s, 3 H, OCH_3), 3.69 (dd, $J_{5,4} = 10.5$ Hz, $J_{5,6} = 10.2$ Hz, 1 H, **H-5**), $3.65\text{-}3.60$ (m, 1 H, **H-9b**), 3.58 (dd, $J_{6,5} = 10.2$ Hz, $J_{6,7} = 1.5$ Hz, 1 H, **H-6**), 3.49 (dd, $J_{7,8} = 8.6$ Hz, $J_{7,6} = 1.5$ Hz, 1 H, **H-7**), $2.62\text{-}2.51$ (m, 3 H, **H-c**, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et-a}$), 2.43 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.3$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 3.7$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), $2.19\text{-}2.12$ (m, 1 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et-b}$), $2.04\text{-}1.98$ (m, 1 H, **H-4**), 1.96 (s, 3 H, AcCH_3), $1.75\text{-}1.67$ (m, 3 H, **H-a**, **H-b**), $1.50\text{-}1.41$ (m, 1 H, **H-b**), 1.45 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.3$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 12.7$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**), 1.26 (t, $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7.1$ Hz, 3 H, OCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOH- d_4):

$\delta/\text{ppm} = 179.27$ (**C-1**), 175.86 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$), 129.42 (arom. **C**), 129.36 (arom. **C**), 126.88 (arom. **C_{para}**), 81.54 (**C-2**), 76.59 (**C-6**), 73.05 (**C-8**), 70.26 (**C-7**), 64.57 (**C-9**), 61.67 (OCH_2CH_3), 52.97 (OCH_3), 50.51 (**C-5**), 43.66 (**C-a**), 39.19 (**C-3**), 38.51 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$), 36.63 (**C-c**), 36.41 (**C-4**), 26.49 (**C-b**), 22.51 (NHAcCH_3), 14.55 (OCH_2CH_3).

8.3.48 5-Acetamido-2,6-anhydro-3,4,5-trideoxy-4-carboxymethyl-2-C-(3-phenylpropyl)-D-erythro-L-manno-nononsäure (105)



40 mg (81 μmol) **104** wurden nach **AAV 3** verseift. Das Rohprodukt wurde durch Größenausschlußchromatographie (Biogel P2) gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 18 mg (40 μmol , 49%); farbloser Feststoff

Summenformel: $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{NO}_9$

Molmasse: 453.48 g/mol

R_f -Wert: 0.75 (EE/MeOH/ H_2O 7:3:1)

Schmelzpunkt: 183-185 °C

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -32.2^\circ$ (c = 0.45, MeOH)

MS (FAB):

m/z = 454.2 ($[M+H]^+$)

HRMS (FAB):

m/z = 454.209564 ($[M+H]^+$), ber. 454.207707

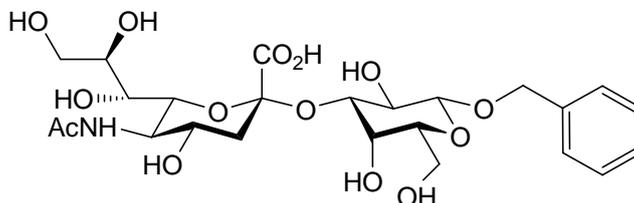
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH- d_4):

$\delta/\text{ppm} = 7.23\text{-}7.07$ (m, 5 H, arom. **H**), 3.86 (ddd, $J_{8,7} = 8.9$ Hz, $J_{8,9b} = 5.6$ Hz, $J_{8,9a} = 2.6$ Hz, 1 H, **H-8**), 3.80 (dd, $J_{9a,9b} = 11.3$ Hz, $J_{9a,8} = 2.6$ Hz, 1 H, **H-9a**), 3.62-3.56 (m, 2 H, **H-6**, **H-9b**), 3.46 (dd, $J_{7,8} = 8.9$ Hz, $J_{7,6} = 2.1$ Hz, 1 H, **H-7**), 3.44 (dd, $J_{5,4} = 10.4$ Hz, $J_{5,6} = 10.4$ Hz, 1 H, **H-5**), 2.58-2.52 (m, 2 H, **H-c**), 2.52 (dd, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.2$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 3.5$ Hz, 1 H, **H-3_{eq}**), 2.34 (dd, $J_{\text{CH}_2\text{-a},\text{CH}_2\text{-b}} = 14.5$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{-a},4} = 5.4$ Hz, 1 H, **CH₂CO₂H-a**), 2.16-2.09 (m, 1 H, **H-4**), 2.04 (dd, $J_{\text{CH}_2\text{-b},\text{CH}_2\text{-a}} = 14.5$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{-b},4} = 6.6$ Hz, 1 H, **CH₂CO₂H-b**), 1.96 (s, 3 H, **AcCH₃**), 1.88-1.59 (m, 4 H, **H-a**, **H-b**), 1.26 (dd, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.2$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = 12.3$ Hz, 1 H, **H-3_{ax}**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOH- d_4):

$\delta/\text{ppm} = 179.86$ (**C-1**), 175.26 (**CH₂CO₂H**), 129.47 (arom. **C**), 129.16 (arom. **C**), 126.51 (arom. **C_{para}**), 82.78 (**C-2**), 76.89 (**C-6**), 72.95 (**C-8**), 70.79 (**C-7**), 64.67 (**C-9**), 52.98 (**C-5**), 42.52 (**C-a**), 41.92 (**CH₂CO₂H**), 41.12 (**C-3**), 37.40 (**C-c**), 37.03 (**C-4**), 27.24 (**C-b**), 22.49 (**AcCH₃**).

8.3.49 Benzyl-3-O-(5'-acetamido-3',5'-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2'-nonulopyranosylonsäure)- β -D-galactopyranosid (109)



18.4 mg (42.8 μ mol) **15** und 18.2 mg (67.3 μ mol) **108** wurden in jeweils 1 mL TRIS/HCl-Puffer (100 mM, pH 7.46) gelöst. Diese Lösungen wurden gemischt und auf zwei Eppendorf-Tubes aufgeteilt. Zu jedem Eppendorf-Tube wurden jeweils 80 μ L TcTS in Tris-HCl-Puffer ($c = 1.3$ mg/mL) gegeben. Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei 23 °C inkubiert. Nach DC-Kontrolle (BuOH/AcOH/H₂O 5:2:2) wurde das Enzym durch Zugabe von 1.5 mL Ethanol pro Eppendorf-Tube denaturiert, die Lösungen wurde 20 min. zentrifugiert (14.000 U/min) und der Überstand beider Eppendorf-Tubes über Biogel P2 gereinigt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute:	16.1 mg (28.7 μ mol; 67%)
Summenformel:	C ₂₄ H ₃₅ NO ₁₄
Molmasse:	561.53 g/mol
R _f -Wert:	0.16 (BuOH/AcOH/H ₂ O 5:2:2)
Drehwert:	$[\alpha]_D^{20} = -13.2^\circ$ ($c = 0.25$, H ₂ O)

MS (MALDI-TOF):

$m/z = 584.2$ ([M+Na]⁺), 600.2 ([M+K]⁺)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O):

δ /ppm = 7.50-7.38 (m, 5 H, arom. **H**), 4.95 (d, $J_{\text{CH}_2\text{-a,CH}_2\text{-b}} = 11.5$ Hz, 1 H, PhCH₂a), 4.75 (d, $J_{\text{CH}_2\text{-b,CH}_2\text{-a}} = 11.5$ Hz, 1 H, PhCH₂b), 4.55 (d, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, 1 H, **H-1**), 4.07 (dd, $J_{3,2} = 9.8$ Hz, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 1 H, **H-3**), 3.95 (br d, $J_{4,3} = 3.2$ Hz, 1 H, **H-4**), 3.88-3.80 (m, 3 H, **H-5'**, **H-9'a**, **H-8**), 3.78-3.72 (m, 2 H, **H-6**), 3.68-3.56 (m, 6 H, **H-2**, **H-5**, **H-4'**, **H-6'**, **H-7'**, **H-9'b**), 2.75 (dd, $J_{3'\text{eq},3'\text{ax}} = 12.4$ Hz, $J_{3'\text{eq},4'} = 4.6$ Hz, 1 H, **H-3'eq**), 2.03 (s, 3 H, NHAcCH₃), 1.79 (dd, $J_{3'\text{ax},3'\text{eq}} = 12.4$ Hz, $J_{3'\text{ax},4'} = 12.0$ Hz, 1 H, **H-3'ax**).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O):

δ/ppm = 175.38 (C-1'), 136.96 (quart. arom. C), 129.19, 129.06 (arom. C), 128.81 (arom. C_{para}), 101.99 (C-1), 101.20 (C-2'), 76.23 (C-3), 75.32 (C-5), 73.20 (C-6'), 72.10 (C-8'), 71.76 (PhCH₂), 69.53 (C-2), 68.73 (C-4'), 68.41 (C-7'), 67.89 (C-4), 62.91 (C-9'), 61.32 (C-6), 52.04 (C-5'), 39.98 (C-3'), 22.40 (NHAcCH₃).

8.4 SPR-Messungen

8.4.1 Immobilisierung der Trans-sialidase auf dem SPR-Sensor-Chip

Zur Immobilisierung der Trans-sialidase wurden 500 μL einer rekombinant aus *E. coli* erhaltenen Lösung (TRIS-HCl, 100 mM, pH 7.5) mit einer Protein-Konzentration von 0.26 mg/mL (entspricht 0.13 mg Protein) durch Ultrazentrifugation umgepuffert ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, 100 mM, pH 7.46, 5-10 mg NaN_3 pro Liter). Dies ist notwendig, da die TRIS-Base als primäres Amin sonst mit den aktivierten Carboxylgruppen der Dextranmatrix des Chips reagieren würde. Nach der Umpufferung wurden 780 μL Enzymlösung erhalten. Nach Überprüfung der Aktivität der Enzymlösung nach **AAV 6** (siehe 8.2.6) wurden 120 μL (0.02 mg Protein) dieser Lösung mit Acetat-Puffer (10 mM, pH 6.06) auf 1000 μL aufgefüllt. Als Laufpuffer zwischen den Schritten diente Phosphatpuffer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, 100 mM, pH 7.46, 5-10 mg NaN_3 pro Liter). Die Flußrate betrug jeweils 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Der CM5-Sensorchip (*flow cell* 3 und 4) wurde zunächst durch Injektion einer Lösung von EDC und NHS aktiviert (*contact time* 20 min). Anschließend wurde wiederholt Enzymlösung injiziert (*flow cell* 4, insgesamt 30 min lang), bis die SPR-Antwort bei ca. 11000 RU lag (RU-Differenz zwischen unbelegtem und belegtem Chip: 10679 RU; entspricht 153 fmol immobilisiertem Enzym). Anschließend wurde Ethanolamin injiziert (*flow cell* 3 und 4, *contact time* 20 min), um übrige aktivierte Carboxylgruppen zu deaktivieren (*capping*).

Dieser Chip wurde zwischen den Messungen in TRIS-HCl im Kühlschrank aufbewahrt.

8.4.2 Methodische Details zu den SPR-Messungen

Es wurden Volumina von 250 μL für jede Konzentration benutzt. Die Konzentrationsreihen wurden ausgehend von einer 5 mM bzw. 2.5 mM Lösung des Liganden in Puffer (TRIS-HCl, 100 mM, pH 7.46) durch 1:1 Verdünnung mit demselben Puffer hergestellt. Vor der Messung wurden die Proben kurz zentrifugiert, um Luftblasen auszuschließen.

Die Flußrate (*flow rate*) betrug während der Messungen 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Die Kontaktzeit der Probe mit dem Chip (*contact time*) betrug 180 s, die *dissociation time* für 300 s. Die Temperatur bei den Messungen betrug 25 °C.

Zur Auswertung wurde die Biacore T100 Evaluation Software, Version 1.1.1, benutzt. Die Gleichgewichts SPR-Antworten wurden 5 s vor Ende der *contact time* abgenommen, der

Kurven-Fit erfolgte im Affinitäts-Modus mit dem „1:1 binding“ Modell (*one site binding model*) der Software.

8.5 Reaktionsverfolgung der enzymatischen Reaktion durch $^1\text{H-NMR}$

1 mL TcTS-Lösung (0.9 mg/mL in TRIS-HCl-Puffer, 100 mM, pH 7.5) wurden zweimal gefriergetrocknet und in 1 mL D_2O gelöst. Ebenso wurde mit 10 mL Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 7.46) verfahren. Anschließend wurde die Aktivität des Enzyms nach **AAV 6** überprüft. Des weiteren wurden sieben NMR-Röhrchen mit jeweils 0.7 mL $\text{MeOH-d}_4/\text{D}_2\text{O}$ (1:1) vorbereitet.

Zur Messung des Umsatzes ohne Liganden in der Lösung wurden 11 mg (25 μmol) **15** und 13 mg (35 μmol) **16** in je 500 μL Tris-HCl-Puffer (D_2O) gelöst. Die Lösungen wurden vereinigt und gut durchmischt. Dann wurden 80 μL Enzymlösung (D_2O) dazugegeben und die Zeit gemessen. Während der Reaktion wurden insgesamt 7 Proben zu je 100 μL entnommen und in die vorbereiteten NMR-Röhrchen gegeben.

Zur Messung des Umsatzes mit Ligand in der Lösung wurden 11 mg (25 μmol) **15** und 13 mg (35 μmol) **16** in je 250 μL deuteriertem Tris-HCl-Puffer gelöst. Die Lösungen wurden vereinigt und mit 500 μL einer 2 mM Lösung von Verbindung **59** in TRIS-HCl-Puffer (D_2O) gemischt. Anschließend wurden 80 μL Enzymlösung (D_2O) dazugegeben und die Zeit gemessen. Während der Reaktion wurden insgesamt 7 Proben zu je 100 μL entnommen und in die vorbereiteten NMR-Röhrchen gegeben.

Der prozentuale Umsatz ergibt sich aus dem Verhältnis der aromatischen Protonen des freien *p*-Nitrophenols zum gesamten (freien und gebundenen) *p*-Nitrophenol. Eine Freisetzung von *p*-Nitrophenol ohne Übertragung der *N*-Acetylneuraminsäure kann dabei vernachlässigt werden.^[50]

8.6 Messung des Umsatzes der enzymatischen Reaktion durch HPLC

8.6.1 Verwendung von Benzylgalactosid als Akzeptor

a) Optimierung der Bedingungen:

Es wurden Lösungen von **108** und **109** mit der Konzentration 0.2 mg/mL angesetzt. Jeweils 20 µL wurden in die Probenschleife injiziert und unter verschiedenen Bedingungen eluiert. Zur Messung beider Substanzen in einem Lauf wurden die Lösungen 1:1 gemischt, so dass die Konzentration jeweils 0.1 mg/mL betrug.

b) Reaktion mit Variation der Enzymmenge:

Es wurde eine Lösung von **108** ($c = 0.5$ mg/mL) und **8** ($c = 0.5$ mg/mL) in TRIS-HCl-Puffer (100 mM, pH 7.46) angesetzt. Zu 200 µL dieser Lösung in einem Eppendorf-Tube (1.5 mL) wurden weitere 60 µL TRIS-HCl-Puffer sowie 40 µL verdünnte Enzymlösung (entsprechend 0.039, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.50, 5.00, 10.0 und 20.0 µL Stammlösung mit der Konzentration 1.3 mg/mL) gegeben und für exakt 20 min bei 23 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 750 µL Ethanol verdünnt (Abbruch der Reaktion durch Denaturierung des Enzyms) und zentrifugiert (5 min, 14000 U/min). Der Überstand wurde abgenommen und gekühlt aufbewahrt.

c) Messung:

Es wurden jeweils 20 µL der Probelösung in die Probenschleife injiziert und dann der Lauf gestartet. Der Lauf dauerte im Programm 9 Minuten, es wurden 10% A und 90% B als Eluent benutzt. Die Flußrate betrug 1.2 mL/min, der Druck war im Bereich um 200 Bar. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 200 nm liefert das Chromatogramm.

Anschließend an alle Messungen folgten Waschschritte.

8.6.2 Verwendung von Methylumbelliferylgalactosid als Akzeptor

a) Reaktion mit Variation der Enzymmenge:

Es wurde eine Lösung von **12** ($c = 0.75$ mg/mL) und **8** ($c = 1.4$ mg/mL) in TRIS-HCl-Puffer (100 mM, pH 7.46) angesetzt. Zu 200 µL dieser Lösung in einem Eppendorf-Tube (1.5 mL) wurden weitere 60 µL TRIS-HCl-Puffer sowie 40 µL verdünnte Enzymlösung (entsprechend

0.625, 1.25, 2.50, 5.00, 10.0 und 20.0 μL Stammlösung mit der Konzentration 1.3 mg/mL) gegeben und für exakt 20 min bei 23 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 750 μL Ethanol verdünnt (Abbruch der Reaktion durch Denaturierung des Enzyms) und zentrifugiert (5 min, 14000 U/min). Der Überstand wurde abgenommen und gekühlt aufbewahrt.

b) Reaktion mit Testsubstanz:

Es wurde eine Lösung von **12** ($c = 0.75 \text{ mg/mL}$) und **8** ($c = 1.4 \text{ mg/mL}$) in TRIS-HCl-Puffer (100 mM, pH 7.46) angesetzt. Zu 200 μL dieser Lösung in einem Eppendorf-Tube (1.5 mL) wurden 60 μL einer Verdünnung der Testsubstanz in TRIS-HCl-Puffer (0.05, 0.5, 5 μM sowie 0.05, 0.5 und 5 mM) sowie 40 μL verdünnte Enzymlösung (entsprechend 5.00 μL Stammlösung mit der Konzentration 1.3 mg/mL) gegeben und für exakt 20 min bei 23 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 750 μL Ethanol verdünnt (Abbruch der Reaktion durch Denaturierung des Enzyms) und zentrifugiert (5 min, 14000 U/min). Der Überstand wurde abgenommen und gekühlt aufbewahrt.

c) Messung:

Zur Messung wurden jeweils 20 μL der Probelösung in die Probenschleife injiziert und dann der Lauf gestartet. Der Lauf dauerte im Programm 9 Minuten, es wurden 12% A und 88% B als Eluent (siehe oben) benutzt. Die Flußrate betrug 1.2 mL/min. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 318 nm lieferte das Chromatogramm.

Jeweils anschließend an die Messungen folgten Waschschrte.

9 Sicherheitsdaten

Substanzname	Gef.- Symbol	R-Sätze	S-Sätze	Carc. Cat.
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	(1/2-)26- 36/37/39-45	-
Aceton	F, Xi	11-36-66-67	(2-)9-16-26-46	-
Acetonitril	F, Xn	11-20/21/22-36	(1/2-)16-36/37	-
Acetylchlorid	F, C	11-14-34	(1/2-)9-16-26-45	-
<i>N</i> -Acetylneuraminsäure	-	-	24/25	-
Allyltributylzinn	T, N	21-25-36/38- 48/23/25-50/53	35-36/37/39-45- 60-61	-
Aluminiumchlorid	C	34	(1/2-)7/8-28-45	-
Aluminiumoxid	-	-	24/25	-
Amberlite IR-120	Xi	36/38	24/25	-
2,2'-Azobis(isobutyronitril)	E, Xn	2-11-20/22-52/53	(2-)39-41-47-61	-
Benzaldehyddimethylacetal	Xn	22	23-36/37	-
Benzol-d ₆	F, T	45-46-11-36/38- 48/23/24/25-65	53-45	1
Benzylalkohol	Xn	20/22	(2-)26	-
Boran-Trimethylamin-Komplex	Xi	36/37/38	16-26-33- 36/37/39	-
Bortrifluoridetherat	T, C	20/22-34-48/23	8-23-26-28A- 36/37/39-45	-
Butan-1-ol	Xn	10-22-37/38-41- 67	(2-)7/9-13-26- 37/39-46	-
<i>tert</i> -Butyllithium	C, Xn, N	12-14/15-17-34- 51/53-65-66-67	7/8-9-16-26-29- 33-36/37/39-45- 61-62	-
Chloroform-d ₁	Xn	63-68-45-22-38- 40-48/20/22	(2-)36/37	2

Sicherheitsdaten

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en	C, Xn, N	22-34-52/53	26-36/37/39-45-61	-
Dichlormethan	Xn	40	(2-)23-24/25-36/37	3
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	(2-)9-16-29-33	-
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Xi	36/37/38	26-37/39	-
2,2-Dimethoxypropan	F, Xi	11-36-66	16-26-33-37/39-9	-
Dimethylsulfoxid-d ₆	-	-	24/25	-
Dowex 50X8	Xi	36	24/25	-
Essigsäure ≥99%	C	16-35	(1/2-)23-26-45	-
Ethanol	F	11	(2-)7-16	-
Ethanolamin	C	20/21/22-34	(1/2-)26-36/37/39-45	-
Ethoxycarbonylmethylen-triphenylphosphoran	T	25-36/37/38	26-37/39-45	-
Ethylacetat	F, Xi	11-36-66-67	(2-)16-26-33	-
<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbo-diimid-Hydrochlorid	Xi	36/37/38	26-36/37/39	-
n-Hexan	F, Xn, N	11-38-48/20-62-65-67-51/53	(2-)9-16-29-33/37-61-62	-
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	Xi	5-36/37/38	24/25	-
Kaliumcarbonat	Xi	36/37/38	26-37/39	-
Kieselgel	Xi	36/37	26-37/39	-
Kupfersulfat-pentahydrat	Xn, N	22-36/38-50/53	(2-)22-60-61	-
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	(1/2-)7-16-36/37-45	-
Methanol-d ₄	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	(1/2-)7-16-36/37-45	-
4-Methoxybenzaldehyd	Xn	22	23-24/25	-
4-Methoxystyrol	-	-	24/25	-
Methyltriphenylphosphonium-bromid	Xn, N	22-51/53	26-36/37/39	-

Sicherheitsdaten

4-Methylumbelliferon	Xn	20/21/22- 36/37/38	26-37/39	-
Molsieb 4Å	Xi	36/37/38	22-24/25	-
NaOH	C	35	(1/2-)26-37/39-45	-
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	(1/2-)28-45-60-61	-
Natriumdihydrogenphosphat	Xi	36	26-39	-
Natriumhydrogencarbonat	-	-	24/25	-
Natriummethanolat	F, C	11-14-34	(1/2-)8-16-26-43- 45	-
Natriumpyrosulfit	Xn	22-31	(2-)25-46	-
Natriumsulfat	-	-	24/25	-
4-Nitrobenzaldehyd	Xi	36/37/38-68	26-36/37/39	-
3-Nitrobenzylalkohol	Xn	20/21/22- 36/37/38	26-36/37/39	-
4-Nitrophenol	Xn	20/21/22-33	(2-)28	-
4-Nitrostyrol	Xi	38	24-36/37	-
Palladium auf Aktivkohle, 5%, wassernass	F	11	16-24/25	-
Petrolether 50-70	F, N, Xn	11-38-51/53-65- 67	(2-)9-16-29-33- 61-62	-
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	(2-)26-28	-
Pyridiniumchlorochromat	T, N	49-43-50/53	53-45-60-61	2
Salzsäure 37%	C	34-37	(1/2-)26-45	-
Styrol	Xn	10-20-36/38	(2-)23	-
Tetrabutylammonium- hydrogensulfat	Xi	36/38	26-37/39	-
Tetrahydrofuran	F, Xi	11-19-36/37	(2-)16-29-33	-
Toluol	F, Xn	11-38-48/20-63- 65-67	(2-)36/37-62	-
<i>p</i> -Toluolsulfonsäure-monohydrat	Xi	36/37/38	(2-)26-37	-
Triethylamin	F,C	11-20/21/22-35	(1/2-)3-16-26-29- 36/37/39-45	-
1,8,9-Trihydroxyanthracen	Xi	36/37/38	26	-

Sicherheitsdaten

Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Xi	36/38	26-37/39	-
Wasserstoff	F+	12	(2-)9-16-33	-

10 Literatur

- [1] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, 5 Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, **2003**.
- [2] T. K. Lindhorst, *Chemie in Unserer Zeit* **2000**, *34*, 38-52.
- [3] N. Sharon, H. Lis, *Mol. Cell. Biochem.* **1982**, *42*, 167-187.
- [4] R. A. Laine, *Glycobiology* **1994**, *4*, 759-767.
- [5] J. E. Turnbull, R. A. Field, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 74-77.
- [6] E. Dabelsteen, *J. Pathol.* **1996**, *179*, 358-369.
- [7] R. Schauer, *Zoology* **2004**, *107*, 49-64.
- [8] R. Schauer, J. P. Kamerling, *New Comp. Biochem.* **1997**, *29b*, 243-402.
- [9] F. G. Blix, A. Gottschalk, E. Klenk, *Nature* **1957**, *179*, 1088.
- [10] E. Klenk, *Z. Physiol. Chem.* **1941**, *268*, 50-58.
- [11] R. Schauer, *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 485-499.
- [12] T. Angata, A. Varki, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 439-469.
- [13] A. Varki, *Nature* **2007**, *446*, 1023-1029.
- [14] G. Uhlenbruck, J. Schmitt, *Naturwissenschaften* **1965**, *52*, 163.
- [15] H.-H. Chou, T. Hayakawa, S. Diaz, M. Krings, E. Indriati, M. Leakey, S. Pääbo, Y. Satta, N. Takahata, A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 11736-11741.
- [16] H. Higashi, Y. Hirabayashi, Y. Fukui, M. Naiki, M. Matsumoto, S. Ueda, S. Kato, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 3796-3802.
- [17] S. Kelm, R. Brossmer, R. Isecke, H.-J. Gross, K. Strenge, R. Schauer, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *255*, 663-672.
- [18] K. I. P. J. Hidari, S. Shimada, Y. Suzuki, T. Suzuki, *Glycoconjugate J.* **2007**, *24*, 583-590.
- [19] K. Shinya, M. Ebina, S. Yamada, M. Ono, N. Kasai, Y. Kawaoka, *Nature* **2006**, *440*, 435-436.
- [20] D. Tyrrell, P. James, N. Rao, C. Foxall, S. Abbas, F. Dasgupta, M. Nashed, A. Hasegawa, M. Kiso, D. Asa, J. Kidd, B. K. Brabdeley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 10372-10376.
- [21] M. Yoshida, A. Uchimura, M. Kiso, A. Hasegawa, *Glycoconjugate J.* **1993**, *10*, 3-15.
- [22] S. V. Shelke, G.-P. Gao, S. Mesch, H. Gaethje, S. Kelm, O. Schwardt, B. Ernst, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4951-4965.

-
- [23] O. Schwardt, H. Gathje, A. Vedani, S. Mesch, G.-P. Gao, M. Spreafico, J. von Orelli, S. Kelm, B. Ernst, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 989-1004.
- [24] B. Kuberan, S. A. Sikkander, H. Tomiyama, R. J. Linhardi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2073-2075.
- [25] J. E. S. Hansen, H. Clausen, C. Nielsen, L. S. Teglbjaerg, L. L. Hansen, C. M. Nielsen, E. Dabelsteen, L. Mathiesen, S. Hakomori, J. O. Nielsen, *J. Virol.* **1990**, *64*, 2833-2840.
- [26] S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. K. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigbee, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 197-204.
- [27] C. M. Morel, J. Lazdins, *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1*, 14-15.
- [28] C. Chagas, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1909**, *1*, 159-218.
- [29] E. Marshall, *Science* **1995**, *267*, 811-812.
- [30] PAHO/WHO, *Estimación Cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas* **2006**.
- [31] A. R. L. Teixeira, N. Nitz, M. C. Guimaro, C. Gomes, C. A. Santos-Buch, *Postgrad. Med. J.* **2006**, *82*, 788-798.
- [32] H. Hahn, D. Falke, S. H. E. Kaufmann, U. Ullmann, *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 3. Aufl., Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, **1999**.
- [33] F. H. Kayser, K. A. Bienz, J. Eckert, R. M. Zinkernagel, *Medizinische Mikrobiologie*, 9. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, **1998**.
- [34] M. P. Barrett, R. J. S. Burchmore, A. Stich, J. O. Lazzari, A. C. Frasch, J. J. Cazzulo, S. Krishna, *Lancet* **2003**, *362*, 1469-1480.
- [35] L. Lauria-Pires, M. S. Braga, A. C. Vexenat, N. Nitz, A. Simoes-Barbosa, D. L. Tinoco, A. R. L. Teixeira, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2000**, *63*, 111-118.
- [36] C. J. Schofield, J. Jannin, R. Salvatella, *Trends Parasitol.* **2006**, *22*, 583-588.
- [37] H. B. Tanowitz, L. V. Kirchoff, D. Simon, S. A. Morris, L. M. Weiss, M. Wittner, *Clin. Microbiol. Rev.* **1992**, *5*, 400-419.
- [38] R. Schauer, G. Reuter, H. Muehlpfordt, A. F. B. Andrade, M. E. A. Pereira, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1983**, *364*, 1053-1057.
- [39] M. J. M. Alves, W. Colli, *IUBMB Life* **2007**, *59*, 274-279.
- [40] S. Schenkman, M. S. Jiang, G. W. Hart, V. Nussenzweig, *Cell* **1991**, *65*, 1117-1125.
- [41] S. S. C. Rubin-de-Celis, H. Uemura, N. Yoshida, S. Schenkman, *Cell. Microbiol.* **2006**, *8*, 1888-1898.

-
- [42] M. S. Leguizamon, E. Mocetti, H. G. Rivello, P. Argibay, O. Campetella, *J. Infect. Dis.* **1999**, *180*, 1398-1402.
- [43] H. Erdmann, C. Steeg, F. Koch-Nolte, B. Fleischer, T. Jacobs, *Cell. Microbiol.* **2009**, *11*, 1600-1611.
- [44] M. E. Pereira, K. Zhang, Y. Gong, E. M. Herrera, M. Ming, *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 3884-3892.
- [45] J. Neres, R. A. Bryce, K. T. Douglas, *Drug Discovery Today* **2008**, *13*, 110-117.
- [46] R. Agusti, A. S. Couto, O. E. Campetella, A. C. C. Frasch, R. M. de Lederkremer, *Glycobiology* **1997**, *7*, 731-735.
- [47] M. E. Pereira, *Science* **1983**, *219*, 1444-1446.
- [48] J. O. Previato, A. F. B. Andrade, M. C. V. Pessolani, L. Mendonca-Previato, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1985**, *16*, 85-96.
- [49] H. Uemura, S. Schenkman, V. Nussenzweig, D. Eichinger, *EMBO J.* **1992**, *11*, 3837-3844.
- [50] P. Scudder, J. P. Doom, M. Chuenkova, I. D. Manger, M. E. A. Pereira, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 9886-9891.
- [51] S. Schenkman, L. B. Chaves, L. C. Pontes de Carvalho, D. Eichinger, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 7970-7975.
- [52] M. L. Cremona, D. O. Sanchez, A. C. C. Frasch, O. Campetella, *Gene* **1995**, *160*, 123-128.
- [53] A. G. Watts, I. Damager, M. L. Amaya, A. Buschiazzo, P. Alzari, A. C. Frasch, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7532-7533.
- [54] A. R. Todeschini, L. Mendonca-Previato, J. O. Previato, A. Varki, H. van Halbeek, *Glycobiology* **2000**, *10*, 213-221.
- [55] I. Damager, S. Buchini, M. F. Amaya, A. Buschiazzo, P. Alzari, A. C. Frasch, A. Watts, S. G. Withers, *Biochemistry* **2008**, *47*, 3507-3512.
- [56] H. Bisswanger, *Enzymkinetik*, 3 Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [57] A. Buschiazzo, M. F. Amaya, M. L. Cremona, A. C. Frasch, P. M. Alzari, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 757-768.
- [58] M. F. Amaya, A. G. Watts, I. Damager, A. Wehenkel, T. Nguyen, A. Buschiazzo, G. Paris, A. C. Frasch, S. G. Withers, P. M. Alzari, *Structure* **2004**, *12*, 775-784.
- [59] M. Ribeiro, V. L. Pereira-Chioccola, D. Eichinger, M. M. Rodrigues, S. Schenkman, *Glycobiology* **1997**, *7*, 1237-1246.

- [60] A. Buschiazzo, G. A. Tavares, O. Campetella, S. Spinelli, M. L. Cremona, G. Paris, M. F. Amaya, A. C. C. Frasch, P. M. Alzari, *EMBO J.* **2000**, *19*, 16-24.
- [61] M. F. Amaya, A. Buschiazzo, T. Nguyen, P. M. Alzari, *J. Mol. Biol.* **2003**, *325*, 773-784.
- [62] G. Paris, L. Ratier, M. F. Amaya, T. Nguyen, P. M. Alzari, A. C. C. Frasch, *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 923-934.
- [63] F. Vandekerckhove, S. Schenkman, L. Pontes de Carvalho, S. Tomlinson, M. Kiso, M. Yoshida, A. Hasegawa, V. Nussenzweig, *Glycobiology* **1992**, *2*, 541-548.
- [64] B. Neubacher, D. Schmidt, P. Ziegelmüller, J. Thiem, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1551-1556.
- [65] A. M. Scheppokat, A. Gerber, A. Schroven, S. Meinke, S. Kopitzki, E. Beketow, J. Thimm, J. Thiem, *Eur. J. Cell Biol.* **2010**, *89*, 39-52.
- [66] B. Neubacher, S. Scheid, S. Kelm, A. C. Frasch, B. Meyer, J. Thiem, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 896-899.
- [67] A. Blume, B. Neubacher, J. Thiem, T. Peters, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1904-1909.
- [68] A. Schroven, S. Meinke, P. Ziegelmüller, J. Thiem, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9012-9021.
- [69] J. A. Harrison, K. P. R. Kartha, S. L. Smith, J. H. Naismith, S. Schenkman, R. A. Field, *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25*, 424S.
- [70] J. A. Harrison, K. P. R. Kartha, W. B. Turnbull, S. L. Scheuerl, J. H. Naismith, S. Schenkman, R. A. Field, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 141-144.
- [71] S.-G. Lee, B.-G. Kim, *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 819-823.
- [72] S. Schrader, E. Tiralongo, G. Paris, T. Yoshino, R. Schauer, *Anal. Biochem.* **2003**, *322*, 139-147.
- [73] J. H. Kim, H. W. Ryu, J. H. Shim, K. H. Park, S. G. Withers, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2475-2479.
- [74] S. Arioka, M. Sakagami, R. Uematsu, H. Yamaguchi, H. Togame, H. Takemoto, H. Hinou, S.-I. Nishimura, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1633-1640.
- [75] J. Neres, P. Bonnet, P. N. Edwards, P. L. Kotian, A. Buschiazzo, P. M. Alzari, R. A. Bryce, K. T. Douglas, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2106-2119.
- [76] J. Neres, M. L. Brewer, L. Ratier, H. Botti, A. Buschiazzo, P. N. Edwards, P. N. Mortenson, M. H. Charlton, P. M. Alzari, A. C. Frasch, R. A. Bryce, K. T. Douglas, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 589-596.

- [77] J. C. Wilson, M. J. Kiefel, S. Albouz-Abo, M. von Itzstein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2791-2794.
- [78] T. Haselhorst, J. C. Wilson, A. Liakatos, M. J. Kiefel, J. C. Dyason, M. von Itzstein, *Glycobiology* **2004**, *14*, 895-907.
- [79] R. Agusti, G. Paris, L. Ratier, A. C. C. Frasch, R. M. de Lederkremer, *Glycobiology* **2004**, *14*, 659-670.
- [80] I. Carvalho, P. Andrade, V. L. Campo, P. M. M. Guedes, R. Sesti-Costa, J. S. Silva, S. Schenkman, S. Dedola, L. Hill, M. Rejzek, S. A. Nepogodiev, R. A. Field, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2412-2427.
- [81] P. Meindl, G. Bodo, P. Palese, J. Schulman, H. Tuppy, *Virology* **1974**, *58*, 457-463.
- [82] H. Streicher, H. Busse, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1047-1057.
- [83] H. Busse, M. Hakoda, M. Stanley, H. Streicher, *J. Carbohydr. Chem.* **2007**, *26*, 159-194.
- [84] S. Buchini, A. Buschiazzo, S. G. Withers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2700-2703.
- [85] M. Engstler, M. A. Ferrero-Garcia, A. J. Parodi, R. Schauer, T. Storz-Eckerlin, A. Vasella, C. Witzig, X. Zhu, *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 1166-1174.
- [86] M. S. Leguizamon, O. E. Campetella, S. M. Gonzalez Cappa, A. C. C. Frasch, *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 3441-3446.
- [87] V. L. Pereira-Chioccola, S. Schenkman, J. K. Kloetzel, *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 2973-2978.
- [88] A. S. Buchovsky, O. Campetella, G. Russomando, L. Franco, R. Oddone, N. Candia, A. Luquetti, S. M. G. Cappa, M. S. Leguizamon, *Clin. Diag. Lab. Immun.* **2001**, *8*, 187-189.
- [89] Q. Wang, M. Wolff, T. Polat, Y. Du, R. J. Linhardt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 941-944.
- [90] M. d. C. Fernández-Alonso, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, G. Cuevas, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7379-7386.
- [91] M. D. Díaz, M. d. C. Fernández-Alonso, G. Cuevas, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *Pure Appl. Chem.* **2008**, *80*, 1827-1835.
- [92] J. C. Morales, J. J. Reina, I. Díaz, A. Aviñó, P. M. Nieto, R. Eritja, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7828-7835.

- [93] S. Vandenbussche, D. Díaz, M. C. Fernández-Alonso, W. Pan, S. P. Vincent, G. Cuevas, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, K. Bartik, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7570-7578.
- [94] B. J. Smith, P. M. Colman, M. von Itzstein, B. Danylec, J. N. Varghese, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 689-696.
- [95] K. Wallimann, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 1520-1532.
- [96] I. R. Vlahov, P. I. Vlahova, R. J. Linhardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1480-1481.
- [97] T. Polat, Y. Du, R. J. Linhardt, *Synlett* **1998**, 1195-1996.
- [98] A. Malapelle, A. Coslovi, G. Doisneau, J.-M. Beau, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 3145-3157.
- [99] W. Notz, C. Hartel, B. Waldscheck, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4250-4260.
- [100] H. Paulsen, P. Matschulat, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 487-495.
- [101] A. D. McNaught, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1919-2008.
- [102] T. M. Trnka, R. H. Grubbs, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18-29.
- [103] A. Fürstner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3012-3043.
- [104] M. Schuster, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 2037-2056.
- [105] N. Calderon, H. Y. Chen, K. W. Scott, *Tetrahedron Lett.* **1967**, 3327-3329.
- [106] J. L. Herisson, Y. Chauvin, *Makromol. Chem.* **1971**, *141*, 161-176.
- [107] W. L. Truett, D. R. Johnson, I. M. Robinson, B. A. Montague, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 2337-2340.
- [108] R. R. Schrock, *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 98-104.
- [109] G. C. Bazan, J. H. Oskam, H. N. Cho, L. Y. Park, R. R. Schrock, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6899-6907.
- [110] S. T. Nguyen, L. K. Johnson, R. H. Grubbs, J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3974-3975.
- [111] E. L. Dias, S. T. Nguyen, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3887-3897.
- [112] M. S. Sanford, J. A. Love, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6543-6554.
- [113] M. S. Sanford, M. Ulman, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 749-750.
- [114] J. A. Tallarico, P. J. Bonitatebus, Jr., M. L. Snapper, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7157-7158.
- [115] T. Weskamp, W. C. Schattenmann, M. Spiegler, W. A. Herrmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2490-2493.
- [116] M. Scholl, S. Ding, C. W. Lee, R. H. Grubbs, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 953-956.

-
- [117] J. S. Kingsbury, J. P. A. Harrity, P. J. Bonitatebus, jr., A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 791-799.
- [118] S. B. Garber, J. S. Kingsbury, B. L. Gray, A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8168-8179.
- [119] N. Holub, S. Blechert, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 1064-1082.
- [120] J. B. Alexander, D. S. La, D. R. Cefalo, A. H. Hoveyda, R. R. Schrock, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4041-4042.
- [121] T. J. Seiders, D. W. Ward, R. H. Grubbs, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3225-3228.
- [122] J. J. van Veldhuizen, J. E. Campbell, R. E. Giudici, A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6877-6882.
- [123] R. Roy, S. K. Das, *Chem. Commun.* **2000**, 519-529.
- [124] M. Jørgensen, P. Hadwiger, R. Madsen, A. E. Stütz, T. M. Wrodnigg, *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 565-588.
- [125] R. Dominique, S. K. Das, R. Roy, *Chem. Commun.* **1998**, 2437-2438.
- [126] G. X. Chang, T. L. Lowary, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4561-4564.
- [127] R. Dominique, S. K. Das, B. Liu, J. Nahra, B. Schmor, Z. Gan, R. Roy, *Methods Enzymol.* **2003**, *362*, 17-28.
- [128] R. Roy, S. K. Das, R. Dominique, M. C. Trono, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 565-571.
- [129] C. Mukherjee, A. K. Misra, *J. Carbohydr. Chem.* **2009**, *28*, 475-482.
- [130] Y.-J. Hu, R. Roy, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3305-3308.
- [131] R. Roy, R. Dominique, S. K. Das, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5408-5412.
- [132] B. Liu, S. K. Das, R. Roy, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2723-2726.
- [133] A. Dondoni, P. P. Giovannini, A. Marra, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 2380-2388.
- [134] M. S. M. Timmer, M. V. Chumillas, W. E. Donker-Koopman, J. M. F. G. Aerts, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, J. H. van Boom, *J. Carbohydr. Chem.* **2005**, *24*, 335-351.
- [135] M. H. D. Postema, J. L. Piper, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7095-7099.
- [136] R. Dominique, R. Roy, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 395-398.
- [137] R. Madsen, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 399-415.
- [138] Z. Gan, R. Roy, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1423-1428.
- [139] E. A. Voight, C. Rein, S. D. Burke, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8489-8499.

- [140] T. Masuda, S. Shibuya, M. Arai, S. Yoshida, T. Tomozawa, A. Ohno, M. Yamashita, T. Honda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 669-673.
- [141] A. K. Chatterjee, T.-L. Choi, D. P. Sanders, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11360-11370.
- [142] S. Meinke, J. Thiem, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1824-1829.
- [143] M. Ulman, R. H. Grubbs, *Organometallics* **1998**, *17*, 2484-2489.
- [144] M. Roldo, E. Barbu, J. F. Brown, D. W. Laight, J. D. Smart, J. Tsibouklis, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2006**, *79A*, 706-715.
- [145] B. R. Dohner, W. H. Saunders, Jr., *Can. J. Chem.* **1986**, *64*, 1026-1030.
- [146] F. Mikes, P. Strop, J. Kalal, *Makromol. Chem.* **1974**, *175*, 2375-2391.
- [147] P. Schwab, R. H. Grubbs, J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 100-110.
- [148] D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7277-7287.
- [149] J. Neumann, S. Weingarten, J. Thiem, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 1130-1144.
- [150] J. S. Brimacombe, A. K. M. S. Kabir, *Carbohydr. Res.* **1986**, *150*, 35-51.
- [151] I. C. Stewart, C. J. Douglas, R. H. Grubbs, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 441-444.
- [152] R. U. Lemieux, R. V. Stick, *Aust. J. Chem.* **1975**, *28*, 1799-1801.
- [153] T. Ercégovic, G. Magnusson, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3378-3384.
- [154] P. J. Garegg, *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56*, 845-858.
- [155] H. H. Brandstetter, E. Zbiral, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 2055-2065.
- [156] T. Winkler, *Dissertation*, Universität Hamburg, **2008**.
- [157] T. Turbadar, *Proc. Phys. Soc., London* **1959**, *73*, 40-44.
- [158] A. Otto, *Phys. Status Solidi B* **1968**, *26*, K99-K101.
- [159] A. Otto, *Z. Phys.* **1968**, *216*, 398-410.
- [160] E. Kretschmann, H. Raether, *Z. Naturforsch., A: Phys. Sci.* **1968**, *23*, 2135-2136.
- [161] U. Jönsson, L. Fägestam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Löfås, B. Persson, H. Roos, B. Persson, H. Roos, I. Rönnberg, S. Sjölander, E. Stenberg, R. Ståhlberg, S. Urbaniczky, H. Östlin, M. Malmqvist, *BioTechniques* **1991**, *11*, 620-622, 624-627.
- [162] S. Löfås, B. Johnsson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1526-1528.
- [163] S. Ohlson, M. Strandh, H. Nilshans, *J. Mol. Recognit.* **1997**, *10*, 135-138.
- [164] P. Mehta, R. D. Cummings, R. P. McEver, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32506-32513.
- [165] I. Okazaki, Y. Hasegawa, Y. Shinohara, T. Kamasaki, R. Bhikhabhai, *J. Mol. Recognit.* **1995**, *8*, 95-99.
- [166] A. M. Hutchinson, *Anal. Biochem.* **1994**, *220*, 303-307.

- [167] R. Karamanska, J. Clarke, O. Blixt, J. I. MacRae, J. Q. Zhang, P. R. Crocker, N. Laurent, A. Wright, S. L. Flitsch, D. A. Russell, R. A. Field, *Glycoconjugate J.* **2008**, *25*, 69-74.
- [168] R. Karlsson, A. Michaelsson, L. Mattsson, *J. Immunol. Methods* **1991**, *145*, 229-240.
- [169] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **1996**.
- [170] M. Ambrosi, N. R. Cameron, B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1593-1608.
- [171] J. C. Paulson, O. Blixt, B. E. Collins, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 238-248.
- [172] J. Rothermel, H. Faillard, *Carbohydr. Res.* **1990**, *196*, 29-40.
- [173] R. Strachan, J. Wood, R. Hirschmann, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 1074-1075.
- [174] R. L. Dotson, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1972**, *34*, 3131-3138.
- [175] R. L. Dotson, *Inorg. Nucl. Chem. Lett.* **1973**, *9*, 215-225.
- [176] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [177] G. Zemplén, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1926**, *59B*, 1254-1266.
- [178] G. Zemplén, E. Pacsu, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, *62B*, 1613-1614.
- [179] S. E. Denmark, C. R. Butler, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 63-66.
- [180] S. Pedatella, A. Guaragna, D. D'Alonzo, M. De Nisco, G. Palumbo, *Synthesis* **2006**, 305-308.
- [181] H. H. Lee, P. G. Hodgson, R. J. Bernacki, W. Korytnyk, M. Sharma, *Carbohydr. Res.* **1988**, *176*, 59-72.
- [182] W. A. Szarek, J. S. Jewell, I. Szczerek, J. K. N. Jones, *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 4473-4476.
- [183] H. L. Carrell, J. P. Glusker, V. Burger, F. Manfre, D. Tritsch, J. F. Biellmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 4440-4444.
- [184] C. S. Rye, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9756-9767.
- [185] R. Mukthavaram, S. Marepally, M. Y. Venkata, G. N. Vegi, R. Sistla, A. Chaudhuri, *Biomaterials* **2009**, *30*, 2369-2384.
- [186] M. A. Maier, C. G. Yannopoulos, N. Mohamed, A. Roland, H. Fritz, V. Mohan, G. Just, M. Manoharan, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 18-29.
- [187] R. Kuhn, R. Brossmer, *Angew. Chem.* **1958**, *70*, 25-26.
- [188] P. Meindl, H. Tuppy, *Monatsh. Chem.* **1969**, *100*, 1295-1306.
- [189] N. Y. Kulikova, A. M. Shpirt, L. O. Kononov, *Synthesis* **2006**, 4113-4114.
- [190] R. Kuhn, P. Lutz, D. L. MacDonald, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 611-617.
- [191] E. Kirchner, F. Thiem, R. Dernick, J. Heukeshoven, J. Thiem, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 453-486.

Lebenslauf

Sebastian Andreas Meinke

Geboren am 07. Dezember 1976 in Hamburg-Harburg

Schulbildung:

August 1983 – Juli 1987 Katholische Schule Harburg-Neugraben (Grundschule)

August 1987 – Juli 1996 Friedrich-Ebert-Gymnasium Hamburg-Harburg

Zivildienst:

Februar 1997 – März 1998 Sozialstation Harburg II, Deutsches Rotes Kreuz, Hamburg-Harburg)

Studium:

April 1998 – September 2005 Studium der Chemie an der Universität Hamburg

Dezember 2000 Diplom-Vorprüfung

Januar/Februar 2005 Diplomprüfung

März 2005 - September 2005 Diplomarbeit am Institut für organische Chemie der Universität Hamburg in der Arbeitsgruppe von Dr. Wolfgang Maison

Titel der Diplomarbeit: „Synthese von Naturstoffgrundgerüsten ausgehend von Azabicycloalkenen“

Seit November 2005 Promotion am Institut für organische Chemie der Universität Hamburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Thiem

Titel der Dissertation: „Assay-Entwicklung und Inhibitorsynthese für die Transsialidase aus Trypanosoma cruzi“

Tätigkeiten:

Während des Studiums Studentische Hilfskraft im IT-Service des Fachbereichs Chemie

November 2005 – September 2009 Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für organische Chemie;

Assistent im Integrierten Synthese-Praktikum und Hauptassistent für das Organische Fortgeschrittenen-Praktikum

Publikationen

Zeitschriftenbeiträge:

- 1) „Azabicycloalkenes as Synthetic Intermediates - Synthesis of Azabicyclo[X.3.0]alkane Scaffolds“, M. Büchert, S. Meinke, A. H. G. P. Prenzel, N. Deppermann, W. Maison, *Org. Lett.* **2006**, 8, 5553-5556.
- 2) „Tandem Exploitation of *Helix pomatia* Glycosyltransferases: Facile Syntheses of H-Antigen-Bearing Oligosaccharides“, H. Bretting, F. Buck, G. Jacobs, S. Meinke, A. M. Scheppokat, J. Thiem, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 7144-7152.
- 3) „Transsialidase from *Trypanosoma cruzi* for Regio- and Stereoselective Synthesis of N-Acyl-Modified Sialylated Oligosaccharides and Measurement of Transfer Rates“, A. Schroven, S. Meinke, P. Ziegelmüller, J. Thiem, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 9012-9021.
- 4) „Cross metathesis for the synthesis of novel C-sialosides“, S. Meinke, J. Thiem, *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 1824-1829.
- 5) „Enzymatic glycosylation, inhibitor design, and synthesis and formation of glyco-self assembled monolayers for simulation of recognition“, A. M. Scheppokat, A. Gerber, A. Schroven, S. Meinke, S. Kopitzki, E. Beketow, J. Thimm, J. Thiem, *Eur. J. Cell Biol.* **2010**, 89, 39-52.

Posterpräsentationen:

- 1) „Tandem Exploitation of *Helix pomatia* Glycosyltransferases: Facile Syntheses of H-Antigen-Bearing Oligosaccharides“ (PO-130), H. Bretting, S. Meinke, G. Jacobs, F. Buck, A. M. Scheppokat, J. Thiem, *14th European Carbohydrate Symposium* in Lübeck, 2. - 7. September **2007**.
- 2) „Regio- and Stereoselective Synthesis of N-Acyl Modified Sialylated Oligosaccharides with *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase and Measurement of Transfer Rates and Activity“ (PO-146), S. Meinke, A. Schroven, J. Thiem, *14th European Carbohydrate Symposium* in Lübeck, 2. - 7. September **2007**.
- 3) „Synthesis of C-Sialosides as Ligands for *Trypanosoma cruzi* Transsialidase and Affinity Measurements by SPR“ (P21), S. Meinke, J. Thiem, *4th Glycan Forum* in Berlin, 23. - 24. Mai **2008**.

- 4) „Cross Metathesis for Synthesis of Novel C-Sialosides and Affinity Measurements by SPR“ (A-P132), S. Meinke, J. Thiem, *24th International Carbohydrate Symposium* in Oslo, 27. Juli - 1. August **2008**.
- 5) „C-Sialosides as Potential Inhibitors for *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase“ (PA 058), S. Meinke, J. Thiem, *15th European Carbohydrate Symposium* in Wien, 19. - 24. Juli **2009**.

Vorträge:

- 1) „Chemistry with *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase – Enzymatic Sialylation and Modified Substrates“, S. Meinke, A. Schroven, J. Thiem, *Symposium des SFB 470*, 10. November **2006**.
- 2) „Assay-Entwicklung und Inhibitorsynthese für die Transsialidase aus *Trypanosoma cruzi*“, S. Meinke, J. Thiem, *Symposium des SFB 470*, 10. Oktober **2008**.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation “Assay-Entwicklung und Inhibitorsynthese für die Trans-sialidase aus *Trypanosoma cruzi*“ selbständig angefertigt und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Es handelt sich hierbei um meinen ersten Promotionsversuch.

Hamburg, im April 2010

Schließlich möchte ich mich bedanken bei

- Herrn Prof. Dr. Joachim Thiem für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, das interessante Thema und die Unterstützung während der Zeit der Promotion
- meiner Freundin Katrin für die unendliche Geduld und die seelische Unterstützung bei chronischem Promotionsstress
- meiner Laborkollegin Jessi, die Stimmung, Ordnung und Musik ins Labor 315 gebracht hat
- Janna, die auch oft spät Feierabend gemacht hat, für gesellige Runden im Rechnerraum
- Maike, die den Großteil der Korrekturen gemacht hat
- Lilia und Kirsten für tatkräftige Unterstützung bei Arbeit und Freizeit und das Wissen, wie was geht und wo man es finden kann
- Janina für Kuchen und Organisation diverser AK-Unternehmungen
- Andreas Schroven, der mich in die Geheimnisse der Neuraminsäurechemie und der Arbeit mit dem „reinen Weltenzym“ TcTS eingeweiht hat
- Sebastian Kopitzki, der immer für mehr oder weniger wissenschaftliche Gespräche nebenan (318) zu erreichen war, Daniel für fachliche Gespräche und Sicherheitskopien und Martin, der während seiner Diplomarbeit das Chaos in OC 315 beseitigt hat
- den Kollegen vom AK B. Meyer, die wissen, wie man feiert, und mir ausserdem diverse Geräte erklärt haben; besonders Anna für Unterstützung beim Biacore und Dirk für die Messungen am 700er (die leider nicht geklappt haben)
- Herwig, der zu jeder Tages- und Nachtzeit für Aufmunterung gesorgt hat
- Tim fürs Döner holen und die „Mittagspausen“ in der Endphase des Schreibens
- Matze und Sven (AK Vill) für viele Tips, Tricks und Geschichten
- Julian für Computerwissen und Schachprogramme
- den Kollegen vom AK C. Meier, besonders die Christel-Mittagspausen-Runde (Svenja, Maike, Sönke, Tilmann) und die OC-F-Hauptassistenten-Kollegen
- allen ISP-Kollegen, aus AK C. Meier und AK Heck, besonders Sabrina, Nils und Markus Dede, ohne die das ISP nicht funktioniert hätte
- den OC-F-Studenten, die mir im Labor geholfen haben, besonders Elena Hense, Marcus Schröder, Moritz Waldmann
- dem NMR-Service, ohne den man in der OC nicht arbeiten kann, besonders Herrn Sinnwell und Thomas Hackl

Vielen Dank!