

**Synthese von
Nucleosiddiphosphatglycosiden
basierend auf acceptorsubstituierten
cycloSal-Nucleosidmonophosphateestern**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Tanja Zismann

vorgelegt dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

Hamburg, im April 2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke

Datum der Disputation: 17.06.2011

*Meiner Familie
und meinen Töchtern
Valeria und Veronika*

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Chris Meier gilt mein Dank für die Überlassung des interessanten Themas, die intensive Betreuung während dieser Arbeit und den gewährten wissenschaftlichen Freiraum.

Allen ehemaligen und aktiven Mitarbeitern des Arbeitskreises Meier danke ich für das gute Arbeitsklima und stete Hilfsbereitschaft. Mein besonderer Dank gilt meinen lieben langjährigen Kollegen aus Labor OC-525, Frau Dipl. Chem. Zita Szombati und Herrn Dr. Bastian Reichardt für die außerordentlich gute Zusammenarbeit, stete Unterstützung und ein immer offenes Ohr.

Ein großer Dank geht auch an die zahlreichen Praktikantinnen und Praktikanten, die im Rahmen ihres Studiums experimentelle Arbeiten für mich durchgeführt haben.

Herrn Dr. V. Sinnwell sowie Herrn Dr. E. T. K. Haupt und ihren Teams danke ich für die Durchführung der zahlreichen NMR-Experimente. Bei Frau A. Meiners, Frau C. Christ und Frau G. Graack bedanke ich mich für die Messung der Massenspektren sowie für anregende Diskussionen.

Ganz besonders danke ich außerdem meinen Kolleginnen Dipl. Chem. Zita Szombati, Dipl. Chem. Sarah Krüger, Dipl. Chem. Annika Mergner und Dipl. Chem. Nadine Lindström nicht nur für die zahlreichen anregenden Diskussionen über die chemischen Probleme sondern auch für die unterhaltsamen Pausen, witzigen Filmabende und internationale Küche.

Für die große Geduld während der kritischen Auseinandersetzung mit diesem Manuskript danke ich ganz besonders Frau Dipl. Chem. Sarah Krüger und Frau Dipl. Chem. Annika Mergner.

Aus tiefstem Herzen danke ich meiner Familie für ihr ständiges Interesse an meinem Studium sowie die liebevolle Unterstützung. Ein riesiger Dank geht an meinen Mann Andrey für das enorme Verständnis und die seelische sowie auch technische Unterstützung im Labor.

ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
Äq.	Äquivalente
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
CDCl ₃	Deuteriochloroform
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
dA	2'-Desoxyadenosin
dd	Dublett eines Dubletts
dC	2'-Desoxycytidin
DC	Dünnschichtchromatographie
dG	2'-Desoxyguanosin
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMDO	Dimethyldioxiran
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimethylsulfoxid (sechsfach deuteriert)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
D ₂ O	Deuteriumoxid
dt	Dublett eines Triplets
dT	2'-Desoxythymidin
DTPM	(1,3-Dimethyl-2,4,6-trioxypyrimidin-5-yliden)methyl
Fuc	Fucose
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GDP	Guanosindiphosphat

gef.	gefunden
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GMP	Guanosinmonophosphat
GT	Glycosyltransferase
h	Stunde
HPLC	<i>high performance liquid chromatographie</i>
IR	Infrarot
<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
KDO	2-Keto-3-deoxyoctonat
LacNAc	<i>N</i> -Acetyllactosamin
m	Multiplett
M	Molar
Man	Mannose
MHz	Megahertz
MS	Massenspektrometrie
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NDP	Nucleosiddiphosphat
NMP	Nucleosidmonophosphat
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quadruplett
R_f	Retentionsfaktor
RP	<i>reversed phase</i>
R_t	Raumtemperatur
s	Singulett
S.	Seite
s.	siehe
Sdp	Siedepunkt
t	Triplett
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBAC	Tetrabutylammoniumchlorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TEA	Triethylamin
TES	Triethylsilan

THF	Tetrahydrofuran
t_R	Retentionszeit
U	Uridin
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
z.B.	zum Beispiel

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. KENNTNISSTAND	5
2.1 Enzymatische Synthesen.....	5
2.2 Chemische Synthesen	7
2.3 Chemische und enzymatische Synthesen von Nucleosiddiphosphat-Oligosacchariden	16
2.4 <i>cycloSal</i>-Nucleotide als aktivierte NMP	19
3. AUFGABENSTELLUNG.....	26
4. RESULTATE UND DISKUSSION	28
4.1 Synthesestrategie.....	28
4.2 Darstellung von <i>cycloSal</i>-Nucleosidmonophosphaten.....	29
4.2.1 Darstellung der Salicylalkohole	30
4.2.2 Darstellung der Saligenylchlorphosphite	33
4.2.3 Darstellung der geschützten Nucleoside	34
4.2.4 Darstellung der <i>cycloSal</i> -Nucleosidmonophosphate	40
4.3 Darstellung von Glycosyl-1-phosphaten	44
4.3.1 Synthese der Glycosyl-1-phosphate nach der Phosphoramidit-Methode.....	45
4.3.2 Synthese der Glycosyl-1-phosphate nach der Koenigs-Knorr-Methode.....	49
4.3.3 Synthese eines Trisaccharid-1-phosphates	51
4.3.3.1 Synthesestrategie	51
4.3.3.2 Darstellung des Lactosaminderivates	52

4.4 Darstellung von Nucleosiddiphosphatglycosiden aus <i>cycloSal</i>-Nucleotiden	59
4.4.1 Wasserausschluss bei der Kupplung von Glycosylphosphaten und <i>cycloSal</i> -Nucleotiden	61
4.4.2 Stabilität der Nucleosiddiphosphatglycoside	65
4.4.3 Einfluss der Zuckerphosphatmenge auf die Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute der Nucleosid-diphosphatglycoside	69
4.4.4 Synthese der Nucleosiddiphosphatglycoside nach den in Kapiteln 4.4.1-4.4.3 optimierten Methode	72
4.4.5 Erste Ansätze zur Darstellung von Nucleosiddiphosphatglycosiden mit alkalischer Phosphatase	74
4.4.6 Einfluss der Acceptorsubstituenten	82
4.4.7 Synthese der Nucleosiddiphosphatglycoside	85
4.4.8 Analytik und Charakterisierung der dargestellten Nucleosiddiphosphatglycoside	90
4.5 Fazit	97
5. ZUSAMMENFASSUNG	98
6. SUMMARY	103
7. EXPERIMENTELLER TEIL	106
7.1 Allgemeines	106
7.1.1 Lösungsmittel und Reagenzien	106
7.1.2 Chromatographie	109
7.1.3 Spektroskopie	110
7.1.4 Geräte	111
7.2 Synthesen	112
7.2.1 Synthese der <i>cycloSal</i> -Nucleosidmonophosphate	112
7.2.2 Synthese der Glycosyl-1-phosphate	138

Inhaltsverzeichnis

7.2.3 Synthese der Nucleosiddiphosphatglycoside	168
8. GEFÄHRSTOFFVERZEICHNIS	191
9. LITERATURVERZEICHNIS	195

1. EINLEITUNG

Kohlenhydrate bilden eine der größten Naturstoffklassen mit vielfältigsten Eigenschaften und sind am Aufbau aller lebenden Organismen beteiligt.^[1] Sie dienen z. B. als Struktur- und Gerüstelemente in Mikroorganismen, Pflanzen- und Tierreich (Cellulose, Agar, Chitin). Als Reservestoffe stellen sie eine gute und rasch verfügbare Energiequelle (Stärke, Glycogen, Inulin) dar. In Form von Glycokonjugaten (Glycoproteine, Glycolipide, Glycophospholipide) als Bestandteile der Zellmembranen, sind sie für die Zellerkennung, -adhäsion und -entwicklung verantwortlich. Weiterhin fungieren solche Oligosaccharide als Rezeptoren in den Antigen-Antikörper-Reaktionen und Signaltransduktionen.^[2] Obwohl sich die Natur in den Biosynthesen auf die Verwendung nur weniger Monosaccharide beschränkt, ergibt sich aufgrund der Polyfunktionalität der Kohlenhydrate eine enorme Strukturvielfalt. Die monomeren Kohlenhydratbausteine können auf viele unterschiedliche Arten miteinander verknüpft werden, wobei sowohl lineare, als auch vielfach verzweigte Oligo- und Polysaccharide entstehen. Durch die Möglichkeit, die Verknüpfungsart der einzelnen Monosaccharide zu variieren, verfügt die Natur über ein riesiges Potential, die biologischen Informationen zu kodieren und weiterzugeben.^[3]

Man unterscheidet zwei Enzymklassen, die in der Natur zur Biosynthese der Oligosaccharide eingesetzt werden. Die Enzyme des Nicht-Leloir-Weges setzen Glycosylphosphate als aktivierte Kohlenstoffsubstrate ein. Die Glycosyl-Transferasen des Leloir-Weges benötigen Nucleosidmono- oder Nucleosiddiphosphatzucker (NMP- oder NDP-Zucker). Der Glycosylrest im NDP-Zucker wird durch die anomere Phosphatestergruppe für die Übertragung aktiviert, während der Nucleosidrest als zusätzliches Erkennungsmerkmal für die Glycosyltransferasen dient.^[4]

Ende der 40er Jahre erkannte *Lius F. Leloir* das allgemeine Prinzip der Biosynthese von Oligo- und Polysacchariden und isolierte die erste Nucleosiddiphosphatglycopyranose, Uridindiphosphatglucose. Es gelang ihm die Rolle der UDP- α -D-Glucose **1** als Glycosyldonor in der Biosynthese des Glycogens nachzuweisen und den mechanistischen Ablauf dieses Stoffwechselforganges aufzuklären.^[5]

Der Aufbau des Glycogens geht von der Glucose **2** aus, die durch Glucokinase und Phosphoglucomutase zum Glucosylphosphat **3** umgesetzt wird. Anschließend wird aus dem Glucosylphosphat **3** und Uridintriphosphat (UTP) **4** in einer durch UDP-Glucose-Pyrophosphorylase katalysierten Reaktion UDP- α -D-Glucose **1** gebildet. Der aktivierte Glycosyldonor wird von einer Glycosyl-Transferase auf die wachsende Glycogenkette übertragen und es wird eine neue glycosidische Bindung, katalysiert durch Glycogensynthase, gebildet (Abb. 1).^[6]

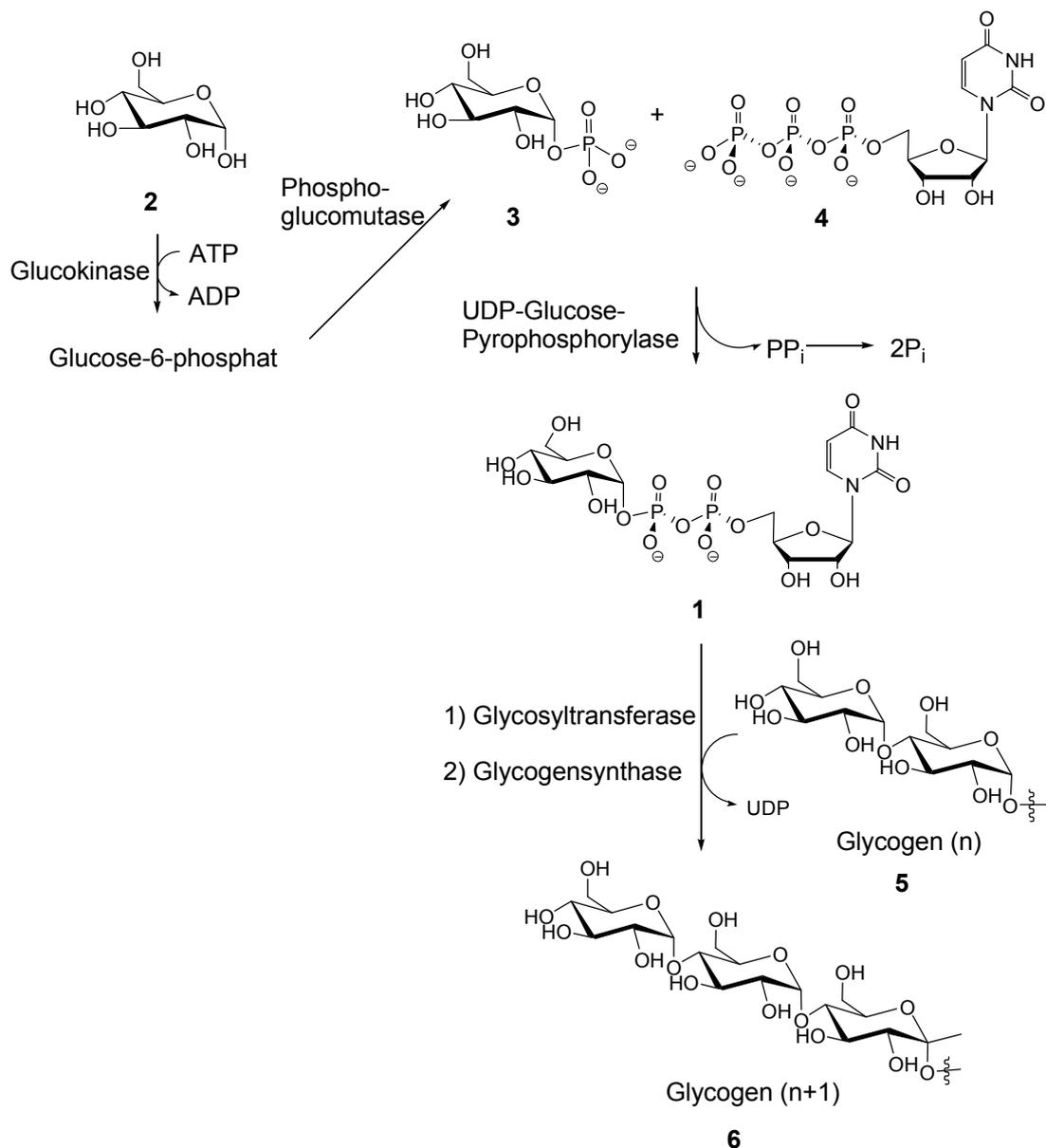


Abbildung 1: Glycogenbiosynthese

Die Glycosyl-Transferasen in Säugetieren beschränken sich auf acht Zuckernucleotide: UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, GDP-Man, GDP-Fuc, UDP-GlcUA, CMP-NeuAc. Die weiteren in Säugetieren anzutreffenden Kohlenhydrateinheiten werden erst nach dem Einbau eines Monosaccharidbausteins in das Oligosaccharid modifiziert. Eine große Zahl anderer Monosaccharide (Xylose, Arabinose, KDO und Desoxyzucker) findet sich auch in Pflanzen und Bakterien, wo sie an der Biosynthese der Zellwände beteiligt sind.^[7]

Die Bestandteile der Zellwand und die Aufklärung ihrer Funktionen und Reaktionsmechanismen sind von großem medizinischen Interesse. Die Erkenntnisse könnten anschließend zur Entwicklung unterschiedlicher Hemmstoffe verwendet werden.^[8] Da die Kohlenhydrate an der Zelloberfläche als biologische Marker für Tumorzellen und in bakteriellen und parasitären Infektionszyklen eine wichtige Rolle spielen, wäre es denkbar mit synthetischen Zuckerbausteinen die Immunantworten auszulösen und sie als Wirkstoffe zur Vorbeugung oder Therapie von Infektionen, Entzündungen und tumorösen Krankheiten einzusetzen.^[9] Es wäre zum Beispiel ein Eingriff in den Aufbau der bakteriellen Zellwand und die damit verbundene Hemmung der beteiligten Glycosyl-Transferasen denkbar. Auf diese Weise könnten erfolgsversprechende Strategien gegen bakterielle Infektionen entwickelt und Zugang zu neuen Antibiotika-Klassen geschaffen werden.^[10]

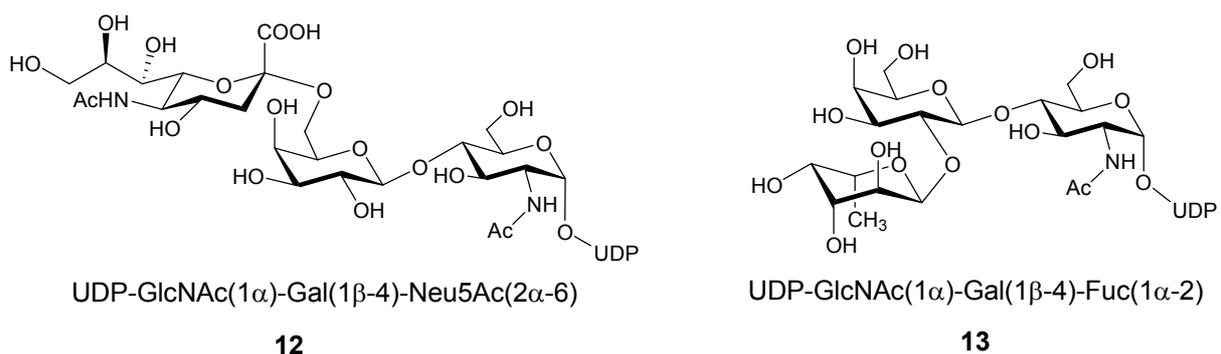


Abbildung 2: Nucleotidaktivierte Oligosaccharide der Säuger

Neben NDP-Monosacchariden wurde 1961 zum ersten Mal von nucleotidaktivierten Oligosacchariden berichtet, die aus Kolostrum und Milch von Ziegen isoliert wurden.^[11] In den folgenden Jahren isolierte man weitere NDP-Trisaccharide aus Kolostrum und Milch von Säugern, wie Schweinen^[12], Schafen^[13] und auch

Menschen.^[14] Diese wurden als verlängerte Derivate des UDP- α -N-Acetylglycosamins (UDP- α -GlcNAc) **7** und des UDP- α -N-Acetylactosamins (UDP- α -LacNAc) **8** charakterisiert, welche als dritten Monosaccharidbaustein häufig N-Acetyl- bzw. N-Glycolyneuraminsäure **9** und **10** sowie die L-Fucose **11** in den 2-, 4- und 6-Positionen der Galactose tragen (Abb. 2, S. 3).

Fucosyliertes UDP-N-Acetylglucosamin **14** sowie ein Phosphogalactosid **15** wurden aus dem Eileiter von Hennen isoliert (Abb. 3).^[15,16] Obwohl diese Verbindungen schon lange bekannt sind, konnten ihre Biosynthesen und die biologischen Funktionen aufgrund der limitierten Verfügbarkeit nicht untersucht werden. Im Gegensatz dazu konnte nachgewiesen werden, dass die Biosynthese verschiedener Kohlenhydratpolymere (S-Layer, Pseudomurein, Methanochondroitin) der Zellwände in Bakterien und Archae, mit nucleotidaktivierten Oligosacchariden als Intermediate, verläuft.^[17,18] Die in solchen Vorgängen beteiligten Enzyme konnten allerdings noch nicht isoliert und charakterisiert werden. Zur Aufklärung der Biosynthese und biologischer Funktionen solcher natürlich vorkommender Glycokonjugaten sollte der chemische Zugang zu natürlichen NDP-Oligosacchariden sowie deren Analoga angestrebt werden.

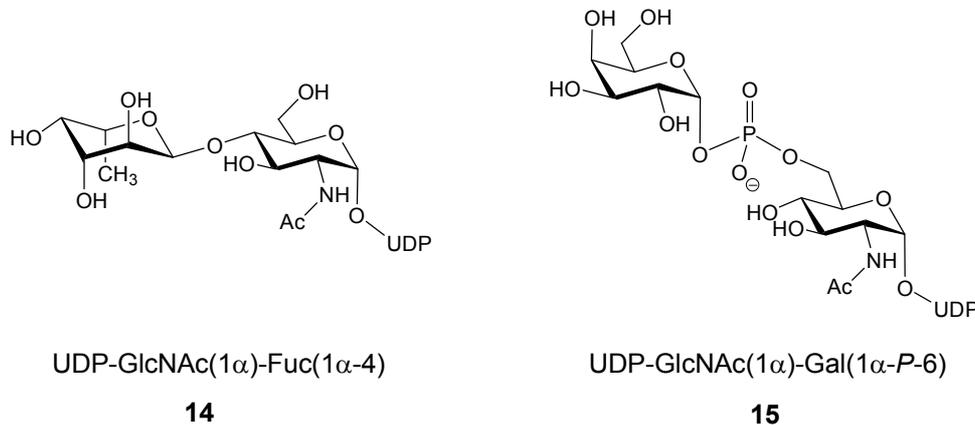


Abbildung 3: Nucleotidaktivierte Oligosaccharide aus dem Eileiter der Henne

2. KENNTNISSTAND

Die Mehrzahl der Substrate der Leloir-Glycosyltransferasen werden *in vivo* aus dem entsprechenden Zuckerphosphat und dem Nucleosidtriphosphat gebildet (Abb. 1, S. 2). Die Triebkraft dieser Kupplung wird aus der anschließenden Hydrolyse des freigesetzten Pyrophosphats geliefert. Einige Nucleosiddiphosphatglycopyranosen werden allerdings auch durch die enzymatische Modifizierung der anderen NDP-Glycoside gebildet. Die UDP-Glucuronsäure (UDP-GlcUA) **16** entsteht zum Beispiel durch Oxidation von UDP- α -Glc **1** mit UDP-Glc-Dehydrogenase. Die GDP- α -Mannose (GDP- α -Man) **17** wird in drei Schritten - Dehydratisierung, Isomerisierung und Reduktion - in die GDP- β -L-Fucose (GDP- β -L-Fuc) **18** überführt. Eine weitere Ausnahme stellt die CMP-Neuraminsäure (CMP-NeuAc) **19** dar. Diese entsteht in der direkten Kupplung, katalysiert von der CMP-NeuAc-Synthase, aus *N*-Acetylneuraminsäure **9** und Cytidintriphosphat (CTP) **20**.^[2]

Seit der Entdeckung der NDP-Glycoside und der Erkenntnis ihres biologischen Potentials und möglicher pharmakologischer Nutzung wird verstärkt an der Entwicklung neuer Synthesemethoden geforscht. In der Literatur findet man eine Reihe von enzymatischen, chemischen und chemoenzymatischen Methoden zur Darstellung dieser Glycosyldonatoren.^[19]

2.1 Enzymatische Synthesen

Einige Jahre nach der ersten Isolierung und Charakterisierung der UDP-Glc **1** wurden erste enzymatische Darstellungsmethoden publiziert. So berichteten *Munch-Petersen et al.* von der Bildung der UDP-Glc **1** aus dem UTP **4** und Glucose-1-phosphat **3** unter Zusatz des Enzyms, UDP-Glc-Pyrophosphorylase, das aus Back- und Bierhefe isoliert werden konnte.^[20] Wenige Jahre später konnten sie auf dem gleichen Weg aus entsprechenden Edukten und unter Zusatz von GDP-Man-Pyrophosphorylase, ebenfalls isoliert aus Bierhefe, die GDP-Man **17** synthetisieren.^[21] Die Vorteile einer enzymatischen Synthese zur Darstellung von Zuckernucleotiden sind die hohe Regio- und Stereospezifität der Reaktion sowie der Verzicht auf Schutzgruppen. Zum Beispiel berichteten *Whitesides et al.* von der

Synthese von UDP-Glc **1** aus einem Gemisch der Nucleosidtriphosphate und Glucose-1-phosphat **3**. Da die Reaktion nur mit der UDP-Glc-Pyrophosphorylase katalysiert wurde, konnte man selektiv nur ein Produkt herstellen.^[22] Die enzymatische Synthese ist inzwischen für nahezu alle natürlichen Zuckernucleotide möglich.^[23,24] *Thiem et al.* publizierten beispielsweise den enzymatischen Zugang zur GDP-β-L-Fucose **18**, deren bisherige Synthese auf dem chemischen Weg sehr schwierig und mit aufwendiger Schutzgruppenchemie verbunden war.^[25] Analog zur Synthese in biologischen Systemen geht man von ungeschützter Fucose **11** aus, die durch Adenosintriphosphat (ATP) **21** und Fucokinase selektiv am anomeren Zentrum phosphoryliert wird. Der Einsatz von Phosphoenolpyruvat und Pyruvat-Kinase erlaubt die Regeneration des während der Reaktion entstehenden und inhibierenden Adenosindiphosphats (ADP) **22** zu ATP **21**. Dadurch wurde es möglich, ATP **21** nur in katalytischen Mengen einzusetzen und die Ausbeuten der Zuckerphosphate auf bis zu 80% zu steigern. Fucose-1-phosphat **23** reagiert dann weiter mit Guanosintriphosphat (GTP) **24** zu GDP-Fuc **18**, wobei ein weiteres Enzym, GDP-Fuc-Pyrophosphorylase, benötigt wird. Das dabei entstehende Pyrophosphat wird durch die anorganische Pyrophosphatase gespalten (Abb. 4). Die Synthese ist allerdings mit 22% Ausbeute nicht zufriedenstellend und ist auf mikromolare Ansatzgrößen beschränkt. Auch die Verfügbarkeit und Beschaffungskosten der beteiligten Enzyme spielen eine entscheidende Rolle.

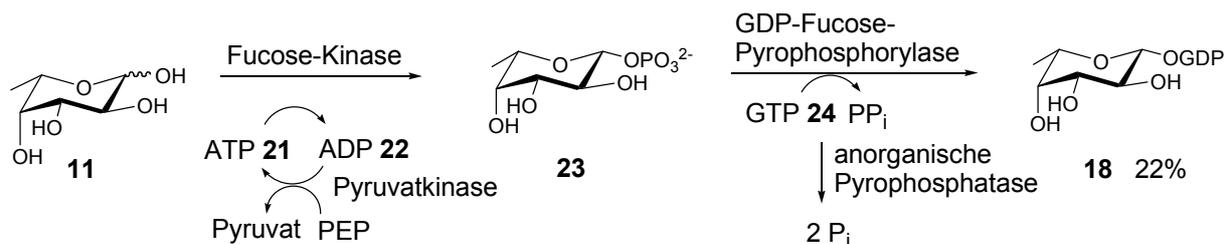


Abbildung 4: Enzymatische Synthese der GDP-β-L-Fucose **18**

Die enzymatischen Methoden können allerdings nur für die Darstellung der natürlichen NDP-Zucker angewendet werden, bei denen die entsprechenden Enzyme zugänglich sind. Der Bedarf an Zuckernucleotiden kann nur durch eine chemische oder chemoenzymatische, generell anwendbare Synthese gedeckt werden.

2.2 Chemische Synthesen

Die bekannten Synthesestrategien für die Darstellung von NDP-Glycosiden können allgemein in zwei Gruppen unterteilt werden (Abb. 5). Zum einen wird die Pyrophosphatbindung aus zwei Monophosphatbausteinen, Nucleosidmonophosphat und Zuckerphosphat, aufgebaut (Abb. 5, Weg A). Dabei muss einer der Reaktionspartner für die erfolgreiche Kupplung aktiviert werden. In den meisten Fällen übernimmt diese Rolle das Nucleosidmonophosphat. Der Vorteil solcher Synthesen besteht im Einsatz von anomenreinen Glycosylphosphaten, dessen Stereochemie sich im Produkt wiederfindet, da die Kupplung nicht am anomeren Zentrum stattfindet.

Alternativ können die NDP-Zucker aus einem Glycosidbaustein und einem Nucleosiddiphosphat aufgebaut werden (Abb. 5, Weg B). Da die Pyrophosphatbindung schon im Edukt vorhanden ist, findet die Aktivierung für die Kupplung am Zucker statt. Allerdings stellt die Darstellung eines anomenreinen Produktes auf diesem Weg ein großes Problem dar. Desweiteren müssen die Reaktionsbedingungen streng überwacht werden, um die Zersetzung des gebildeten NDP-Glycosids zu vermeiden.

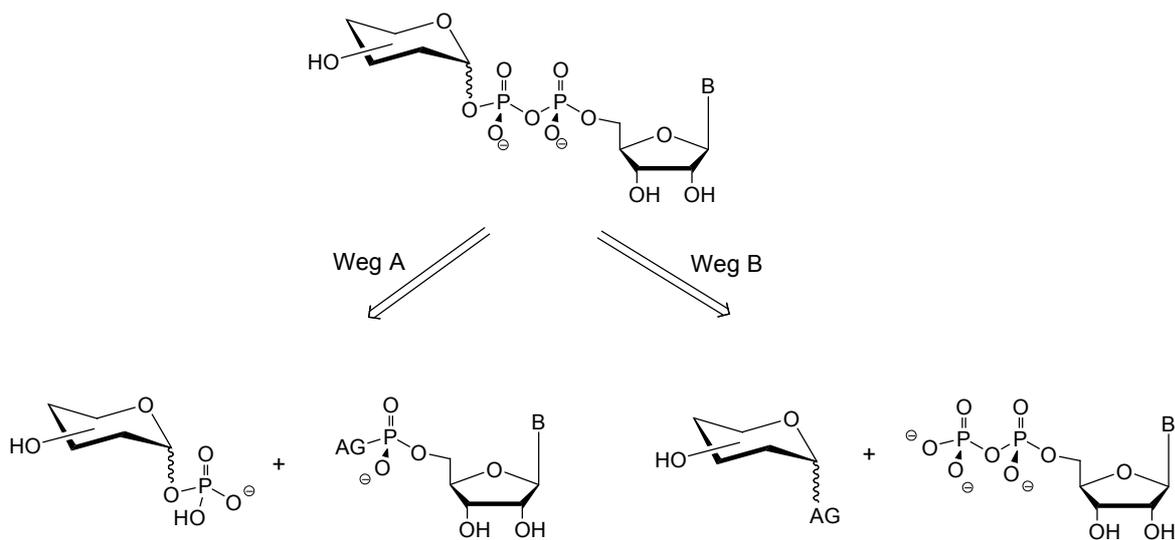


Abbildung 5: Allgemeine Synthesestrategien zur Darstellung von NDP-Zuckern

2.2.1 Synthese der NDP-Zucker unter Ausbildung einer Pyrophosphatbindung

Die Bildung einer Pyrophosphatgruppe aus zwei Monophosphaten setzt die Aktivierung einer der beiden Phosphatgruppen voraus. Dieses Vorgehen erlaubt die Kupplung unter milderer Bedingungen, so dass die Zersetzung des gebildeten NDP-Zuckers sowie die Entstehung der unerwünschten Homodimere verhindert werden.

Moffatt und *Khorana* berichteten erstmals von der Kupplung eines ungeschützten Uridinphosphoramidates **32** und eines ebenso ungeschützten Glucose-1-phosphates **3** zu UDP- α -D-Glucose **1** (Abb. 6).^[26]

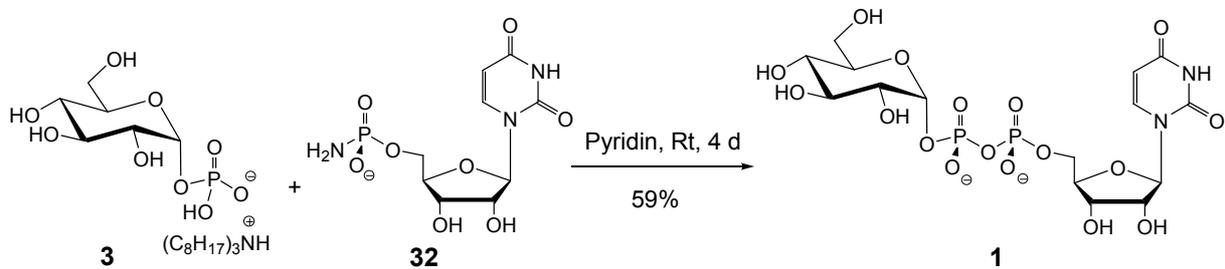


Abbildung 6: Synthese von UDP- α -D-Glc **1** nach der Amidatmethode

Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur in einem Zeitraum von vier Tagen durchgeführt. Bedingt durch die hohe Instabilität des Produktes bei niedrigen pH-Werten wurde Pyridin als optimales Lösungsmittel gewählt. Das Zuckerphosphat wurde als Trioctylammoniumsalz eingesetzt, welches zusätzlich zu der Stabilität des Produktes beitragen sollte. Mit dieser Methode konnte UDP- α -D-Glc **1** erfolgreich mit einer Ausbeute von 59% synthetisiert werden und es entstanden lediglich kleine Mengen der Nebenprodukte, wie Uridinmonophosphat (UMP) **25** und Diuridindiphosphat **26**. Allerdings stellte die Löslichkeit anderer Nucleosidphosphoramidate in Pyridin ein großes Problem dar. Deshalb wurden weitere Nucleosidphosphoramidate bezüglich ihrer Löslichkeit und Reaktivität untersucht.^[27] Es zeigte sich, dass die Amidate von starken Basen wie Piperidin sehr reaktiv in den Kupplungsreaktionen waren, jedoch nur in geringen Ausbeuten erhalten werden konnten. Dagegen konnten die Amidate schwacher Basen wie *p*-Anisidin in sehr guten Ausbeuten dargestellt werden, zeigten sich jedoch als sehr reaktionsträge bei der Darstellung von NDP-Zuckern. Als gute Alternative erwiesen

sich Nucleosidphosphormorpholidate **27**, die hervorragende Löslichkeit und hohe Stabilität im Vergleich zu den oben beschriebenen Amidaten zeigten.

Die Umsetzung des 4-Morpholin-*N,N'*-dicyclohexylcarboxamidiniumsalzes des Nucleosidphosphormorpholidates **27** mit zwei bis drei Äquivalenten des Zuckerphosphates **28** als Trioctylammoniumsalz in Pyridin ergab die Nucleosiddiphosphatglycoside **29** in den Ausbeuten von 63 bis 70% (Abb. 7).^[28] Mit der Morpholidatmethode gelang vielen Arbeitsgruppen die Synthese natürlicher als auch nicht-natürlicher Zuckernucleotide, inklusive NDP-Heptosen und fluorierter UDP-Glucose **30** und -Galactose **31**.

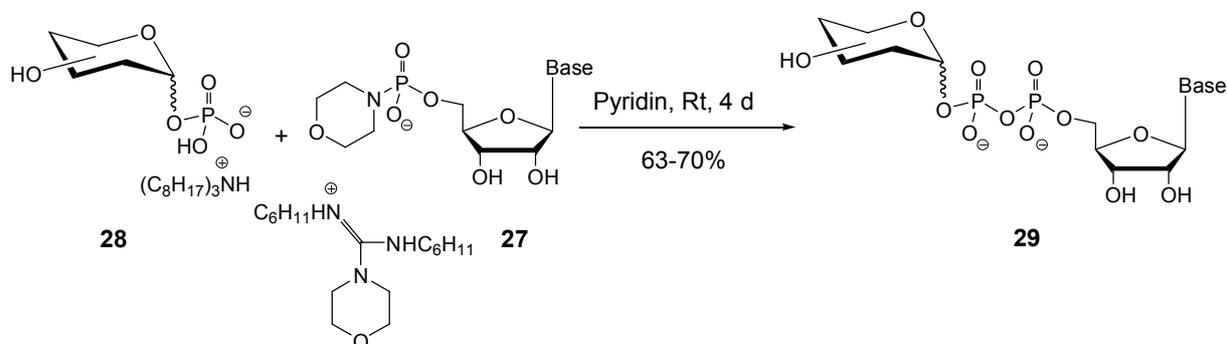
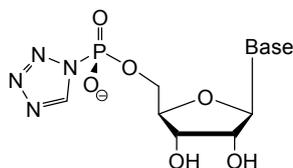


Abbildung 7: Synthese von NDP-Zuckern nach der Morpholidatmethode

Die längeren Reaktionszeiten dieser Kupplung führen jedoch zu unerwünschten Nebenreaktionen oder hydrolytischer Spaltung der entstandenen NDP-Glycoside. Somit wurde vermehrt nach einem geeigneten Katalysator gesucht, der die Reaktionszeiten verkürzt und die labile Pyrophosphatbindung des Produktes nicht angreift. *Wittmann* und *Wong* fanden 1*H*-Tetrazol **38** als effektiven Katalysator für die Morpholidatkupplung.^[29] Für die ausschlaggebende katalytische Wirkung ist vermutlich die Tatsache verantwortlich, dass Tetrazol sowohl als Brönstedt-Säure ($pK_A = 4.9$) als auch als Nucleophil fungiert. Tetrazol **38** protoniert zunächst die Morpholidatgruppe am Stickstoffatom, die zu einer leicht abspaltbaren Gruppe wird, und greift anschließend das elektrophile Phosphoratom an. So entsteht ein sehr reaktives Intermediat, Nucleosidmonophosphotetrazolid **33** (Abb. 8, S. 10), das die Kupplungsdauer zu NDP-Zuckern auf 48 Stunden verkürzt. Die beträchtliche Toleranz des Tetrazols **38** gegenüber verschiedenen funktionellen Gruppen erlaubte

eine schnellere Synthese der NDP-Zucker, welche Modifikationen am Zucker^[30] oder auch am Nucleosid^[31] tragen.



33

Abbildung 8: Nucleosidphosphotetrazolid 33

Alternativ zur Tetrazolkatalyse setzten *Wagner* und *Collier*, inspiriert durch die frühere Synthese von Nikotinamidadenindinucleotid **34**^[32], erfolgreich die Lewisäure $MnCl_2$ als Katalysator ein. Sie synthetisierten GDP- α -D-Man **187**, welche eine Modifikation an der Nucleobase trägt.^[33] Die Reaktionsdauer betrug bei Raumtemperatur sechs Tage und lieferte das gewünschte Produkt mit einer Ausbeute von 56%. Allerdings schlugen weitere Versuche zur Darstellung von NDP-Zuckern der Pyrimidinnucleobasen bis heute fehl.^[34]

Cramer et al. berichteten von Nucleotidimidazoliden **35** als aktivierte Ausgangsverbindungen für die Synthese von Nucleotidderivaten, wie Nucleosiddi- und -triphosphaten, FAD und einigen NDP-Zuckern.^[35] Die Synthese der Nucleosidmonophosphatimidazole **35** aus NMP **36** und *N,N'*-Carbonyldiimidazol (CDI) **37** verläuft unter milden Bedingungen und benötigt keine Schutzgruppen für das Nucleosidmonophosphat. Desweiteren werden bei den Kupplungen mit NMP-Imidazoliden **35** keine katalytischen Zusatzreagenzien wie Tetrazol **38** benötigt und die Ausbeuten hängen weniger vom Lösungsmittel ab.^[36]

Baisch und *Öhrlein* synthetisierten mit Hilfe der CDI-Aktivierungsmethode eine Reihe von natürlichen und nicht natürlichen Zuckernucleotiden in Ausbeuten bis zu 91%. Dabei dauerten die Reaktionen bis zu 50 Stunden bei Raumtemperatur (Abb. 9, S. 11).^[37] Die hohen Ausbeuten sind auf den Einsatz von vollständig acetylierten Zuckerphosphaten zurückzuführen. Wie *Ishimizu et al.* gezeigt haben, lieferten die Kupplungsreaktionen mit ungeschützten Zuckerphosphaten nur moderate Ausbeuten, auch wenn die Löslichkeit der Monophosphate durch die Trioctylammonium-Gegenionen gewährleistet war.^[38] Weiterhin entwickelten

Jacobson *et al.* erfolgreiche Synthesen von verschiedenen UDP-Zucker mit Hilfe der CDI-Methode. Dabei waren diese NDP-Zucker an Nucleobase oder Ribose modifiziert.^[39]

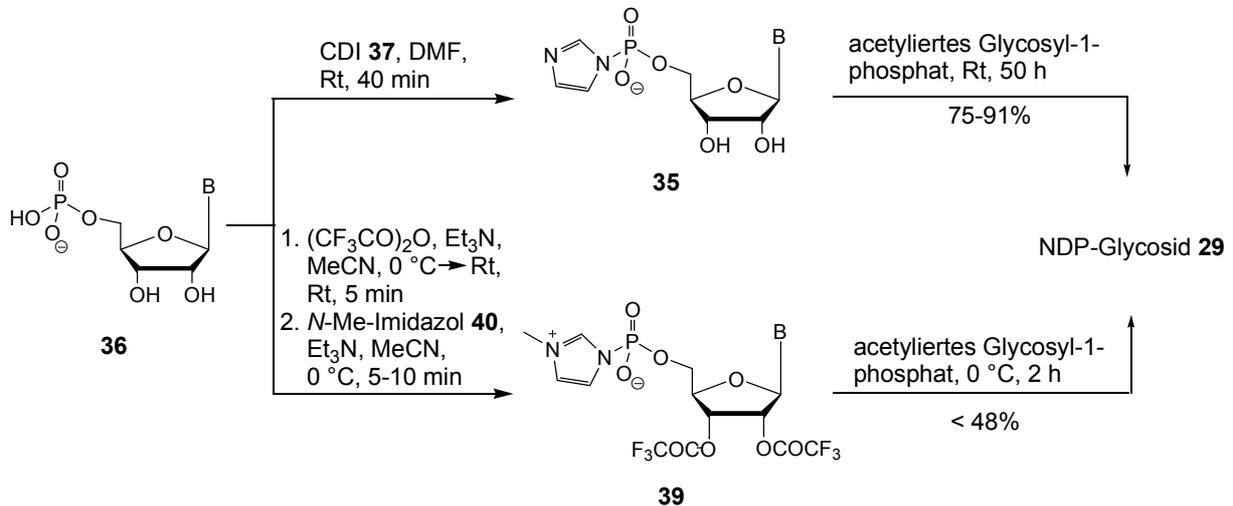


Abbildung 9: Synthese der NDP-Zucker aus NMP-Imidazoliden nach *Cramer* und *Bogachev*

Bogachev et al. stellten 1996 Nucleotidmethylimidazolide **39** als aktivierte Nucleotide für die Synthese von Desoxynucleotidtriphosphaten vor.^[40] Die Triethylammoniumsalze der NMP wurden mit dem Überschuss an Trifluoressigsäureanhydrid in Gegenwart von Triethylamin und *N,N*-Dimethylanilin in Acetonitril geschützt. Anschließende Zugabe von *N*-Methylimidazol **40** ergab die elektrophilen NMP-*N*-Methylimidazolide **39** (Abb. 9). Die Intermediate wurden ohne Reinigung mit anorganischen Phosphaten umgesetzt. Anschließende Abspaltung der Trifluoracetylschutzgruppen lieferte die entsprechenden Nucleosidtriphosphate. Die Methode wurde für die Synthese von verschiedenen Zuckernucleotiden angewendet, wobei die gewünschten Produkte aufgrund der hohen Reaktivität der NMP-*N*-Methylimidazolide **39** schon nach 2 bis 3 Stunden bei 0°C erhalten wurden.^[41] So konnten *Marlow* und *Kiessling* mit der Methode erfolgreich die synthetisch anspruchsvolle UDP- α -D-Galactofuranose **41** darstellen.^[42] Nachteile dieser Methode sind zum einen die Ausbeuten unter 48% sowie die Bildung der Dinucleosiddiphosphate.

Eine weitere Methode der Phosphoramidataktivierung entwickelten *Borch et al.*^[43] Sie synthetisierten einen Benzylester des Brombutylphosphoramidats von Thymidin **42**. Dieses cyclisiert *in situ* nach der hydrogenolytischer Spaltung des Benzylesters zu dem Zwitterion **43**. Dieses hochreaktive Intermediat ergab in der Reaktion mit β -D-Glucose-1-phosphat **3b** nach einer Stunde die entsprechende dTDP- β -D-Glucose (dTDP- β -D-Glc) **44** mit einer Ausbeute von 77% (Abb. 10). Zur Erhöhung der Löslichkeit des Glycosylphosphates wurde der Reaktion Tetrabutylammoniumchlorid zugesetzt. Die ungewöhnlich kurzen Reaktionszeiten machen diese Synthese sehr ansprechend. Man sollte jedoch die neunstufige Synthese des Phosphoramidates **42** und auch die Bildung der Nebenprodukte bei der intramolekularen Cyclisierung zu dem Zwitterion **43** bedenken.

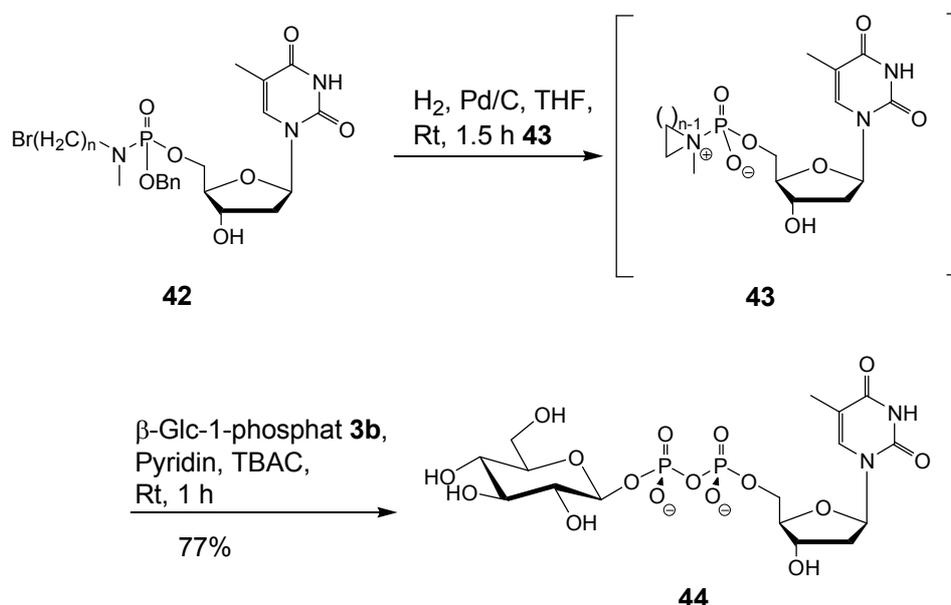


Abbildung 10: Synthese von dTDP- β -D-Glucose **44** nach *Borch et al.*

Die verbreitete Verwendung der Phosphor-(III)-Chemie in der Oligonucleotidsynthese inspirierte *van der Marel et al.* dazu, die reaktiven Phosphoramidite für die Zuckernucleotidsynthese einzusetzen.^[44] Sie berichteten von der Synthese der UDP- α -D-GlcNAc **7** und zwei weiteren nicht-natürlichen UDP-Zuckern **47** (Abb. 11, S. 13). Uridinphosphoramidit **45** wurde in einer vierstufigen Synthese mit 93% Ausbeute dargestellt. Dabei wurde die Cyanoethylgruppe am Phosphit als am leichtesten unter basischen Bedingungen abspaltbare Schutzgruppe gewählt. Die mit Dicyanoimidazol (DCI) aktivierte Kupplung des Phosphoramidits **45** und des silylierten

Zuckerphosphats **46** lieferte in 30 Minuten ein Phosphat-Phosphit-Intermediat, welches *in situ* mit *tert*-Butylhydroperoxid zu einem Diphosphat oxidiert wurde. Die anschließende Abspaltung aller Schutzgruppen und der Ionenaustausch sowie die Reinigung mittels RP-18-Chromatographie ergab die entsprechenden UDP-Zucker mit einer Ausbeute von 63 bis 76%.

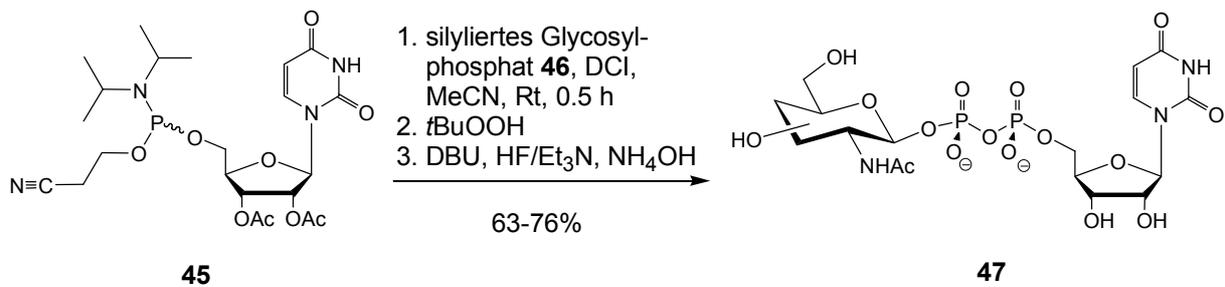


Abbildung 11: Synthese von UDP-Zuckern aus Uridinphosphoramidit **45**

2.2.2 Synthese der NDP-Zucker durch Glycosylierung der Nucleosiddiphosphate

Die Synthesen der Zuckernucleotide durch Kupplung der Nucleosiddiphosphate am terminalen Phosphat mit elektrophilen Glycosyldonatoren sind relativ neu. Die Glycoside werden am anomeren Zentrum mit einer Abgangsgruppe wie z. B. einem Halogenid versehen. Es kann aber auch ein 1,2-Anhydroglycosid als Glycosyldonor verwendet werden. Da bei diesen Reaktionen eine neue Bindung am anomeren Zentrum gebildet wird, stellt die Stereokontrolle hier die größte Herausforderung dar.

Arlt und *Hindsgaul* berichteten von einer Methode, die von einem benzylierten Glycosid ausgeht (Abb. 12, S. 14).^[45] Dieses wird mit Oxalylbromid halogeniert und mit dem Tetrabutylammoniumsalz des Nucleotids umgesetzt. Nach einer anschließenden hydrogenolytischen Spaltung der Benzylschutzgruppen erhält man den gewünschten NDP-Zucker. So konnten UDP-D-Galactose (UDP-Gal) **57**, UDP-D-Arabinose (UDP-Ara) **48** und GDP-L-Fuc **18** in Ausbeuten von 10 bis 30% über drei Stufen erhalten werden. Dabei betrug das Anomerenverhältnis α/β in Abhängigkeit vom pH-Wert 1:1-3:1. *Uchiyama* und *Hindsgaul* berichteten 1998 von der Synthese fünf weiterer UDP-Zucker, wobei hier Derivate des Per-*O*-trimethylsilylgalactosids

verwendet wurden. Die isolierten Ausbeuten betragen 30-40%. Auch hier erfolgte keine Stereokontrolle.^[46]

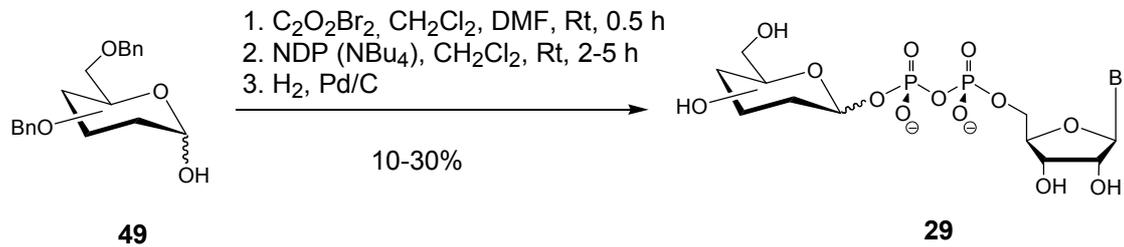


Abbildung 12: Synthese von NDP-Zuckern aus Glycosylbromiden

Timmons und *Jakeman* verbesserten die oben beschriebene Synthesestrategie, indem sie den Nachbargruppeneffekt der Acetyl- bzw. Benzoylschutzgruppen ausnutzten (Abb. 13).^[47] Auf diese Weise konnten α -D-Mannose und β -L-Fucose verknüpfte Nucleosiddiphosphate von Guanosin und Uridin in Ausbeuten vergleichbar mit der Hindsgaul-Methode (31-38%) dargestellt werden. Die Möglichkeit der Stereokontrolle mittels Nachbargruppeneffekts verleiht dieser Methode einen erheblichen Vorteil. Allerdings werden auf diesem Weg nur die 1,2-*trans*-konfigurierten Produkte erhalten.

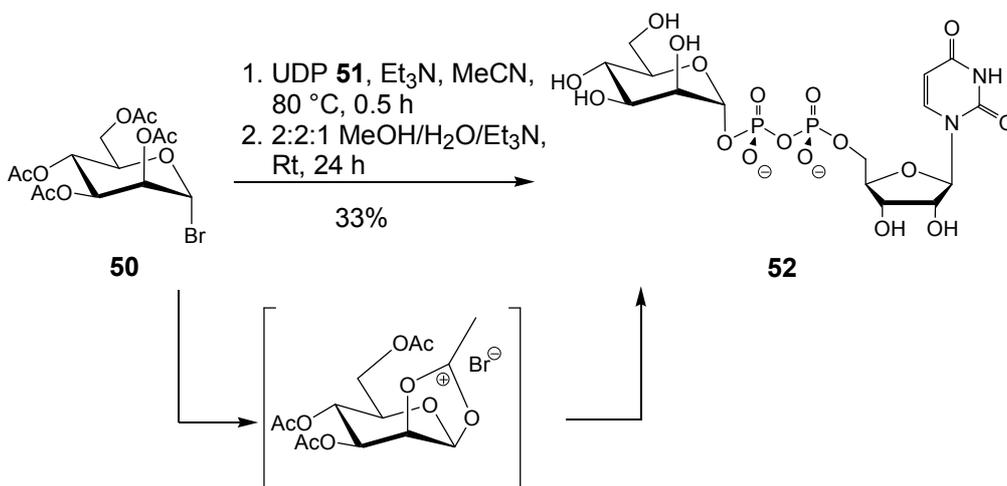


Abbildung 13: Stereoselektive Synthese von UDP- α -D-Mannose **52**

Im Jahre 1998 publizierten *Hanessian et al.* eine Methode, bei der Glucose durch eine 3-Methoxypyridin-Gruppe (MOP) am anomeren Zentrum für die Synthese mit

einem Uridindiphosphat (UDP) **51** aktiviert ist (Abb. 14, S. 15).^[48] Ein Vorteil dieser Reaktion ist, dass die Edukte ungeschützt eingesetzt werden. Nach vollständiger Umsetzung innerhalb von drei Stunden wurde der Überschuss an UDP **51** durch Zugabe von alkalischer Phosphatase zerstört und somit in besser abtrennbare Nucleoside überführt. Dieses erleichtert die anschließende Reinigung der Zuckernucleotide, welche mit Ausbeuten von 55 bis 60% erhalten wurden. Auch bei dieser Methode entstehen untrennbare α/β -Gemische im Verhältnis 3:1 bzw. 4:1.

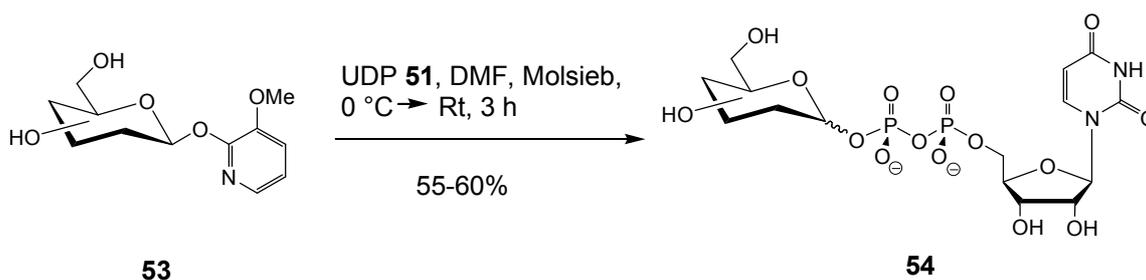


Abbildung 14: Synthese von UDP-Glycosiden **54** nach *Hanessian*

Eine aktuellere Methode wurde 2007 von *Ferrières et al.* publiziert.^[49] Die freie Säure des Uridindiphosphates wurde mit einer aktivierten Glycofuranose **55** umgesetzt (Abb. 15). Die Aktivierung des anomeren Zentrums wurde durch ein Benzimidazolthioglycosid erreicht. Die Reaktionszeiten schwanken von zwei Minuten bis drei Stunden je nach eingesetztem Zucker. Dabei konnte man eine Zersetzung des Produktes bei längeren Reaktionszeiten beobachten. Auch hier wurde die Reinigung der entstandenen Tetrabutylammoniumsalze der UDP-Zucker **54** durch den Einsatz von alkalischer Phosphatase erleichtert. Die UDP-Zucker wurden in Ausbeuten von 21 bis 37% als α/β -Gemische im Verhältnis 1:1 bzw. 1:2 isoliert.

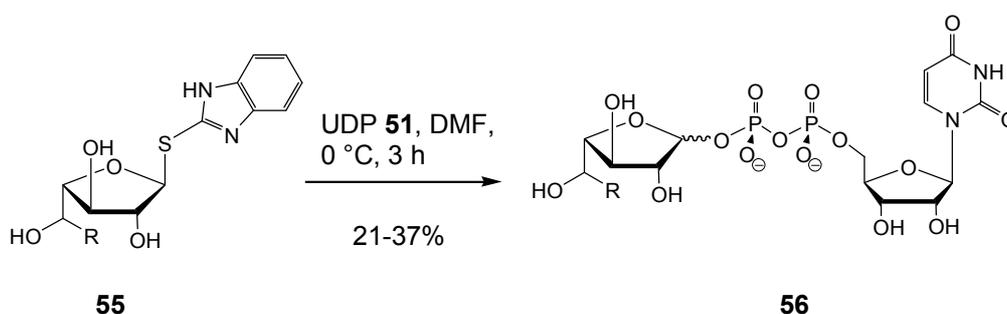


Abbildung 15: Synthese von UDP-Zucker **56** mit Thioimidoylglycosid **55**

Inspiriert durch die anomerenreine Methanolyse der 1,2-Anhydrozucker,^[50] verwendeten *Ernst* und *Klaffke* diese Zucker zur Glycosylierung von Nucleosiddiphosphaten (Abb. 16). Jedoch war in diesen Fällen die Stereokontrolle weniger effektiv als bei der Methanolyse. Abhängig von den Schutzgruppen am Zucker, sowie auch vom Zucker selbst, wurden Anomerengemische mit α/β -Verhältnissen von 1:1 für UDP-Glc **1**, UDP-Gal **57** und UDP-Fuc **58**, 5:3 für UDP-Xyl **59** und 3:1 für UDP-Ara **48** erreicht. Die Ausbeuten lagen zwischen 30 und 60%.^[51,52]

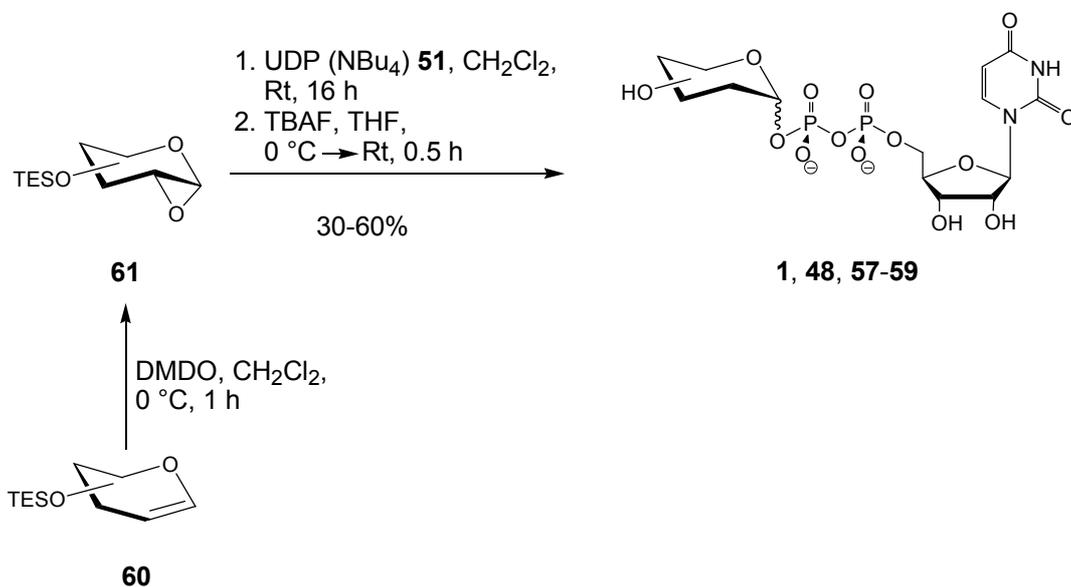


Abbildung 16: Glycosylierung von UDP mit 1,2-Anhydrozuckern

2.3 Chemische und enzymatische Synthesen von Nucleosiddiphosphat-Oligosacchariden

Die biologische Funktion der schon in den 60er Jahren isolierten NDP-Oligosaccharide ist weitgehend ungeklärt. Da die entsprechenden Di- und Trisaccharideinheiten in Oligosacchariden und deren Derivaten vorgefunden wurden, liegt die Vermutung nahe, dass solche NDP-Oligosaccharide als aktivierte Substrate der Oligosaccharyltransferasen dienen könnten. Der Zugang zu nucleotidaktivierten Oligosacchariden mit chemischen oder enzymatischen Methoden kann bei der

Aufklärung der Biosynthese sowie biologischer Funktionen solcher Glycokonjugaten helfen.

Elling et al. und *Vliegenthart et al.* berichteten von enzymatischen Synthesen der UDP-Lactose (UDP-Lac) **62** und UDP-LacNAc **8** mit Hilfe der aus Menschen- und Rindermilch isolierten β -1,4-Galactosyltransferase. Als Acceptor dieser Leloir-Glycosyltransferase dienten UDP- α -D-Glc **1** und UDP- α -D-GlcNAc **7**. Dabei wurde Galactose **124** von UDP-Gal **57** transferiert (Abb. 17).^[53]

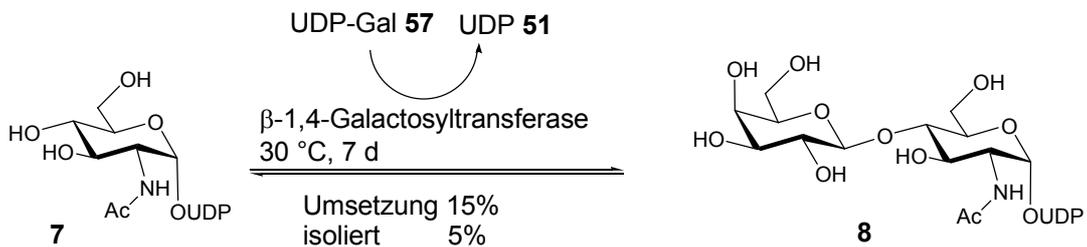


Abbildung 17: Enzymatische Synthese von UDP-LacNAc **8** mit β -1,4-Galactosyltransferase

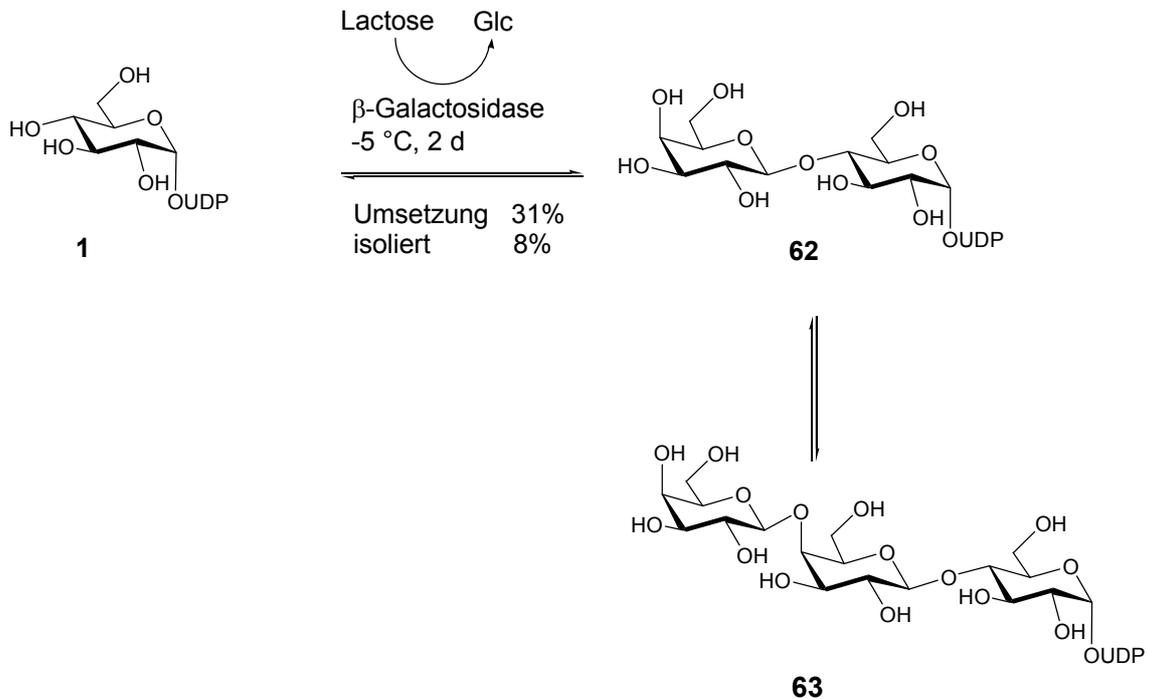


Abbildung 18: Enzymatische Synthese von UDP-LacNAc **62** mit β -Galactosidase

Des Weiteren setzten sie Nucleotidzucker als Acceptorsubstrate für β -Galactosidase in den Transglycosylierungsreaktionen mit Lactose als Donor ein (Abb. 18, S. 17).^[54]

Das Enzym β -Galactosidase wurde aus dem grampositiven Bakterium *Bacillus circulans* isoliert. Aufgrund von mangelnder Selektivität des Enzyms gegenüber Acceptorsubstraten werden nicht nur UDP-Glc **1** und UDP-GlcNAc **7** erkannt sondern auch neu gebildete UDP-Lac **62** und UDP-LacNAc **8**, was zu einer Bildung von UDP-Trisacchariden führt.

Die isolierten Ausbeuten in beiden oben beschriebenen Fällen lagen allerdings unter 10%. Desweiteren sind diese Methoden nur auf natürliche Substrate begrenzt, vorausgesetzt die benötigten Enzyme liegen vor.

Finney et al. synthetisierten UDP-Chitobiose **64** für die Aufklärung des Funktionsmechanismus der Chitin-Synthase. Diese ist eine für die Polymerisation der UDP-GlcNAc **7** unter Ausbildung von Chitin verantwortliche Glycosyltransferase. Die Darstellung erfolgte nach der mit Tetrazol **38** katalysierten Morpholidat-Methode. Dabei diente Chitobiose-1-phosphat **65** als nucleophiles Reagenz (Abb. 19).^[30]

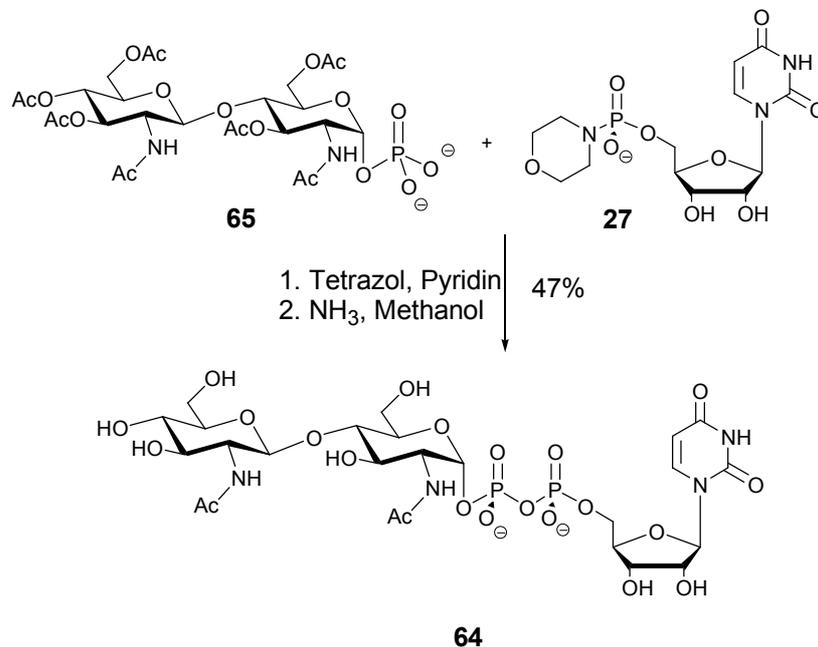


Abbildung 19: Synthese von UDP-Chitobiose **64** nach der Morpholidat-Methode

Takaku et al. berichteten von der Synthese der UDP-LacNAc **8** und ihres Regioisomers Gal(1 β →3)GlcNAc-UDP **66** durch Kondensation der entsprechenden

Disaccharidphosphate **67-68** und UMP-Imidazolidat **35** in Pyridin (Abb. 20). Beide Nucleotiddisaccharide **8** und **66** konnten als Ammoniumsalze mit einer Ausbeute von 77% isoliert werden.^[55]

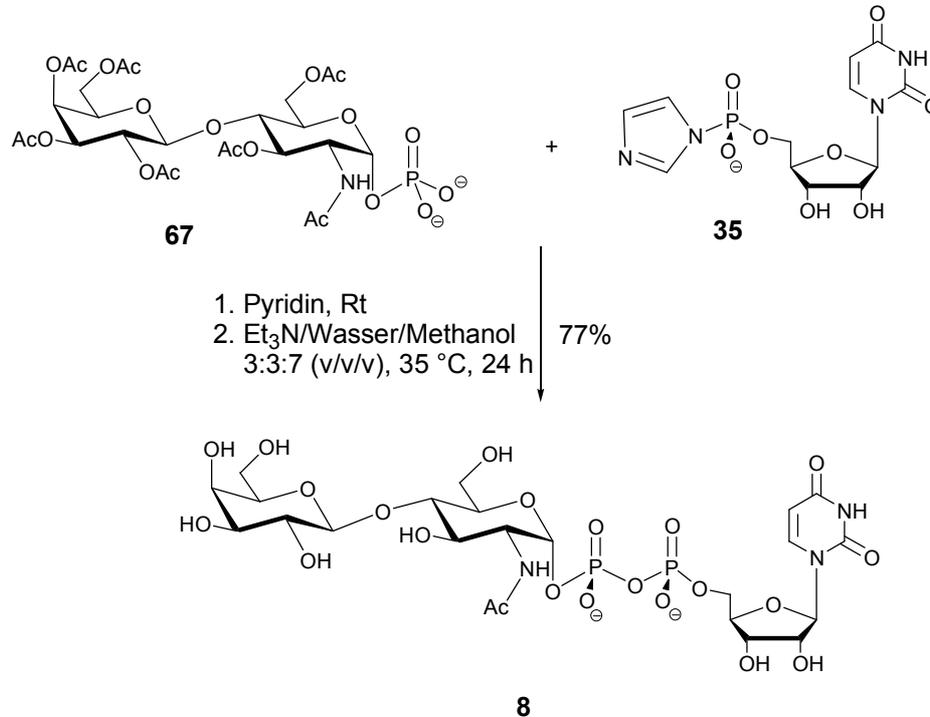
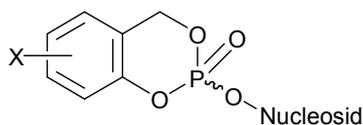


Abbildung 20: Synthese von UDP-LacNAc **8** aus dem UMP-Imidazolidat **35**

2.4 *cycloSal*-Nucleotide als aktivierte NMP

Einen neuen Weg zur Darstellung der Zuckernucleotide bietet das *cycloSal*-Konzept, das ursprünglich 1996 von *Meier et al.* als ein Prodrug-Konzept für biologisch aktive Nucleotide entwickelt wurde.^[56] In den meisten Fällen ist der erste Phosphorylierungsschritt von Nucleosidanaloga gehemmt. Daher wird versucht die Nucleosidmonophosphate direkt in die Zelle zu bringen.^[57] Um den zweifach negativ geladenen Nucleotidanaloga die Passage der hydrophoben Zellmembran zu ermöglichen, werden die negativen Ladungen maskiert. In Abbildung 21 (S. 20) ist eine allgemeine Struktur der *cycloSal*-Nucleosidmonophosphate **69** dargestellt.



69

Abbildung 21: Struktur der *cyclo*Saligenyl-Nucleotide **69**

Im Gegensatz zu anderen Pronucleotid-Systemen kommt das *cyclo*Sal-Konzept bei der Freisetzung der lipophilen Maske ohne eine enzymatisch katalysierte Aktivierung und ohne einen zweiten Aktivierungsschritt aus. Als Maske werden Salicylalkohol-Derivate verwendet, die mit einem Nucleosidmonophosphat cyclische Phosphatriester-Derivate ergeben. Der aromatische Ring der *cyclo*Saligenyl-Nucleosidmonophosphate (*cyclo*Sal-NMP) verleiht den Verbindungen ausreichende Lipophilie und ermöglicht somit einen passiven Transport durch die Zellmembran.^[58] Diese besondere Struktur der *cyclo*Sal-Verbindungen ermöglicht eine hochselektive hydrolytische Freisetzung des Nucleotids. Die Abspaltung erfolgt nach einem pH-abhängigen Kaskadenmechanismus, dem zwei Hydrolyseschritte zugrunde liegen (Abb. 22, S. 21). Da die Phenyl-, Benzyl- und Alkylphosphatester-Bindungen von unterschiedlicher Labilität sind, gelingt eine selektive chemische Hydrolyse.

Die phenylische Phosphatesterbindung stellt die labilste der drei Esterbindungen dar, so dass die Freisetzung des Nucleotids aus dem Phosphatriester **73** durch die selektive Spaltung dieser Bindung eingeleitet wird. Es resultiert ein mesomeriestabilisierter 2-Hydroxybenzylphosphatdiester **74**. Als Konsequenz der Spaltung wird der *ortho*-Substituent der benzylichen Phosphatesterbindung von einem sehr schwachen Donorsubstituenten (Phosphatestergruppe) in einen starken Donorsubstituenten (Hydroxylgruppe) überführt. Dieser Wechsel induziert nach einer intramolekularen Protonenübertragung die spontane Spaltung der benzylichen C-O-Bindung. Es wird das Nucleotid sowie, nach der Umsetzung mit Wasser, der Salicylalkohol **75** freigesetzt. Das *cyclo*Sal-Konzept konnte erfolgreich auf viele Nucleosidanaloga angewendet werden.^[59,60]

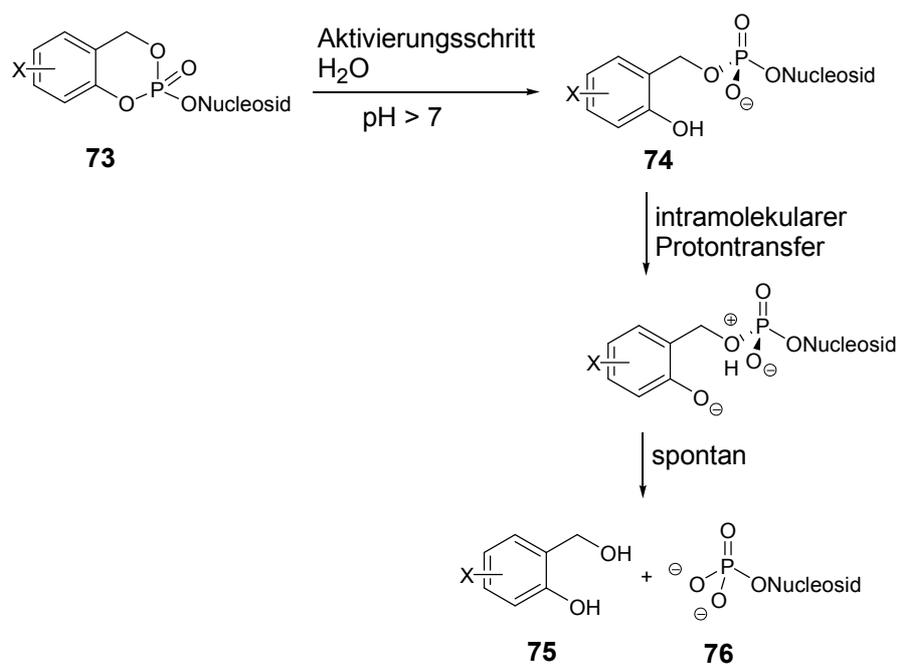


Abbildung 22: Hydrolyse von *cycloSal*-Nucleosidmonophosphateestern

Da die Freisetzung der Nucleotide durch einen nucleophilen Angriff am Phosphoratom stattfindet, konnten *cycloSal*-Verbindungen durch die Umsetzung mit verschiedenen Nucleophilen zur Darstellung von entsprechenden Nucleosidkonjugaten genutzt werden (Abb. 23, S. 22).^[61,62] Durch den nucleophilen Angriff der Mono- und Diphosphate in Form ihrer *tert*-Butylammoniumsalze konnten die entsprechenden natürlichen Nucleosiddi- bzw. -triphosphate sowie auch die NDP- und NTP-Analoga erfolgreich synthetisiert werden. Des Weiteren wurden ausgehend von *cycloSal*-Nucleotiden verschiedene Dinucleosid-5',5'-di- und -tetraphosphate mit Ausbeuten bis zu 60% synthetisiert. Die Reaktionen mit entsprechenden Glycosylphosphaten ergaben in guten Ausbeuten anomereneine NDP-Pyranosen. Auch die kinetisch kontrollierten Kupplungen mit den am anomeren Zentrum deprotonierten Glycosiden führten zu NMP- β -Glucose und -Galactose. Das entsprechende Mannose-Derivat konnte allerdings nur als Anomerengemisch dargestellt werden.^[63]

Kenntnisstand

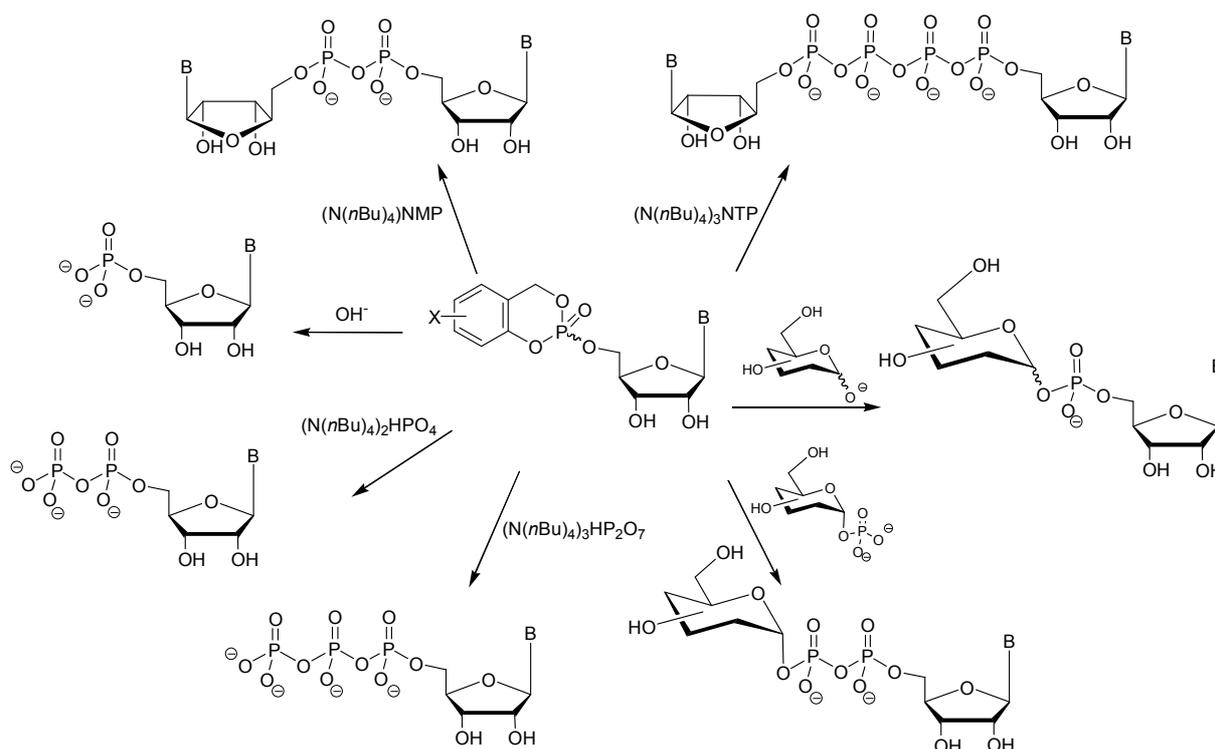


Abbildung 23: Synthetisches Potenzial von *cycloSal*-Nucleotiden

Die Hydrolysehalbwertszeiten der *cycloSal*-Nucleotide hängen stark von den Substituenten am aromatischen Ring ab. Die Ergebnisse der Hydrolysestudien von unterschiedlich substituierten *cycloSal*-d4TMP-Derivaten sind in Tabelle 1 (S. 23) dargestellt.^[64]

Donorsubstituenten am aromatischen Ring in *ortho*- und *para*-Stellung zur Phenylphosphatesterbindung stabilisieren und verlangsamen somit die Reaktionsgeschwindigkeit des ersten Schrittes der *cycloSal*-Ringöffnung. Im Fall der Pronucleotide werden die größeren Hydrolysehalbwertszeiten angestrebt, damit sie intakt an ihren spezifischen Wirkort im Körper gelangen können. Die Substituenten wie 3-Methyl, 5-Methyl, 3-*tert*-Butyl und 3,5-di-*tert*-Butyl stabilisieren die Bindung und vervielfachen die Hydrolysehalbwertszeit im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung (*cycloSal*-d4TMP).

Die in *ortho*- und *para*-Stellung zur phenylischen Phosphatesterbindung acceptorsubstituierten *cycloSal*-Derivate weisen in allen Puffergemischen viel niedrigere Hydrolysehalbwertszeiten auf, wobei eine Abnahme der Halbwertszeiten mit steigender Acceptorstärke beobachtet wurde. Die Acceptorsubstituenten wie zum Beispiel die Chlor- oder die Nitro-Gruppe neigen nach der Öffnung des *cycloSal*-

Ringes zur Stabilisierung des entstehenden Phenolations, weswegen die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht wird.

Tabelle 1: Hydrolyseverhalten verschieden substituierter *cycloSal*-d4TMPs in unterschiedlichen Puffersystemen bei 37 °C

<i>cycloSal</i> - Substituent X	TRIS-Puffer pH 6.9, 30 mM $t_{1/2}$ [h]	Phosphat-Puffer pH 7.3, 30 mM $t_{1/2}$ [h]	Borat-Puffer pH 8.9, 30 mM $t_{1/2}$ [h]
5-NO ₂	4.1	0.15	0.06
5-Cl	6.4	0.7	0.3
3-OMe	9.5	1.4	0.4
H	24.5	4.5	1.1
5-Me	28.3	8.0	1.3
3-Me	68.5	10.2	1.5
3- <i>t</i> Bu	n.d.	96.0	n.d.
3,5- <i>t</i> Bu	n.d.	73.0	n.d.

S. Wendicke konnte erfolgreich *cycloSal*-aktivierte Nucleosidmonophosphate mit verschiedenen Glycosyl-1-phosphaten zu den entsprechenden NDP-Zuckern umsetzen (Abb. 24, S. 24).^[65] Auf diesem Syntheseweg konnte sie verschiedene 2'-Desoxythymidin- und 2'-Desoxycytidindiphosphatglycoside erfolgreich herstellen. Sie optimierte in ihren Arbeiten die Synthese der Zuckernucleotide, indem sie Einflüsse des Lösungsmittels und der Temperatur auf den Reaktionsverlauf untersuchte. Es wurde festgestellt, dass die Erhöhung der Reaktionstemperatur sowie der Reaktionszeit bei unreaktiveren *cycloSal*-Triestern, wie z. B. 5''-Chlor-*cycloSal*-NMP, nötig war. Die Untersuchungen zur Lösungsmittelabhängigkeit zeigten, dass Pyridin eine Nebenreaktion mit dem Phosphattriester eingeht und zur Bildung eines unerwünschten Phosphatdiesters führt. Außerdem wurde die Isolierung durch Pyridin als Gegenion erschwert. Die Umsetzung in DMF lieferte dagegen zum größten Teil die gewünschten Produkte. Des Weiteren wurde die Abhängigkeit der Ausbeuten von der Lipophilie des Gegenions untersucht, wobei *tert*-Butylammonium, Trioctylammonium und Triethylammonium getestet wurden. Da allerdings kein Einfluss des Gegenions auf die Ausbeute festgestellt werden konnte,

wurden die NDP-Zucker weiterhin als Triethylammoniumsalze synthetisiert. Zur Isolierung der Zuckernucleotide wurden chromatographische Methoden angewendet, wobei Biogel, Sephadex[®] sowie RP-18-Kieselgel als stationäre Phasen dienten. Die Isolierung der stark polaren Produkte gelang an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent. Die Elektrophilie des Phosphoratoms im *cycloSal*-Phosphattriester wurde durch Einführung verschiedener Acceptorsubstituenten beeinflusst. Die Reaktionen mit 5''-Chlor-substituierten *cycloSal*-Nucleosidmonophosphaten litten selbst nach mehreren Tagen an einer unvollständigen Umsetzung. Die Umsetzungen von *cycloSal*-Phosphattriestern, die in der 5-Position der *cycloSal*-Maske eine stark elektronenziehende Nitrogruppe tragen, führten zu höheren Ausbeuten von 45 bis 50%. Weiter konnte durch die Einführung dieses starken Acceptorsubstituenten die Reaktionszeit auf wenige Stunden reduziert werden.

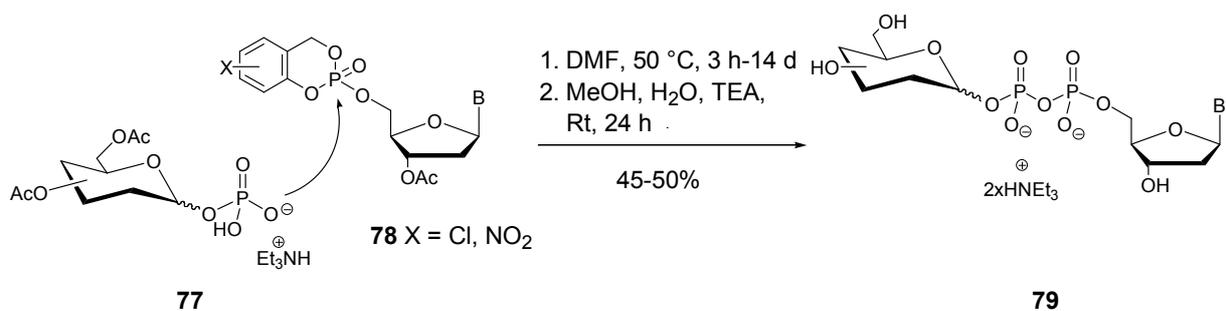


Abbildung 24: Syntheseroute zur Darstellung von NDP-Zuckern mit Hilfe der *cycloSal*-aktivierten Nucleosidmonophosphate

Einerseits erwiesen sich die 5''-Nitro-substituierten Verbindungen im Vergleich zu den donorsubstituierten *cycloSal*-Phosphattriestern als hoch labil, andererseits eignen sich die acceptorsubstituierten *cycloSal*-Nucleotide auf Grund ihrer Reaktivität als Phosphatdonatoren. Es ist daher zu erwarten, dass Verbindungen mit Acceptorsubstituenten, die (-)I- und (-)M-Effekte besitzen, sich ebenfalls ähnlich gegenüber Nucleophilen verhalten. Zwei Vertreter solcher (-)I- und (-)M-Substituenten sind die Cyano- bzw. die Methylsulfonylgruppe. Aus diesen Gründen ist es von großem Interesse *cycloSal*-Nucleotide mit diesen Gruppen an der *ortho*-Position zu der Phenylphosphatesterbindung darzustellen und diese aktivierten Phosphatdonatoren hinsichtlich ihres Potentials in der Synthese zu testen.

Die *cycloSal*-Methode stellt eine attraktive Alternative zu den existierenden und in Kapiteln 2.1-2.3 beschriebenen Synthesen zur Darstellung der Zuckernucleotide dar. So können die enzymatischen Methoden nur zur Darstellung der natürlichen NDP-Zucker herangezogen werden, wobei die entsprechenden Enzyme zugänglich sein sollten.^[20-25] Die chemischen Synthesen mit Nucleosiddiphosphaten und aktivierten Glycosiden liefern Zuckernucleotide als Anomerengemische.^[45,48-50] Lediglich in wenigen Fällen konnte man den Nachbargruppeneffekt der Schutzgruppen ausnutzen um zu den anomerenreinen Produkten zu gelangen.^[47] Ein weiterer Nachteil solcher Synthesen sind oft niedrige Ausbeuten. Im Gegensatz dazu liefern die Reaktionen der Glycosidphosphate und aktivierter Nucleotide anomerenreine NDP-Zucker. Allerdings dauern die Reaktionen oftmals mehrere Tage und mit niedriger Effizienz wie z. B. bei der Morpholidat-Kupplung.^[28,29] Bei der Aktivierung der Nucleotide mit Imidazolen ergibt sich bei den Kupplungen mit Zuckerphosphaten eine kürzere Reaktionszeit und höhere Ausbeuten. Bei diesen Reaktionen entstehen neben den gewünschten Produkten noch Dinucleosiddiphosphate.^[36,37,40] Jedoch verbirgt sich manchmal hinter erfolgreicher Kupplung eine aufwendige Synthese der Reaktionspartner, wie z. B. die neunstufige Synthese eines Phosphoramidates von Thymidin **42** in der von *Borch et al.* entwickelten Methode^[43] oder eine zehnstufige Synthese der Zuckerphosphate für die Kupplungen der reaktiven Phosphoramidite nach *van der Marel et al.*^[44] Die *cycloSal*-Nucleotide stellen dagegen schnell-synthetisierbare reaktive Phosphatester dar, die sich zur schnellen Zuckernucleotidsynthese eignen. Da allerdings die Ausbeuten noch nicht sehr hoch sind, kann die Methode durchaus noch weiter optimiert werden.

3. AUFGABENSTELLUNG

Aufgrund der biologischen Wichtigkeit der Nucleosiddiphosphatglycoside als Substrate der Leloir-Glycosyltransferasen, deren Funktion und mögliches medizinisches Potential noch nicht vollständig untersucht worden sind, besteht ein erhöhter Bedarf an NDP-Zuckern. Der Zugang zu den natürlichen Zuckernucleotiden sowie deren Strukturanaloga würde mit Hilfe einer effizienten chemischen Synthese signifikant verbessert.

Die in unserem Arbeitskreis entwickelte Methode, basierend auf den *cycloSal*-aktivierten Nucleosidmonophosphaten, konnte erfolgreich für die Darstellung der CDP-, dTDP- und dGDP-Pyranosen^[65-66] sowie vieler weiterer phosphatverbrückter Nucleosid-Biokonjugate^[63] angewendet werden. Da allerdings die erzielten Ausbeuten für NDP-Zucker noch nicht zufriedenstellend waren, sollte die Kupplung hinsichtlich der Reaktionsbedingungen optimiert werden. An erster Stelle war das Ziel neben hochreaktiven 5''-Nitro-substituierten *cycloSal*-Verbindungen auch 5''-Methylsulfonyl- und 5''-Cyano-substituierte *cycloSal*-Phosphattriester zu synthetisieren, die eine mit 5''-Nitro-Verbindungen vergleichbare Reaktivität aufweisen sollten. Im Folgenden sollten diese Verbindungen durch Umsetzung mit verschiedenen Glycopyranose-1-phosphaten die neue NDP-Zucker liefern (Abb. 25).

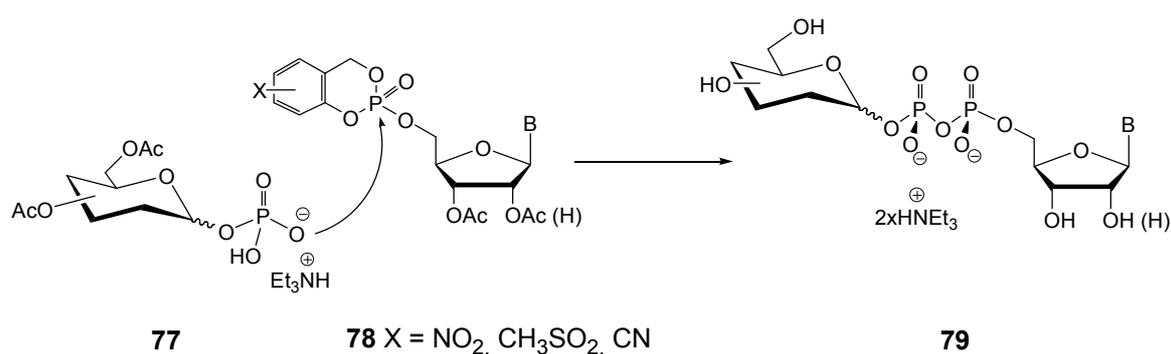


Abbildung 25: Synthese unterschiedlicher NDP-Glycopyranosen mit Hilfe der *cycloSal*-Phosphattriester

Neben den NDP-Pyranosen wurden in verschiedenen Organismen auch NDP-Oligosaccharide entdeckt. Die Funktion dieser Verbindungen und in ihrer Biosynthese beteiligten Enzyme sind jedoch nicht vollständig erforscht. Aus diesem Grund sollte die Methode zur Darstellung von NDP-Pyranosen auch auf die Synthese der NDP-Oligosacchariden ausgeweitet werden.

Die ersten Versuche zur Synthese von NDP-Disacchariden, wie UDP-Lactose **62** und UDP-Maltose **80** nach der *cycloSal*-Methode waren erfolgreich.^[67] Im Rahmen dieser Arbeit sollte das aus menschlicher Milch und Kolostrum isolierte UDP-Trisaccharid (UDP-(1 α)GlcNAc-(1 β →4)Gal-(2 α →6)NeuAc) **82** synthetisiert werden (Abb. 26). Dabei bestand der Schwerpunkt in der Darstellung des anomerenreinen Trisaccharidphosphates **81**.

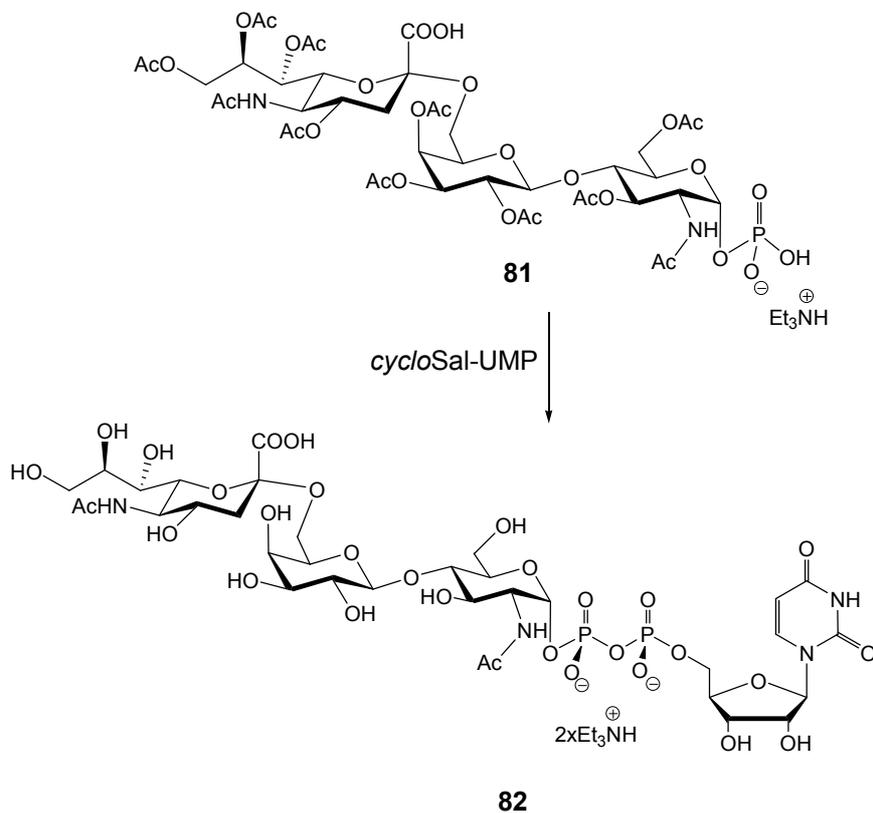


Abbildung 26: Synthese von UDP-(1 α)GlcNAc-(1 β →4)Gal-(2 α →6)NeuAc **82**

4. RESULTATE UND DISKUSSION

4.1 Synthesestrategie

Die Darstellung diverser NDP-Glycoside **79** erfolgte in einer konvergenten Synthese von Glycosidphosphaten **83** und verschiedener acceptorsubstituierter *cyclo*Sal-Nucleotide **84** (Abb. 27).

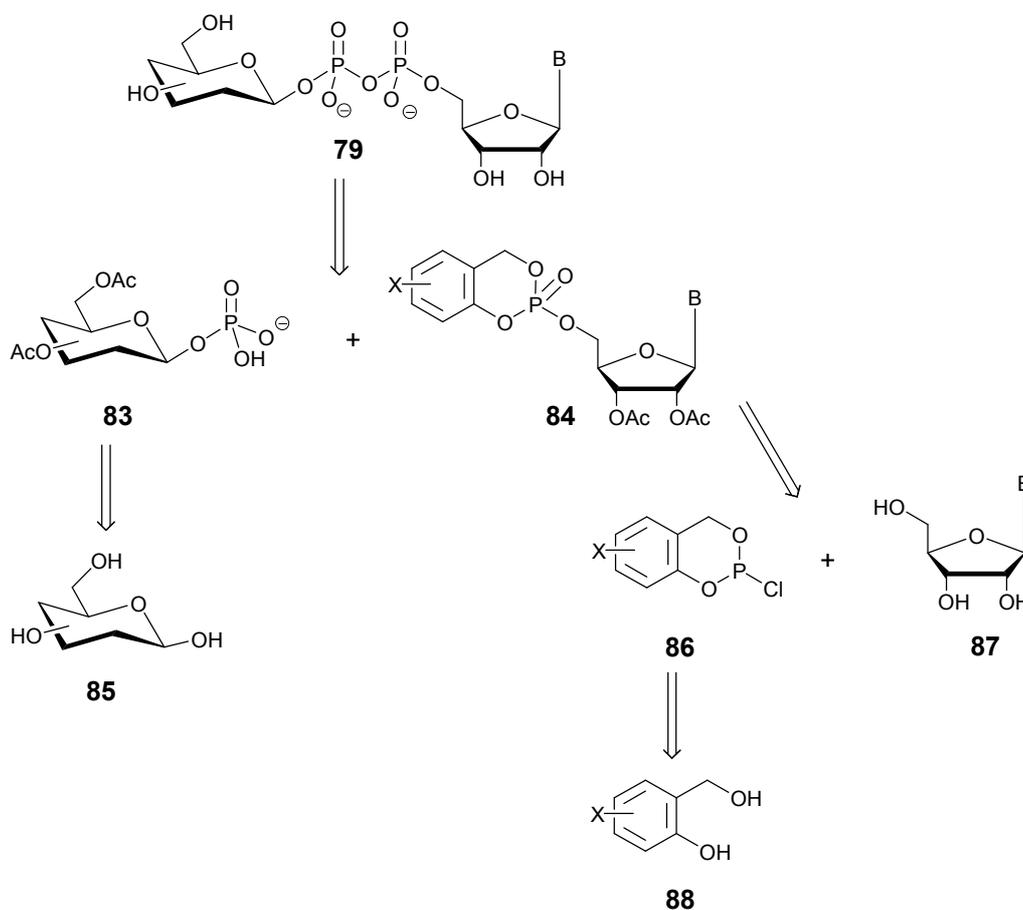


Abbildung 27: Konvergente Retrosynthesestrategie zur Darstellung der NDP-Glycoside **79**

Die Zuckerphosphate **83** wurden als reine Anomere ausgehend von Pyranosen **85** synthetisiert. Dabei wurden sie zur optimalen Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, sowie zur Vermeidung möglicher Nebenreaktionen, mit Acetylschutzgruppen versehen.

Die Synthese der *cycloSal*-Nucleotide **83** stellt wiederum eine konvergente Methode dar. Zum einen werden wie für die Zucker, acetylierte Nucleoside **87** gebraucht und zum anderen müssen die reaktiven Chlorphosphite **86** ausgehend von verschiedenen Salicylalkoholen **88** synthetisiert werden.

Wie bereits im Kenntnisstand erwähnt, zeigten die ersten Ansätze zur Darstellung von NDP-Pyranosen mit Chlor- und Brom-substituierten *cycloSal*-Phosphatriestern eine unzureichende Effizienz. Diese Kupplungen zeichneten sich durch sehr lange Reaktionszeiten, unvollständige Umsetzungen sowie Bildung zahlreicher Nebenprodukte aus. Eine wesentlich höhere Reaktivität konnte durch Einsatz der 5''-Nitro-*cycloSal*-Nucleotide erreicht werden. Hier konnten die Reaktionszeiten auf wenige Stunden reduziert und die Ausbeuten bis auf 60% gesteigert werden. Demzufolge sollten die Kupplungen mit acceptorsubstituierten *cycloSal*-Phosphatriestern erfolgen. Wie z. B. Cyano- und Methylsulfonyl-Substituenten, die einen (-)I- und einen (-)M-Effekt aufweisen. So bestand eine Hauptaufgabe dieser Arbeit in der Darstellung dieser Synthesebausteine. Die eigentliche Herausforderung, die Optimierung der Methode zur Darstellung von NDP-Zuckern, wird in Kapitel 4.4 beschrieben.

4.2 Darstellung von *cycloSal*-Nucleosidmonophosphaten

Die Synthese der reaktiven *cycloSal*-Phosphatriester erfolgte nach einer in der Arbeitsgruppe etablierten Standardmethode, die die hohe Reaktivität der Phosphor(III)-Verbindungen ausnutzt. Die Umsetzung beinhaltet zwei Schritte, zunächst werden das reaktive cyclische Chlorphosphit **86** und das geschützte Nucleosid **87** zu einem Phosphitriester geknüpft und anschließend zu der entsprechenden Phosphor(V)-Verbindung **84** oxidiert.^[68]

Die in der Arbeitsgruppe entwickelte Methode zur Darstellung der donorsubstituierten *cycloSal*-Nucleotide (Abb. 28, S. 30) erwies sich für die Synthese mit starken Acceptoren substituierten Phosphatriestern als unzuverlässig. So konnten Nitro-substituierte *cycloSal*-Nucleotide in nur 5 bis 20% Ausbeute synthetisiert werden.^[65] Zudem stellte sich diese Synthese als nicht zuverlässig reproduzierbar heraus. Die Synthese eines Methylsulfonyl-substituierten Phosphatriesters nach dieser Methode war ebenfalls nicht erfolgreich.^[66] Erst der Austausch des Oxidationsmittels gegen Oxone[®], sowie eine verbesserte Aufarbeitung des Rohproduktes erlaubte die

Synthese des Nitro-substituierten *cycloSal*-Triesters in zufriedenstellender Ausbeute und einem angemessenen Reinheitsgrad.^[63] Die Grundbausteine dieser Methode sind geschützte Nucleoside und acceptorsubstituierte Salicylalkohole, deren Synthesen in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden.

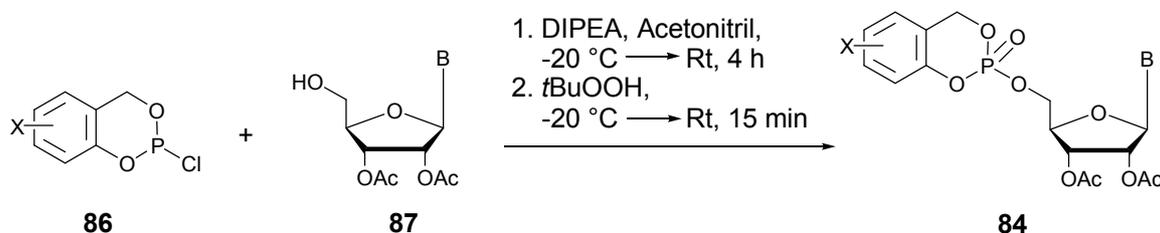


Abbildung 28: Phosphor(III)-Methode zur Synthese der donorsubstituierten *cycloSal*-Nucleosidmonophosphate **84**

4.2.1 Darstellung der Salicylalkohole

Die Synthese des 5-Nitrosalicylalkohols **89** erfolgte durch Reduktion des entsprechenden Salicylaldehyd **90** bei milden Bedingungen, so dass die Nitro-Gruppe toleriert wird.^[69] Die Reduktion wurde mit Natriumborhydrid in Ethanol durchgeführt und das Produkt in hoher Ausbeute von 88% nach Umkristallisation aus Wasser erhalten.

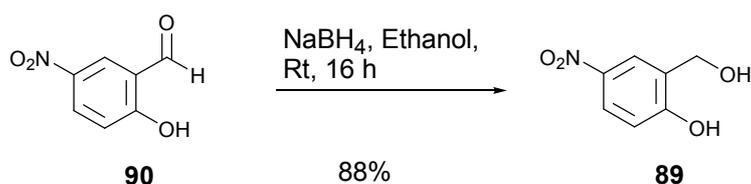


Abbildung 29: Synthese des 5-Nitrosalicylalkohols **89** durch Reduktion von 5-Nitrosalicylaldehyd **90**

Aufgrund der nicht käuflich vorhandenen Methylsulfonyl- und Cyano-substituierten Derivate der Salicylsäure bzw. des Salicylaldehyds, die eine Reduktion zu den gewünschten Produkten erlauben würden, wurde auf die Hydroxymethylierung der entsprechend substituierten Phenole ausgewichen.^[70] Dabei wurden die Phenole

zunächst in Dioxaborine überführt und anschließend mit Wasserstoffperoxid zu Salicylalkoholen oxidiert.

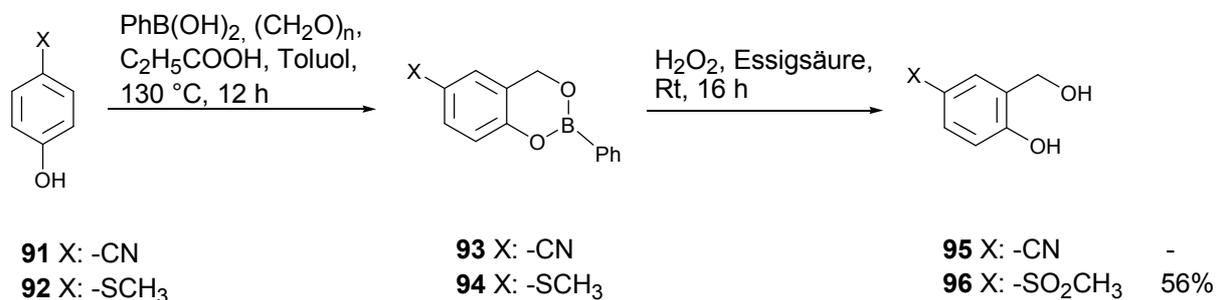


Abbildung 30: Hydroxymethylierung der *para*-substituierten Phenole **91-92**

4-Cyanphenol **91** und 4-Methylmercaptophenol **92** wurden mit Boronsäure und *para*-Formaldehyd in Toluol bei 130 °C erhitzt, wobei das bei der Reaktion entstehende Wasser durch einen Wasserabscheider entfernt wurde. Die Entstehung von Dioxaborin **94** konnte durch ¹H-NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Nach dem Entfernen des nicht umgesetzten *para*-Formaldehyds wurde das Dioxaborin **94** mit Wasserstoffperoxid in Essigsäure bei 45 °C über Nacht hydrolysiert. Durch die gewählten Bedingungen wurde die gleichzeitige Oxidation der Methylsulfidgruppe in eine Methylsulfonylgruppe erreicht.^[71] Der 5-Methylsulfonylsalicylalkohol **96** wurde nach dieser Methode mit einer Ausbeute von 56% über zwei Stufen synthetisiert. Im Gegensatz dazu schlug bei der Darstellung des Cyansalicylalkohols **95** schon die Synthese des Dioxaborins **93** fehl. Vermutlich wirkt der stark elektronenziehende Charakter der Cyangruppe zu desaktivierend auf das Phenol und verhindert somit eine elektrophile Substitution am Aromaten.

Alternativ wurde versucht, 4-Cyanphenol **95** durch *ortho*-Formylierung in 5-Cyan-Salicylaldehyd **97** zu überführen, um anschließend zum 5-Cyansalicylalkohol **95** zu reduzieren (Abb. 31, S. 32). Für diesen Syntheseweg standen zwei Methoden zur Auswahl. Zum einen mit Urotropin nach *Suzuki et al.*^[72], zum anderen mit Paraformaldehyd nach *Skattebøl et al.*^[73]. Zur Reduktion sollten anschließend Lithiumaluminiumhydrid sowie Natriumborhydrid getestet werden.

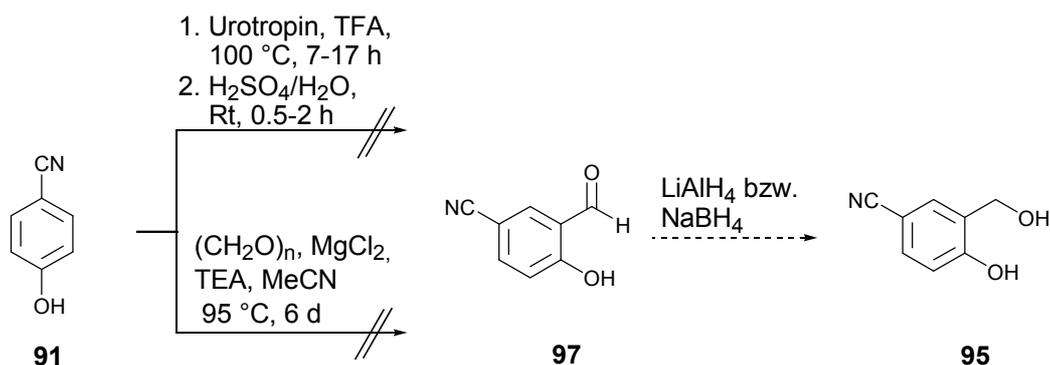


Abbildung 31: *ortho*-Formylierung von Cyanphenol **91** mit anschließender Reduktion

Die *ortho*-Formylierung nach *Suzuki* wurde mit Urotropin durchgeführt, das durch seine Zersetzung im sauren Milieu zu Formaldehyd und Ammonium-Ionen als Formyläquivalent dient. In einem ersten Ansatz gelang es, das Salicylaldehyd-Derivat **97** mit einer Rohausbeute von 22% darzustellen. Bei der nachfolgenden Reinigung konnte allerdings das Nebenprodukt nicht entfernt werden. Da die *ortho*-Formylierung als Testansatz durchgeführt wurde, reichte die Menge des Aldehyds **97** nicht für die anschließende Reduktion aus. Leider erwies sich diese Art der *ortho*-Formylierung für 4-Cyanphenol **91** in etlichen Versuchen als nicht reproduzierbar.

Bei der Variante nach *Skattebøl* wurden 3 Äquivalente *para*-Formaldehyd zu dem Phenol **91** gegeben, da die Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH; 9:1) nach 44 Stunden keine detektierbare Umsetzung zeigte, wurden erneut 7 Äquivalente *para*-Formaldehyd zugegeben. Dieser Zusatz wurde wiederholt, da nach zwei weiteren Tagen die dünnschichtchromatographische Kontrolle dasselbe Ergebnis zeigte. Nach weiteren zwei Tagen ohne Veränderung wurde die Reaktion abgebrochen und auf eine Aufarbeitung verzichtet.

Des Weiteren wurde versucht, die Darstellung des 5-Cyansalicylalkohols **95** nach Rosemund-von-Braun-Reaktion durchzuführen.^[74] Die Rosemund-von-Braun-Reaktion findet mit einem leichten Überschuss an Kupfer(I)cyanid in hochsiedenden Lösungsmitteln wie Pyridin, *N,N*-Dimethylformamid, *N*-Methyl-2-pyrrolidin oder Hexamethylphosphorsäuretriamid statt. Bei dieser Reaktion wird das Bromatom einer aromatischen Verbindung durch eine Nitrilgruppe ausgetauscht, wobei der Mechanismus einer radikalischen Sandmeyer-Reaktion gleicht. Das Kupfer(I)cyanid ist gleichzeitig der Katalysator dieser Reaktion.^[75]

In den Vorversuchen von S. Warnecke konnte keine Umsetzung von 5-Bromsalicylaldehyd **98** beobachtet werden.^[76] Aus diesem Grund wurde auf 5-Bromsalicylalkohol **99** als Ausgangsverbindung ausgewichen, da die Alkoholfunktion den aromatischen Ring stärker aktiviert. Die Darstellung dieses Salicylalkohols erfolgte problemlos durch die Reduktion von 5-Bromsalicylaldehyd **98** mit 2 Äquivalenten Lithiumaluminiumhydrid in THF.^[77] Der anschließende Austausch von Brom durch eine Nitrilgruppe mittels einer Rosemund-von-Braun-Reaktion schlug allerdings fehl (Abb. 32).

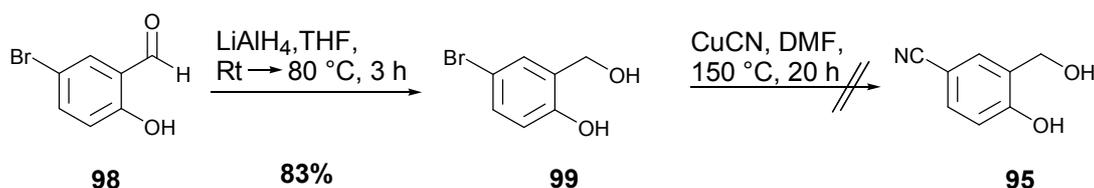


Abbildung 32: Reduktion des Salicylaldehyds **98** mit anschließender Rosemund-von-Braun-Reaktion

Da die Darstellung von 5-Cyansalicylalkohol **95** weder durch die Hydroxymethylierung noch durch eine *ortho*-Formylierung, noch durch Substitution am Aromaten zu einem Erfolg führte, wurde auf weitere Darstellungsversuche verzichtet. Die vergleichsweise zuverlässig und mit sehr guten Ausbeuten darstellbaren 5-Nitro- und 5-Methylsulfonyl-substituierten Salicylalkohole wurden für die Synthese von *cyclo*Sal-Phosphatriestern eingesetzt.

4.2.2 Darstellung der Saligenylchlorphosphite

Die Saligenylchlorphosphite werden nach einer in der Arbeitsgruppe etablierten Methode synthetisiert.^[56] Dabei reagieren bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ die in absolutem Diethylether gelösten Salicylalkohole mit Phosphor(III)chlorid. Die tiefe Temperatur sowie die richtige Verdünnung erlauben einen intramolekularen Ringschluss. Der dabei entstehende Chlorwasserstoff wird durch das ebenfalls in absolutem Diethylether gelöste Pyridin abgefangen. Mit anschließender Schlenkfiltration wird Pyridiniumchlorid von den resultierenden cyclischen Saligenylchlorphosphiten abgetrennt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter verminderten Druck bleiben

die Saligenylchlorphosphite als Feststoffe zurück. Aufgrund der hohen Feuchtigkeitsempfindlichkeit und Reaktivität wird bei den Chlorphosphiten auf eine Reinigung verzichtet. Sie werden in Form von Rohprodukten als phosphitylierende Agenzien für die nachfolgende Darstellung von *cyclo*Sal-Nucleotiden eingesetzt. Über den erfolgreichen Verlauf der Reaktion wird mit Hilfe der ³¹P-NMR-Spektroskopie entschieden, wobei für die Produkte typische Signale zwischen 150-140 ppm erwartet werden. Die ¹H-NMR-Spektren zeigen den Anteil an dem eventuell noch vorhandenen Pyridiniumchlorid an und geben Aufschluss über den Anteil des Saligenylchlorphosphites in dem Rohgemisch.

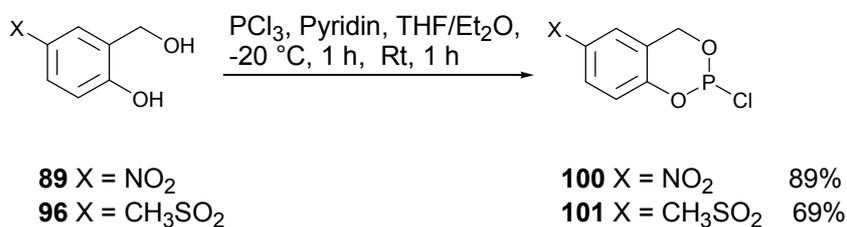


Abbildung 33: Synthese der Saligenylchlorphosphite **100-101**

Mit der oben beschriebenen Methode konnten die Saligenylchlorphosphite **100** und **101** in sehr guten Ausbeuten von 69 bis 89% dargestellt werden.

4.2.3 Darstellung der geschützten Nucleoside

Aufgrund der hohen Reaktivität der Saligenylchlorphosphite kann es in den Reaktionen mit ungeschützten Nucleosiden zu unerwünschten Mehrfachphosphitylierungen kommen.^[78] Auch die Löslichkeit der Nucleoside, die durch die Schutzgruppen der Hydroxy- und Aminogruppen gesteigert wird, spielt eine wichtige Rolle in den nachfolgenden Reaktionen zur Darstellung der Zielverbindungen. Als Schutzgruppe wurden Acetylgruppen verwendet, da diese zum einen eine ausreichende Stabilität während der folgenden Syntheseschritte aufweist und zum anderen einfach und unter milden Bedingungen von der Zielverbindung abgespalten werden kann.

Die Darstellung der geschützten Nucleoside **111-113** wurde auf einer bereits erprobten dreistufigen Syntheseroute, ausgehend von Uridin **102**, Guanosin **103** und 2'-Desoxyguanosin **104** angestrebt.^[79]

Die Darstellung des geschützten Guanosins **114** (Abb. 34) in einer vierstufigen Synthese wurde bereits beschrieben, allerdings konnte mit der Verbindung **114** kein *cycloSal*-Triester synthetisiert werden. Da die versuchte Darstellung nach dem für donorsubstituierte *cycloSal*-Nucleotide entwickelten Syntheseprotokoll erfolgte.^[66]

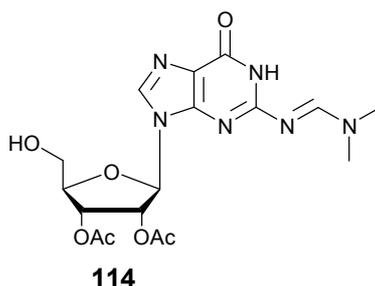


Abbildung 34: 2',3'-O-Diacetyl-2-*N*-((dimethylamino)methylenyl)guanosin **114**

Auch die erneuten Versuche zur Darstellung der Verbindung **114** nach dieser bereits beschriebenen Methode scheiterten, wobei eine Zersetzung des Eduktes während der Acetylierungsreaktionen beobachtet wurde. Deshalb wurde eine neue dreistufige Syntheseroute angestrebt (Abb. 35, S. 36).

Im ersten Schritt wurden die 5'-Hydroxypositionen der Nucleoside **111-113** selektiv als *tert*-Butyldimethylsilylether geschützt. Dabei gestaltete sich die Silylierung von Uridin **102** in DMF und 2'-Desoxyguanosin **104** in Pyridin sowie deren Aufarbeitung als unproblematisch. Im Gegensatz dazu entstand bei der Silylierung des Guanosins **103** neben 5'-*O*-TBDMS-Guanosin **106** auch 3',5'-geschütztes Guanosin. Der Anteil der doppeltgeschützten Verbindung konnte durch Erhitzen des Guanosins **103** in DMF auf 150 °C und langsame Abkühlung des Gemisches während der Reaktion auf Raumtemperatur verringert werden. Auch die anschließende chromatographische Reinigung wurde durch identische R_f -Werte des Produktes **106** und Guanosins **103** extrem erschwert.

Resultate und Diskussion

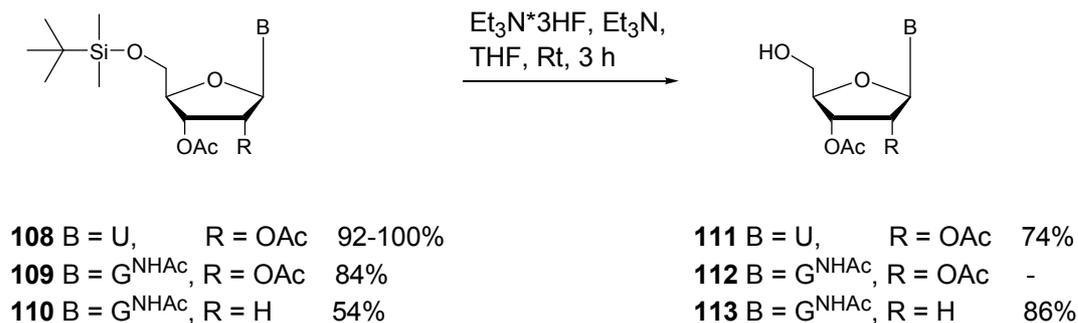
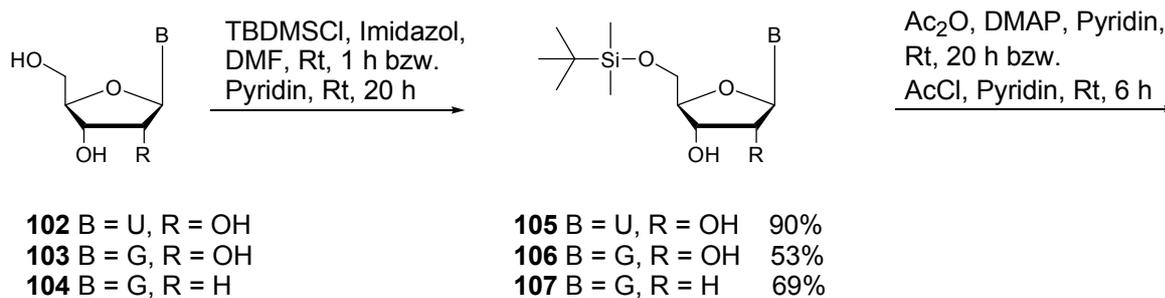


Abbildung 35: Synthese der geschützten Nucleoside **111-113**

Zur anschließenden Veresterungen der verbleibenden reaktiven Positionen bieten sich zwei Wege an. Die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin lieferte nach 20 h Reaktion und anschließender chromatographischer Reinigung die gewünschten Produkte **108-110** mit sehr guten Ausbeuten bis zu 92%. Aufgrund der niedrigen Reaktivität der exocyclischen Aminogruppe benötigte die Umsetzung der Guanosinderivate **106** und **107** 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin als zusätzlichen Aktivator. Die Acetylierung mit Acetylchlorid lieferte nur für die Verbindung **108** eine quantitative Ausbeute. Im Fall der Guanosinderivate **106** und **107** wurde die vollständige Zersetzung der Nucleoside beobachtet.

Die Abspaltung der Silylschutzgruppen erfolgte mit Triethylamintrihydrofluorid in THF. Um eine zusätzliche Abspaltung der Acetylschutzgruppen zu verhindern, wurde das Reaktionsgemisch mit Triethylamin gepuffert. So konnten die Verbindungen **111** und **113** mit sehr guten Ausbeuten erhalten werden. Die Verbindung **112** konnte dagegen auf diesem Weg auch nach mehrmaligen Versuchen nicht synthetisiert werden. Eine Entschützung mit Tetrabutylammoniumfluorid konnte in diesem Fall nicht angewendet werden, da in einer Testreaktion trotz Pufferung mit Essigsäure eine Abspaltung der Acetylschutzgruppen stattfand.

Das Guanosinderivat **112** mit einer freien 5'-Hydroxyfunktion konnte mit Hilfe einer chemoenzymatischen Methode synthetisiert werden (Abb. 36).

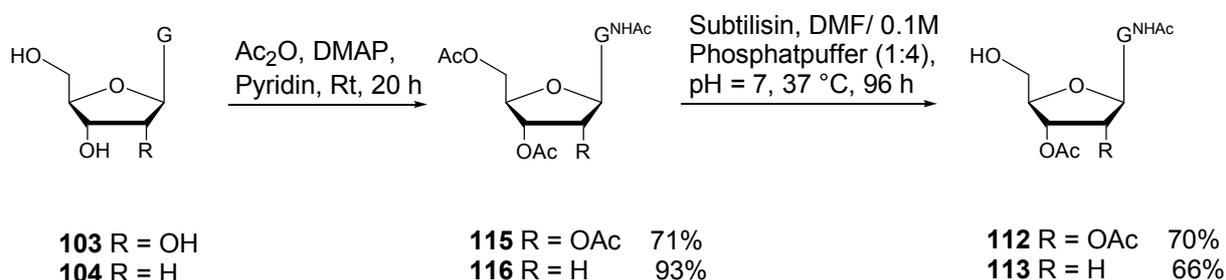


Abbildung 36: Chemo-enzymatische Deacetylierung

Zunächst wurde Guanosin **103** mit Essigsäureanhydrid in Anwesenheit des nucleophilen Katalysators DMAP mit einer Ausbeute von 71% peracetyliert. Anschließend konnte die 5'-Position des peracetylierten-Guanosins **115** selektiv mit Hilfe der Protease Subtilisin, isoliert aus Bakterien *Bacillus licheniformis*, entschützt werden.^[80] So wurde *N*²-Acetyl-2',3'-*O*-acetylguanosenin **112** mit einer guten Ausbeute von 70% erhalten. Auch *N*²-Acetyl-3'-*O*-acetyl-2'-desoxyguanosenin **113** konnte auf diesem chemoenzymatischen Weg mit einer Ausbeute von 61% über zwei Stufen erfolgreich dargestellt werden.

Für eine regioselektive Deacetylierung der primären Hydroxygruppe peracetylierter Hexapyranosen wurde eine Lipase aus *Candida rugosa* (CRL) beschrieben.^[81,82] *J.-W. Chern et al.* übertrug erfolgreich diese Art der Deacetylierung durch CRL auf peracetylierte Ribofuranosen.^[83] Da Nucleoside Derivate der Ribofuranosen darstellen, wurde versucht die primäre Hydroxygruppe des peracetylierten Guanosins **115** auf diesem Weg zu deacetylieren. Die Reaktionsbedingungen weichen von denen für die oben beschriebene enzymatische Deacetylierung mit Subtilisin nicht ab. Allerdings erwies sich die Lipase in diesem Fall als inert, wahrscheinlich auf Grund des zu großen Unterschiedes der Ausgangsverbindungen, bedingt durch die Nucleobase.

Alternativ wurde versucht die Acetylschutzgruppe selektiv an der 5'-Position chemisch mit einer 1%-igen Iodlösung in Methanol bei 67 °C abzuspalten (Abb. 37, S. 38).

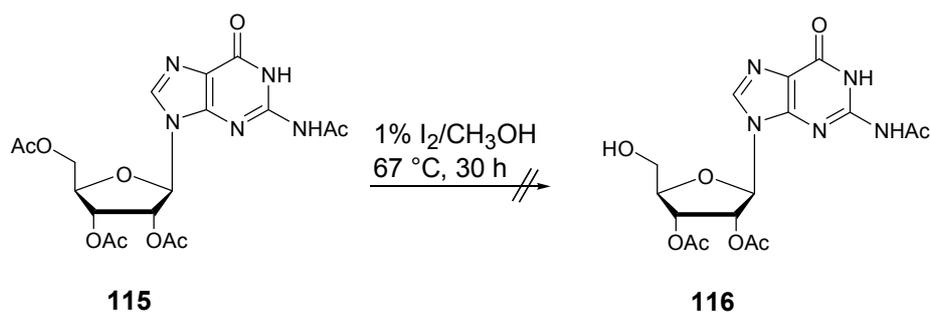


Abbildung 37: Chemische Deacetylierung mit einer Iod-Methanol-Lösung

Es wird vermutet, dass es bei der Deacetylierung durch Iod in Methanol zunächst zu einer Komplexierung des Iods mit einem Sauerstoffatom der primären Acetatgruppe im Nucleosid kommt. Es folgt ein anschließender nucleophiler Angriff mit Methanol unter Bildung der freien 5'-OH-Funktion. Eine Komplexierung des Iodmoleküls an den sekundären Acetatgruppen wird durch sterische Hinderung blockiert (Abb. 38).^[84]

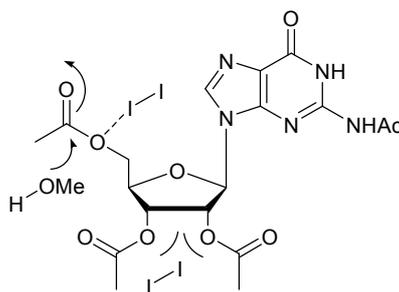


Abbildung 38: Vermuteter Mechanismus der Deacetylierung mit einer Iod-Methanol-Lösung

Da die ersten Versuche in Anlehnung an die Literaturvorschrift keinen Erfolg brachten,^[66] wurde versucht die Reaktion mittels Mikrowellenstrahlung anzuregen (Abb. 39, S. 39). Bei dieser Synthese wurden *N*²-Acetyl-2',3',5'-*O*-triacetylguanosin **115** in eine Iod/Methanol-Lösung gelöst und die Abspaltung in der Mikrowelle bei verschiedenen Temperaturen und Reaktionszeiten durchgeführt.

Eine Bildung des Produktes, mittels Dünnschichtchromatographie, konnte erst nach einem zehnmütigen Reaktionsdurchlauf bei 100 °C beobachtet werden. So wurde

die Temperatur anschließend auf 120 °C erhöht und eine komplette Umsetzung nach fünf Minuten beobachtet. Die Reaktionsbedingungen und Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 2 aufgeführt.

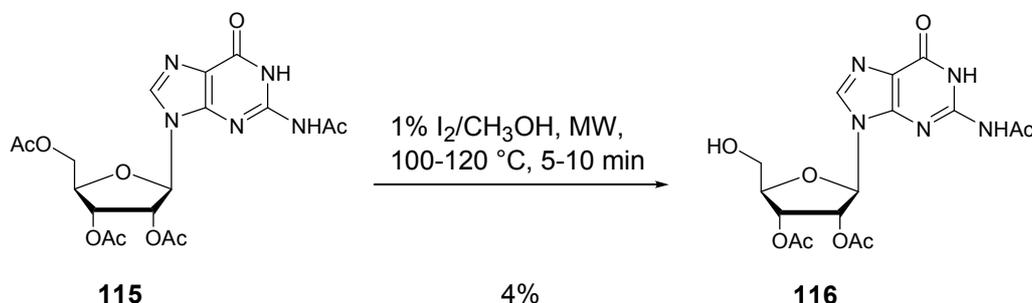


Abbildung 39: Chemische Deacetylierung mit einer Iod-Methanol-Lösung mittels Mikrowelle

Tabelle 2: Chemische Deacetylierung von **115** mittels Mikrowellenstrahlung.
Versuch 1 zur Ermittlung der Reaktionstemperatur

Mikrowelle [W]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Produktbildung
100	100	2	-
100	100	5	-
100	100	15	unvollständig
100	120	20	vollständig

Wie die Ergebnisse der Tabelle 2 zeigen, wird eine vollständige Umsetzung erst bei 120 °C beobachtet. So wurde der erneute Versuch bei 120 °C durchgeführt, um die optimale Reaktionszeit zu ermitteln. Eine vollständige Umsetzung erfolgte erst nach mehreren fünfminütigen Durchläufen. Die Reaktionsbedingungen und Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 3 auf Seite 40 aufgeführt.

Nach der Umsetzung wurde Iod durch Natriumthiosulfat reduziert und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan-Methanol-Gradient (0-10%) gereinigt. Obwohl die dünnschichtchromatographische Verfolgung eine quantitative Umsetzung der Verbindung **115** zum Produkt *N*²-Acetyl-2',3'-O-diacetylguanosin **116** zeigte, konnte nach Aufarbeitung nur eine Ausbeute von 4% erzielt werden. In Anbetracht dieser Ergebnisse wurde von der chemischen

Deacetylierung abgesehen und auf die erfolgreiche enzymatische Umsetzung zu der gewünschten Verbindung **116** zurückgegriffen.

Tabelle 3: Chemische Deacetylierung von **115** mittels Mikrowellenstrahlung.
Versuch 2 zur Ermittlung der Reaktionszeiten

Mikrowelle [W]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Produktbildung
100	120	5	-
100	120	10	unvollständig
100	120	15	unvollständig
100	120	20	unvollständig
100	120	25	vollständig

4.2.4 Darstellung der *cycloSal*-Nucleosidmonophosphate

Die Darstellung der *cycloSal*-Nucleosidmonophosphate erfolgte nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten^[68] und von S. Warnecke optimierten^[63] Syntheseprotokoll. Es wurden die 5“-Nitro- sowie 5“-Methylsulfonyl-*cycloSal*igenyl-Phosphattriester von 2’,3’-Di-O-acetylrudin **111**, N²-Acetyl-2’,3’-di-O-acetylguanosin **112** und N²-Acetyl-3’-O-acetyl-2’-desoxyguanosin **113** in guten bis sehr guten Ausbeuten synthetisiert (Abb. 40, S. 41). Hierzu wurde das jeweilige geschützte Nucleosid in absolutem Acetonitril vorgelegt, und zusätzlich mehrere Kugeln 3 Å Molekularsieb der Reaktionslösung zugefügt, um eventuelle Feuchtigkeitsspuren auszuschließen. Das Nucleosid wurde bei -20 °C in Gegenwart von 2 Äquivalenten Diisopropylethylamin mit 2 Äquivalenten des entsprechenden Saligenylchlorphosphites, ebenfalls gelöst in abs. Acetonitril, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur vollständigen Umsetzung des Nucleosids bei Raumtemperatur gerührt. Im Gegensatz zu den von S. Warnecke beschriebenen Reaktionszeiten von 3-5 h wurde hier die vollständige Umsetzung des Nucleosids erst nach 20-24 h beobachtet (DC-Kontrolle: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1, v/v). Im Anschluss wurde das gebildete Nucleosidphosphit mit 4 Äquivalenten Oxone[®], gelöst in Wasser, *in situ* zu dem *cycloSal*-Nucleotid oxidiert.

Resultate und Diskussion

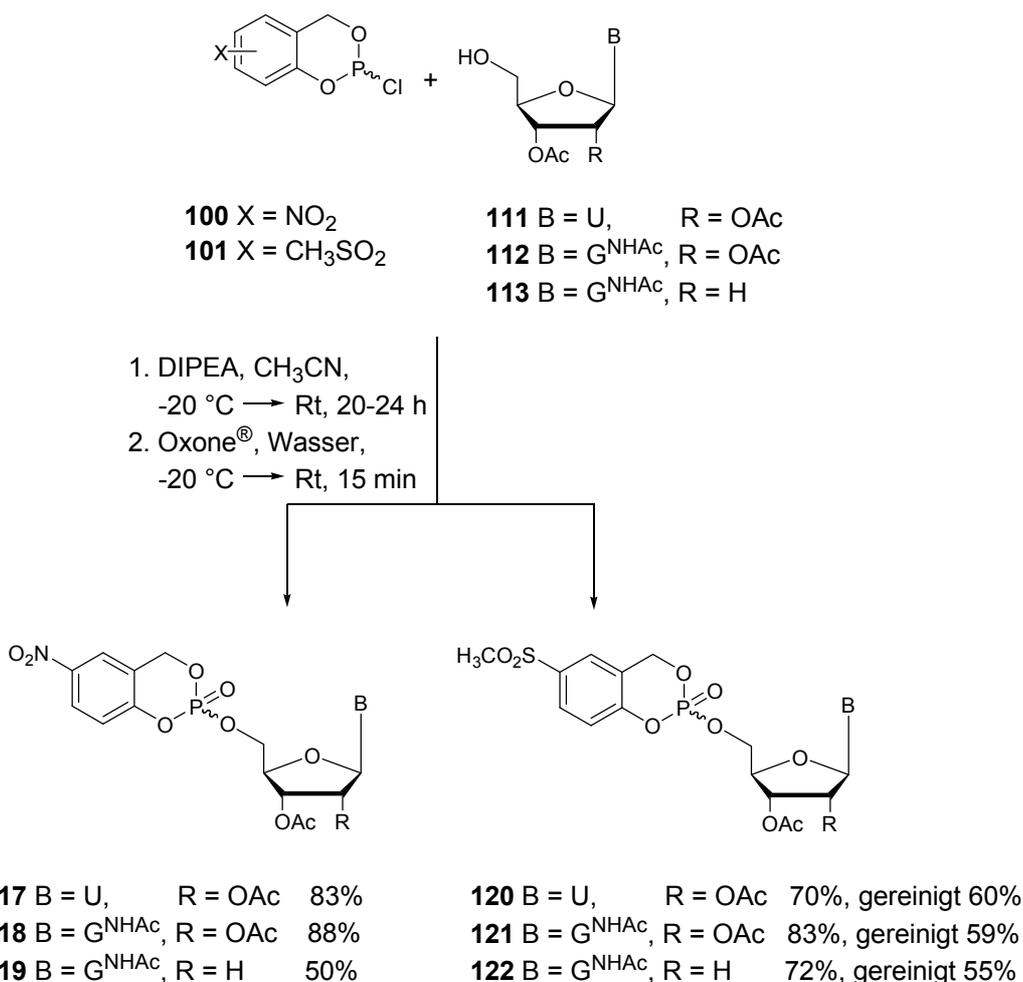


Abbildung 40: Synthese von acceptorsubstituierten *cycloSal*-Nucleotiden **117-122**

Die Aufarbeitung der Reaktionslösung beinhaltete die Extraktion mit Ethylacetat sowie Wasser, um restliche Spuren von Oxone[®] zu entfernen. Anschließend erfolgte die Aufnahme des Rohgemisches in Dichlormethan und Filtration, wodurch die Produkte von unlöslichen organischen Nebenprodukten befreit wurden. Die in Form von farblosen Schäumen erhaltenen Diastereomere der *cycloSal*-Nucleotide zeigten einen hohen Reinheitsgrad, wie es in ³¹P- und ¹H-NMR-Spektren nachgewiesen werden konnte (Abb. 41-42, S. 42). Lediglich die Signale im Bereich von 1-3.5 ppm im ¹H-NMR-Spektrum deuten auf noch vorhandene Verunreinigungen durch DIPEA-Salze hin.

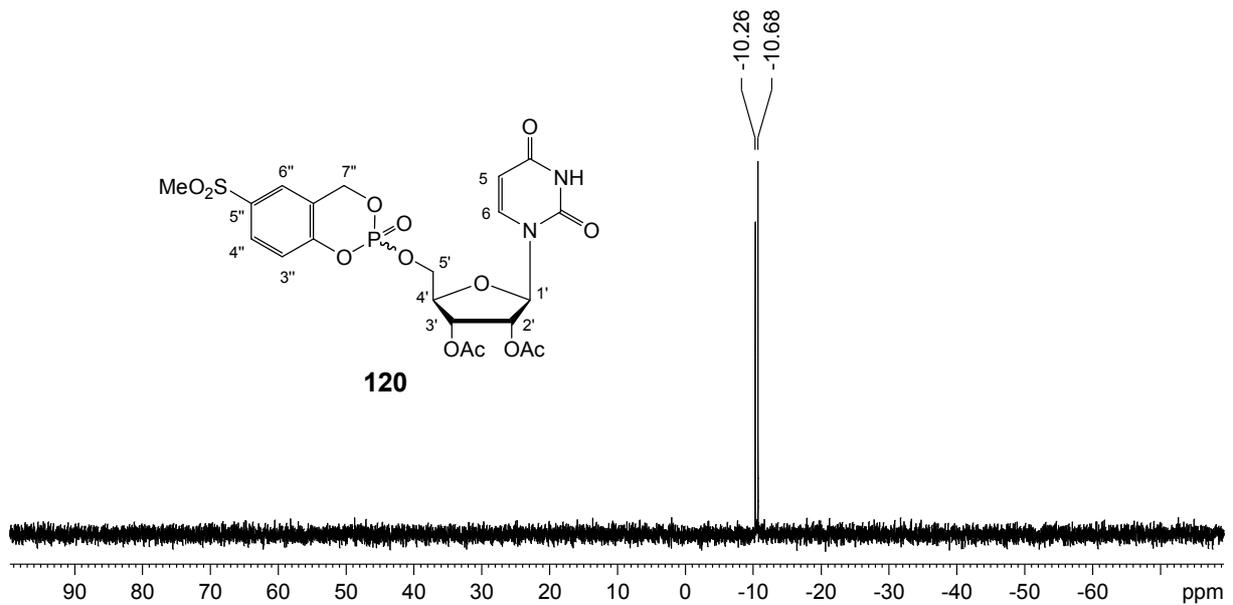


Abbildung 41: ^{31}P -NMR-Spektrum des Rohgemisches von 5''-Methylsulfonyl-*cyclo*Saligenyl-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **120**

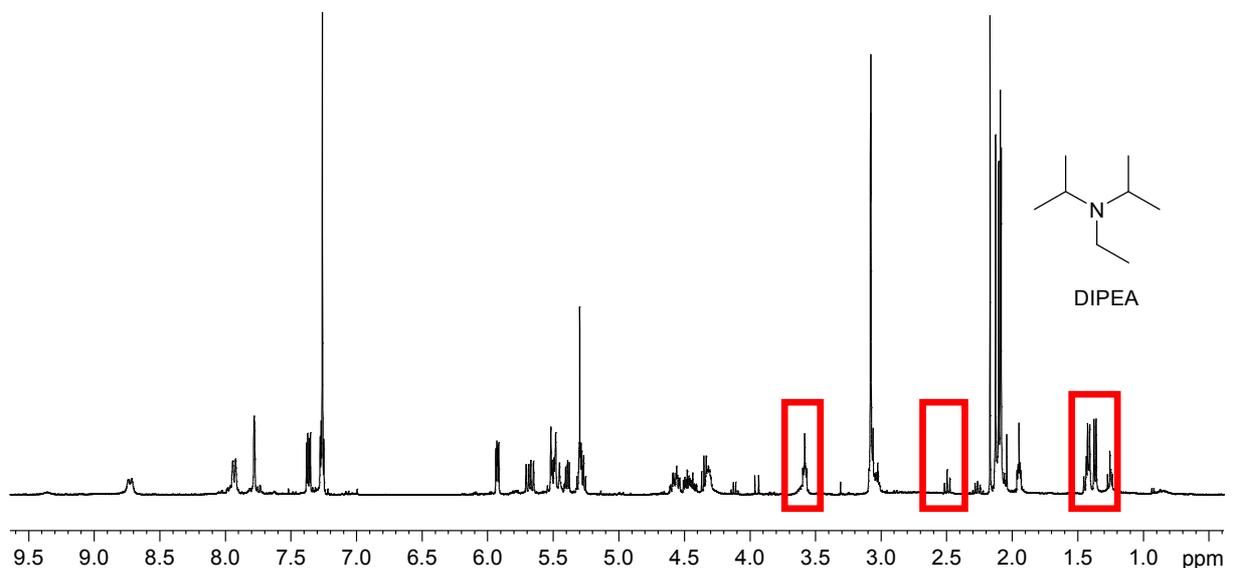


Abbildung 42: ^1H -NMR-Spektrum des Rohgemisches von 5''-Methylsulfonyl-*cyclo*Saligenyl-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **120**

Die Qualität der synthetisierten *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate erlaubte die Umsetzung dieser Verbindungen ohne einen weiteren Reinigungsschritt in den Folgereaktionen. Dieses Vorgehen zeigt allerdings zwei Nachteile hinsichtlich der nachfolgenden Kupplungsreaktionen. Zum einen, wie es sich zu einem späteren

Zeitpunkt dieser Arbeit herausstellte, werden bei Kupplungen mit nicht gereinigten *cycloSal*-Nucleotiden niedrigere Ausbeuten erzielt. Zum anderen können die Ausbeuten dieser Folgereaktionen nicht mehr genau bestimmt werden.

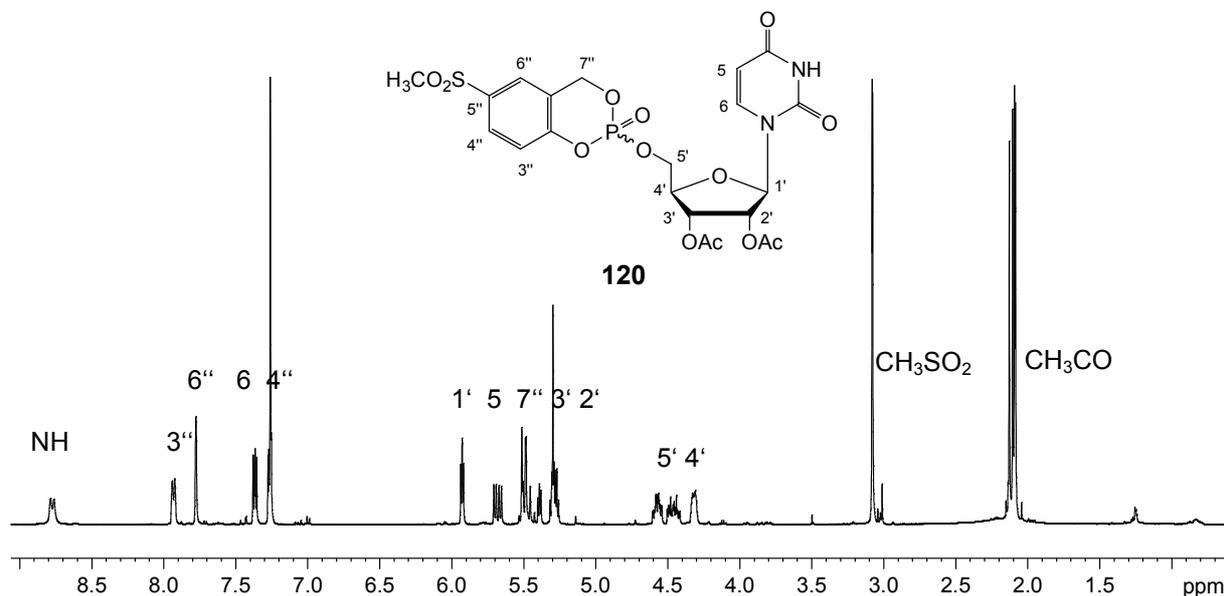


Abbildung 43: ^1H -NMR-Spektrum des chromatographisch gereinigten 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal*igenyl-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphats **120**

Der Vorteil der acceptorsubstituierten Phosphattriester, in deren Nutzen als reaktive Phosphatdonatoren, brachte auch eine Herausforderung in Form von schwieriger Synthese sowie anschließender chromatographischer Reinigung mit sich. Mit Hilfe des optimierten Syntheseprotokolls ist es im Rahmen dieser Arbeit erstmals gelungen, die 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal*-Nucleotide **120-122** in sehr guten Ausbeuten zu synthetisieren (Abb. 40, S. 41). Anschließend konnte auch eine geeignete chromatographische Reinigungsmethode gefunden werden. Die *cycloSal*-NMPs **120-122** wurden am Chromatotron mit einem angesäuerten (ca. 1-1.5% von Essigsäure) Dichlormethan/Methanol-Gemisch (0-2%) gereinigt und dadurch von DIPEA-Salzen befreit worden (Abb. 43).

Obwohl die chromatographische Reinigung zur Zersetzung eines Teils des empfindlichen Produktes führte, konnten gute Ausbeuten zwischen 55 und 60% erzielt werden. In Anbetracht der viel höheren Ausbeuten bis zu 90% (s. Kapitel 4.4.7) bei den Zielverbindungen durch Einsatz der gereinigten Substanzen in den nachfolgenden Kupplungsreaktionen mit Zuckerphosphaten stellen die erzielten Ausbeuten zufriedenstellende Ergebnisse dar.

Alternativ wurde versucht, die Synthese des 5'-Methylsulfonyl-cycloSal-Triesters **123** mit ungeschütztem 2'-Desoxyguanosin **104** durchzuführen. Als Hauptproblem dieser Reaktion wurde, die mögliche mehrfache Phosphitylierung aufgrund der ungeschützten Positionen im Nucleosid angenommen. Da allerdings wie oben beschrieben die Methylsulfonyl-Derivate der Phosphatester stabil genug für eine chromatographische Reinigung waren, wurde dieser Versuch mit der Option einer späteren chromatographischen Reinigung gewagt (Abb. 44). Allerdings stellte auch die mangelhafte Löslichkeit des ungeschützten Nucleosids ein unerwartetes Problem dar. So wurde die Reaktion zunächst, wie es in dem bereits erfolgreich angewendeten Syntheseprotokoll beschrieben ist, in abs. Acetonitril durchgeführt. Das gewünschte Produkt wurde dabei mit einer Ausbeute von 2% erhalten. Aufgrund besserer Löslichkeit des Nucleosids in DMF wurde die Synthese nochmals in diesem Lösungsmittel durchgeführt. Mit 6% Ausbeute wurde ein besseres Ergebnis als zuvor erzielt. Jedoch ist es für einen Einsatz als eine Schlüsselverbindung ist es nicht akzeptabel.

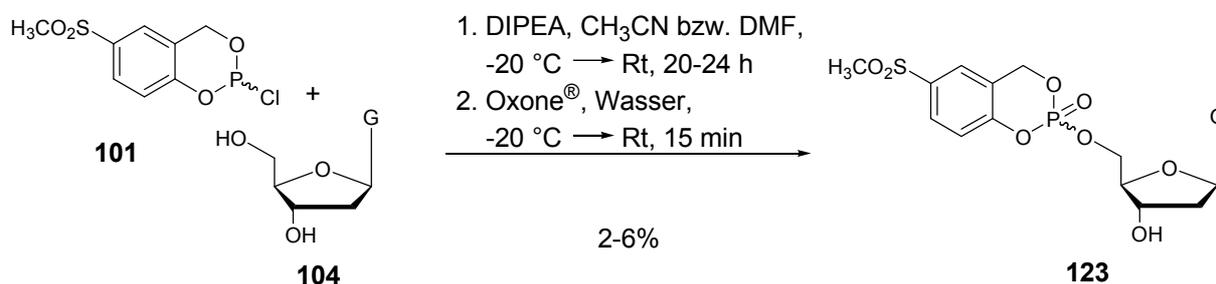


Abbildung 44: Darstellung von 5'-Methylsulfonyl-cycloSaligenyl-2'-desoxyguanosinmonophosphats **123**

4.3 Darstellung von Glycosyl-1-phosphaten

Die chemische Bildung einer glycosidischen Bindung verläuft in den meisten Fällen nicht diastereoselektiv, wodurch die anomeren Isomere entstehen. Häufig wird das α -Anomer als thermodynamisches Produkt, trotz der sterisch ungünstigeren axialen Position, begünstigt. Die Entstehung der beobachteten anomeren Produktgemische ist auf den anomeren Effekt zurückzuführen. Dieser Effekt wird durch den Substituenten an C-2 stark beeinflusst. So wird dieser Effekt durch die axiale

Stellung des Substituenten verstärkt, was zum Beispiel im Fall eines Mannosederivates ausschließlich zur Bildung der α -Anomere führt. Zusätzlich wird der anomere Effekt durch die Elektronegativität des Substituenten am anomeren Zentrum beeinflusst. Weiterhin zeigen das gewählte Lösungsmittel und die entsprechende Reaktionstemperatur einen großen Einfluss auf das Anomerenverhältnis der Glycosylierungsreaktionen. Unter biochemischen Aspekten ist allerdings häufig nur ein Anomer der Nucleosiddiphosphatglycoside relevant. Somit ist eine stereoselektive Synthese der anomerenreinen Glycosylmonophosphate für die Kupplungsreaktionen wünschenswert, um anschließende schwierige und in vielen Fällen unmögliche Trennung der Anomerenmische zu vermeiden.^[85] Zur Darstellung der anomerenreinen Glycosylmonophosphate gibt es mehrere Methoden, zwei dieser Ansätze werden in dieser Arbeit präsentiert. Es wurden zum einen die Phosphoramidit-Methode zur Darstellung der α -Anomere und zum anderen die Koenigs-Knorr-Methode über Halogenose-Aktivierung zur Darstellung reiner β -Glycosylmonophosphate eingesetzt.

4.3.1 Synthese der Glycosyl-1-phosphate nach der Phosphoramidit-Methode

Sowohl für die Phosphoramidit-Methode als auch für die Koenigs-Knorr-Methode werden peracetylierte Glycoside benötigt. Diese wurden aus den entsprechenden Monosacchariden **2** und **124-127** mit Essigsäureanhydrid in Pyridin synthetisiert (Abb. 45).^[86]

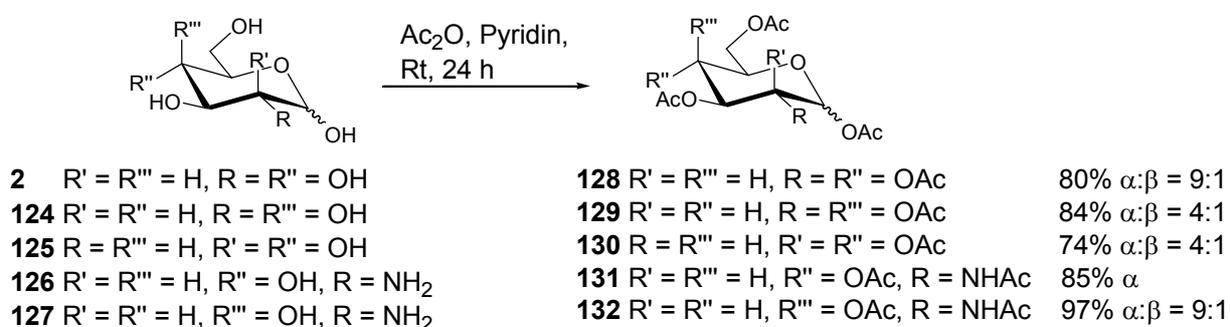


Abbildung 45: Acetylierung der Monosaccharide **2**, **124-127**

Alle peracetylierten Monosaccharide **128-132** wurden in sehr guten Ausbeuten von 74% bis 97% als Anomerengemische erhalten. Nur im Fall des Glucosaminderivates wurde das reine α -Anomer beobachtet, was allerdings auf die Aufarbeitungsmethode zurückzuführen ist. Das peracetylierte Glucosamin **131** wurde im Gegensatz zu anderen Monosaccharidderivaten aus Methanol kristallisiert und dadurch wird wahrscheinlich nur die Kristallisation nur des α -Anomeres bevorzugt.

Für die Darstellung des peracetylierten Derivates des Lactosamins wurde *N*-DTPM-Lactosamin **123** eingesetzt, das zuvor aus Lactulose **159** synthetisiert wurde (s. Kapitel 4.3.3.2). Vor der Acetylierung musste zunächst die Schutzgruppe der Aminofunktion mit einer Ammoniaklösung abgespalten werden. Nach anschließender Filtration und Entfernen des Lösungsmittels wurde die Acetylierung, wie bereits für die Monosaccharide beschrieben, durchgeführt (Abb. 46). Das Produkt **134** wurde mit einer Ausbeute von 35% erhalten. Das Anomerenverhältnis konnte leider aufgrund der Signalüberlagerungen in den NMR-Spektren nicht bestimmt werden.

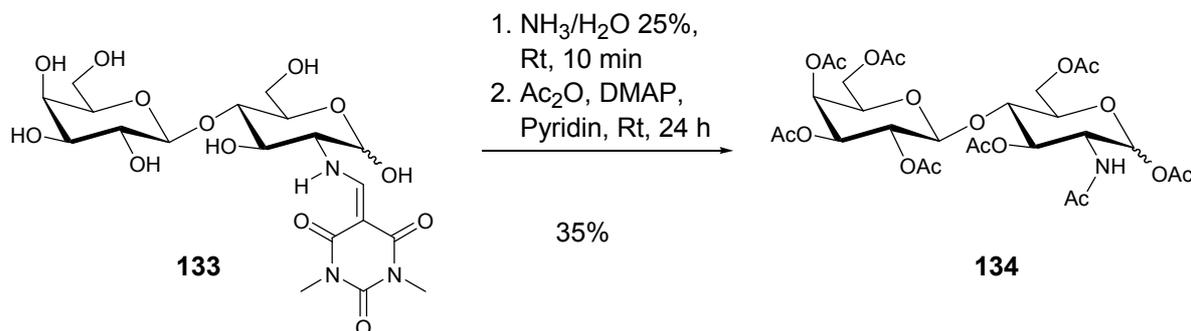


Abbildung 46: Darstellung von peracetyliertem Lactosamin **134**

Als beste Methode für die selektive Deacetylierung am anomeren Zentrum erwies sich in Vorarbeiten^[65-66] die Aminolyse mit Hydraziniumacetat.^[87] Die peracetylierten Verbindungen **128-134** wurden in DMF mit guten Ausbeuten von 61% bis 89% selektiv deacetyliert (Abb. 47, S. 47). Die Verbindungen **137** und **139** wurden als reine α -Anomere isoliert und im Fall der Verbindung **140** war die Bestimmung des Anomerenverhältnisses aufgrund der Signalüberlagerungen unmöglich.

Resultate und Diskussion

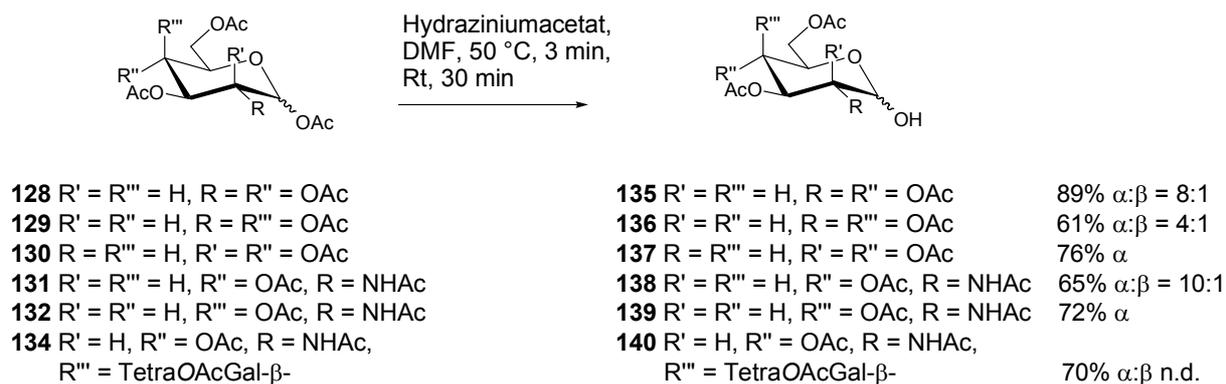


Abbildung 47: Selektive Aminolyse der Verbindungen **135-140**

Die entstandenen Anomerengemische konnten nicht chromatographisch getrennt werden, daher wurden die Verbindungen **135-140** direkt zu Dibenzylphosphaten umgesetzt (Abb. 48).^[88] Die Umsetzung der Verbindungen **135-140** mit Dibenzyl-*N,N'*-diisopropylphosphoramidit und Dicyanoimidazol führte zu intermediär gebildeten Dibenzylphosphiten, die anschließend *in situ* mit 3-Chlorperbenzoesäure in Dibenzylphosphate **141-146** überführt wurden. In der Phosphorylierungsreaktion fungiert DCI als Aktivator.

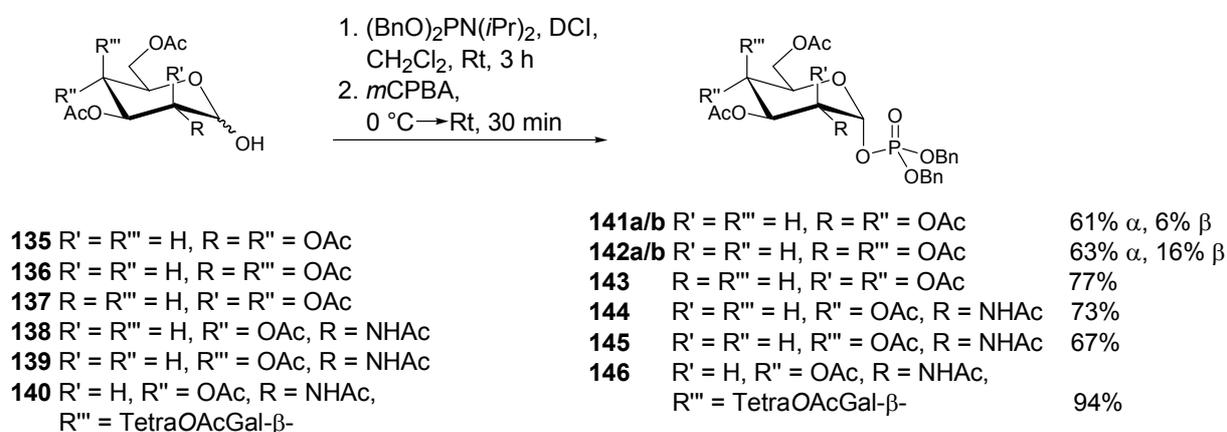


Abbildung 48: Darstellung der Dibenzylphosphate **141-146**

Im Fall der Glucose- und Galactosederivate **141** und **142** wurden α - und β -Anomere erhalten, die durch säulenchromatographische Reinigung voneinander getrennt werden konnten. Die gewünschten α -anomerenreinen Verbindungen wurden schließlich mit Ausbeuten von 61% und 63% erhalten. Die β -Anomere der Verbindungen **141** und **142** wurden in Ausbeuten von 6% und 16% isoliert. Die

Dibenzylphosphate der Mannose **143** sowie der Aminozucker **144-146** wurden als α -anomerenreine Verbindungen erhalten. Diese Ergebnisse sind auf die Nachbargruppeneffekte zurückzuführen. So ist bei dem Mannosederivat die axialstehende Acetylgruppe am zweiten Kohlenstoffatom dafür verantwortlich, dass nur das 1,2-*trans*-Produkt erhalten wird. Auch bei Aminozuckern wirkt die Acetamidogruppe destabilisierend auf das β -Anomer und es wird das thermodynamisch stabilere α -Anomer bevorzugt gebildet.

Die anschließende hydrogenolytische Spaltung der Benzylschutzgruppen erfolgte in Anwesenheit von 2 Äquivalenten Triethylamin und Pd/C (5%, 55% Wasser) als Katalysator (Abb. 49).^[89] Die Hydrogenolyse der Verbindungen **141a-144** und **146** in Dioxan lieferte entsprechende Triethylammoniumsalze der ungeschützten Glycosyl-1- α -Phosphate **147a-150** und **67** in sehr guten Ausbeuten von 91% bis 98%. Die Spaltung der Benzylschutzgruppen von Verbindung **145** blieb unter gleichen Reaktionsbedingungen erfolglos. Auch nach der Erhöhung des Wasserstoffdruckes auf 80 bar konnte keine Umsetzung beobachtet werden. Erst der Austausch des Lösungsmittels Dioxan gegen Methanol und Hydrogenolyse bei Normaldruck lieferte das gewünschte ungeschützte Phosphat **151** als Triethylammoniumsalz in 80% Ausbeute.

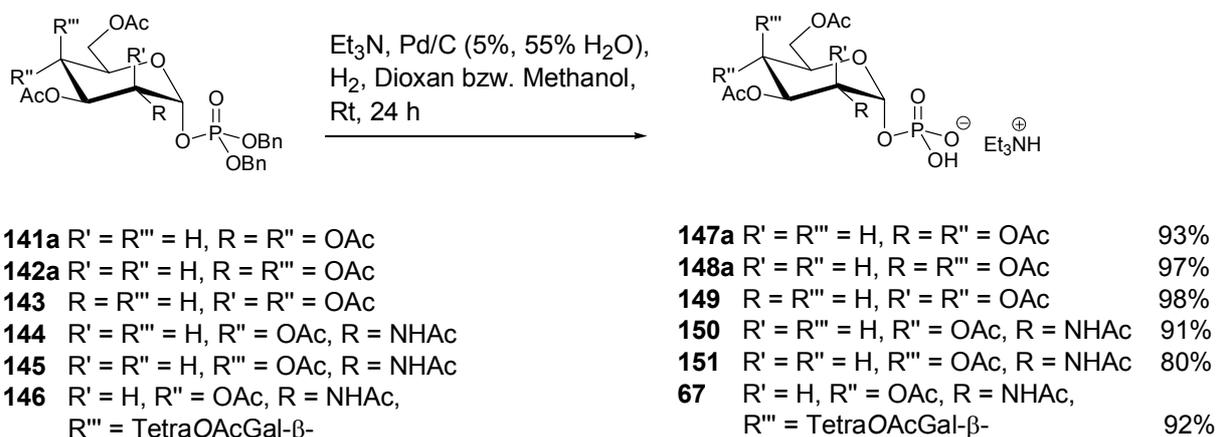


Abbildung 49: Darstellung der α -anomerenreinen Glycosyl-1-Phosphate **147a-151** und **67** als Triethylammoniumsalze

Die Phosphoramiditmethode bietet zwar den Vorteil, beide Anomere der Glycosylphosphate in reiner Form gleichzeitig darzustellen, die erhaltenen Mengen

an β -Anomeren sind aber äußerst gering. Daher wird für die Darstellung der reinen β -Anomere die relativ einfach durchführbare Koenigs-Knorr-Methode herangezogen.

4.3.2 Synthese der Glycosyl-1-phosphate nach der Koenigs-Knorr-Methode

Die Synthese der β -konfigurierten Glycoside erfolgt meistens problemlos unter Koenigs-Knorr-Bedingungen.^[89] Diese Reaktionen am anomeren Kohlenstoffatom verlaufen stereochemisch ausgesprochen selektiv. Zur Darstellung der Glycosylhalogenide wurden pentaacetylierte Monosaccharide **128-129** und **131** mit Bromwasserstoff (33%) in Essigsäure umgesetzt (Abb. 50). Im Fall der Glucose- und Galactose-Derivaten **152** und **153** entstanden die α -anomerenreinen Glycosylbromide in Ausbeuten von 93% und 84%. Bei der Umsetzung des peracetylierten Glycosamins **131** mit Bromwasserstoff wurde keine Reaktion beobachtet, was auf die Acetamidogruppe an C-2 zurückzuführen ist.

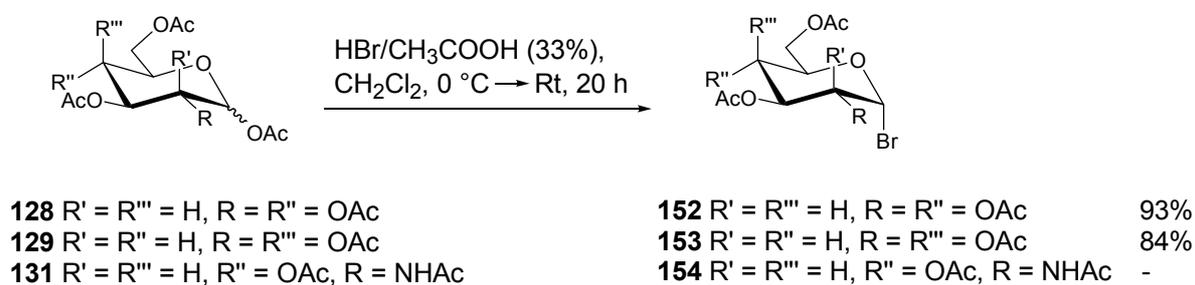


Abbildung 50: Darstellung der Glycosylbromide **152-154**

Die reaktiven und relativ instabilen Glycosylbromide **152-153** wurden anschließend mit Dibenzylphosphat unter Zusatz von Silbercarbonat zu Tetra-O-acetyl- β -D-glycosyl-1-dibenzylphosphaten **141b-142b** umgesetzt (Abb. 51, S. 50). Das eingesetzte Silbercarbonat hat zweifache Wirkung, zum einen wird das freiwerdende Bromidion gebunden und zum anderen wird Dibenzylphosphat deprotoniert und erhält dadurch seine starke Nucleophilie.

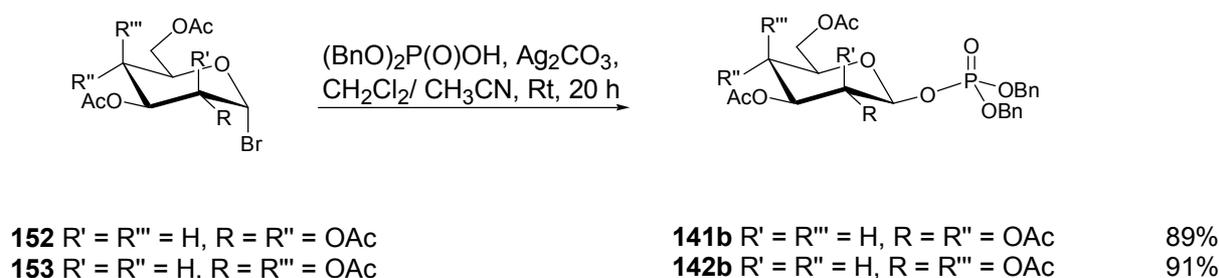


Abbildung 51: Darstellung der β -anomerenreinen Glycosyl-1-dibenzylphosphate **141b** und **142b**

Die Hydrogenolyse der Verbindungen **141b** und **142b** in Dioxan lieferte entsprechende Triethylammoniumsalze der ungeschützten Glycosyl-1- β -Phosphate **147b** und **148b** mit sehr guten Ausbeuten von 89% bis 91% (Abb. 52).

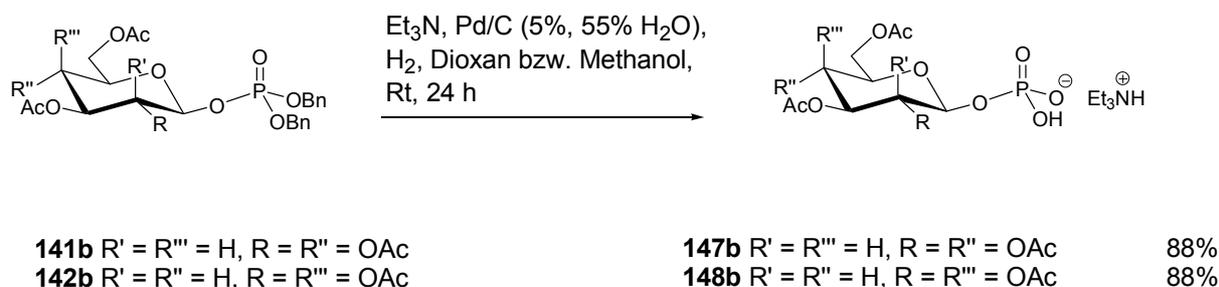


Abbildung 52: Darstellung der β -anomerenreinen Glycosyl-1-Phosphate **147b** und **148b** als Triethylammoniumsalze

Die Konfigurationen des anomeren Zentrums der glycosidischen Bindung konnten mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren geklärt werden. Gemäß der Karplus-Beziehung weisen α -Glycoside mit einem Diederwinkel von 60° zwischen H-1 und H-2 Kopplungskonstanten von $^3J_{1,2} \approx 3.5$ Hz auf. Die β -Glycoside mit *trans*-ständigen H-1 und H-2 zeigen dagegen eine Kopplungskonstante von $^3J_{1,2} \approx 8.0$ Hz. Zusätzlich zur ^1H - und ^{13}C -Spektroskopie dient die ^{31}P -Spektroskopie der Charakterisierung der phosphorhaltigen Verbindungen. Die α - und β -Anomere zeigen jeweils ein Singulett mit der typischen chemischen Verschiebung von $\delta = 0.05$ bis -3.0 ppm.

4.3.3 Synthese eines Trisaccharid-1-phosphates

4.3.3.1 Synthesestrategie

Obwohl die Strukturen der schon in den 60er Jahren aus Säugern isolierten NDP-Oligosaccharide bekannt sind, sind die Funktionen und die Biosynthese dieser Verbindungen weitgehend ungeklärt. So könnte der Zugang zu nucleotidaktivierten Oligosacchariden mit chemischen oder enzymatischen Methoden bei der Aufklärung der Biosynthese sowie biologischer Funktionen solcher Glykokonjugaten helfen. Die meisten Verbindungen wurden als verlängerte Derivate des UDP-GlcNAc und des UDP-LacNAc charakterisiert, welche als dritten Monosaccharidbaustein häufig *N*-Acetyl- bzw. *N*-Glycolylneuraminsäure sowie die L-Fucose tragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die erstmalige Darstellung des aus menschlicher Milch und Kolostrum isolierten UDP-Trisaccharids **82**, UDP-(1 α)GlcNAc-(1 β →4)Gal-(2 α →6)NeuAc, gerichtet (Abb. 26, S. 27). Da die Synthese nach dem bereits beschriebenen Weg aus Glycosylphosphat und einem *cyclo*Sal-Triester stattfinden sollte, bestand die größte Herausforderung in der Darstellung des anomenreinen peracetylierten Trisaccharidphosphates **81**, GlcNAc-(1 β →4)Gal-(2 α →6)NeuAc-1- α -phosphat.

Die Darstellung des gewünschten Trisaccharidphosphates **81** sollte in einer konvergenten Synthese aus dem peracetylierten Glycosylchlorid **156** und aus dem ebenfalls acetylierten Lactosamin-1-dibenzylphosphat **157** stattfinden (Abb. 53, S. 52).

Das peracetylierte Glycosylchlorid **156** kann in einer zweistufigen Synthese aus *N*-Acetylneuraminsäure **9** synthetisiert werden.^[63] Die Darstellung beinhaltet die Veresterung der Säuregruppe als Methylester und anschließende Acetylierung mit gleichzeitiger Halogenierung mit Acetylchlorid.^[90,91]

Die Kupplung der Verbindungen **156** und **157** sollte unter Ausschluss von Feuchtigkeit in absolutem Dichlormethan und in Anwesenheit des Quecksilbercyanides und Quecksilberbromides stattfinden. Glycosylierungsreaktionen von den Neuraminsäurehalogenid-Derivaten ergeben meistens Anomerengemische als Produkte mit überwiegendem α -Anteil. Diese Anomerengemische stellen weiterhin keine Schwierigkeiten dar, da sie problemlos säulenchromatographisch voneinander getrennt werden können.^[92]

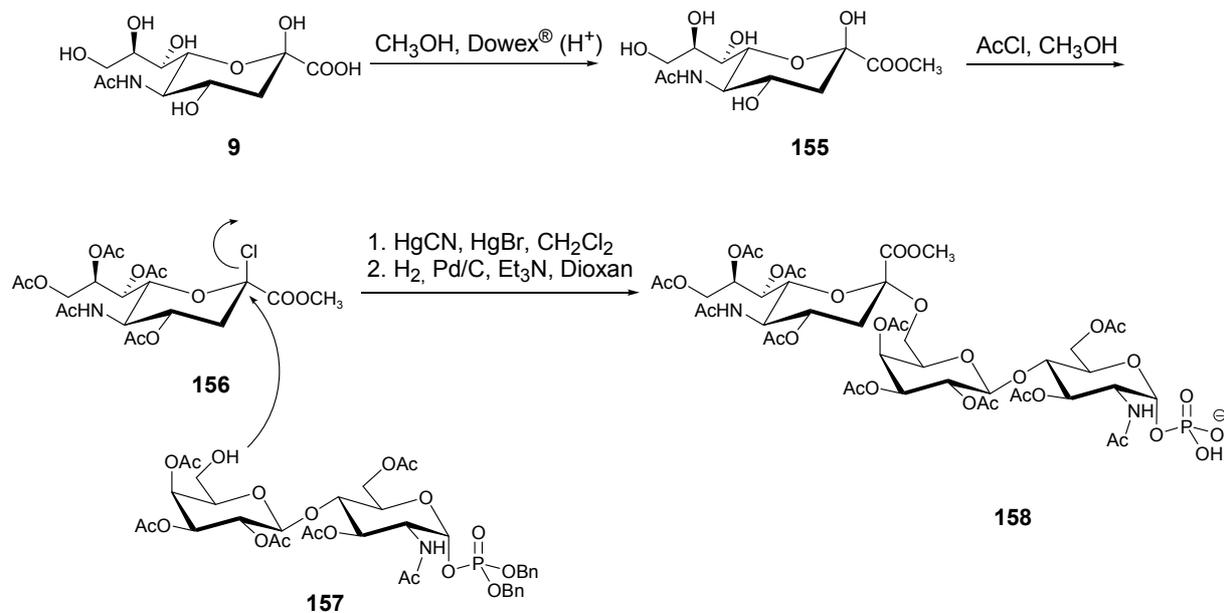


Abbildung 53: Synthesepfad des Trisaccharidphosphates
 GlcNAc-(1 β →4)Gal-(2 α →6)NeuAc-1- α -phosphat **158**

Das Dibenzylphosphat des Lactosaminderivates **157** sollte nach der bereits beschriebenen Phosphoramidit-Methode (Kapitel 4.3.1) aus Lactosamin **133** dargestellt werden. Das Ziel bestand dabei, die Hydroxygruppe in der 6'-Position für die anschließende Kondensation mit Glycosylhalogenid **156** frei vorliegen zu haben.

4.3.3.2 Darstellung des Lactosaminderivates **157**

Aus Kostengründen wurde Lactosamin **133** durch Umlagerung aus günstiger Lactulose **159** synthetisiert (Abb. 54, S. 53). Die Heyns-Umlagerung wurde durch Überführung der Lactulose **159** mit Benzylamin in *N*-Benzylactulosylamin **160** und anschließender Umsetzung des erhaltenen Rohproduktes mit Eisessig in Methanol erzielt.^[93] Die Schutzgruppe im *N*-Benzylactosamin **161** wurde durch katalytische Hydrierung über Pearlman's Katalysator (Pd(OH)₂ 20%) in verdünnter Salzsäure abgespalten. Da die Aufarbeitung dieser drei Reaktionen nur das Filtrieren der Rohprodukte beinhaltete, lag das gewünschte Hydrochlorid des Lactosamins **162** in einem Gemisch von vielen Nebenprodukten vor. Um eine aufwendige säulenchromatographische Reinigung zu umgehen, wurde die freie Aminogruppe im Lactosamin **162** mit Hilfe des DTPM-Reagenzes (1,3-Dimethyl-5-

((dimethylamino)methylen)-2,4,6-trioxypyrimidin), hergestellt aus *N,N*-Dimethylformamiddiethylacetal und 1,3-Dimethylbarbitursäure in 79% Ausbeute, blockiert.^[94] Diese zur Blockierung der Aminofunktionen eingesetzte Schutzgruppe ist stabil unter den meisten in der Kohlenhydratchemie verwendeten Reaktionsbedingungen und kann ganz leicht mit einer Ammoniaklösung innerhalb von zehn Minuten entfernt werden.^[95] Nach erfolgreicher Schützung der Aminogruppe in Methanol und in Anwesenheit von Triethylamin fällt die gewünschte Verbindung **133** als weißer Feststoff aus, während die nicht reaktiven Nebenprodukte in Lösung bleiben. Das *N*-DTPM-Lactosamin **133** wurde auf diesem Weg in vier Reaktionsschritten und ohne aufwendige Aufarbeitung mit einer Ausbeute von 27% erhalten.

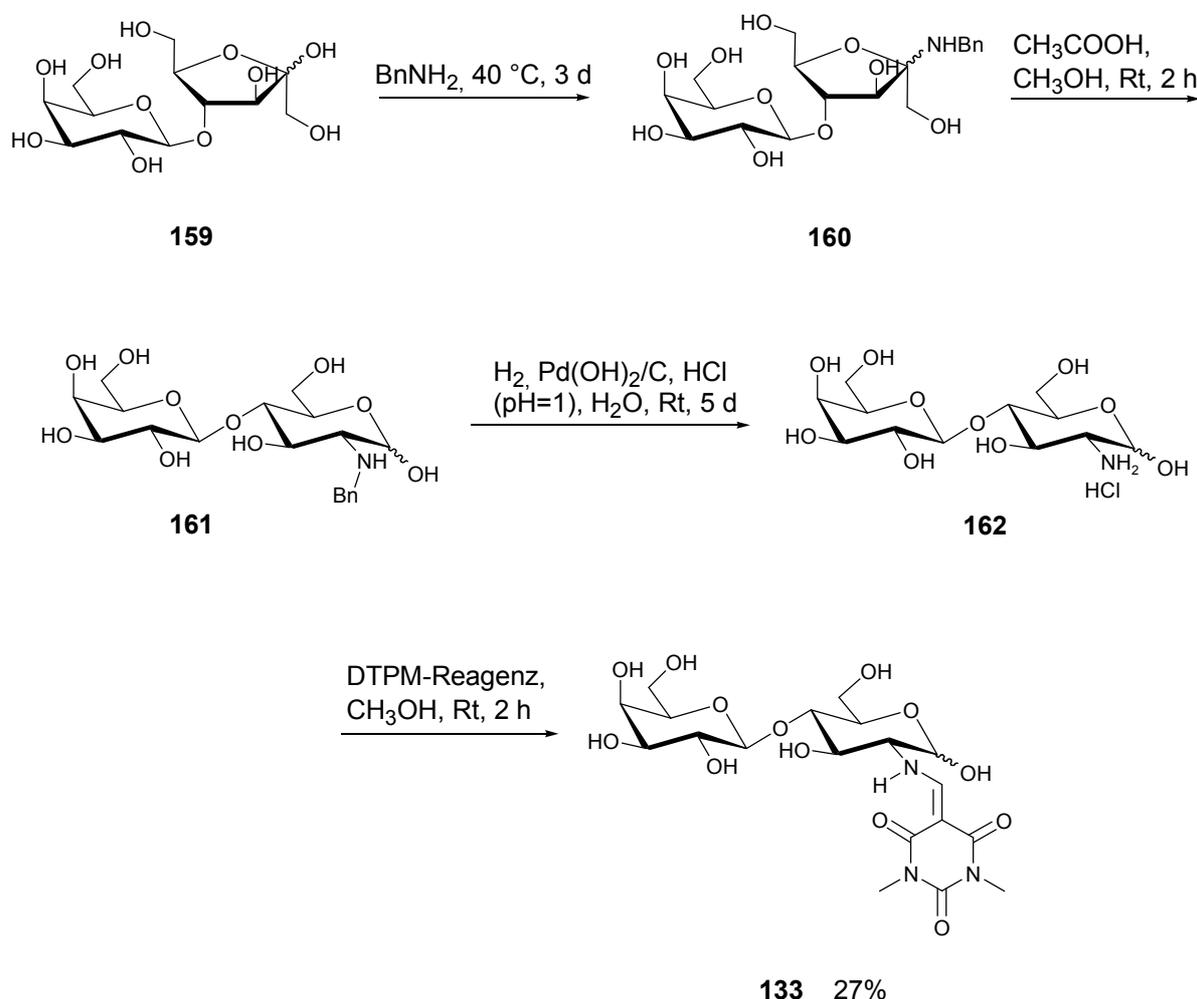


Abbildung 54: Synthese von *N*-DTPM-Lactosamin **133** nach Heyns-Umlagerung

Für die Kupplung des Glycosylhalogenids **156** und des Dibenzylphosphates **157** zur Darstellung des Trisaccharidphosphates **158** muss die 6'-OH-Gruppe bei dem

Lactosaminderivat **157** frei vorliegen. Deshalb sollten die 4'- und 6'-OH-Gruppen in Form eines Acetals während der Acetylierung der restlichen Hydroxylgruppen und anschließenden Phosphorylierung blockiert bleiben. Nach anschließender Spaltung des Acetals zum 4',6'-Diol **163** könnten die 6'-OH-Gruppen selektiv silyliert und die 4'-OH-Gruppe acetyliert werden. Anschließende Spaltung des Silylethers würde die gewünschte Verbindung **157** liefern (Abb. 55).

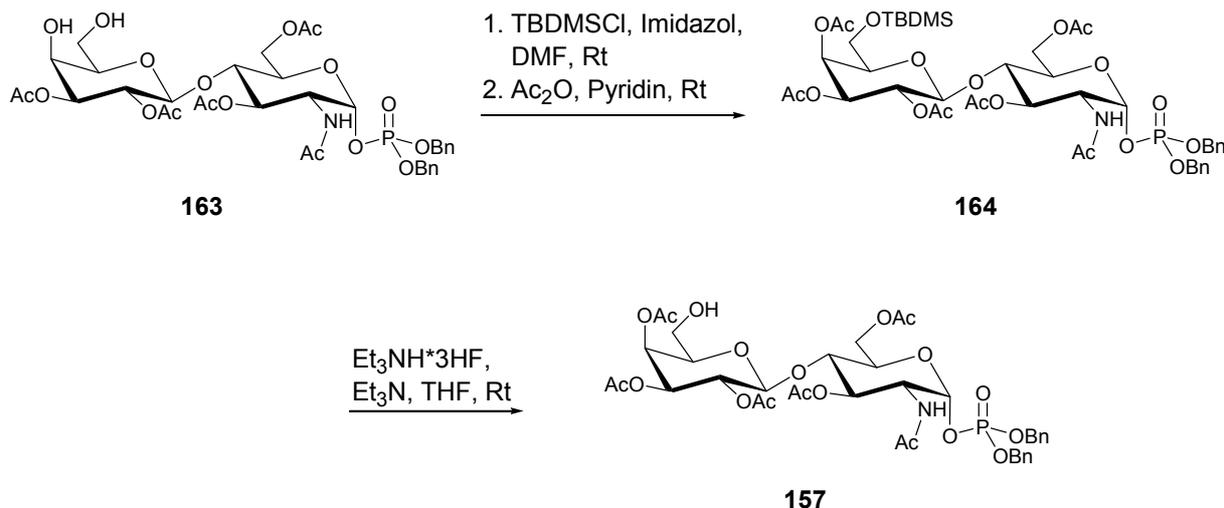


Abbildung 55: Synthesepfad von Dibenzyolphosphat des Lactosamins **157** mit freier 6'-Hydroxylgruppe

Die Umsetzung des *N*-DTPM-Lactosamins **133** mit Benzaldehyddimethylacetal in Anwesenheit von Camphersulfonsäure lieferte das 4',6'-*O*-Benzylidenacetal **165**.^[96] In einer Eintopfsynthese wurde anschließend die DTPM-Gruppe mit Ammoniak-Lösung abgespalten^[95] und alle freien Hydroxylgruppen sowie die Aminogruppe mit Essigsäureanhydrid unter Zusatz von DMAP acetyliert. Die Verbindung **165** wurde mit einer Ausbeute von 42% erhalten (Abb. 56).^[97]

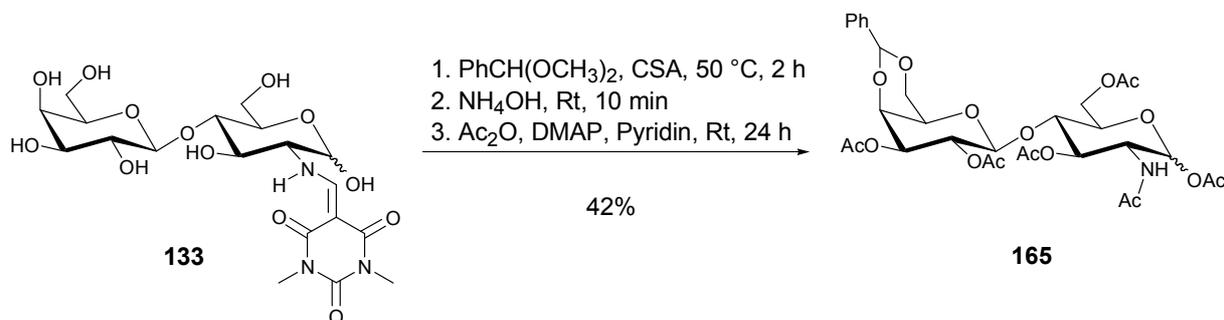


Abbildung 56: Synthese von acetyliertem 4',6'-*O*-Benzylidenacetal **165**

Die Phosphorylierung des Lactosaminderivates **165** erfolgte nach der bereits beschriebenen Phosphoramidit-Methode. Zunächst wurde die Verbindung **165** selektiv mit Hydraziniumacetat am anomeren Zentrum mit einer guten Ausbeute von 60% deacetyliert. Anschließend erfolgte die Umsetzung mit *N,N*-Dibenzyl-*N,N'*-diisopropylphosphoramidit zu einem Glycosylphosphit und Oxidation mit *m*CPBA zum Dibenzylphosphat **167** in einer sehr guten Ausbeute von 85% (Abb. 57).

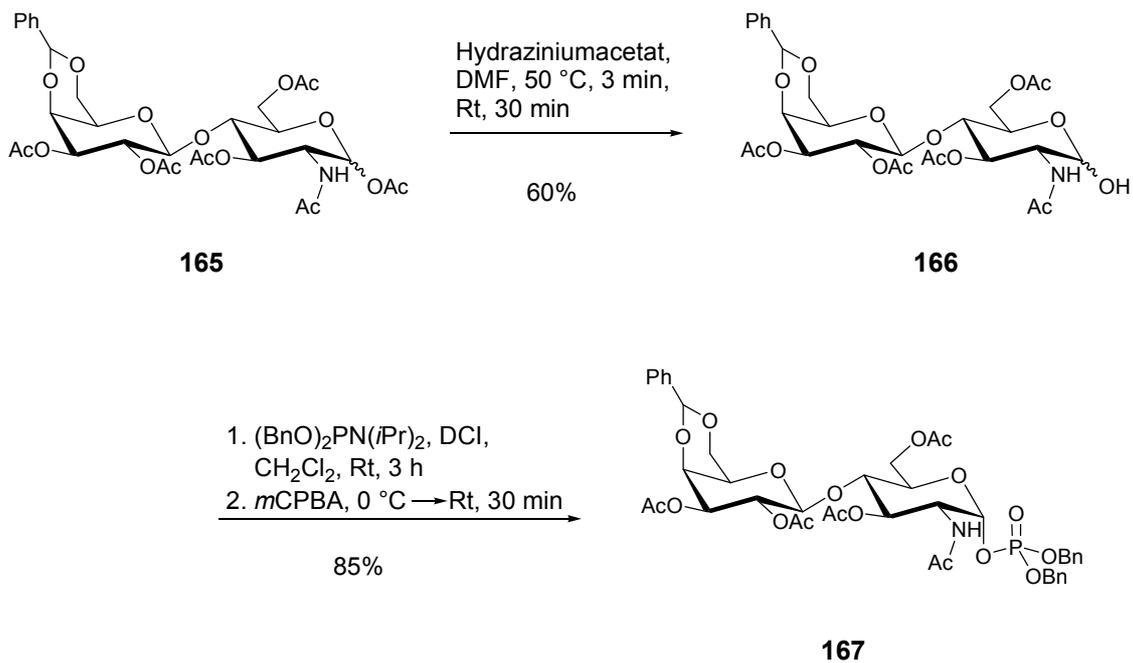


Abbildung 57: Synthese von Dibenzylphosphat **167**

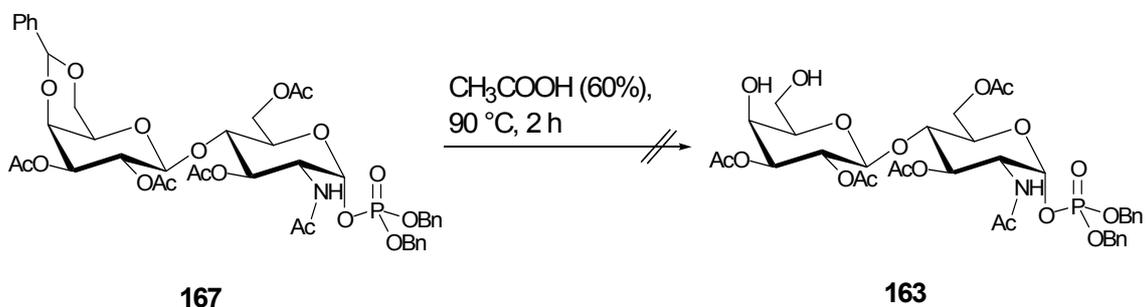
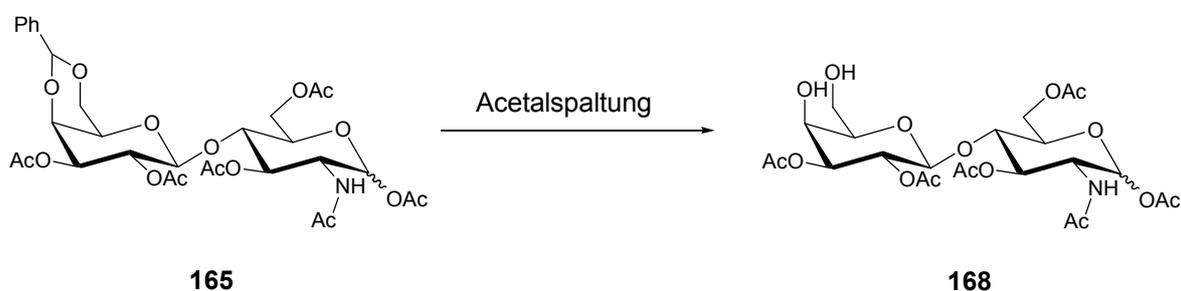


Abbildung 58: Hydrolyse der 4',6'-*O*-Benzylidenacetalgruppe von Glycosyldibenzylphosphat **163**

Die Hydrolyse der Acetalgruppe wurde mit 60%-iger Essigsäure bei 90 °C vorgenommen (Abb. 58, S 55).^[97] Leider wurde anstatt der Bildung des 4',6'-Diols **163** eine Zersetzung des Produktes beobachtet. Zum einen hat sich die Phosphatfunktion zersetzt und zum anderen wurde die Glycosylbindung zwischen Glucosamin und Galactose gespalten.

Um eine geeignete Methode zur Spaltung des Benzylidenacetals zu finden, wurde auf die mehrstufige Phosphorylierung des Disaccharides verzichtet und die Testreaktionen mit dem peracetylierten 4',6'-O-Benzylidenacetallactosamin **165** durchgeführt (Abb. 59).



Abspaltbedingungen

- | | |
|--|----------------|
| 1. CH ₃ COOH (60%), Rt, 4 h | keine Reaktion |
| 2. CH ₃ COOH (60%), 90 °C, 2 h | Zersetzung |
| 3. CH ₃ COOH (80%), 60 °C, 2 h | Zersetzung |
| 4. CH ₃ CN, HCl | Zersetzung |
| 5. H ₂ , Pd/C, C ₂ H ₅ OH, Rt, 24 h | keine Reaktion |
| 6. H ₂ , Pd/C, THF, Rt, 24 h | keine Reaktion |

Abbildung 59: Hydrolyse der 4',6'-O-Benzylidenacetalgruppe von Verbindung **165**

Eine erneute Hydrolyse des Acetals wurde weiterhin mit 60%-iger Essigsäure vorgenommen. Allerdings wurde die Reaktion zunächst bei Raumtemperatur durchgeführt (Abb. 59, Abspaltbedingung 1). Da nach 4 Stunden keine Umsetzung der Verbindung **165** mittels dünnschichtchromatographischer Kontrolle (Ethylacetat/Methanol, 4:1) beobachtet wurde, wurde die Temperatur erneut auf 90 °C erhöht (Abb. 59, Abspaltbedingung 2). Die Reaktion wurde weitere 2 Stunden bei 90 °C gerührt, da eine Veränderung im Reaktionsgemisch mittels dünnschichtchromatographischer Kontrolle (Ethylacetat/Methanol, 4:1) nach diesem Zeitraum festgestellt werden konnte. Nach der Aufarbeitung des

Reaktionsgemisches wurde jedoch erneut die Zersetzung der glycosidischen Bindung festgestellt.

Wie aus dem vorherigen Versuch ersichtlich, findet bei Raumtemperatur keine Umsetzung statt und zu hohe Temperaturen führen zur Zersetzung des Disaccharids. Aus diesem Grund wurde die erneute Hydrolyse des Benzylidenacetals bei 60 °C jedoch mit konzentrierter Essigsäure (80%-ig) durchgeführt (Abb. 59, S. 56, Abspaltbedingung 3).^[98] Auch dieser Versuch brachte keinen Erfolg und es wurde die Spaltung der glycosidischen Bindung festgestellt.

Weiterhin wurde eine in der Arbeitsgruppe erfolgreich verwendete Methode zur Acetalspaltung eingesetzt.^[99] Die Verbindung **165** wurde in Acetonitril gelöst und in Anwesenheit von 3 Tropfen konzentrierter Salzsäure kurzzeitig erhitzt (Abb. 59, S. 56, Abspaltbedingung 4). Auch hier konnte keine Produktbildung beobachtet werden.

Da die Anwendung der sauren Hydrolysemethoden zur Spaltung der Acetalgruppe für die Verbindung **165** nicht erfolgreich war und zu einem Bruch der labilen Glycosidbindung führte, wurde auf eine mildere Methode, die hydrogenolytische Spaltung, zurückgegriffen.

Die Verbindung **165** wurde in Ethanol gelöst und über Pd/C als Katalysator hydriert (Abb. 59, S. 56, Abspaltbedingung 5).^[100] Nach 24 Stunden konnte keine Umsetzung des Eduktes mittels dünnschichtchromatographischer Kontrolle (Ethylacetat/Methanol, 4:1) beobachtet werden. Da solche hydrogenolytischen Spaltungen der Acetalgruppen häufig auch in THF als Lösungsmittel erfolgreich durchgeführt werden,^[101] wurde die Reaktion erneut unter gleichen Bedingungen in THF vorgenommen (Abb. 59, S. 56, Abspaltbedingung 6). Leider konnte auch in diesem Fall keine Umsetzung der Verbindung **165** festgestellt werden. Auch ständige Sättigung der Reaktionslösung mit Wasserstoff brachte keinen Erfolg.

Obwohl zur Abspaltung der Benzylidenacetale noch weitere Möglichkeiten zur Verfügung stehen (Abb. 60, S. 58), wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterhin auf dieses Thema eingegangen. Stattdessen wurde versucht das erhaltene Lactosamin **133** in ein Phosphat zu überführen (Kapitel 4.3.1) und zur erstmaligen Darstellung eines Nucleosiddiphosphatdisaccharides, UDP-LacNAc **8**, mit dem *cycloSal*-Konzept einzusetzen (Kapitel 4.4.7).

Wie bereits erwähnt, kann man Acetale nicht nur auf den hydrogenolytischen und säurekatalysierten hydrolytischen Wegen spalten (Abb. 60). *Feldman et al.* berichteten von Benzylidenspaltung mit Iod in einem Methanol-Dichlormethan-Gemisch in sehr guten Ausbeuten.^[102] Die Acetalspaltung findet entweder bei Raumtemperatur statt oder wird durch kurzzeitiges Erhitzen angeregt. Diese Methode erlaubt selektives Spalten verschiedener Acetale und hat den Vorteil, dass sensible glycosidische Bindungen in Disacchariden nicht gespalten werden.^[103]

Morin et al. beschrieben eine oxidative Spaltung des Benzylidenacetals von dem acetylierten Glucosederivat **169**, dabei wurde 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinon (DDQ) eingesetzt.^[104] Der Vorteil dieses Reagenzes gegenüber der herkömmlichen säurekatalysierten Methode liegt in der Neutralität des Moleküls, so dass auch säurelabile Substituenten und funktionelle Gruppen nicht angegriffen werden. Die Reaktionsbedingungen sind wesentlich milder und das Reagenz wird nur in katalytischen Mengen eingesetzt.

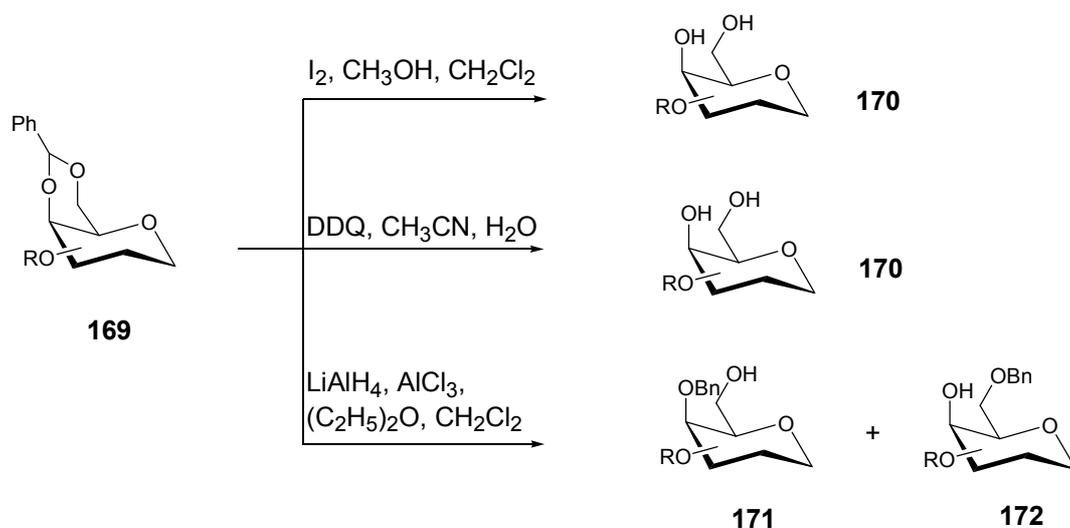


Abbildung 60: Alternative Methoden zur Benzylidenacetalspaltung

Weiterhin sind mehrere Reagenzien bekannt, die eine reduktive Spaltung der Acetale ermöglichen, z. B. Diisobutylaluminiumhydrid^[105], Decaborane^[106], Tetraalkylsilane^[107], Borane^[108] und Lithiumaluminiumhydrid mit Lewisäuren, wie BF_3 oder $AlCl_3$ ^[109]. Diese Reagenzien spalten regioselektiv cyclische Acetale in Hydroxy-O-alkyl- oder Hydroxy-O-arylalkylether. So entstehen aus 4,6-O-Benzylidenacetalderivaten **169** 4- und 6-O-Benzyl geschützte Glycoside **171** und **172**. *Nanasi et al.* untersuchten die Regioselektivität dieser Spaltungen unter Einsatz von

$\text{LiAlH}_4\text{-AlCl}_3$.^[110] Sie stellten fest, dass die Selektivität der Spaltung von den Substituenten am C-3 abhängt. So wird die Spaltung des Acetals an C-6 und die Bildung von 4-O-Benzylglycosiden **171** bevorzugt, wenn sich an der Position 3 des Glycosides eine sterisch anspruchsvolle Gruppe z. B. Benzyl befindet. Dadurch wird die Position 4 abgeschirmt, so dass AlCl_3 einen Komplex nur mit dem freien Elektronenpaar von O-6 bilden kann und folglich die Acetalspaltung an dieser Position stattfindet. Es wurde im Fall des Glucosederivats ausschließlich die Bildung des 4-O-Benzylglucosids beobachtet. Beim Galactosederivat entstanden 4- und 6-O-Benzylgalactosid im Verhältnis 9:1.

4.4 Darstellung von Nucleosiddiphosphatglycosiden aus *cycloSal*-Nucleotiden

Die in unserer Arbeitsgruppe etablierte Methode zur Darstellung der NDP-Glycoside beruht auf dem *cycloSal*-Konzept und nutzt *cycloSal*-Verbindungen als Phosphataktivester (Abb. 61, S. 60).

Das *cycloSal*-Konzept wurde ursprünglich zur selektiven Freisetzung von modifizierten Nucleosidmonophosphaten entwickelt. Im Gegensatz zu vielen literaturbekannten Pro-Nucleotid-Konzepten ist dieses Konzept nicht auf einen enzymatischen Aktivierungsschritt angewiesen, sondern wird durch Steigerung des pH-Wertes in der Zelle chemisch aktiviert. Dieser Vorteil kann auch synthetisch genutzt werden, indem man *cycloSal*-Nucleotide als aktive Phosphatester zur Synthese verschiedener phosphorylierter Biomoleküle einsetzt (Kap. 2.4).

Aufgrund der chemischen Differenzierbarkeit der drei Phosphatesterbindungen in *cycloSal*-Verbindungen erfolgt nach Angriff des Nucleophils als Initialreaktion eine selektive Spaltung der phenolischen Phosphatesterbindung zum Benzylphosphatdiester. In einer anschließenden Spontanreaktion spaltet sich die benzyliche C-O-Bindung und setzt somit ein neues, phosphoryliertes Molekül frei.

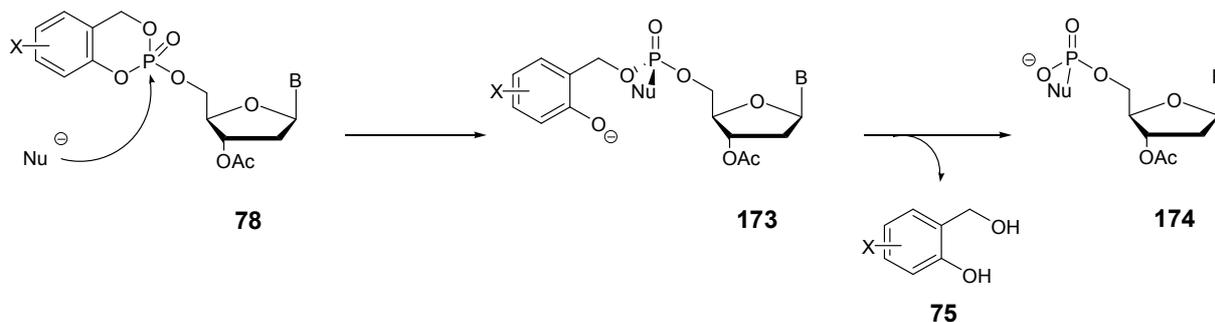


Abbildung 61: Nucleophiler Angriff an einem *cycloSal*-Nucleotid **78**

S. Wendicke konnte erfolgreich *cycloSal*-aktivierte Nucleosidmonophosphate mit verschiedenen Glycosyl-1-phosphaten zu den entsprechenden NDP-Zuckern umsetzen (Abb. 62).^[65] Untersucht wurden dabei die Einflüsse des Lösungsmittels und der Temperatur auf den Reaktionsverlauf (S. 23-24). Des Weiteren untersuchte sie die Abhängigkeit der Ausbeuten von der Lipophilie des Gegenions am Zuckerphosphat sowie dem entstandenen Zuckernucleotid.

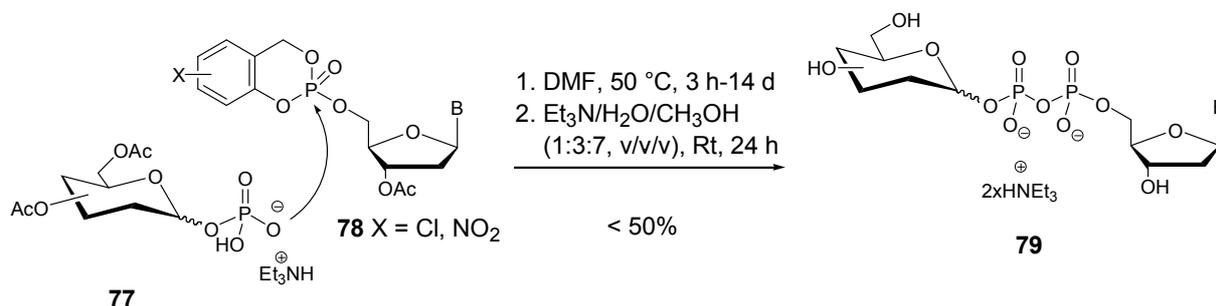


Abbildung 62: Darstellung von NDP-Zuckern mit Hilfe der *cycloSal*-aktivierten Nucleosidmonophosphate **78**

Die Umsetzung eines Äquivalenten des *cycloSal*-Triesters mit 1.2 Äquivalenten Zuckerphosphat erfolgte unter Stickstoffatmosphäre in absolutem DMF. Das Reaktionsgemisch wurde bei 50 °C gerührt und der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt (CH₂Cl₂/CH₃OH, 9:1). Dabei wurde eine vollständige Umsetzung des 5'-Nitro-*cycloSal*-Nucleotids nach 3-5 Stunden beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde bei einem 5'-Chlor-*cycloSal*-Nucleotid selbst nach 14 Tagen keine vollständige Umsetzung festgestellt. Nach anschließender kurzer Aufarbeitung zum Abtrennen der organischen Verunreinigungen wurden die

Acetylschutzgruppen vor der abschließenden Reinigung mit einer Mischung aus Triethylamin/Wasser/Methanol (1:3:7, v/v/v) abgespalten, da die peracetylierten Rohprodukte ein schwieriges chromatographisches Verhalten aufwiesen.^[111] Die Isolierung der stark polaren Produkte gelang säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent. Die Ausbeuten beim Ansatz von 5''-Chlor-*cycloSal*-Nucleotiden bewegten sich im Rahmen von 20% bis 30%. Umsetzungen der 5''-Nitro-*cycloSal*-Nucleotide lieferten die gewünschten Produkte in Ausbeuten von ca. 50%.

Dieses Verfahren stellt eine zuverlässige und reproduzierbare Methode dar. Es muss allerdings noch geklärt werden, warum die gewünschten Produkte nie mit Ausbeuten über 50% entstehen.

4.4.1 Wasserausschluss bei der Kupplung von Glycosylphosphaten und *cycloSal*-Nucleotiden

In eigenen Vorarbeiten konnte die oben beschriebene Methode zur Darstellung von beiden Anomeren des 2'-dGDP-Gal **175a/b** angewendet werden.^[66] Es wurde der 5''-Chlor-*cycloSal*-Triester des 2'-Desoxyguanosins **176** eingesetzt und entsprechende Zuckernucleotide **175a/b** in Ausbeuten von 20% und 22% erhalten.

Da Triester, die stärkere Acceptoren als Substituenten tragen, bessere Ergebnisse versprechen, wurde der Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Anwendung von 5''-Nitro- und 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal*-Nucleotide gelegt.

Die ersten Ansätze zur Darstellung von NDP-Glycosiden wurden mit 5''-NO₂-*cycloSal*-2',3'-O-diacetyluridinmonophosphat **117** als Phosphataktivester durchgeführt. Zum einen war die Synthese von Nitro-Triestern an vielen anderen Nucleosidmodellen bereits erprobt^[63] und zum anderen stellte die Handhabung des Uridins **102** als Nucleosidkomponente bezüglich der Löslichkeit und vorangehenden Reaktionsschritte zur Schützung des Nucleosids weniger Probleme dar (Kap. 4.2.3).

Der *cycloSal*-Triester **117** wurde jeweils mit 1.2 Äquivalenten der im Vakuum vorgetrockneten Zucker-1-phosphate **148b** und **150-151** von β-Gal, α-GalNAc und

α -GlcNAc umgesetzt (Abb. 63). Eine vollständige Umsetzung des Aktivesters **117** wurde in allen Fällen bereits nach dreistündigem Rühren bei 50 °C mittels dünnschichtchromatographischer Kontrolle (Dichlormethan/Methanol, 9:1, v/v) festgestellt. Der abgespaltene 5-Nitrosalicylalkohol wurde durch die Extraktion mit Dichlormethan und Wasser entfernt. Nachdem die wässrige Phase gefriergetrocknet wurde, konnte das Rohprodukt direkt mit einem Gemisch aus Triethylamin, Wasser und Methanol (1:3:7, v/v/v) entschützt werden. Nach erneuter Gefrierd Trocknung wurden die Rohgemische an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

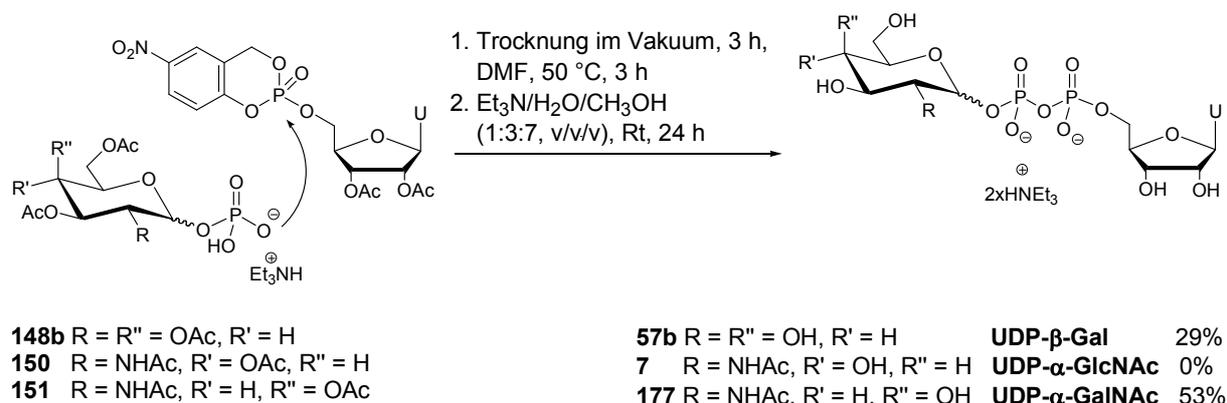


Abbildung 63: Darstellung von UDP-Glycosiden nach *S. Wendicke*

Die erzielten Ergebnisse waren allerdings nicht zufriedenstellend. Das UDP- β -Gal **57b** wurde mit einer Ausbeute von 29% erhalten, dabei waren mehr als zwei chromatographische Reinigungsschritte nötig. Die Isolierung des Produktes wurde durch die Hydrolyse des Triesters und gebildeten Nebenprodukt Uridinmonophosphat **25** erheblich erschwert.

Das UDP- α -GalNAc **177** wurde mit einer Ausbeute von 53% erhalten. Das entsprach zwar der erwarteten Menge, allerdings lagen 28% des Produktes nach mehrfacher chromatographischer Reinigung als Gemisch von UDP-Zucker **177** und Uridinmonophosphat **25** vor (Abb. 64, S. 63). Im Fall der UDP- α -GlcNAc **7** konnten lediglich Uridinmonophosphat **25** und *N*-Acetylglucosamin-1-phosphat **178** isoliert werden.

Die eingesetzten Zuckerphosphate liegen in Form von Triethylammoniumsalzen vor und stellen äußerst hygroskopische Verbindungen dar. Obwohl versucht wurde die

Reaktionen möglichst in wasserfreien Bedingungen durchzuführen, indem die Zuckerphosphate im Vakuum drei Stunden lang vorgetrocknet wurden, ist das vollständige Entfernen der Wasserreste auf diesem Weg nicht möglich. Die mit den hygroskopischen Zuckerphosphaten eingeschleusten Wasserreste können mit dem reaktiven Triester **117** eine Reaktion eingehen, dass die Bildung von Uridinmonophosphat **25** zur Folge hat. Diese Vermutung wird durch das zuletzt beschriebene Beispiel, die fehlgeschlagene Synthese von UDP- α -GlcNAc **7**, bekräftigt. Im Vergleich zu den beiden anderen eingesetzten Zuckerphosphaten **148b** und **151** stellt peracetyliertes Glucosamin-1-phosphat **150** eine viel hygroskopischere Substanz dar, die sich schon beim schnellen Umfüllen in das Reaktionsgefäß "verflüssigte". Somit reichte anscheinend die Trockenzeit im Vakuum, wie für Galactose- und Galactosamin-1-phosphate **148b** und **151**, nicht aus und die Reaktion mit dem Triester endete in der vollständigen Bildung von Uridinmonophosphat **25**.

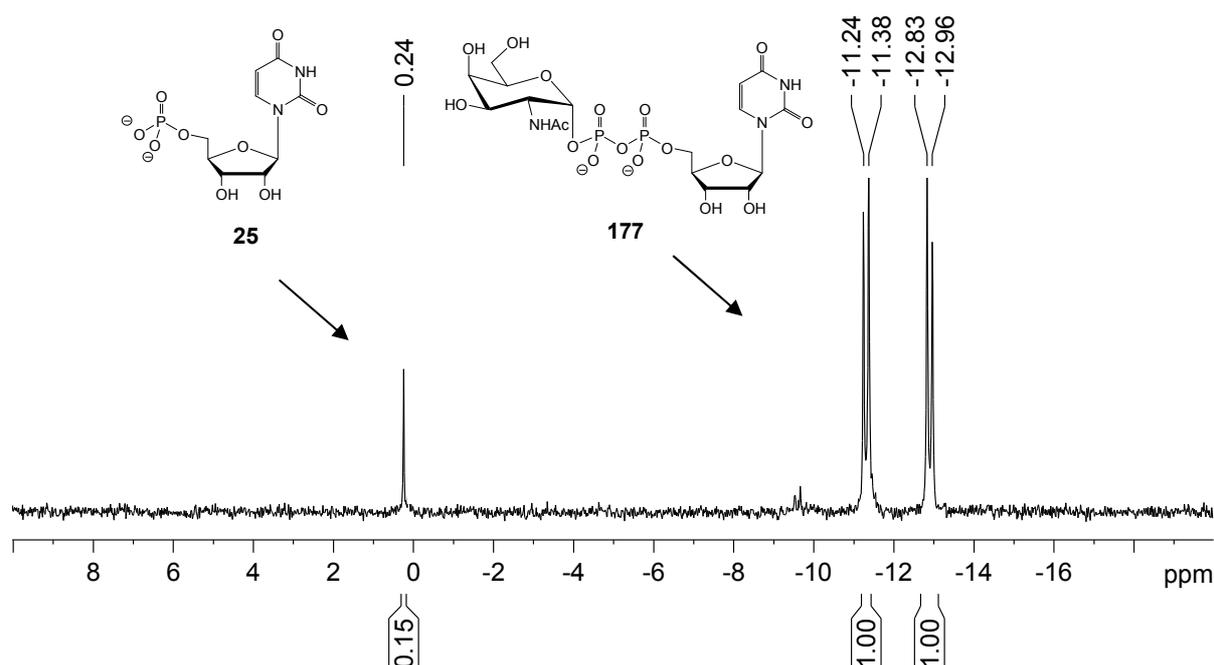


Abbildung 64: ^{31}P -NMR-Spektrum des Gemisches von UDP- α -GalNAc **177** und UMP **25**

Die Nebenreaktion, die Hydrolyse des Triesters, und damit die Bildung des Nucleosidmonophosphats senkt zum einen die Ausbeute der Kupplungsreaktion zum NDP-Zucker und führt zum anderen zu enormen Schwierigkeiten bei der

chromatographischen Trennung des gewünschten Produktes von dem Nebenprodukt. Aus diesem Grund wurden bei dem nächsten Versuch zur Darstellung von UDP- α -GalNAc **177** beide Edukte, *cycloSal*-Nucleotid **177** und Glycosylphosphat **151**, vor der Reaktion für zwei Tage im Ölpumpenvakuum getrocknet und für zwei Stunden in DMF über Molsieb gelagert. Erst nach dieser intensiven Trocknung wurde die Kupplungsreaktion nach der oben beschriebenen Methode durchgeführt (Abb. 65).

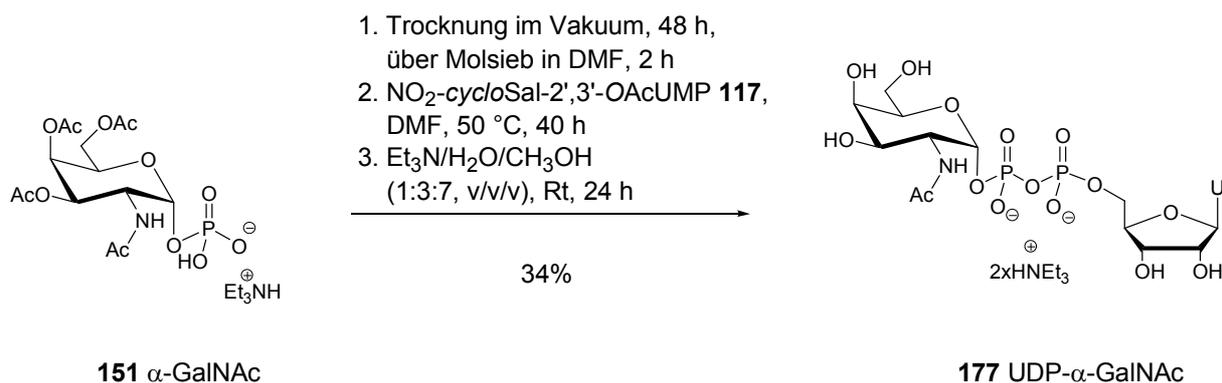


Abbildung 65: Synthese von UDP- α -GalNAc **177** mit intensiver Vortrocknung über Molsieb

Wie vorher schon erwähnt, dauerten die Reaktionen bis zum vollständigen Umsatz des mit einem starken Acceptor substituierten Triesters im Schnitt drei bis fünf Stunden. Hier wurde zum ersten Mal das vollständige Abreagieren des aktiven Phosphatesters **117** nach 40-stündigem Rühren bei 50 °C beobachtet. Mit dem Reaktionsansatz wurde wie zuvor beschrieben fortgefahren und das Produkt, UDP- α -GalNAc **177**, konnte nach zweifachem Reinigen über RP-18-Kieselgel in 34% Ausbeute isoliert werden.

Zwar ist die Ausbeute bei dieser Reaktion nicht zufriedenstellend, aber es wurde wesentlich weniger von dem Nebenprodukt, UMP **25**, gebildet, was die chromatographische Reinigung erleichterte. Bei der bisherigen Reaktionsdurchführung fungierten eingeschleuste Wasserreste neben den Zuckerphosphaten als Nucleophil. Aufgrund der geringeren Größe im Vergleich zu Glycosylphosphaten könnten Hydroxydionen viel schneller das elektrophile Phosphoratom im *cycloSal*-Nucleotid nucleophil angreifen. Aus diesem Grund

beobachtete man eine schnellere Umsetzung des *cycloSal*-Triesters und vermehrte Bildung des Nucleosidmonophosphates. Durch das intensive Vortrocknen konnten die Wasserreste dem Reaktionsansatz soweit entzogen werden, so dass das Phosphoratom im Triester nur langsam von dem schwächeren Nucleophil, dem Zuckerphosphat, angegriffen werden konnte.

Obwohl durch das Vortrocknen die Ausbeute etwas erhöht werden konnte, ist dieser Wert immer noch nicht zufriedenstellend. Außerdem muss noch geklärt werden, warum trotz der nicht vorhandenen Wasserreste im Reaktionsansatz eine Bildung des Uridinmonophosphates beobachtet wurde.

4.4.2 Stabilität der Nucleosiddiphosphatglycoside

Das Entstehen des Nucleosidmonophosphates trotz des gründlichen Trocknens der Reaktanden vor der Kupplung lässt darauf schließen, dass es den entstehenden Produkten, den NDP-Glycosiden, eventuell an Stabilität mangelt (Abb. 66).

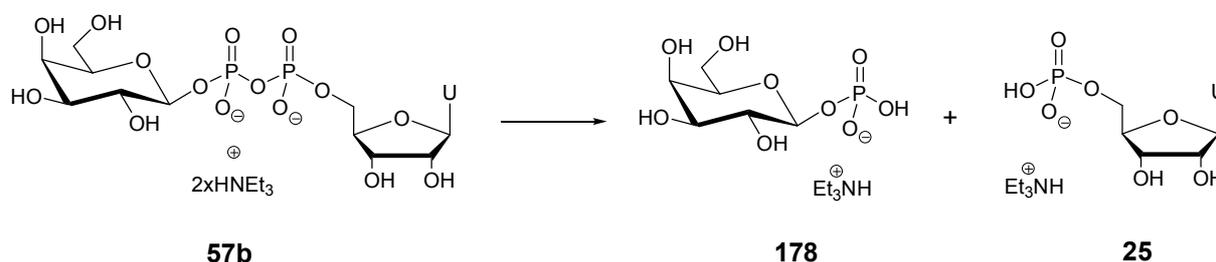


Abbildung 66: Zersetzungsprodukte von Zuckernucleotiden

In der Literatur ist die Darstellung und Isolierung verschiedener Zuckernucleotide auf unterschiedlichen Wegen beschrieben. In den meisten Fällen wurden diese Verbindungen bei Normalbedingungen als stabil beschrieben.^[29,31,41] So liegt die Vermutung nahe, dass die in unserem Syntheseprotokoll verwendeten Reaktionsbedingungen für die Zersetzung neugebildeter NDP-Zucker verantwortlich sind. In Abbildung 66 sind mögliche Zersetzungsprodukte der Zuckernucleotide dargestellt, die durch Bruch der Pyrophosphatbrücke entstehen könnten. Das Diphosphat wird in den NDP-Zuckern als schwächste Stelle angesehen, da es sich dabei um eine energiereiche Phosphoanhydridbindung handelt. Aus den hohen Energien resultieren aber auch thermische Instabilität und

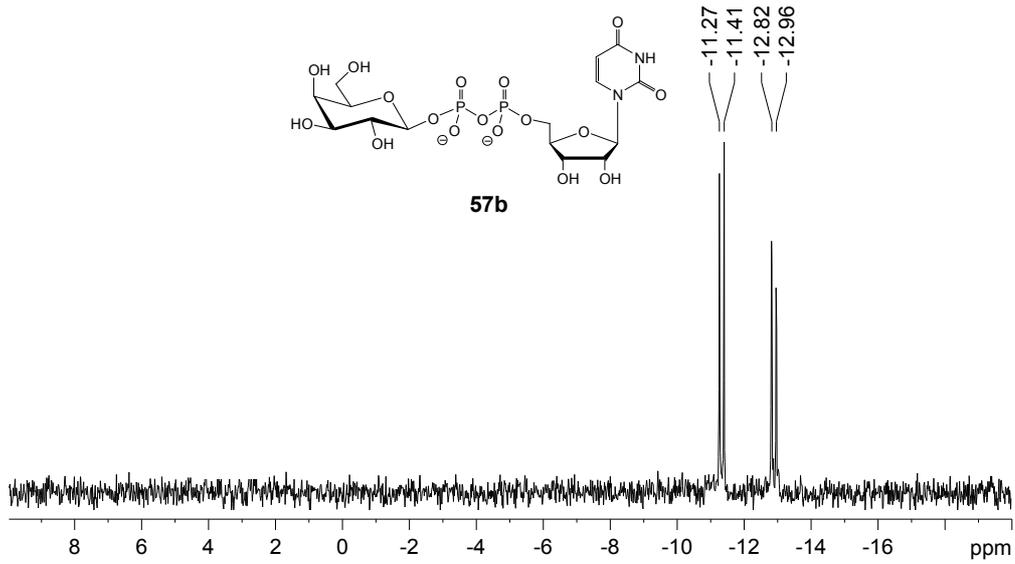
Hydrolyseempfindlichkeit.^[112] Durch Hydrolyse solcher Bindungen wird eine große Menge Energie freigesetzt und die stabileren Monophosphate gebildet. Auf diesem Prinzip basiert zum Beispiel biochemische Energiegewinnung aus ATP durch Hydrolyse mit ATPasen.^[6]

Zunächst wurden die Reaktionsbedingungen von der Kupplung des *cycloSal*-Triesters mit dem Zuckerphosphat untersucht. Für diesen Zweck wurde bereits vorhandene UDP- β -Gal **57b** in abs. DMF gelöst und bei 50 °C gerührt. Die Veränderungen in der angesetzten Lösung wurden mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie verfolgt (Abb. 67, S. 67). Die beiden Phosphoratome des Produktes zeigen typische Signale bei -11 und -12 ppm, die durch geminale ²J_{PP}-Kopplungen jeweils ein Dublett ausbilden (Abb. 67 A, S. 67). Nach 20 Stunden konnte man eindeutig die Bildung der Zerfallsprodukte beobachten. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits ca. 20% des Produktes zerfallen (Abb. 67 B, S. 67). Der Fortschritt der Zersetzung wird durch wachsende Singulettsignale bei 0.78 und 8.64 ppm deutlich. Das Signal bei 0.78 ppm konnte dem Uridinmonophosphat **25** zugeordnet werden. Bei dem Signal bei 8.64 ppm handelt es sich nicht um den erwarteten β -Galactose-1-phosphat **178** sondern um das cyclische Phosphatdiester der Galactose **193** (Abb. 67 B, S. 67). Eine vollständige Zersetzung des Zuckernucleotids wurde nach 8 Tagen festgestellt (Abb. 67 C, S. 67).

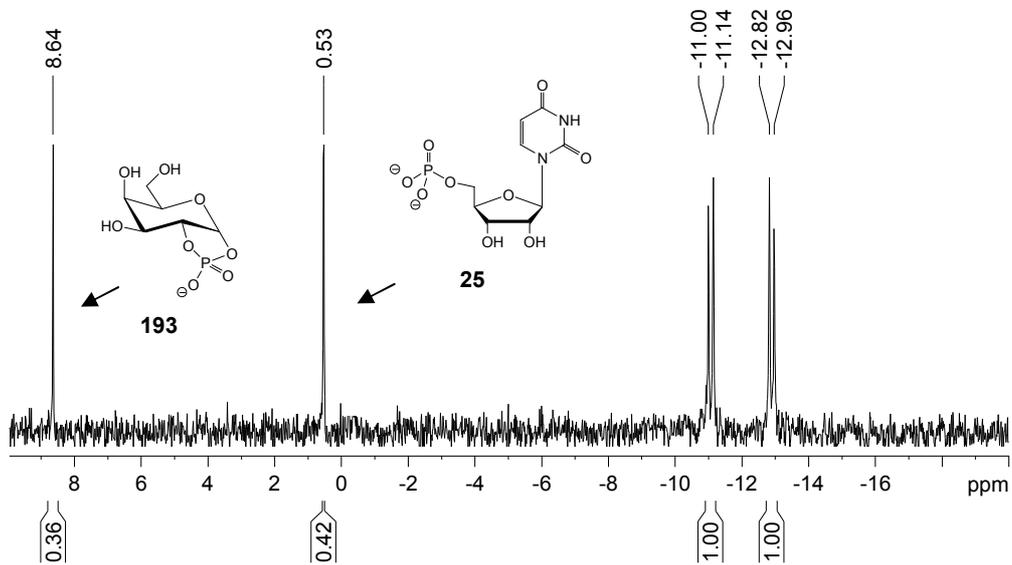
Wie es im vorherigen Kapitel 4.4.1 beschrieben, wird eine vollständige Umsatzung des *cycloSal*-Nucleotids während der Kupplung zu dem peracetylierten NDP-Zucker nach 40 Stunden bei 50 °C beobachtet. Allerdings findet in dieser Zeit bereits die Zersetzung eines merklichen Teils des gebildeten Produktes statt, so dass die Ausbeuten nicht über 50% steigen. Zusätzlich führen auf diesem Weg gebildete Nucleosidmonophosphate zu Schwierigkeiten bei der Chromatographie, was durch häufiges Wiederholen der Reinigungsschritte zu einem Verlust an Produkt und somit zu einer Ausbeuteminimierung führt.

Des Weiteren wurde die Stabilität der UDP- β -Gal **57b** in abs. DMF bei Raumtemperatur untersucht und mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie verfolgt. Erfreulicherweise konnte auch nach mehreren Tagen keine Zersetzung des Zuckernucleotids festgestellt werden. Aus diesem Grund werden Synthesen von NDP-Glycosiden weiterhin nur bei Raumtemperatur durchgeführt.

A



B



C

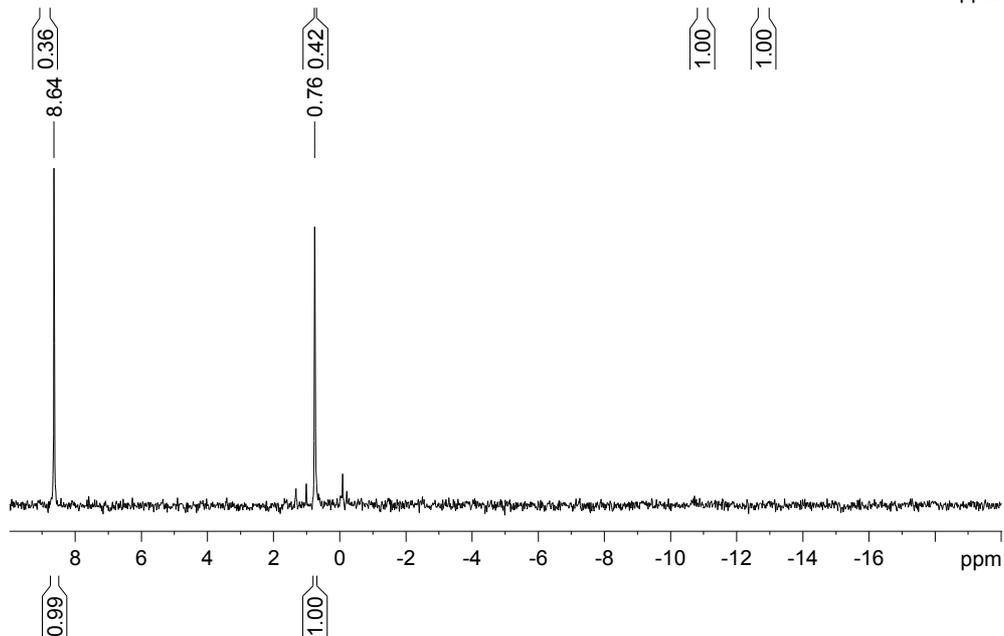
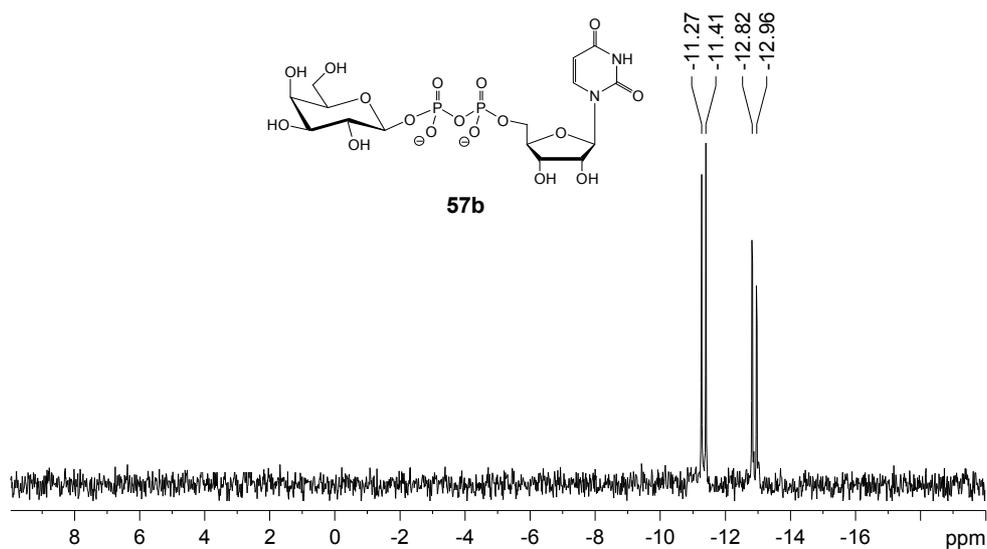
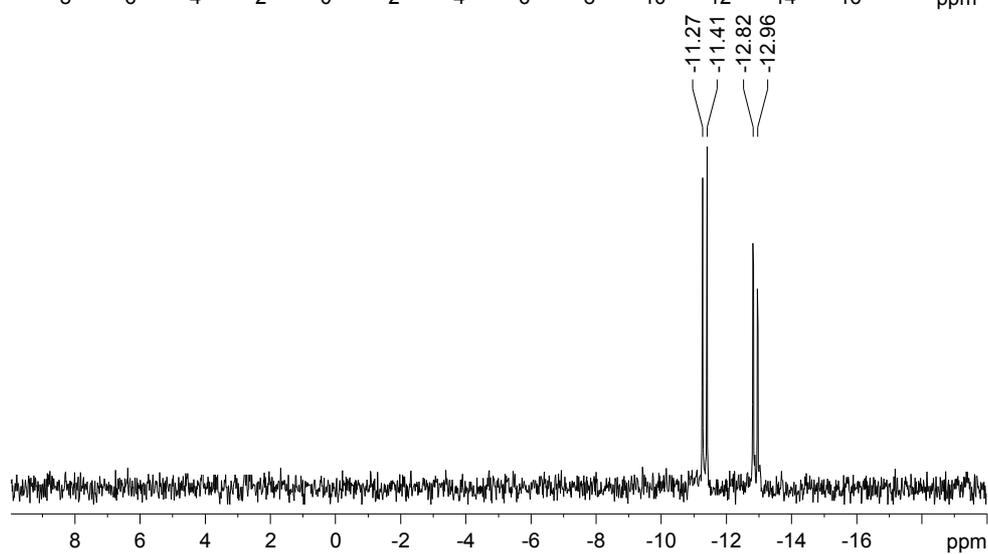


Abbildung 67: ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung (D_2O , 162 MHz) der Stabilität des UDP-β-Gal **57b** unter den Kupplungsbedingungen (A: 0 h, B: 20 h, C: 8 d)

A



B



C

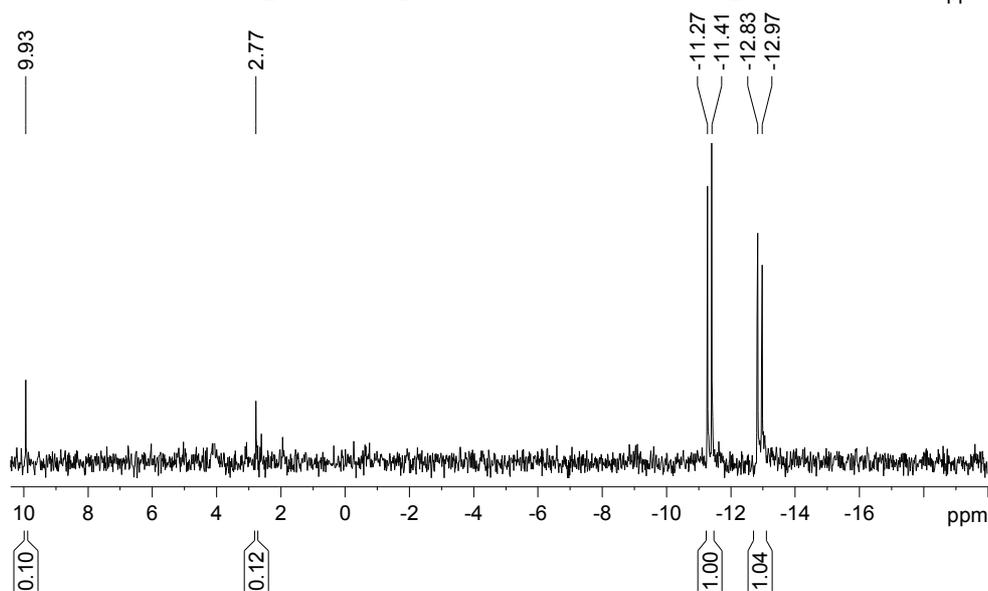


Abbildung 68: ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung (D_2O , 162 MHz) der Stabilität des UDP- β -Gal **57b** während der Acetylgruppenabspaltung (A: 0 h, B: 20 h, C: 8 d)

Bei dem zweiten Teil der Zuckernucleotidsynthese werden Acetylschutzgruppen mit Triethylamin in einem Wasser/Methanol-Gemisch gespalten. Obwohl diese Methode bereits mehrfach beschrieben und auch bei NDP-Zuckern angewendet wurde,^[111] wurde die Stabilität der Zuckernucleotide unter den Abspaltbedingungen untersucht. Für diesen Zweck wurde UDP- β -Gal **57b** in einem Gemisch aus Triethylamin, Wasser und Methanol (1:3:7, v/v/v) gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Um eventuelle Veränderungen in der angesetzten Lösung zu verfolgen, wurden in regelmäßigen Abständen Proben abgenommen und mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie untersucht (Abb. 68, S. 68).

Neben den erwarteten typischen Signalen bei -11 und -12 ppm in Form von zwei Dubletts wurden in den für die Abspaltung der Acetylgruppen benötigten Zeiten keine neuen Signale gefunden (Abb. 68, A und B, S. 68). Erst nach acht Tagen wurde eine Bildung des Uridinmonophosphats **25** und des cyclischen Phosphatdiesters der Galactose **193** beobachtet. Die Zersetzung wurde durch wachsende Singulettsignale bei 2.77 und 9.93 ppm deutlich (Abb. 68, C, S. 68). Da allerdings die komplette Acetylgruppenabspaltung in den meisten Fällen maximal nach 24 Stunden abgeschlossen ist, muss diese Zersetzung nach acht Tagen nicht berücksichtigt werden und die Abspaltbedingungen nach unserem Syntheseprotokoll können weiterhin angewendet werden.

4.4.3 Einfluss der Zuckerphosphatmenge auf die Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute der Nucleosiddiphosphatglycoside

Nachdem die wesentlichen Bedingungen der Reaktionsdurchführung zur Darstellung von NDP-Zuckern nach der von *S. Wendicke* entwickelten Methode untersucht und optimiert wurden, sollte auch der Einfluss des Nucleophils auf den Erfolg dieser Synthese getestet werden.

S. Wendicke untersuchte bereits in ihrer Arbeit den Einfluss der Gegenionen auf die Nucleophilie der Zuckerphosphate sowie die Wirkung der Gegenionen auf das chromatographische Verhalten resultierender NDP-Glycoside. Sie stellte fest, dass ein größeres und lipophileres Gegenion, wie z. B. tetra-*n*-Butylammonium, das die

Nucleophilie des Zuckerphosphates erhöhen sollte, keinerlei Auswirkung auf die Reaktionszeiten hatte. Außerdem wirkten sich die stark lipophilen Ionen nachteilig auf das Elutionsverhalten des gebildeten Produktes aus, so dass optimale Ergebnisse bei der Reinigung durch Umkehrphasenchromatographie mit Triethylammoniumsalzen der Produkte erreicht wurden.

Bei den Synthesen von Nucleosid-5'-di- und- triphosphaten wurde ein positiver Einfluss der Menge an Nucleophil auf die Ausbeuten verzeichnet.^[63] Auch bei der Festphasensynthese von Nucleosid-5'-di- und- triphosphaten sowie NDP-Glycopyranosen wirkte sich ein hoher Überschuss des Nucleophils vorteilhaft auf die Ausbeuten aus.^[113]

Um spätere Schwierigkeiten bei der Chromatographie durch einen hohen Anteil des restlichen Zuckermonophosphates zu vermeiden, wurden die Kupplungen zu dem gewünschten NDP-Glycosid mit zwei und drei Äquivalenten des Glycosidphosphates durchgeführt (Abb. 69). *S. Wolf* hatte ähnliche Untersuchung bei der Synthese von CDP- β -D-Glucose durchgeführt und der Fortschritt der Kupplungen mittels HPLC verfolgt. Wie erwartet konnte mit höheren Äquivalenten an Nucleophil eine deutlich höhere Produktbildung beobachtet werden. Die Auswirkung des hohen Überschusses an Glycosidphosphaten auf die chromatographische Reinigung wurde dabei nicht untersucht.^[114]

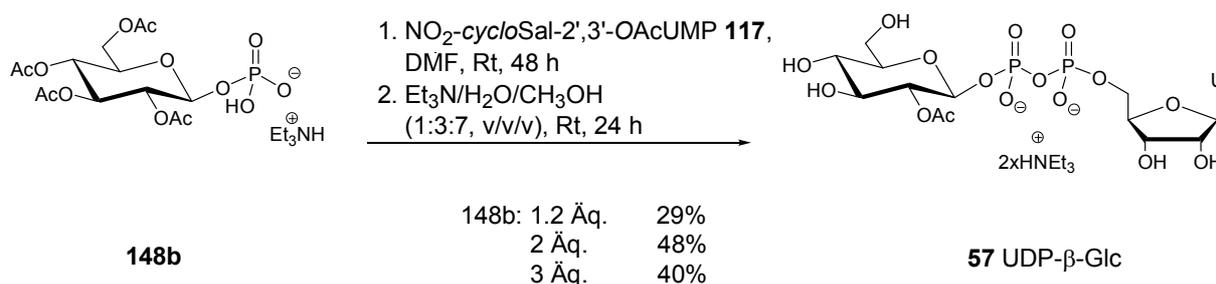


Abbildung 69: Einfluss der Zuckerphosphatmenge auf die Synthese von UDP- β -Glc **57**

Nach den Ergebnissen aus Kapitel 4.4.1, wurden Reaktanden, 5'-Nitro-cycloSal-UMP **117** und β -Glc-1-phosphat **148b**, zum Entfernen sämtlicher Feuchtigkeitsreste vorgetrocknet. Weiterhin wurde noch eine Änderung am

ursprünglichen Syntheseprotokoll vorgenommen. Damit zu jedem Zeitpunkt der Reaktion ein Überschuss des Nucleophils vorlag und eine schnelle Umsetzung gewährleistet ist, wurde die Zugabereihenfolge der Reaktanden geändert.^[114] So wurde das in abs. DMF gelöste *cycloSal*-Nucleotid **117** tropfenweise zu dem Zuckerphosphat **148b** über zwei Stunden zugegeben. Eine vollständige Umsetzung des Aktivesters **117** wurde erst nach 48-stündigem Rühren bei Raumtemperatur festgestellt. Der abgespaltene 5-Nitrosalicylalkohol wurde durch die Extraktion mit Dichlormethan und Wasser entfernt. Nachdem die wässrige Phase gefriergetrocknet wurde, wurden die Acetylschutzgruppen innerhalb von 24 Stunden abgespalten. Nach erneuter Gefrierdrocknung wurden die Rohgemische mittels RP18-Kieselgel mit Wasser chromatographiert.

Die Synthese mit zwei Äquivalenten β -Glc-1-phosphat **148b** lieferte UDP- β -Glc **57** in einer Ausbeute von 48%. Im Vergleich zu dem ursprünglichen Syntheseprotokoll konnte die Ausbeute um das anderthalbfache gesteigert werden. Die Umsetzung mit drei Äquivalenten des Nucleophils ergab UDP- β -Glc **57b** in einer Ausbeute von 40%, dabei bestand die größte Schwierigkeit in der Chromatographie, was durch den Überschuss an Zuckerphosphat zu erwarten war. Hier musste der Reinigungsschritt fünf Mal wiederholt werden, was zu erheblichen Ausbeuteeinbußen führte.

Für die zukünftigen Synthesen der NDP-Zucker ist es also sinnvoll zwei Äquivalente des Nucleophils einzusetzen, da dies ein positives Ergebnis hinsichtlich der Ausbeute darstellt und keine nachteilige Wirkung auf die chromatographische Reinigung ausübt.

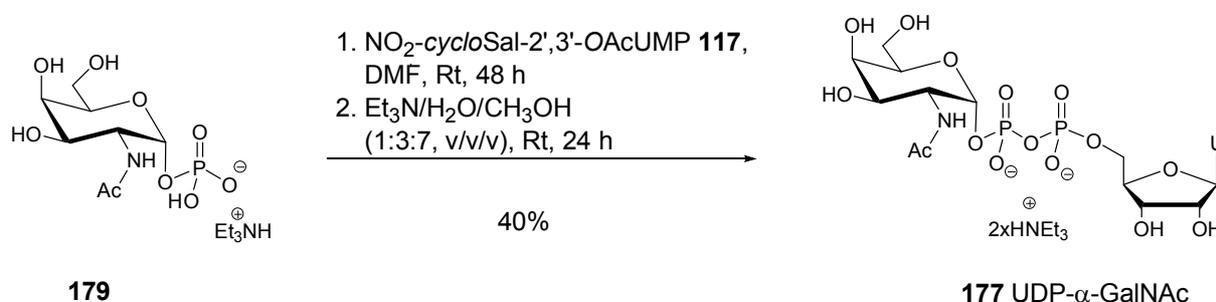


Abbildung 70: Synthese der UDP- α -GalNAc **177** mit deacetyliertem GalNAc-phosphat **179**

Der einzige denkbare Nachteil wäre, dass die im Überschuss eingesetzten Zuckerphosphate nicht in gleicher Form reisoliert werden. Für teure und schwer synthetisierbare Zuckerphosphate wäre es ein intolerabler Verlust. Allerdings kann in den meisten Fällen der Großteil der Zuckerphosphate in deacetylierter Form wieder isoliert werden. Da auch die Morpholidat-Kupplungen (Kap. 2.2.1) mit ungeschützten Zuckerphosphaten durchgeführt wurden, bietet sich hier die Möglichkeit die reisolierten deacetylierte Zuckerphosphate für die Synthese der NDP-Zucker nach unserem Syntheseprotokoll einzusetzen (Abb. 70, S. 71).

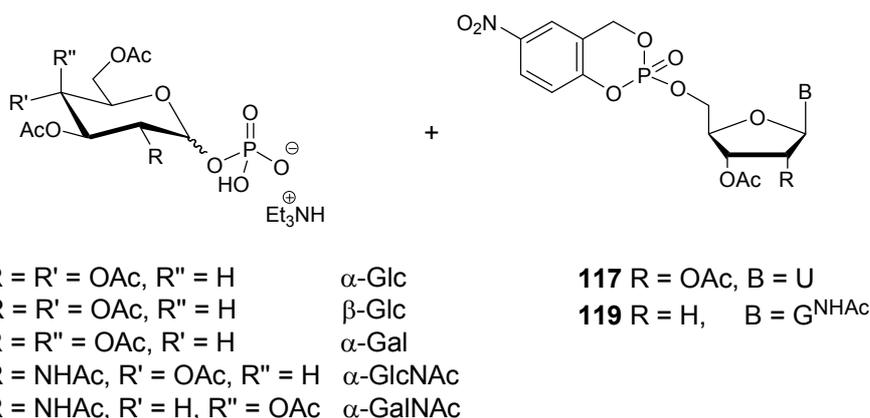
Die Umsetzung erfolgte mit zwei Äquivalenten des deacetylierten GalNAc-phosphates **179**. Der einzige Unterschied zu dem zuvor beschriebenen Syntheseprotokoll ist, dass hier aufgrund der fehlenden Acetylgruppen die doppelte Menge an abs. DMF für das vollständige Lösen benötigt wurde. Die Reaktionszeiten blieben gleich und die Ausbeute von 40% war mit den anderen Synthesen sogar vergleichbar.

4.4.4 Synthese der Nucleosiddiphosphatglycoside nach den in Kapiteln 4.4.1- 4.4.3 optimierten Methode

Für die folgenden Umsetzungen wurde das ursprüngliche Syntheseprotokoll gemäß den in Kapiteln 4.4.1- 4.4.3 gesammelten Erfahrungen überarbeitet und wie folgt geändert: Ein Äquivalent des *cycloSal*-Nucleosidmonophosphats sowie zwei Äquivalente des Glycosid-1-phosphates wurden 48 Stunden im Ölpumpenvakuum und anschließend zwei Stunden über Molsieb in abs. DMF vorgetrocknet. Das in DMF gelöste *cycloSal*-Nucleotid wurde tropfenweise zu dem Zuckerphosphat über zwei Stunden zugegeben und der Reaktionsansatz 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Acetylgruppenabspaltung und Isolierung geschah nach der alten Methode (s. Kap. 4.4, S. 60-61).

Die generelle Anwendbarkeit dieser Methode wurde durch die Synthese der UDP-Glycoside **1**, **7** und **177** sowie dGDP-Glycoside **175a-180b** belegt (Abb. 71, S. 73). Die erzielten Ausbeuten lagen zwischen 29% für dGDP- α -Gal **175a** und 61% für UDP- α -GalNAc **177**.

Die etwas besseren Ausbeuten für UDP-Glycoside **1a**, **7** und **177** können durch das allgemeine nicht komplizierte synthetische Verhalten von Uridinderivaten erklärt werden. Im Gegensatz dazu bereiten 2'-Desoxyguanosinderivate durch ihre schlechte Löslichkeit Schwierigkeiten in der Handhabung. Zum anderen lassen sich die dGDP-Zucker **175a** und **180b** nicht so gut mit Färbereagenzien visualisieren, so dass kleinere Produktmengen nicht detektierbar sind und möglicherweise verlorengehen.



1. Trocknung im Vakuum, 48 h, über Molsieb in abs. DMF, 2 h
2. abs. DMF, Rt, 48 h
3. Et₃N/H₂O/CH₃OH (1:3:7, v/v/v), Rt, 24 h
4. RP-18-Chromatographie

1a	UDP-α-Glc	41%
7	UDP-α-GlcNAc	39%
177	UDP-α-GalNAc	61%
180b	dGDP-β-Glc	34%
175a	dGDP-α-Gal	29%

Abbildung 71: Synthese der UDP- sowie dGDP-Glycoside aus 5'-Nitro-cycloSal-NMPs **117** und **119**

Die hier erzielten Ausbeuten sind jedoch immer noch optimierbar. Die Ausbeuteverluste können auf Trennschwierigkeiten bei der Chromatographie zurückgeführt werden. In allen Fällen konnten die erzielten NDP-Zucker nur schwer von in geringen Mengen gebildeten Uridinmonophosphat **25** bzw. 2'-Desoxyguanosinmonophosphat **181** getrennt werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich eine sorgfältige Trocknung der Ausgangsverbindungen als ausgesprochen wichtig für die anschließende Produktbildung herausstellte. Weiterhin wirkte sich der doppelte Überschuss an Zuckerphosphat sowie die langsame Zugabe des *cycloSal*-Nucleotides positiv auf die Ausbeute der gewünschten NDP-Glycoside aus. Allerdings konnte keine Erklärung für die Bildung der Nebenprodukte gefunden werden, obwohl zahlreiche Vorkehrungen zur Vermeidung des Entstehens von NMPs unternommen wurden und die Umsetzung des *cycloSal*-Triesters vor der wässrigen Aufarbeitung laut Dünnschichtchromatographie vollständig abgelaufen ist. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Herausforderung, die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes so zu optimieren, um anschließende Isolierung der NDP-Glycoside mit RP-18-Chromatographie zu erleichtern.

Weiterhin sollte eine bessere Reinigung der *cycloSal*-Nucleotide bezüglich der Steigerung von Ausbeuten der NDP-Glycoside in Betracht gezogen werden. Auf Grund der ^{31}P - und ^1H -NMR-Spektren der *cycloSal*-Triester wurden diese bisher als rein genug für die Zuckernucleotidsynthese eingestuft. Der Nachteil liegt allerdings darin, dass die nicht gereinigten Verbindungen teilweise noch anorganische Verunreinigungen enthalten können, die durch Spektroskopie nicht erkannt werden, und somit die Ausbeutebestimmung verfälschen.

4.4.5 Erste Ansätze zur Darstellung von Nucleosiddiphosphatglycosiden mit alkalischer Phosphatase

Bisher wurden die Reaktionsbedingungen so optimiert, dass die Synthesen von NDP-Zuckern schneller und effizienter verliefen. Obwohl die Umsetzungen laut Dünnschichtchromatographie vollständig waren, blieben die Ausbeuten eher durchschnittlich. Dabei wurden die größeren Ausbeuteverluste nach mehrfachen Reinigungen durch RP-18-Chromatographie verzeichnet. Diese chromatographischen Trennungen benötigte man zur effizienten Entfernung des Nebenproduktes (Nucleosidmonophosphat) von dem gewünschten Produkt (Zuckernucleotid), die bei dem gewählten Laufmittel (Wasser) häufig coeluierten.

In der Literatur ist eine Reihe der Isolierungsmethoden für NDP-Zucker beschrieben worden, wie Größenausschlußchromatographie über Biogel^[115,116] oder Sephadex LH 20^[117,118], Ionenaustauscherchromatographie über Diethylaminoethyl-Cellulose^[46] oder DOWEX 50WX8^[48] und semipräparative HPLC über eine RP-18-Säule^[119]. Die genannten Methoden waren jedoch nicht so erfolgreich wie die beschriebene RP18-Chromatographie. Genauso wurden unterschiedliche Laufmittel, wie Ammoniumsalzlösungen, Acetonitril und Aceton getestet. Die besten Ergebnisse erzielte man jedoch mit Wasser als Elutionsmittel. So konnte hier keine bemerkenswerte Optimierung vorgenommen werden.

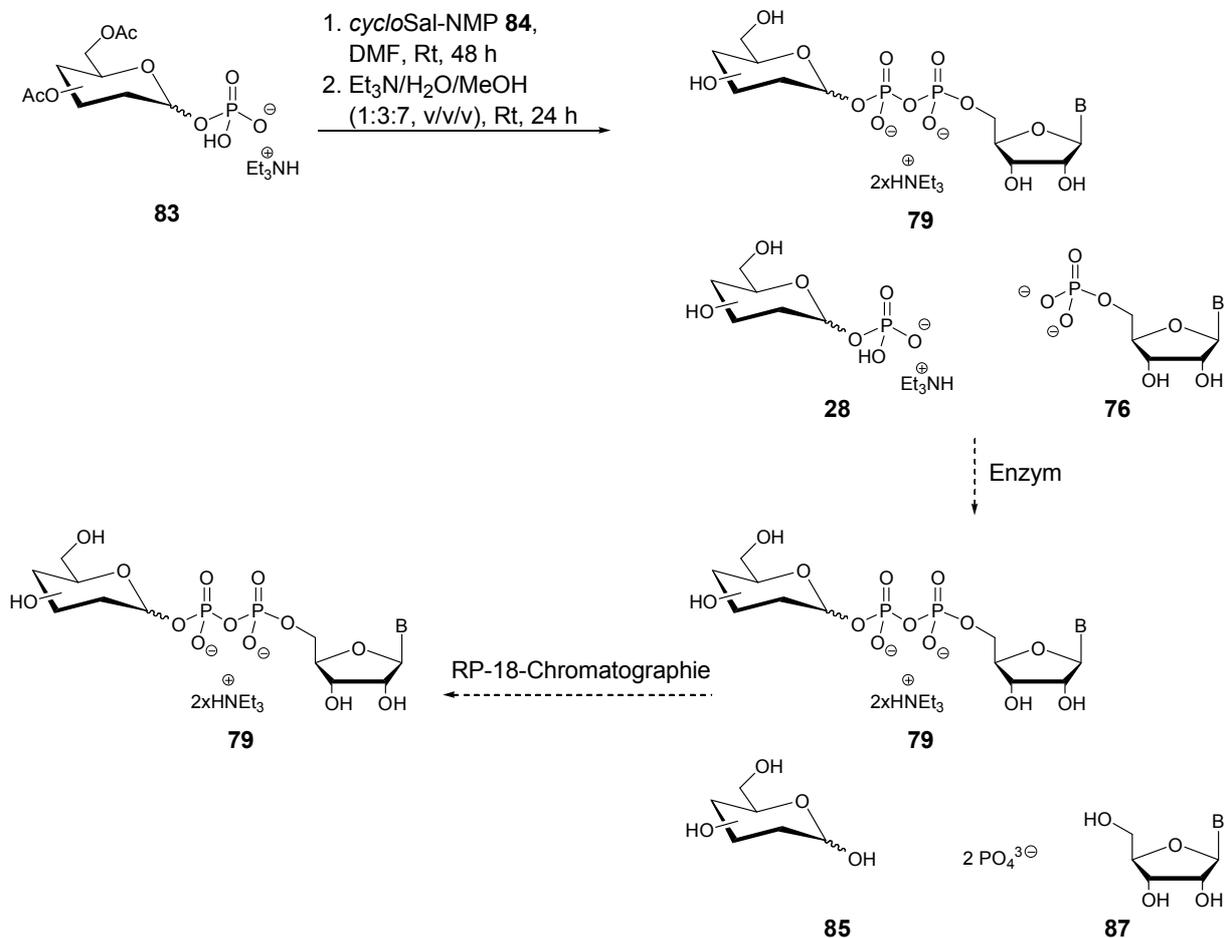


Abbildung 72: Nebenprodukte der Zuckernucleotidsynthese und deren Dephosphorylierung

Die Schwierigkeiten bei der Isolierung von NDP-Zuckern werden durch gleichzeitiges Eluieren des NMPs bereitet, so könnte man diese Verbindungen in weniger polare Substanzen überführen und somit längere Elutionszeiten erzwingen (Abb. 72).

Solche Ansätze wurden zum Beispiel bei den Synthesen der NDP-Zucker aus aktivierten Glycosiden und NDPs praktiziert, indem man die in Überschüssen eingesetzte NDPs enzymatisch zu Nucleosiden zersetzt.^[45-49]

In der Natur trifft man eine Vielzahl der Phosphorsäureester mit einer großen Funktionsvielfalt. Den Auf- und Abbau dieser Ester übernehmen Enzyme, wie z. B. Kinasen, Nucleasen, Ribonucleasen, Phospholipasen und Phosphatasen.^[120] Zu Substraten der Phosphatasen zählen kleine phosphorylierte Metabolite, wie Zuckerphosphate und Nucleotide, sowie phosphorylierte Proteine.^[121]

Die große Familie der Phosphatasen wird aufgrund der Funktionsspezifität in drei Gruppen eingeteilt: spezifische und unspezifische Phosphatasen sowie Phosphoproteinphosphatasen. Einige Phosphoesterasen nutzen einen nucleophilen Aminosäurerest des aktiven Zentrums als Acceptor der Phosphorylgruppe, andere dagegen übertragen die Phosphorylgruppe direkt auf ein Wassermolekül. Letztere sind meistens binucleare Metallproteine und nutzen einen Zwei-Metallionen-Mechanismus, um die Phosphatester zu binden und die folgende Hydrolyse zu katalysieren. Dabei sorgt die Lewis-Acidität des einen Metalls für die Deprotonierung des nucleophil angreifenden Wassermoleküls, während das zweite Metallion die Katalyse durch Ladungsstabilisierung unterstützt.

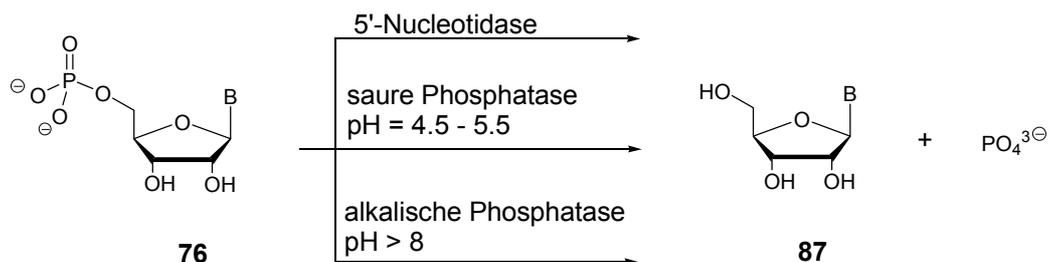


Abbildung 73: Enzymatische Überführung der NMPs **76** in Nucleoside **87**

Die Dephosphorylierung des Nucleosidmonophosphates übernimmt meistens 5'-Nucleotidase (5'-NT) sowie saure und alkalische Phosphatasen aus der Gruppe der unspezifischen Phosphoesterasen (Abb. 73). Es muss allerdings die Stabilität des sich ebenfalls im Reaktionsgemisch befindenden NDP-Zuckers in Betracht gezogen werden. So zählt dieser zum Beispiel auch zu den Substraten von 5'-NT

und wird zu Nucleosid und Zuckerphosphat abgebaut.^[122] Die Substrate der sauren Phosphatase sind dagegen nur freie Phosphate, allerdings wird Dephosphorylierung nur in saurem Medium vorgenommen. Allerdings wird die Pyrophosphatbrücke der NDP-Zucker bei den sauren Bedingungen instabil und führt zur Bildung der Monophosphate des Zuckers und des Nucleosids. Die alkalische Phosphatase (AP) führt die Dephosphorylierung bereits in schwachen alkalischen Medien (pH 8) aus. Wie Stabilitätstests in Kapitel 4.4.2 gezeigt haben, bleiben die Nucleosidiphosphatglycoside bei diesen Bedingungen über einen längeren Zeitraum stabil.

Die alkalische Phosphatase gehört mit zwei Zink- und einem Magnesiumion im aktiven Zentrum zu der Gruppe der binuclearen Metallproteine (Abb. 74), stellt jedoch eine bemerkenswerte Ausnahme dieser Gruppe dar. Sie reagiert nicht nach dem typischen Zwei-Metallionen-Mechanismus, sondern über ein Phosphoseryl-Intermediat. Hier wird die Deprotonierung des hydrolysierenden Wassers von einem Serinrest übernommen (Abb. 75, S. 78).^[123]

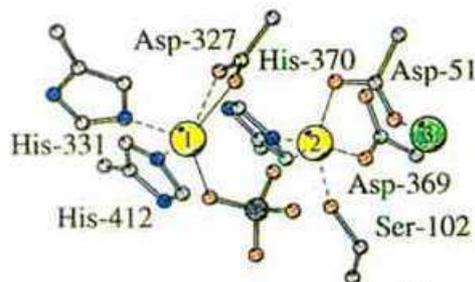
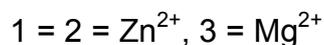


Abbildung 74: Bindung des Phosphates in der aktiven Seite von AP



Zur Überführung der Nucleosiddiphosphate in Nucleoside für eine effizientere Isolierung der Zuckernucleotide verwendeten *Hanessian et al.*, *Hindsgaul et al.*, *Jakeman et al.* für 0.1 mmol der eingesetzten Phosphatgruppe 25 U alkalischer Phosphatase, isoliert aus Kalbsdarm.^[46-48] Die beschriebenen Reaktionsbedingungen wurden für die Synthese der Zuckernucleotide mit Hilfe der *cycloSal*-Triester unverändert übernommen, um das überschüssige Zuckerphosphat sowie das entstandene NMP zu zersetzen.

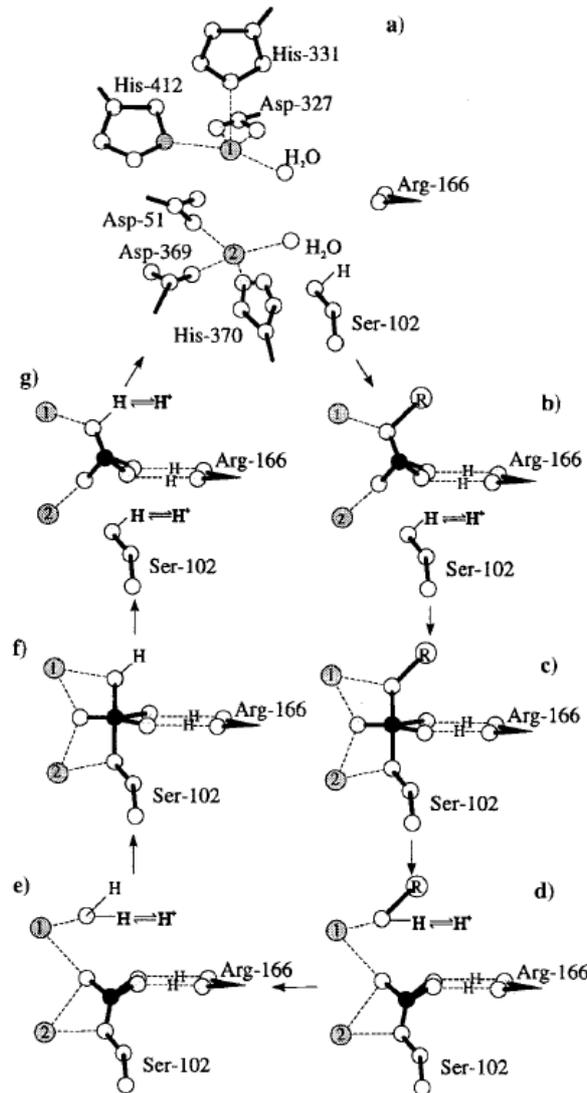


Abbildung 75: postulierter Mechanismus für die Hydrolyse eines Phosphomonoesters durch die AP

Zunächst erfolgte die Synthese der UDP- α -Glc **1a** nach dem in Kapitel 4.4.4 beschriebenen Syntheseprotokoll (Abb. 76, S. 79). Nachdem der Reaktionsansatz deacetyliert und gefriergetrocknet wurde, wurde das Rohgemisch mit Wasser aufgenommen und mit Triethylamin ein pH-Wert von 8 eingestellt. Die Lösung wurde mit je 25 U alkalischer Phosphatase pro 0.1 mmol eingesetztem Phosphat, einschließlich 5''-Nitro-*cyclo*Sal-UMP **117**, versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 16 Stunden wurde eine vollständige Umsetzung der Monophosphate, UMP **25** und α -Glucose-1-phosphat **184** mittels Dünnschichtchromatographie (*i*PrOH/1M NH₄Ac, 1:2, v/v) festgestellt und das Gemisch gefriergetrocknet.

Anschließend erfolgte die Isolierung der UDP- α -Glc **1a** über RP-18-Chromatographie, dabei konnte das Produkt bereits nach der ersten Trennung sauber erhalten werden. Allerdings war die Ausbeute von 13% verwunderlich, denn laut Dünnschichtchromatographie verlief die Umsetzung von dem Triester **117** problemlos und vollständig und auch die Bildung des Nebenproduktes UMP **25** wurde auf weniger als 10% ermittelt.

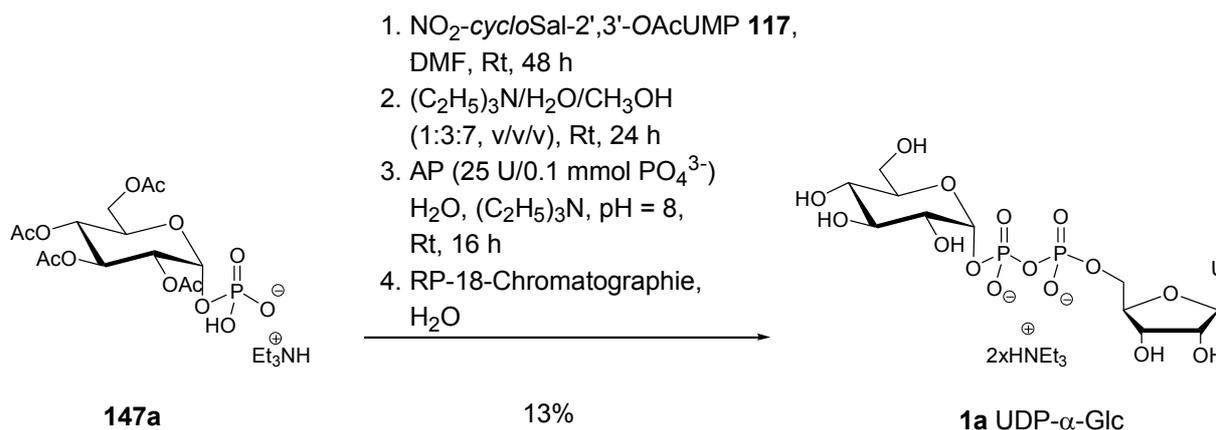


Abbildung 76: Synthese von UDP- α -Glc **1a** mit Einsatz von 25 U AP

Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob Zuckernucleotide genügend Stabilität gegenüber der alkalischen Phosphatase aufweisen. *Hof et al.* berichteten von der Zersetzung der NDP-Zucker mit Nucleotidpyrophosphatase und alkalischer Phosphatase sowie erfolgreicher Inhibierung dieser Enzyme mit Dimercaptopropanol.^[124] *Ferrieres et al.* verwendete bei der Synthese der NDP-Furanosen aus durch thioetherverbrückten Benzimidazol aktivierten Furanosen und Nucleosiddiphosphaten pro 0.1 mmol der eingesetzten Phosphatgruppe nur 7 U alkalischer Phosphatase.^[49] Diese Reaktionsbedingungen wurden für weitere Synthesen der Zuckernucleotide adaptiert.

Diesmal wurde die Synthese der UDP- β -Glc **1b** nach in Kapitel 4.4.4 beschriebenem Syntheseprotokoll durchgeführt (Abb. 77, S. 80). Zur Dephosphorylierung der Monophosphate, UMP **25** und β -Glucose-1-phosphat **185**, wurde der Reaktionsansatz in Wasser aufgenommen, der pH-Wert mit Triethylamin auf 8 eingestellt und die Lösung anschließend mit je 7 U alkalischer Phosphatase pro 0.1 mmol eingesetztes Phosphat versetzt. Nach 16 stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die vollständige Umsetzung der Monophosphate **25** und **185**

mittels Dünnschichtchromatographie (*i*PrOH/1M NH₄Ac, 1:2, v/v) festgestellt und das Gemisch gefriergetrocknet. Die anschließende Reinigung (RP-18-Chromatographie, H₂O) verlief problemlos, so dass das gewünschte UDP-β-Glc **1b** auf diesem Weg nach einmaliger Reinigung in einer Ausbeute von 69% isoliert werden konnte.

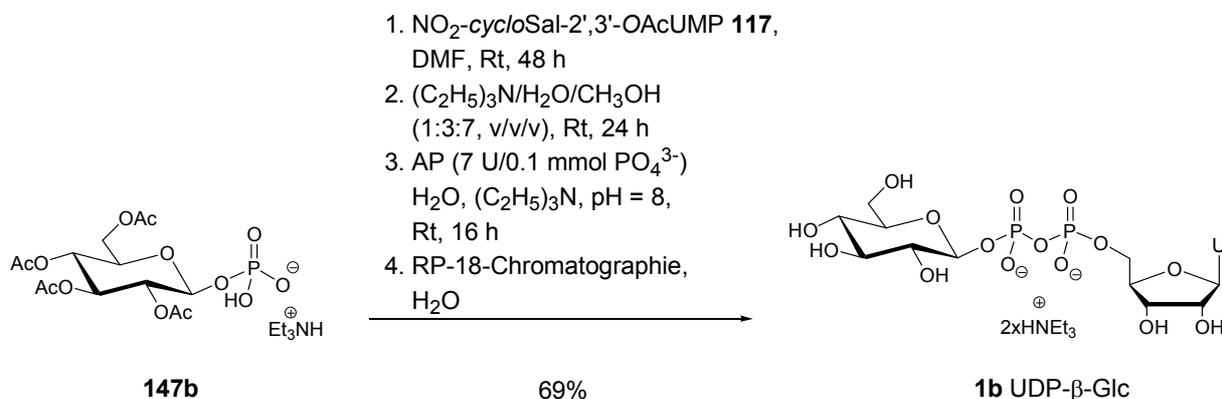


Abbildung 77: Synthese von UDP-β-Glc **1b** mit Einsatz von 7 U von alkalischer Phosphatase

Das durch Dephosphorylierung des Zuckerphosphates und NMPs gebildete Phosphat eluierte unmittelbar nach dem gewünschten Produkt **1b**. Die freigesetzte Glucose konnte bereits vor dem gewünschten Produkt **1b** isoliert werden. Das Nucleosid **102** sowie 5-Nitrosalicylalkohol **89** eluierten erst nach Zugabe von größeren Mengen Methanol zu dem Laufmittel. Dadurch blieb die Bildung zahlreicher Mischfraktionen mit dem UDP-β-Glc **1b** aus und die Chromatographie wurde wesentlich erleichtert. Das spiegelt sich in den hohen Ausbeuten wieder, da in den bisherigen Versuchen durch häufige chromatographische Reinigung die erzielten Produkte verlorengegangen sind.

Zur Bestätigung, dass dieses erzielte Ergebnis kein Zufallserfolg darstellt, wurde die Stabilität der NDP-Glycoside gegenüber der alkalischen Phosphatase getestet. Die Stabilität wurde am Beispiel der UDP-β-Glc **1b** in Gegenwart von 25 U sowie 7 U alkalischer Phosphatase pro 0.1 mmol der Phosphatgruppe überprüft.

Hierzu wurde eine 12.7 mM Lösung von UDP-β-Glc **1b** in Wasser hergestellt und der pH-Wert mit Triethylamin auf 8 eingestellt. Anschließend wurde diese Lösung mit 25 U bzw. 7 U alkalischer Phosphatase versetzt. Für die Stabilitätsuntersuchung mittels HPLC wurde nach 12 Stunden die erste Probe und anschließend alle zwei Stunden weitere Proben entnommen. Die Entnahme der letzten Probe geschah nach

36 Stunden, da Dephosphorylierungen der Monophosphate bei der eingesetzten Menge von AP (25 U bzw. 7 U) nie länger dauern. Es wurde jeweils 1 μL von dem Testansatz entnommen und mit 100 μL Milli-Q-Wasser aufgenommen, um eine geeignete Konzentration für die HPLC-Untersuchungen zu erreichen.

Damit die entnommenen Proben nicht weiterhin der möglicherweise zersetzenden Wirkung der alkalischen Phosphatase ausgesetzt sind, sollte die katalytische Aktivität des Enzyms inhibiert werden. Für die Enzymhemmung im Fall der alkalischen Phosphatase bietet sich eine Inhibierung im aktiven Zentrum durch Komplexbildung der beiden Zinkionenzentren an. Als weit verbreiteter Komplexbildner eignet sich EDTA, da mit divalenten Metallionen (hier Zn^{2+}) besonders stabile Chelatkomplexe gebildet werden. Demnach wurde jede Probe nach der Entnahme mit 50 μL einer 0.3 M EDTA-Lösung versetzt.

Die erhaltenen Proben wurden an einer RP-18-Säule mittels HPLC analysiert. Als Elutionsmittel diente ein Gradient aus einer 0.5 M Tetrabutylammoniumhydroxid-Lösung (pH = 6.9) und Acetonitril. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Sollte es zur Zersetzung der Zuckernucleotide in Gegenwart der alkalischen Phosphatase kommen, werden als erste Hydrolyseprodukte Nucleosidmono- sowie Zuckerphosphat erwartet. Da diese Substanzen die eigentlichen Substrate der AP darstellen, werden sie schnell zum Nucleosid, Glycosid und Phosphat abgebaut. So wurde im Fall der UDP- β -Glc **1b** folgendes Gemisch erwartet: UDP- β -Glc **1b**, Uridin **102**, Glucose **2** und Phosphat. Bei der zur Verfügung stehenden Wellenlänge ($\lambda = 260 \text{ nm}$) können jedoch nur die nucleosidhaltige Substanzen detektiert werden.

Bei der HPLC-Analyse der Probe nach 36 h in Gegenwart von 25 U alkalischer Phosphatase konnte die Bildung des Uridins **102** festgestellt werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass die niedrige Ausbeute bei der Synthese von UDP- α -Glc **1b** (S. 79) tatsächlich auf der Labilität des Produktes in Anwesenheit von größeren Mengen der alkalischen Phosphatase beruht. Bei der HPLC-Analyse der Probe nach 36 h in Gegenwart von 7 U alkalischer Phosphatase konnte nur eine minimale Bildung des Uridins **102** festgestellt werden. Dieses Ergebnis sowie auch die besseren Ausbeuten bei der Darstellung von UDP- β -Glc **1b** (S. 80) sprechen eindeutig für den Vorteil eines sparsameren Einsatzes der alkalischen Phosphatase.

Die in diesem Kapitel erzeugten Ergebnisse sind sehr erfreulich, da die gewünschten Nucleosiddiphosphatglycoside nach erfolgreichen Kupplungen, Deacetylierung und Dephosphorylierung der Monophosphate durch einfache Chromatographie in reiner Form und hohen Ausbeuten erhalten werden konnten.

Weiterhin sollte untersucht werden, welchen Einfluss andere Acceptorsubstituenten der *cycloSal*-NMPs auf die Reaktionszeiten und Ausbeuten bei der Synthese von NDP-Zucker haben.

4.4.6 Einfluss der Acceptorsubstituenten

Das Ziel dieser Arbeit, die Optimierung der Syntheseroute zur Darstellung von NDP-Glycosiden hinsichtlich der chemischen Ausbeuten zu verwirklichen, konnte bisher gut umgesetzt werden, indem unterschiedliche Reaktionsparameter und Aufarbeitungsmethoden überarbeitet wurden. Eine weitere Möglichkeit die Ausbeuten zu erhöhen und eventuell Reaktionszeiten zu verkürzen besteht in der Beeinflussung durch die Acceptorsubstituenten der *cycloSal*-Triester. Bisher wurden alle Reaktionen mit 5''-Nitro-*cycloSal*-Nucleotiden durchgeführt. Es wäre jedoch interessant den Einfluss der 5''-Methylsulfonylgruppe zu untersuchen. Da es zu erwarten ist, dass Verbindungen mit Acceptorsubstituenten, die mit der Nitrogruppe vergleichbare (-)I- und (-)M-Effekte besitzen, sich ebenfalls ähnlich gegenüber Nucleophilen verhalten.

Der Einfluss des *cycloSal*-Substituenten auf den Reaktionsverlauf wurde am Beispiel von UDP- β -Glc **1b** untersucht. Zunächst wurde das Zuckernucleotid **1b** aus nicht chromatographierten 5''-Nitro- sowie 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal*-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **117** und **120** nach in Kapitel 4.4.4 beschriebenen Methode synthetisiert (Abb. 78, S. 83).

In beiden Fällen wurden keine gravierenden Unterschiede im Reaktionsverlauf festgestellt. Besonders die Hoffnung auf kürzere Reaktionszeiten wurde nicht erfüllt. Eine vollständige Umsetzung des *cycloSal*-Nucleotids konnte mittels dünnschichtchromatographischer Kontrolle ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1, v/v) bei beiden Reaktionsansätzen nach 48 stündigem Rühren bei Raumtemperatur beobachtet.

Auch die Aufarbeitung und Isolierung des gewünschten Produktes **1b** verlief nach gleichem Muster und es wurden in beiden Fällen drei Chromatographieschritte benötigt, um UDP- β -Glc **1b** in reiner Form zu erhalten. Der erste Unterschied der beiden Ansätze machte sich nur bei den erzielten Ausbeuten bemerkbar. Es wurden bei der Umsetzung des Nitro-substituierten Aktivesters **117** 14% mehr Produkt als aus dem Methylsulfonyl-substituierten Triesters **120** erzielt.

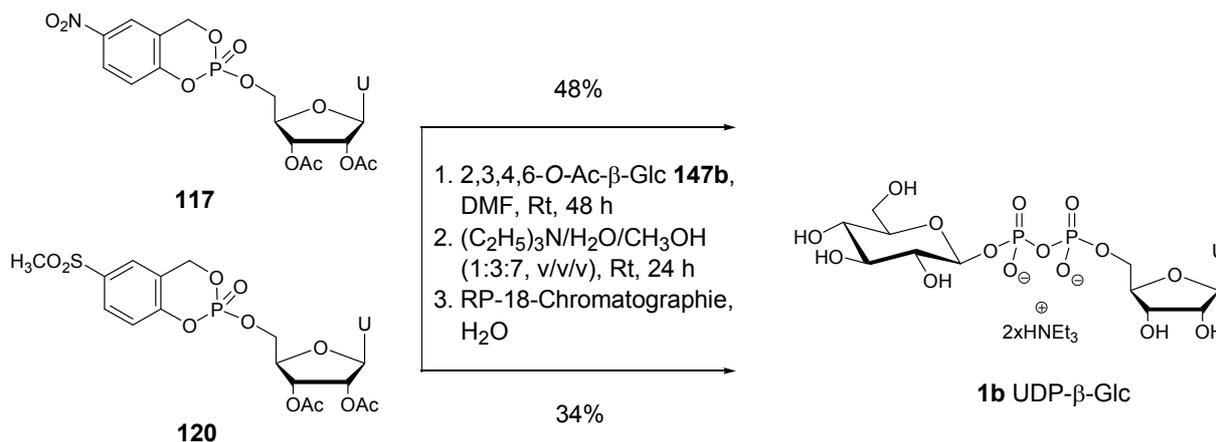


Abbildung 78: Einfluss des *cycloSal*-Substituenten auf die Synthese von UDP- β -Glc **1b**

Dieses Ergebnis spricht für eine etwas schwächere Reaktivität der 5'-Methylsulfonyl-*cycloSal*-Verbindungen. Die auf den ersten Blick als Nachteil erscheinende niedrigere Reaktivität des Methylsulfonyl-substituierten Aktivesters **120** besitzt eine vorteilhafte Wirkung bei der chromatographischen Reinigung dieser Substanzen. Wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben, gelang erstmals die Synthese sowie chromatographische Reinigung der 5'-Methylsulfonyl-*cycloSal*-Nucleotide **120-122**. In Gegensatz dazu konnten die 5'-Nitro-Derivate **117-119** auf Grund der höheren Reaktivität nicht chromatographiert werden.

Um den Vorteil der chromatographisch gereinigten *cycloSal*-Triester in der Synthese der Zuckernucleotide zu bestätigen, wurde UDP- β -Glc **1b** erneut nach der oben beschriebenen Methode allerdings aus chromatographierten 5'-CH₃SO₂-*cycloSal*-2',3'-O-diacetyluridinmonophosphat **120** synthetisiert (Abb. 79, S. 84).

Auch diesmal konnten keine Unterschiede im Reaktionsverlauf festgestellt werden. Eine vollständige Umsetzung des *cycloSal*-Nucleotids wurde nach 48-stündigem

Rühren bei Raumtemperatur beobachtet. Auch die Aufarbeitung und Isolierung des gewünschten Produktes **1b** verlief problemlos, es waren jedoch nur zwei Chromatographieschritte nötig, um UDP- β -Glc **1b** in reiner Form zu erhalten. Ein weiterer, sehr positiver Unterschied war, dass die erzielte Ausbeute bei 60% lag. Im Gegensatz zu den Ausbeuten bei der Umsetzung des Nitro-substituierten Aktivesters **117** wurden hier 12% mehr Produkt erhalten.

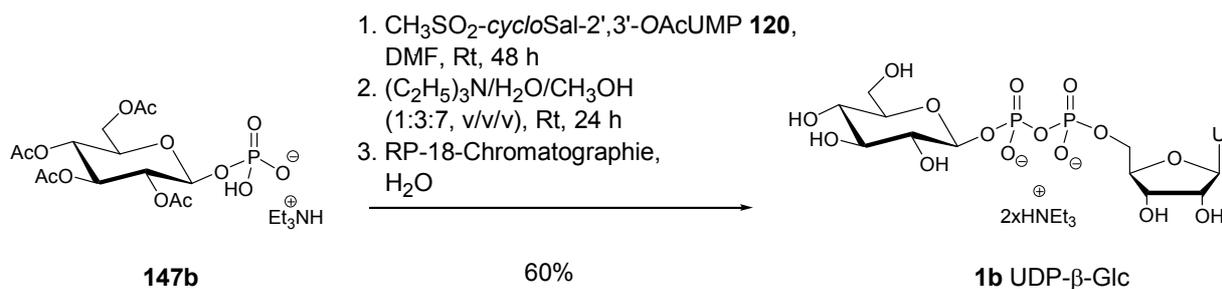


Abbildung 79: Synthese von UDP- β -Glc **1b** aus gereinigtem 5'-Methylsulfonyl-*cycloSal*-2',3'-O-diacetyluridinmonophosphat **120**

Mit der im Kapitel 4.4.5 gesammelten Erfahrung wurde der Versuch zur Darstellung von UDP- β -Glc **1b** aus dem chromatographierten 5'-Methylsulfonyl-*cycloSal*-2',3'-O-diacetyluridinmonophosphat **120** wiederholt und vor der chromatographischen Reinigung mit 7 U alkalischer Phosphatase versetzt (Abb. 80).

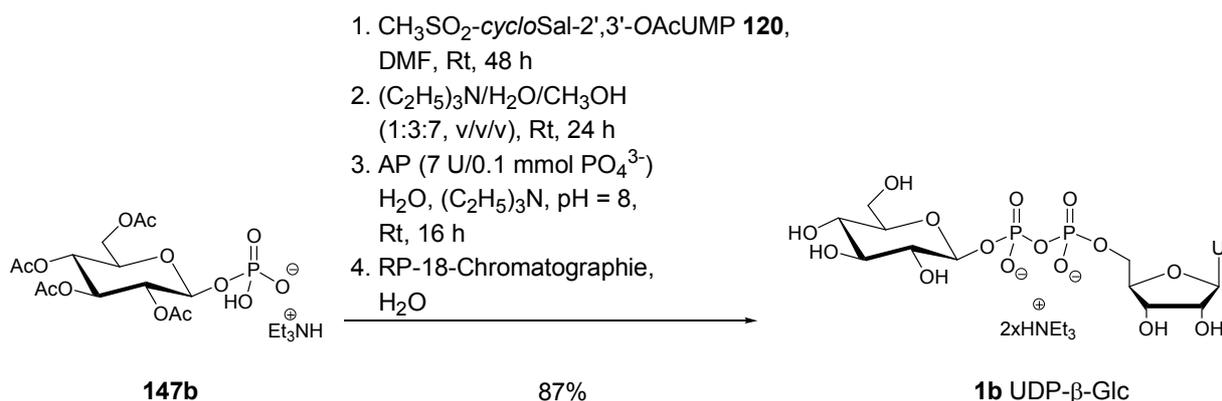


Abbildung 80: Synthese von UDP- β -Glc **1b** aus gereinigtem 5'- CH_3SO_2 -*cycloSal*-2',3'-O-diacetyluridinmonophosphat **120** und Einsatz der alkalischen Phosphatase

Nach entsprechender Aufarbeitung konnte das Produkt **1b** nach einmaliger chromatographischer Reinigung in reiner Form mit einer Ausbeute von 87% isoliert werden. Wie in Abbildung 77 (S. 80) dargestellt, ergab die Umsetzung des nicht chromatographierten 5''-Nitro-*cycloSal*-2',3'-O-diacetyluridinmonophosphats **117** nach der gleichen Methode die gewünschte UDP- β -Glc **1b** in einer Ausbeute 69%.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich die Reinheit des *cycloSal*-Nucleotides positiv auf die Ausbeute der gewünschten NDP-Glycoside auswirkt. Weiterhin stellte sich eine Überführung der Monophosphate in weniger polare Verbindungen als ausgesprochen vorteilhaft für die anschließende Produktisolierung heraus. Der einzige Nachteil ist, dass die im Überschuss eingesetzten Zuckerphosphate wieder zu Ausgangssubstanzen abgebaut werden und nicht mehr für erneute Synthesen der Zuckernucleotide eingesetzt werden können. Für kostspielige und schwer synthetisierbare Zuckerphosphate wäre es ein nicht akzeptabler Verlust. Allerdings wurden bisher noch keine Schwierigkeiten bei der Isolierung der NDP-Glycoside durch Zuckerphosphate festgestellt. So wäre es sinnvoll, Glycosylphosphate und NDP-Zucker direkt nach der Kupplung und Deacetylierung in einem schnellen Durchlauf über eine RP-18-Säule voneinander zu trennen. Erst danach können zuckernucleotid- und nucleosidmonophosphathaltige Fraktionen mit alkalischer Phosphatase behandelt werden und anschließend erneuten chromatographischen Reinigungen unterzogen werden.

Nachfolgend sollten die in den vorangegangenen Abschnitten gewonnenen Erkenntnisse zusammengefasst und zur Synthese der NDP-Glycopyranosen sowie NDP-Disacchariden angewendet werden.

4.4.7 Synthese der Nucleosiddiphosphatglycoside

Für die folgenden Umsetzungen wurde das Syntheseprotokoll gemäß der in den Kapiteln 4.4.1- 4.4.6 gesammelten Erfahrungen überarbeitet. Ein Äquivalent des 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal*-Nucleosidmonophosphats sowie zwei Äquivalente des Glycosid-1-phosphates wurden sorgfältig vor der Reaktion für 48 Stunden im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend zwei Stunden über Molsieb in abs. DMF gelagert. Das in DMF gelöste *cycloSal*-Nucleotid wurde langsam zu dem

Zuckerphosphat über zwei Stunden zugetropft und der Reaktionsansatz für 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach anschließender Acetylgruppenabspaltung mit dem Gemisch aus Triethylammin/Wasser/Methanol (1:3:7, v/v/v) wurde der Reaktionsansatz gefriergetrocknet und einer groben chromatographischen Reinigung über eine RP-18-Säule unterzogen, um den Überschuss an Glycosylphosphat abzutrennen. Fraktionen, die Zuckernucleotid erhielten, wurden mit wenig Wasser aufgenommen und bei pH 8 über Nacht mit 7 U alkalischer Phosphatase pro 0.1 mmol des Phosphats behandelt. Die gewünschten NDP-Glycoside wurden über RP-18-Chromatographie mit Wasser als Eluent isoliert.

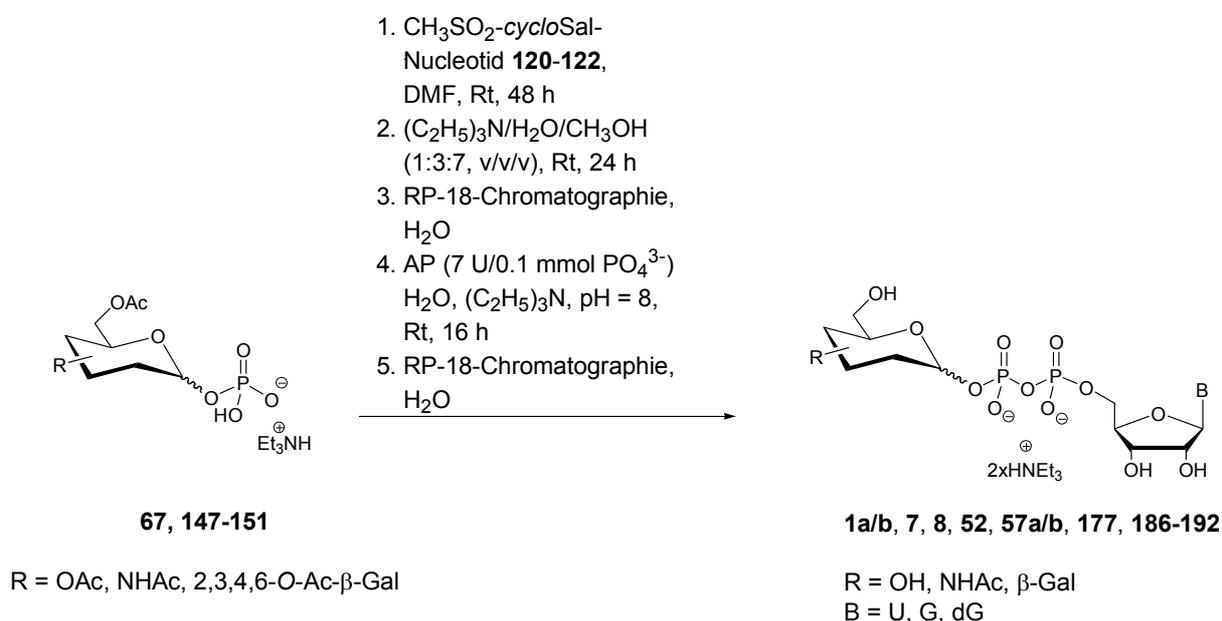


Abbildung 81: Synthese der NDP-Glycoside aus 5'-Methylsulfonyl-cycloSal-Nucleosidmonophosphaten **120-122**

Weitere Änderungen zu dem ursprünglichen Syntheseprotokoll waren, dass auf eine Extraktion des acetylierten Produktes mit Wasser sowie Waschen mit Dichlormethan und Ethylacetat verzichtet wurde. Diese Vorgänge dienen dem Entfernen der organischen Verunreinigungen, speziell des abgespaltenen Salicylalkohols. Wie sich allerdings herausstellte, besitzen die Salicylalkohole **89** und **96** eine hohe Polarität. Dadurch erschwert sich die Überführung in die organische Phase. Um Produktverluste durch häufiges Extrahieren zu vermeiden, wurde auf Waschvorgänge verzichtet. Dieses Vorgehen stellt weder einen Nachteil für die

nachfolgende Deacetylierung dar noch stört Salicylakohol bei der Isolierung des Produktes, da es von der RP-18-Säule erst mit größeren Mengen Methanol eluiert.

Die Synthese der NDP-Glycoside nach dieser Methode ist in Abbildung 81 (S. 86) dargestellt. Die auf diesem Weg erhaltenen Produkte sowie die erzielten Ausbeuten sind in Abbildungen 82-84 (S. 88-90) zusammengefasst.

Die überarbeitete Methode zur Darstellung der NDP-Zucker ermöglichte die Synthesen der UDP-Glycoside (Abb. 82, S. 88) in sehr guten Ausbeuten von 71 bis 90%. Dabei gelang die Isolierung durch Einsatz von alkalischer Phosphatase schnell und problemlos. Weiterhin können diese guten Ausbeuten zum einen durch einfaches synthetisches Verhalten von Uridinderivaten erklärt werden. Zum anderen stellen synthetisierte Uridindiphosphatzucker die am meisten in der Natur anzutreffende Derivate dar. In der Natur gibt es vielfältige UDP-Zucker. Hierzu gehören sechs der neun gewöhnlichen eukaryotischen Zuckernucleotide und viele Zuckerdonatoren, die an der Synthese von Polysacchariden bakterieller Zelloberflächen beteiligt sind.

Die einzige Abweichung vom Syntheseprotokoll wurde bei UDP- α -LacNAc **8** vorgenommen. *J. Huchting* berichtete von Schwierigkeiten bei der Abspaltung der Acetylschutzgruppen von der peracetylierten UDP-Lac **62** nach dem ursprünglichen Protokoll. Die Entschützung verlief nicht vollständig, wodurch die chromatographische Reinigung enorm beeinträchtigt wurde. Es konnte ein an 3'-Hydroxyl (3-OH bei Glucose) monoacetyliertes Produkt isoliert werden, das anschließend einer erneuten Entschützung unterzogen wurde.^[67] Um eine vollständige Deacetylierung zu gewährleisten, wurden mehr Äquivalente Triethylamin eingesetzt und die Reaktionstemperatur erhöht. Die Entschützung fand mit einem Triethylamin/Wasser/Methanol-Gemisch (3:3:7, v/v/v) bei 35 °C statt.

Die Synthese des UDP- α -D-N-Acetyllactosamin **8** gelang durch Einsatz von *cycloSal*-aktiviertem Uridinmonophosphatester **120** mit einer Ausbeute von 90%. Die erzeugte Ausbeute ist bislang das beste in Erfahrung gebrachte Ergebnis bei der Synthese von dieser Substanz. *Elling et al.* berichteten über die enzymatische Synthese von UDP- α -LacNAc **8** aus UDP- α -GlcNAc **7** und UDP- α -Gal **57a** unter Katalyse mit β -1,4-Galactosyltransferase isoliert aus Menschenmilch. Sie isolierten das gewünschte UDP- α -LacNAc **8** als Natriumsalz mit einer Ausbeute von nur 5%.^[53] *Takaku et al.*

berichtet von der chemischen Synthese von UDP- α -LacNAc **8** aus Uridin-5'-monophosphoimidazolidat **185**. Die Ausbeute lag bei 77%, dabei wurde das Produkt erst nach Reinigung über eine Anionenaustauscher-HPLC-Säule sowie Sephadex G-10 erhalten.^[55]

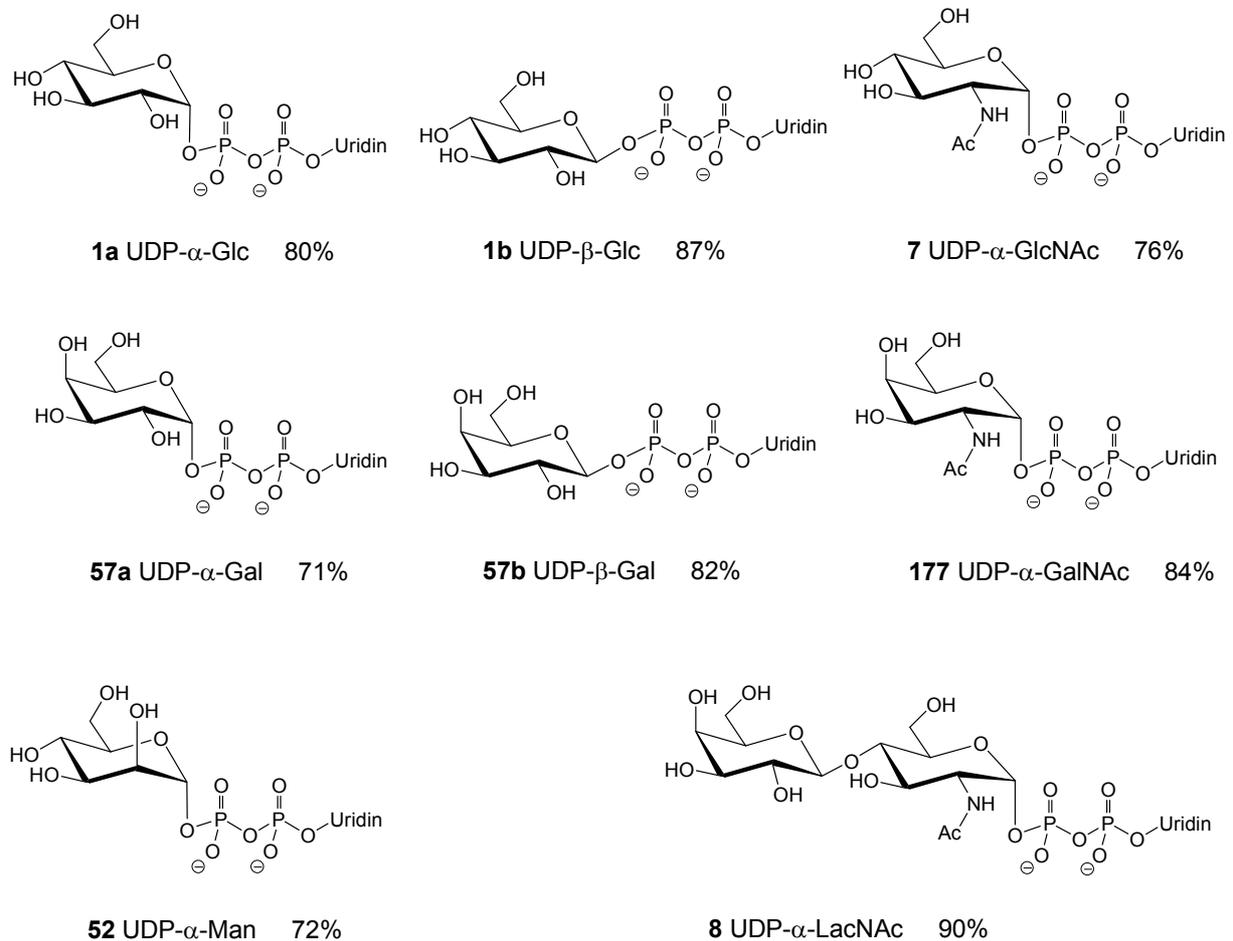


Abbildung 82: synthetisierte UDP-Glycoside als Triethylammoniumsalze

UDP- α -LacNAc **8** wurde 1963 von *Kobata* aus menschlicher Milch und Kolostrum isoliert und charakterisiert.^[125] Als nucleotidaktiviertes Oligosaccharid könnte das synthetisierte UDP- α -LacNAc **8** bei der Aufklärung deren Biosynthese und biologischer Funktion helfen. Desweiteren könnte UDP- α -LacNAc **8** hilfreich bei der Isolierung und Aufklärung der Reaktionsmechanismen der sogenannten Oligosaccharidtransferasen sein, die möglicherweise Di- sowie Trisaccharideinheiten auf Acceptoren in einem Schritt übertragen.

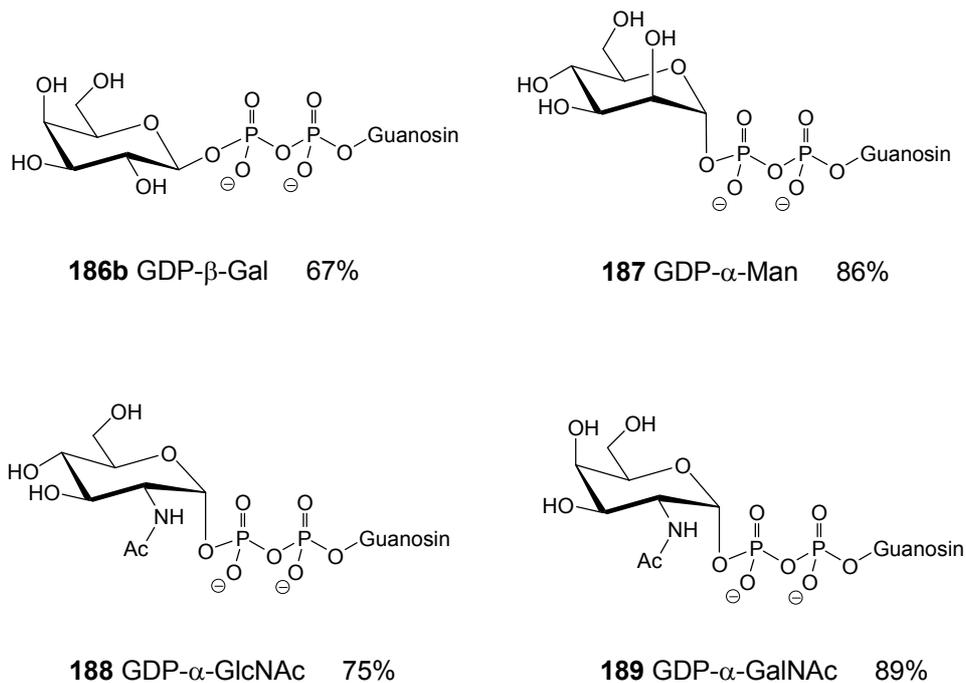


Abbildung 83: Synthetisierte GDP-Glycoside **186b-189** als Triethylammoniumsalze

Nach der Synthese der GDP- β -Gal **186b** mit 67% Ausbeute nach dem überarbeiteten Syntheseprotokoll wurden weitere Derivate der Guanosindiphosphate **186b-189** synthetisiert, die in der Natur am häufigsten anzutreffen sind. Die natürlichen GDP-Glycoside **187-189** wurden mit der überarbeiteten Methode in sehr guten Ausbeuten von 75 bis 89% dargestellt. Die Isolierung gelang durch Einsatz von alkalischer Phosphatase schnell und problemlos.

GDP-aktivierte Zucker sind allgemein an der Biosynthese von Polysacchariden bakterieller Zelloberflächen und von eukaryotischen Glycanen beteiligt. GDP- α -Mannose **187** ist zum Beispiel die vorgeschlagene Vorstufe für die Zuckerreste in den Polyenmakroliden Nystatin, Amphotericin, Pimaricin und Candicidin, im Aminoglycosid-Antibiotikum Hygromycin A und im Antitumorwirkstoff Bleomycin.^[126,127]

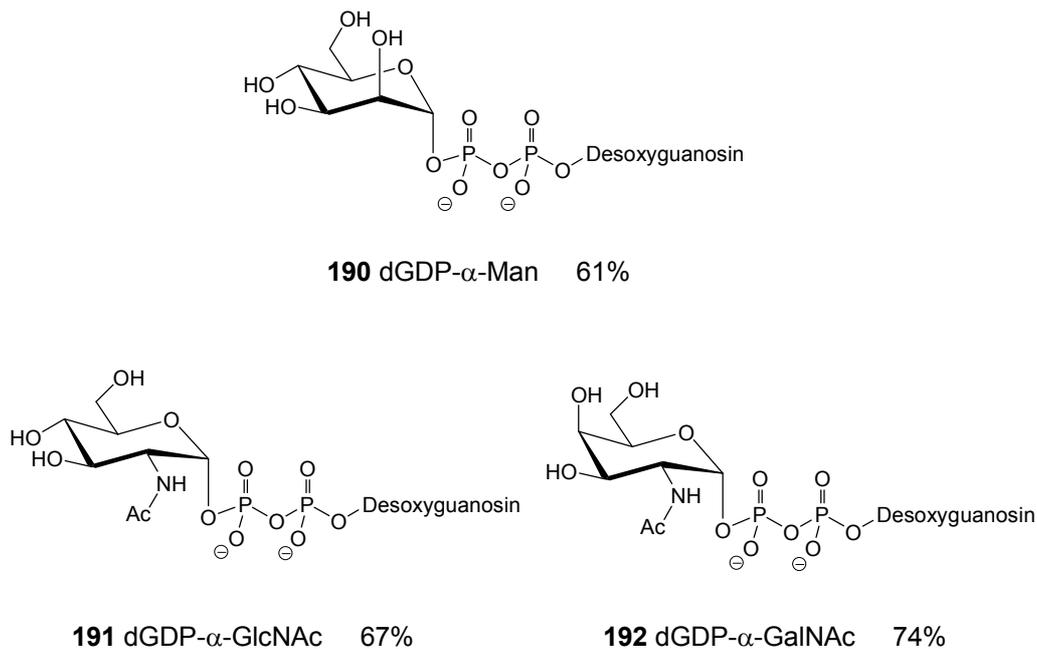


Abbildung 84: synthetisierte dGDP-Glycoside **190-192** als Triethylammoniumsalze

In Gegensatz zu UDP- und GDP- Glycosiden stellen 2'-Desoxyguanosinderivate **190-192** nichtnatürliche Zuckernucleotide dar. Die Ausbeuten dieser NDP-Glycoside sind niedriger als bei den beiden anderen Nucleosiden ausgefallen. Zum einen können schlechtere Ausbeuten durch das schwierige Syntheseverhalten der 2'-Desoxyguanosinderivate, insbesondere durch ihre schlechte Löslichkeit erklärt werden. Zum anderen lassen sich die dGDP-Zucker nicht gut mit Färbereagenzien detektieren, so dass kleinere Produktmengen nicht erkannt werden und möglicherweise verloren gehen.

Insgesamt können diese Resultate trotzdem als Erfolg gewertet werden. Denn die erzielten Ausbeuten von 61-74% sind bedeutend höher als die Ergebnisse, die bislang nach der ursprünglichen Methoden erhalten wurden.^[66]

4.4.8 Analytik und Charakterisierung der dargestellten Nucleosiddiphosphatglycoside

Neben der Synthese ist vor allem eine sorgfältige Analytik und Charakterisierung der dargestellten Nucleosiddiphosphatglycoside nötig. Der Nachweis über die Reinheit

und Erhalt der synthetisierten Verbindungen wurde über eine umfassende NMR-spektroskopische Untersuchung erbracht.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung der Zielverbindungen soll exemplarisch für α - und β -Anomere der UDP-Glucose **1** sowie für das Disaccharid UDP- α -LacNAc **8** vorgestellt werden.

Der Nachweis der Abwesenheit organischer Verunreinigungen erfolgte hauptsächlich über ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt einen Signalsatz mit sieben Protonen, die dem glycosidischen Teil zuzuordnen sind, und einen Signalsatz mit den acht Protonen des Uridins (Abb. 85, S. 92). Beide Signalsätze stehen in einem 1:1-Verhältnis zueinander, das für eine Anomerenreinheit des Produktes spricht.

Weiterhin kann auch die Konfiguration der glycosidischen Bindung im Produkt anhand des ^1H -NMR-Spektrums bestimmt werden. Gemäß der Karplus-Beziehung ergibt sich für das α -Anomer mit einer *cis*-Stellung von H-1'' und H-2'' eine Kopplungskonstante von $^3J_{\text{H1-H2}} \sim 3.5$ Hz. Die β -Glycoside zeigen hingegen auf Grund der *trans*-Stellung von H-1'' und H-2'' eine Kopplungskonstante von $^3J_{\text{H1-H2}} \sim 8.0$ Hz. Zudem muss auch die vicinale Kopplung des Protons zu dem Phosphoratom berücksichtigt werden. Auf Grund dieser Wechselwirkung ergibt sich für das anomere Proton der α -Glycoside ein dd-Signal und für β -Glycoside ein Triplett (Abb. 86, S. 92).

Das ^{13}C -NMR-Spektrum der UDP- α -Glc **1a** zeigt typische Dubletts für 4'- und 5'-Kohlenstoffatome des Nucleosids sowie 1''- und 2''-Kohlenstoffatome der Glucose, die aus den geminalen und vicinalen Kopplungen mit den Phosphoratomen resultieren (Abb. 87, S. 93).

Resultate und Diskussion

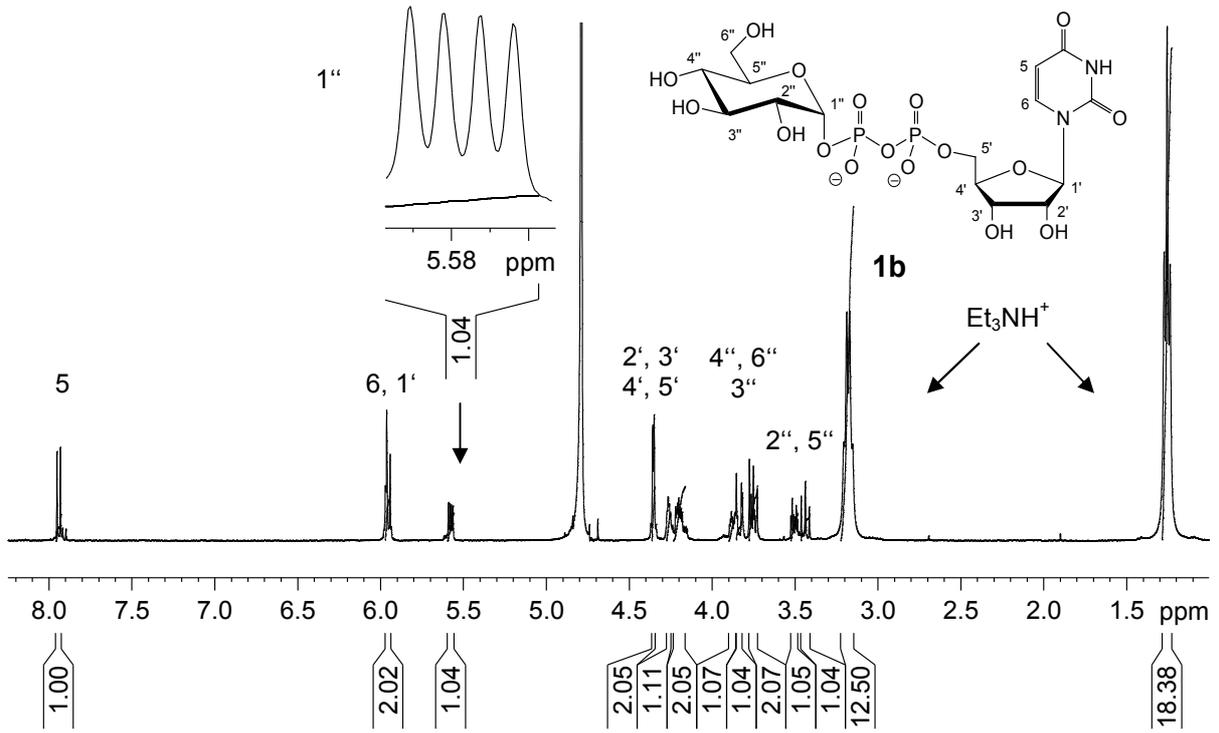


Abbildung 85: ¹H-NMR-Spektrum (D₂O, 400 MHz) von UDP- α -Glc **1a**

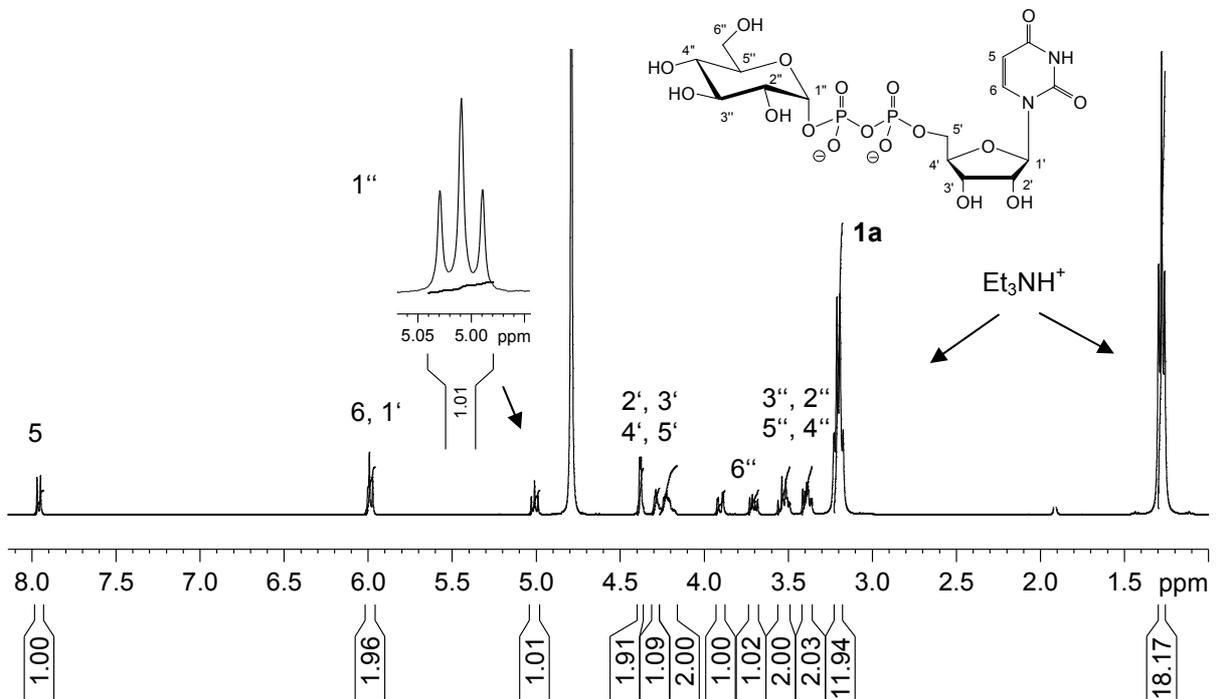


Abbildung 86: ¹H-NMR-Spektrum (D₂O, 400 MHz) von UDP- β -Glc **1b**

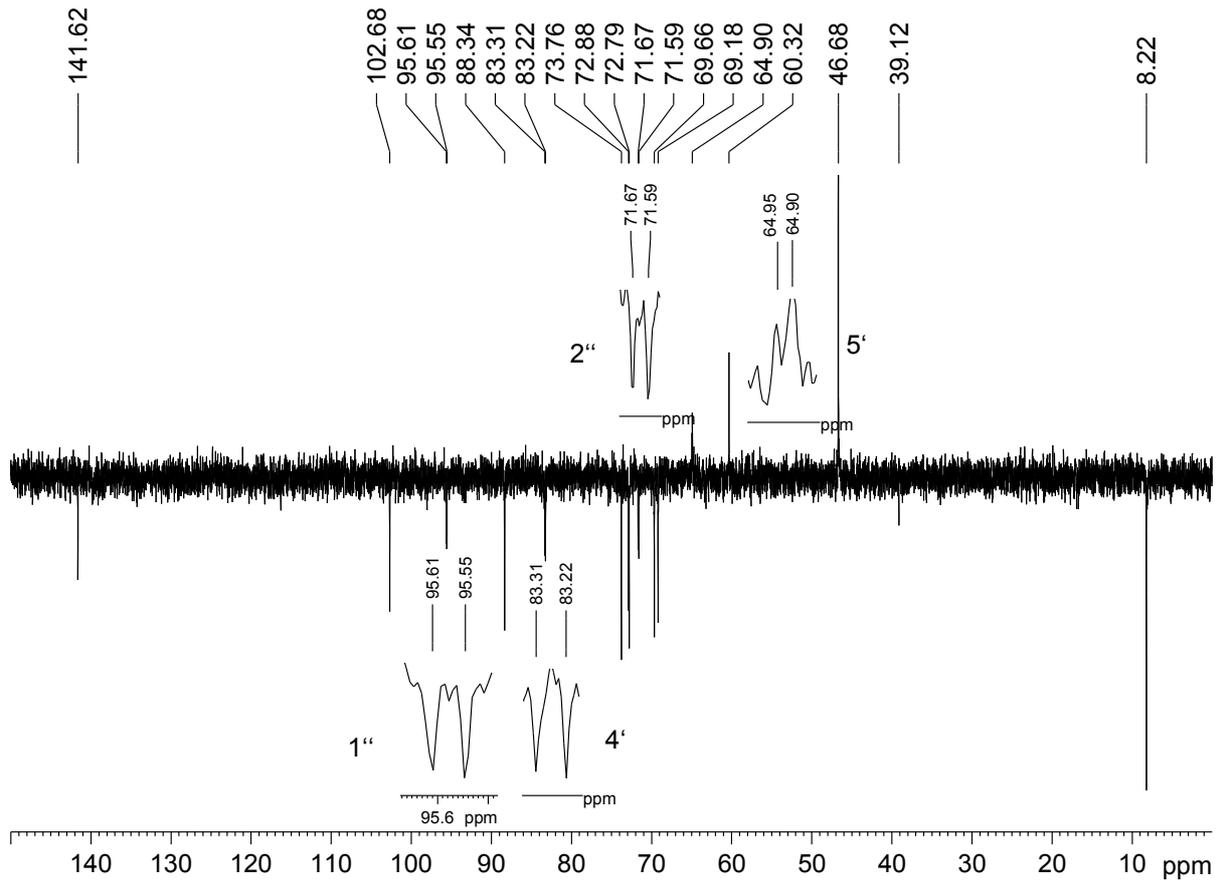


Abbildung 87: ^{13}C -NMR-Spektrum (D_2O , 101 MHz) von UDP- α -Glc **1a**

Ein Hauptproblem bei der Isolierung der NDP-Glycoside stellte die Abtrennung der Nucleosidmonophosphate dar. Für den Nachweis über eine vollständige Entfernung der Nucleosidmonophosphate bietet sich die ^{31}P -NMR-Spektroskopie an.

Die NDP-Glycoside zeigen in den entkoppelten ^{31}P -NMR-Spektren ein charakteristisches Signalmuster, bestehend aus zwei Signalen (Abb. 88, S. 94). Die beiden Phosphoratome P_α und P_β erzeugen durch die geminale $^2J_{\text{PP}}$ -Kopplung jeweils ein Dublett im Bereich von -11 und -14 ppm mit einer typischen Kopplungskonstante von ca. 20 Hz.

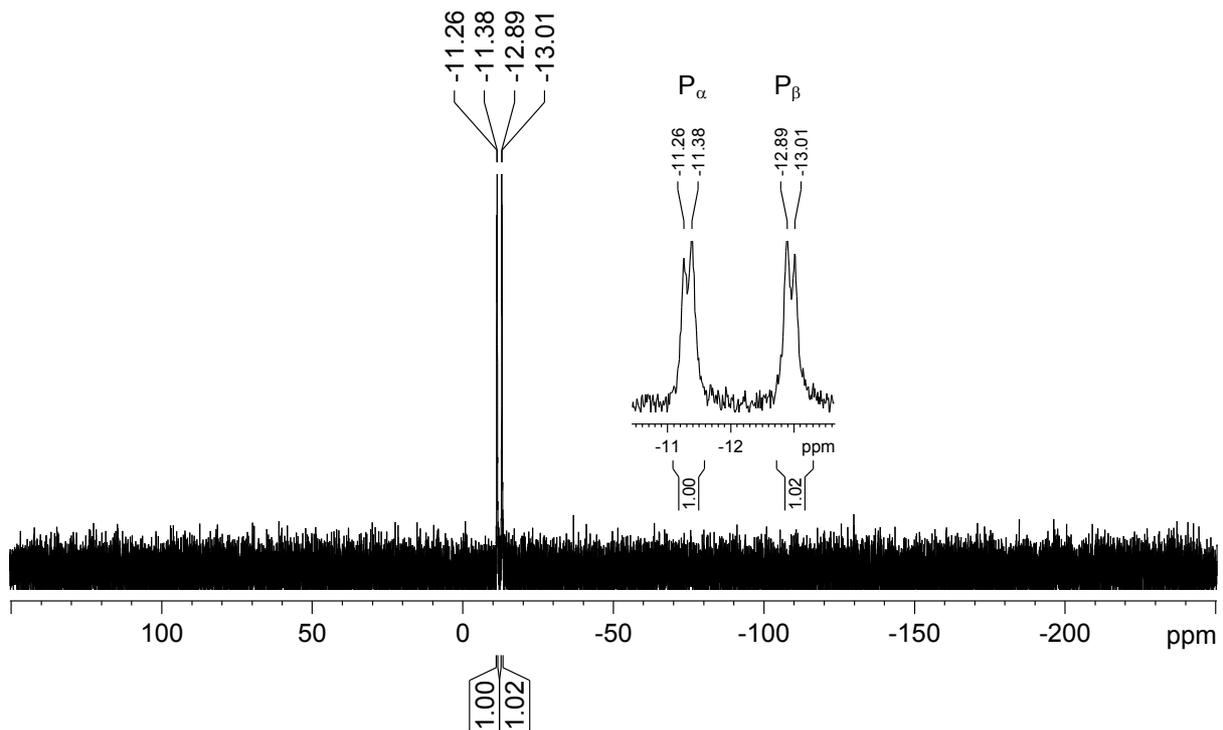


Abbildung 88: ^{31}P -NMR-Spektrum (D_2O , 162 MHz) von UDP- α -Glc **1a**

Die beiden Dubletts konnten durch Aufnahme eines protonengekoppelten ^{31}P - ^1H -COSY-Spektrums eindeutig zugeordnet werden. Das tieffeldverschobene Signal bei -11.32 ppm wird von dem P_α -Atom erzeugt, das in dem 2D-NMR-Spektrum zu einem Signal durch vicinale Kopplung mit den beiden 5'-Protonen des Nucleosidteils führt. Das zweite Resonanzsignal bei -12.95 ppm kann entsprechend dem P_β -Atom zugeordnet werden, das in dem 2D-NMR-Spektrum zu einem Signal durch vicinale Kopplung mit dem Proton am anomeren Zentrum des Zuckers führt.

Neben der NMR-Spektroskopie bietet sich auch die Massenspektrometrie zur Charakterisierung der dargestellten Verbindungen an. Diese hochpolaren Substanzen benötigen allerdings schonende Ionisierungsmethoden wie z. B. die Elektronenspray-Ionisation (ESI) im Negativionenmodus. Außerdem muss für diese Methode keine besondere Probenvorbereitung durchgeführt werden. Es wurden gut auswertbare Spektren erhalten, die keine weiteren Signale zeigten, die auf die Zersetzung der Pyrophosphatbrücke zurückzuführen sind.

Das Erhalten und die Reinheit des NDP-Disaccharids, UDP- α -LacNAc **8**, wurde mit Hilfe einer umfassenden NMR-spektroskopischen Untersuchung sowie Massenspektrometrie nachgewiesen.

Das in D₂O aufgenommene ¹H-NMR-Spektrum zeigt einen Signalsatz mit 14 glycosidischen Protonen und einen Signalsatz mit den acht Protonen, die dem Uridin zuzuordnen sind (Abb. 89). Beide Signalsätze stehen in einem 1:1-Verhältnis zueinander.

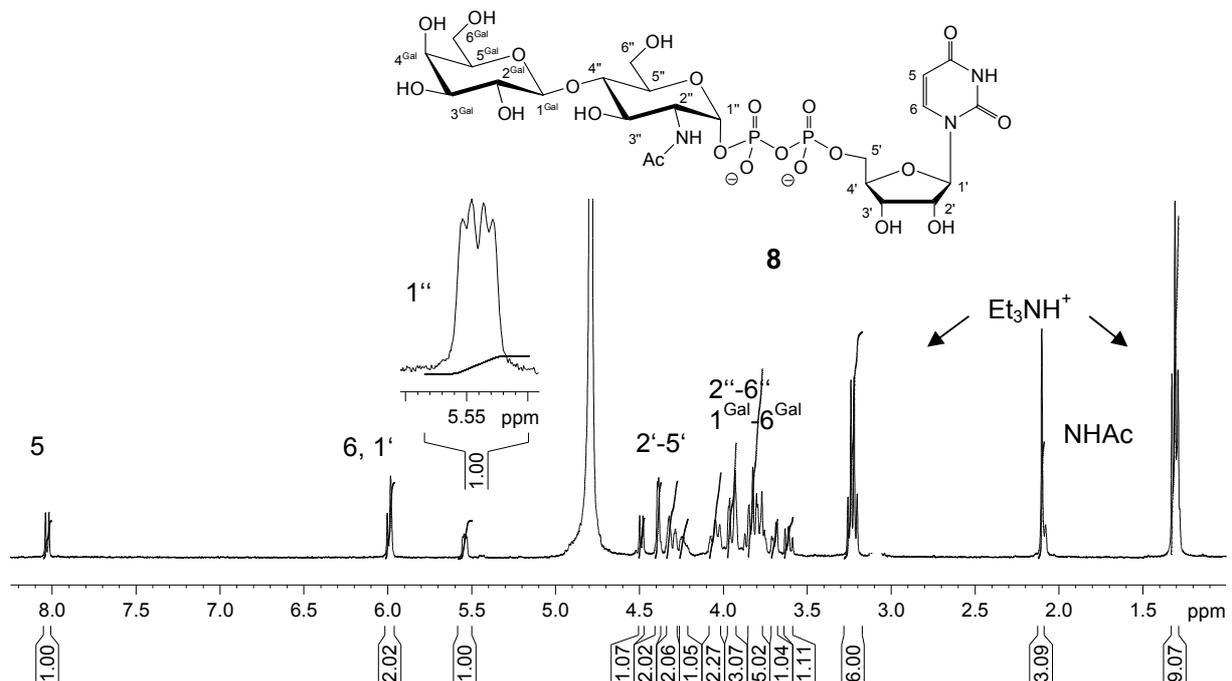


Abbildung 89: ¹H-NMR-Spektrum (D₂O, 400 MHz) von UDP- α -LacNAc **8**

Das von dem anomeren Kohlenstoffatom des Glucosaminteils erzeugte Signal gibt den Aufschluss über die Konfiguration der glycosidischen Bindung im Produkt. Gemäß der Karplus-Beziehung ergibt sich für das α -Anomer mit einer *cis*-Stellung von H-1'' und H-2'' (Protonen von GlcNAc) eine Kopplungskonstante von $^3J_{H1-H2} \sim 3.5$ Hz. So deutet die experimentell beobachtete $^3J_{HH}$ -Kopplungskonstante von 3.0 Hz auf ein α -Glycosid hin. Aufgrund der vicinalen Kopplung des Protons zu dem Phosphoratom ergibt sich für das anomere Proton ein dd-Signal, welches auch auf ein α -Glycosid schließen lässt.

Auch hier kommt das Signal des anomeren Kohlenstoffs des Glycosamins im ^{13}C -NMR-Spektrum als typisches Dublett, das aus der geminalen Kopplung mit dem Phosphoratom resultiert (Abb. 90).

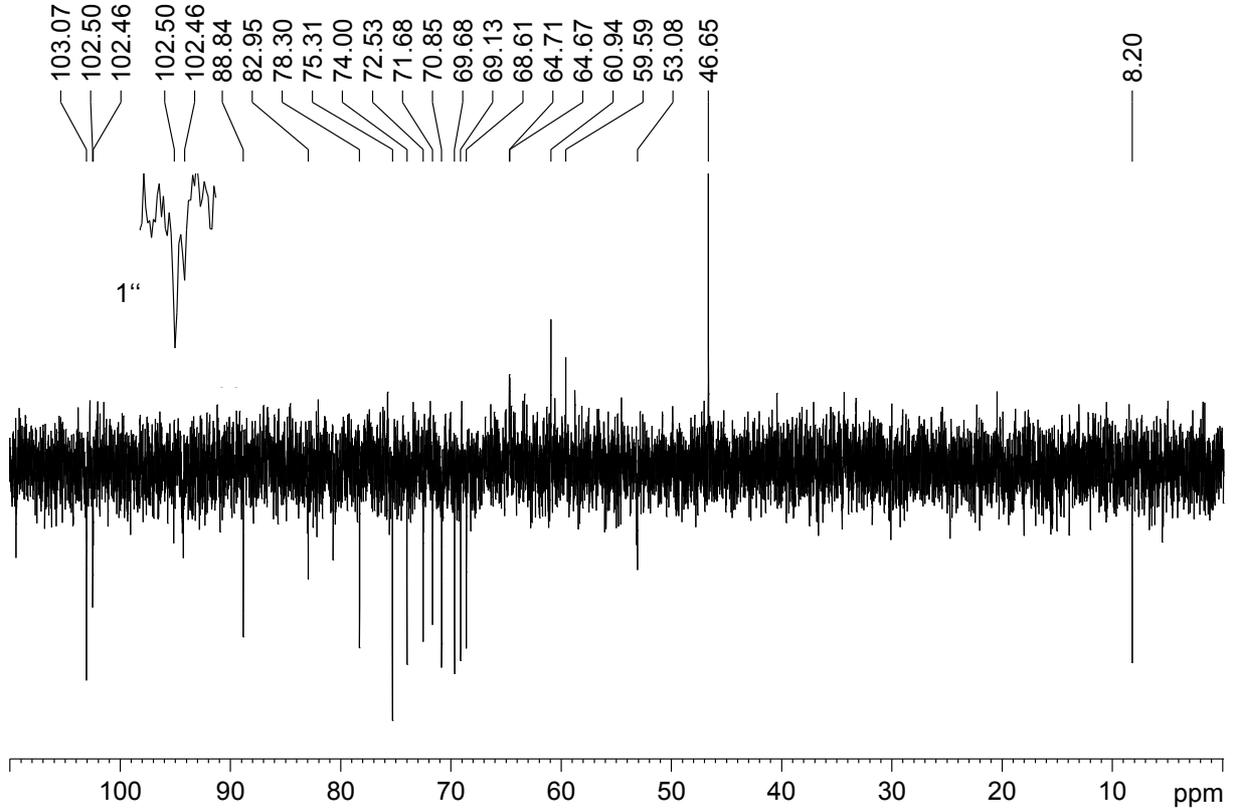


Abbildung 90: ^{13}C -NMR-Spektrum (D_2O , 101 MHz) von UDP- α -LacNAc **8**

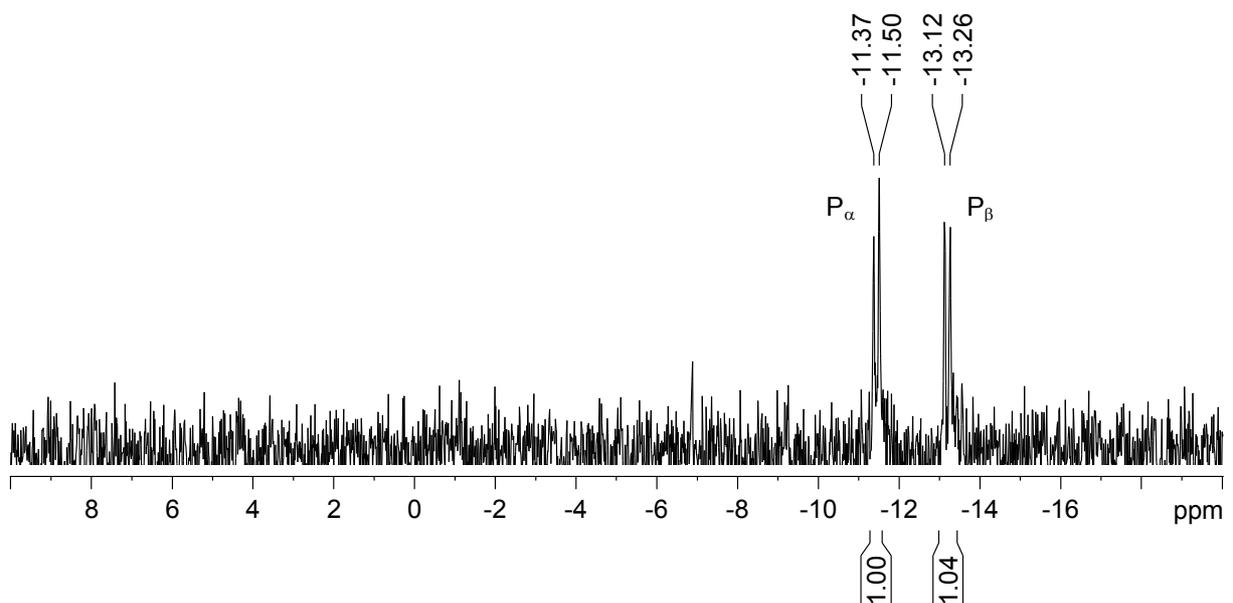


Abbildung 91: ^{31}P -NMR-Spektrum (D_2O , 162 MHz) von UDP- α -LacNAc **8**

UDP- α -LacNAc **8** zeigt in dem entkoppelten ^{31}P -NMR-Spektrum ein charakteristisches Signalmuster, bestehend aus zwei Signalen (Abb. 91, S. 96). Die beiden Phosphoratome P_α und P_β erzeugen durch die geminale $^2J_{\text{PP}}$ -Kopplung jeweils ein Dublett bei -11.44 und -13.19 ppm mit einer typischen Kopplungskonstante von 22 Hz.

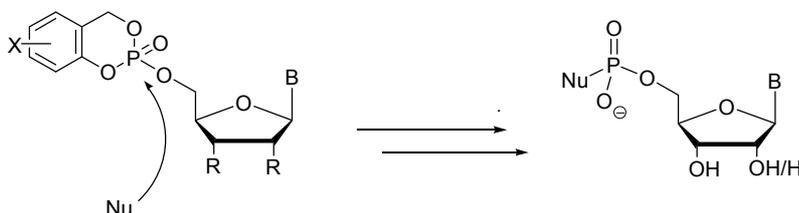
4.5 Fazit

In dieser Arbeit konnten die Vorteile der chemisch-enzymatischen Synthesen deutlich gezeigt werden. So konnte die Entschützung des Guanosins, das auf einem rein chemischen Weg über mehrere Stufen problematisch war, durch Einsatz des Enzyms Subtilisin mit sehr guten Ergebnissen bewältigt werden. Dabei wurde der Syntheseweg zum einen verkürzt und zum anderen durch den Verzicht auf zusätzliche Schützungs-schritte kostengünstiger durchgeführt. Bei der Reinigung der Zielverbindungen erwies sich der Einsatz von alkalischer Phosphatase durchaus als hilfreich. Die dadurch ermöglichte schnelle und problemlose Isolierung führte zu weniger Produktverlust. Weiterhin konnten erstmals 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal*-Verbindungen synthetisiert werden. Zum ersten Mal gelang eine zuverlässige säulenchromatographische Reinigung dieser acceptorsubstituierten *cycloSal*-Phosphataktivester. Die hohe Reaktivität und Reinheit dieser aktivierten Nucleotide ermöglicht in den Reaktionen mit Nucleophilen einen effizienten und schnellen Zugang zu NDP-Glycosiden. So konnten NDP-Mono- sowie Disaccharide mit Ausbeuten bis zu 90% erhalten werden. Diese erfolgreichen Ergebnisse lassen nicht daran zweifeln, dass das *cycloSal*-Konzept auch die Darstellung von NDP-Trisaccharide sowie modifizierten NDP-Saccharide ermöglichen wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die phosphorylierten Substanzen übernehmen in biologischen Systemen vielfältige Aufgaben. Die Nucleosiddiphosphatglycoside sind essentiell für die Stoffwechselfvorgänge, zum Aufbau glycosidischer Bindungen dienen. Als Substrate der Glycosyltransferasen werden sie als aktivierte Glycoside zur Biosynthese von Oligo- und Polysacchariden, die Struktur- und Gerüstelemente sowie Reservestoffe in Organismen darstellen, genutzt. Die NDP-Glycoside werden auch zur Synthese von Glykokonjugaten als Bestandteile der Zellmembranen herangezogen, wie Glycoproteine, Glycolipide und Glycophospholipide. Neben NDP-Monosacchariden wurden NDP-Di- und Trisaccharide aus Kolostrum und Milch von Säugern isoliert, deren Funktion und Biosynthese jedoch noch nicht bekannt sind.

Aufgrund der enormen Relevanz der NDP-Glycoside in der Natur und des großen pharmakologischen Potentials von Oligosacchariden ist der effiziente synthetische Zugang zu NDP-Sacchariden von großem Interesse. Es wurden bereits eine Vielzahl von synthetischen Ansätzen dieser Verbindungen publiziert. Jedoch brauchen manche Synthesen längere Reaktionszeiten und liefern die gewünschten Zuckernucleotide in geringen Ausbeuten. Im Gegensatz dazu wurden auch weitere Methoden publiziert, die innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden ablaufen. Allerdings entstehen häufig bei diesen Synthesen anomere Gemische der NDP-Glycoside. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Synthese verschiedener NDP-Mono- und Disaccharide ausgehend von acceptorsubstituierten *cycloSal*-Nucleosidmonophosphaten.



Prodrug:

X = Donor, Nu = OH⁻

Aktivester:

X = Acceptor, Nu =

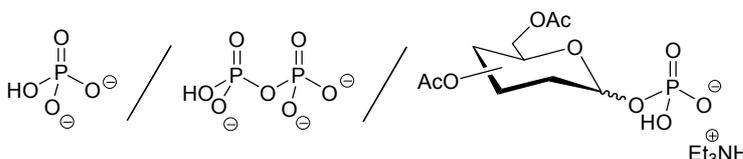


Abbildung 92: *cycloSal*-Nucleotide als Prodrugnucleotide und Aktivester

Die *cycloSal*-Nucleotide wurden als lipophile Vorläufer potentieller Wirkstoffe, sogenannte Prodrugs, entwickelt. Um eine passive Membrandurchgängigkeit zu ermöglichen werden Salicylalkohol-Derivate zur Maskierung der Nucleotide eingesetzt. In der Zelle werden *cycloSal*-Nucleotide mit Hydroxidionen nucleophil angegriffen und Nucleosidmonophosphate freigesetzt. Ähnlich können diese *cycloSal*-Verbindungen mit anderen Nucleophilen reagieren und als synthetische Bausteine eingesetzt werden (Abb. 92, S. 98). Um das synthetische Potential dieser Phosphataktivester zu erhöhen, müssen sie mit acceptorsubstituierten Salicylalkoholen maskiert werden.

Die Darstellung der Nucleosiddiphosphat-Glycoside erfolgte nach einer konvergenten Synthesestrategie. Sie gliederte sich in die Synthese der acceptorsubstituierten Saligenylchlorphosphite, die Kupplung mit entsprechend geschützten Nucleosiden zu aktivierten Phosphattriestern sowie abschließend deren Umsetzung mit anomerenreinen Glycosyl-1-phosphaten zu den entsprechenden Zuckernucleotiden (Abb. 93).

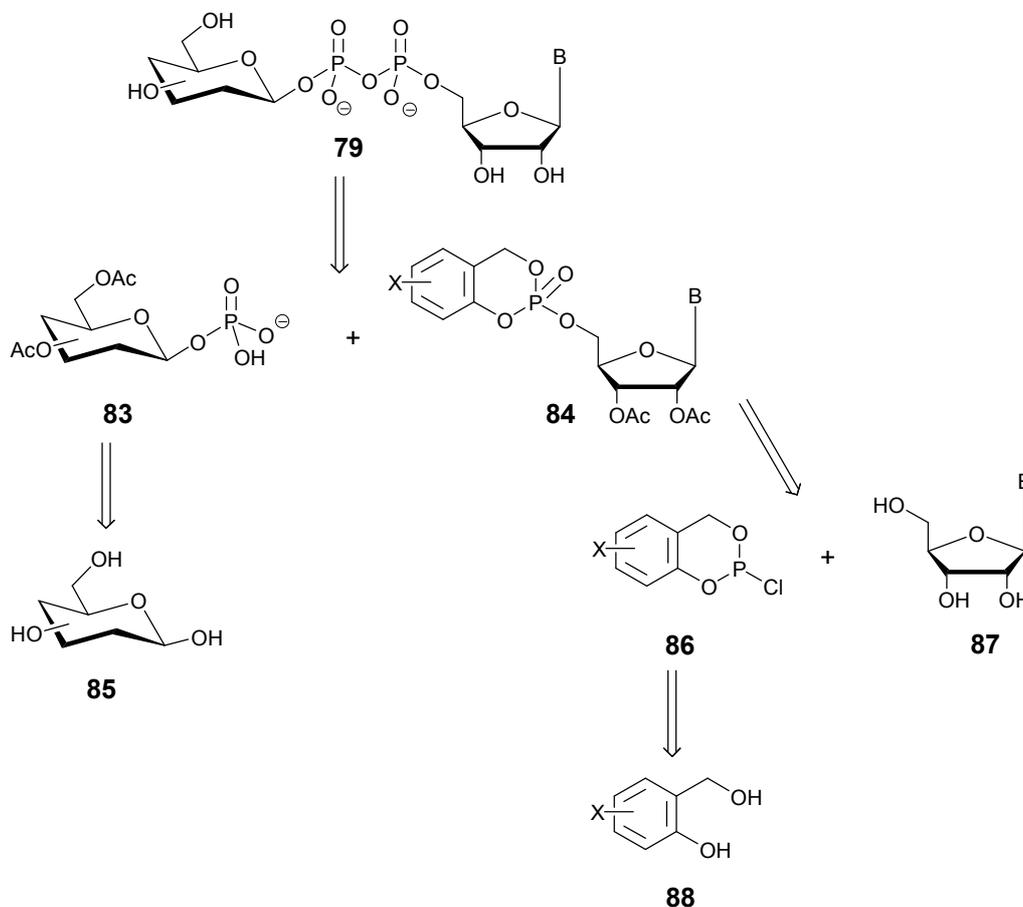


Abbildung 93: Konvergente Synthese der Zuckernucleotide

Für die Darstellung der *cycloSal*-Verbindungen wurde in der Arbeitsgruppe eine Methode etabliert, die die Darstellung der donorsubstituierten Phosphatriester in sehr guten Ausbeuten (>80%) erlaubte. Diese Methode wurde auf die Darstellung der acceptorsubstituierten Phosphatriester übertragen und lieferte *cycloSal*-Verbindungen mit einem starken Acceptor (NO₂) nur in niedrigen Ausbeuten (<20%). Allerdings funktionierte die Methode nicht immer zuverlässig. Erst die Verwendung eines neuen Oxidationsmittels Oxone[®], ein gemischtes Salz aus 2KHSO₅·KHSO₄·K₂SO₄, und überarbeitete Aufarbeitungsmethode brachte den gewünschten Erfolg.^[63] Die 5''-Nitro-*cycloSal*-Verbindungen wurden mit einem hohen Reinheitsgrad erhalten und konnten als Rohsubstanzen für die folgenden Synthesen eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neben nitrosubstituierten auch 5''-Methylsulfonyl- sowie 5''-Cyano-*cycloSal*-Triester verschiedener Nucleotide synthetisiert und für die Darstellung der NDP-Glycoside eingesetzt werden. Die *cycloSal*-Triester wurden durch die Umsetzung der jeweiligen Nucleosiden mit acceptorsubstituierten Saligenylchlorphosphite, dargestellt aus entsprechenden Salicylalkoholen, synthetisiert.

5-Nitrosalicylalkohol **89** wurde durch Reduktion des entsprechenden Aldehyds **90** in einer Ausbeute von 88% erhalten (S. 30). 5-Methylsulfonylsalicylalkohol **96** wurde aus 5-Methylmercaptophenol **92** über ein Benzodioxoborinderivat in einer Ausbeute über zwei Stufen von 56% synthetisiert (S. 31). Die Synthese des 5-Cyansalicylalkohols **95** konnte wahrscheinlich auf Grund des starken desaktivierenden Effektes der Cyanogruppe nicht erzielt werden (S. 31-33).

Die Synthese der cyclischen Saligenylchlorphosphite **100-101** erfolgte nach einer etablierten Methode durch Reaktion der Salicylalkohole **89** und **96** mit Phosphortrichlorid bei tiefen Temperaturen mit Ausbeuten von 89 und 69% (S. 33-34).

Zur Vermeidung der Nebenreaktionen bei der Synthese der *cycloSal*-Phosphatriester sowie nachfolgender Synthese der NDP-Glycoside wurden die jeweiligen funktionellen Gruppen der eingesetzten Nucleoside durch Acetylschutzgruppen blockiert. Die Darstellung der geschützten Nucleoside **111** und **113** erfolgte nach einer erprobten, drei Stufen umfassenden Synthese mit guten Ausbeuten (S. 35-36). Die erfolgreiche Synthese des geschützten Guanosins **112**

sowie 2'-Desoxyguanosins **113** erfolgte nach einer chemoenzymatischen zweistufigen Methode in den Gesamtausbeuten von 50% und 61% (S. 37).

Mit den erhaltenen Saligenylchlorphosphiten **100-101** und den geschützten Nucleosiden **111-113** konnten anschließend die Umsetzungen zu den entsprechenden *cycloSal*-Nucleotiden durchgeführt werden. Die intermediär gebildeten Phosphor(III)-Verbindungen wurden anschließend in situ mit Oxone[®] zu den entsprechenden *cycloSal*-Nucleosidmonophosphaten **117-122** oxidiert (S. 40-41). Die 5''-Nitro-*cycloSal*-Nucleotide **117-119** wurden in hoher Reinheit in Ausbeuten von 50 bis 88% erhalten. Die 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal*-Nucleotide **120-122** wurden ebenfalls in hoher Reinheit in Ausbeuten von 70 bis 83% erhalten. Diese konnten jedoch im Gegensatz zu nitrosubstituierten Derivaten anschließend chromatographisch gereinigt werden. Die *cycloSal*-Nucleotide **120-122** wurden in reiner Form in den Ausbeuten von 55 bis 60% synthetisiert (S. 43).

Um anomenreine Zielverbindungen zu erhalten, wurden die benötigten Glycosyl-1-phosphate anomenrein synthetisiert. Die peracetylierten Dibenzylphosphate **141-142** wurden nach der Phosphoramiditmethode als α/β -Gemische synthetisiert. Die beiden Anomere konnten anschließend säulenchromatographisch voneinander getrennt werden. Die Dibenzylphosphate **143-146** wurden dagegen aufgrund der Effekte, die die Acetatester und -amide an C-2 ausüben, als reine α -Anomere erhalten. Die anschließende hydrogenolytische Debenzylierung lieferte α -Glycosyl-1-phosphate **147a-151** und **67** als Triethylammoniumsalze in Ausbeuten von 80 bis 98% (S. 45-48). Da bei der Phosphoramiditmethode das α -Anomer als Hauptprodukt entsteht und die erhaltene Menge an β -Anomer unzureichend war, wurden die β -Glycosylderivate **147b** und **148b** zusätzlich mittels Koenigs-Knorr-Methode generiert. Beide β -Glycosyl-1-phosphate wurden als Triethylammoniumsalze in vier Stufen in Gesamtausbeuten von ca. 60% erhalten (S. 49-50). Für die Synthese des NDP-Trisaccharides **82** wurde das Trisaccharidphosphat **81** benötigt. Es konnte erfolgreich das Dibenzylphosphat des Lactosaminderivates **167** dargestellt werden, jedoch scheiterte die anschließende Synthese zum Trisaccharidphosphat **81** an der Spaltung des 4',6'-O-Benzylidenacetals (S. 52-57).

Zur Darstellung der Zielverbindungen wurden die entsprechenden 5''-Nitro-*cycloSal*-Nucleotide **117-119** mit Glycosyl-1-phosphaten gekoppelt. Zunächst erfolgte die Synthese nach dem in der Arbeitsgruppe etabliertem Protokoll. Allerdings wurde neben schlechten Ausbeuten, die Entstehung der Nucleosidmonophosphate als Nebenprodukte beobachtet. Daher wurden die Stabilität der Zielverbindungen bei den Reaktionsbedingungen getestet und die Reaktionsparameter entsprechend optimiert (S. 65-69). Im Gegensatz zu dem ursprünglichen Syntheseprotokoll wurden Umsetzungen bei Raumtemperatur und mit zwei Äquivalenten des Nucleophils durchgeführt. Weiterhin wurden bessere Ausbeuten erzeugt, wenn die Edukte sorgfältig im Ölpumpenvakuum und über Molekularsieb vorgetrocknet wurden. Die gewünschten Produkte wurden in Ausbeuten bis zu 61% erhalten (S. 72-74).

Weiterhin konnten die Zielverbindungen problemlos in reiner Form nach nur einem Reinigungsschritt isoliert werden, indem die NMPs mit Hilfe von alkalischer Phosphatase zu Nucleosiden und Phosphat abgebaut wurden. Die gewünschten Produkte wurden in Ausbeuten bis zu 69% erhalten (S. 78-80).

Neben nitrosubstituierten Triestern wurden auch 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal*-Nucleotide **120-122** zur Darstellung der Zielverbindungen eingesetzt. Der Vorteil dieser Verbindungen ist, dass sie im Gegensatz zu Nitro-Phosphateestern **117-119** säulenchromatographisch gereinigt werden konnten und so als reine Substanzen für die Kupplungsreaktionen eingesetzt werden konnten. Die während dieser Arbeit gewonnenen Erfahrungen wurden hier angewendet und die gewünschten NDP-Glycopyranosen (Abb. 82-84, S. 88-90) in den Ausbeuten von 61 bis 89% synthetisiert. Neben Monosacchariden wurde auch das UDP-Disaccharid **8** mit Hilfe der *cycloSal*-Aktivester in 90% Ausbeute erhalten.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit die zuvor erarbeitete Methode zur Darstellung der NDP-Glycoside erfolgreich optimiert werden. Es konnte demonstriert werden, dass neben nitrosubstituierten Triestern auch Methylsulfonylderivate als reaktive Synthesebausteine eingesetzt werden können. Aufgrund seiner Reaktivität und hoher Reinheit lieferten sie die Zielverbindungen schnell und effizient. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass der Einsatz von Enzymen die Durchführung mancher Reaktionen sowie die Isolierung der Zielverbindungen erleichtert.

6. SUMMARY

Carbohydrates are crucial for a diverse range of biological functions, and as such glycobiology offers numerous new opportunities for clinical diagnosis and therapeutic intervention. Carbohydrates play as oligosaccharides and glycoconjugates important roles in a variety of biological processes. The biosynthesis of these biopolymers is catalyzed by glycosyltransferases. These enzymes require activated sugar donor species, typically in the form of sugar nucleotides (NDP-sugars), and transfer monosaccharide residue stereospecifically to acceptors such as oligosaccharides, lipids or proteins.

For this reason, a chemical access to NDP-sugars is of great interest as substrates for enzymatic reactions, as enzyme inhibitors, as tools for the study of glycoconjugate biosynthesis and as pharmacological substances. As a result, a number of different methods have been developed for the preparation of naturally occurring sugar nucleotides as well as for their structural analogs. A variety of procedures has been reported that can be classified in three categories. The first one is enzymatic synthesis of natural NDP-sugars. The second category involves the reaction of a protected and at the anomeric center activated glycosyl donor with salts of nucleoside 5'-diphosphate. And third the pyrophosphate bridge can be introduced by coupling of a monosaccharide-1-phosphate with an activated nucleoside 5'-monophosphate. However, all this literature-known chemical procedures either led to anomeric mixture of NDP-sugars or proceed with long reaction times.

The thesis in hand describes the preparation of various NDP-sugars starting from *cycloSal*-nucleotides as active esters. Originally, *cycloSal*-nucleotides had been developed as prodrug to deliver biological active nucleotides into cells. These nucleotides are masked by salicylalkohol to ensure the membrane-permeability of phosphorylated drugs. The pH-dependent cleavage is initiated by nucleophilic attack of water/hydroxide at the phosphate triester and yields by selective hydrolysis pathway to nucleotide and masking unit. For synthetic application, the *cycloSal*-nucleotide can be cleaved by an initial attack of other nucleophiles. So, the reaction of glycosyl monophosphate on phosphorus center of *cycloSal*-nucleotide led to NDP-sugars. For a fast and efficient reaction it is important to apply strong acceptor substituted *cycloSal*-nucleotides like 5-nitro and 5-methylsulfonyl in order to increase the electrophilic properties of the phosphorous atom.

Summary

As starting material several *cycloSal*-nucleotides and glycosyl monophosphates were prepared. The *cycloSal*-nucleotides were prepared by known synthetic routes using the high reactivity of phosphorous(III)-reagents. Previously, 5-nitrosalicylalkohol **89** was synthesized by reduction of the corresponding aldehyde in 88% yield and 5-methylsulfonylsalicylalkohol **96** was synthesized by hydroxymethylation of *p*-methylmercaptophenol in 56% yield over two steps. The cyclic chlorophosphite **100-101** were achieved by a standard procedure using phosphorous trichloride at low temperature. To avoid side reactions during the *cycloSal*-triesters synthesis and for better solubility, the corresponding nucleosides **102-104** were protected with acetyl groups. The nucleosides **111** und **113** were synthesized in three steps by silylation, acetylation and subsequent desilylation. The nucleosides **112-113** were achieved by a chemoenzymatic method in two steps in 50-60% yields. The coupling of the chlorophosphites **100-101** with the acetylated nucleosides **111-113** was carried out in acetonitrile at -20 °C. The resulting phosphite triesters were oxidized in one-pot reaction with oxone[®], which is a mixed salt composed of 2KHSO₅·KHSO₄·K₂SO₄. The inorganic salts could be removed by extraction with water. The purity of resulting *cycloSal*-nucleotides **117-122** was found to be sufficiently high for the following reactions with sugar phosphates according to ³¹P-NMR spectrum. However, 5''-methylsulfonyl-*cycloSal*-nucleotides **120-122** could be purified by chromatography. These pure active triesters obtained in following coupling reactions NDP-sugars in higher yields.

The glycosides were peracetylated by standard conditions to increase the solubility and to minimize side reactions at the hydroxyl functions. The peracetylated glycosides **128-134** were deacetylated at the anomeric center by hydrazinium acetate and treated with dibenzyl(diisopropylamino)phosphine in a presence of dicyanoimidazole to give the phosphite intermediates, which were converted into the α/β -anomeric mixture of 1-phosphates by oxidation with *m*-chloroperbenzoic acid. However, both anomers could be separated from each other by column chromatography. In the case of glycosides **143-146** only α -anomers were obtained. For the formation of the β -configured glycosyl-1-phosphate, peracetylated glucose **128** and galactose **129** were converted into pyranosyl-bromides **152-153**, which were treated with dibenzylphosphate in the presence of Ag₂CO₃. Subsequently, the phosphate moieties were debenzylated by hydrogenolysis using

Pd/C, H₂ and Et₃N to give anomerically pure glycosyl-1-phosphates **147-151** and **67** as their triethylammonium salts in 80-98% yield.

The aims of the presented thesis were an optimisation of a new route towards NDP-sugar developed in our group and synthesis of new sugar nucleotides. The original protocol is a two-step procedure including the coupling of glycosyl-1-phosphate to the *cycloSal*-triester and the deacetylation to desire NDP-sugar in second step. Originally, the preparation of target molecules was carried out in DMF at 50 °C. Herein, the stability of NDP-sugars was tested at coupling and deacetylation conditions. Because of decomposition of the product at 50 °C, the 5''-nitro-*cycloSal*-nucleotides and glycosyl-1-phosphates were reacted finally at room temperature. In contrast to the original protocol two equivalents of nucleophile were used. Therefore, the highly hygroscopic triethylammonium salts of sugar phosphates were exhaustively dried in vacuum and then dissolved in DMF over molecular sieve. After reworking of the original protocol yields until 61% were obtained. To facilitate the efficient purification of sugar nucleotide alkaline phosphatase was added after deacetylation. This led to dephosphorylation of the by-product nucleoside monophosphate and easier isolation of the products via reversed-phase chromatography using water as the eluting solvent. The NDP-sugars were successfully obtained on this way with yields up to 69%. However, the best results were achieved by this method using purified 5''-methylsulfonyl-*cycloSal*-triester. The UDP-, GDP- and dGDP-glycosides (Abb. 82-84, S. 88-90) were obtained with yields between 61% and 89%. Additionally, this method was successfully used for the preparation of NDP-disaccharide, UDP- α -D-LacNAc **8** in 90% yield.

In conclusion, the thesis in hand demonstrates that acceptor substituted *cycloSal*-nucleotides are effective chemical synthons for efficient and fast syntheses of NDP-mono- and oligosaccharides. The original method was optimized with regard to the reaction temperature, the nucleophile equivalents, the substituents at the *cycloSal*-active ester and the isolation using alkaline phosphatase. The method can be applied to the synthesis of anomeric pure NDP-sugars with modified sugar or nucleosides.

7. EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 Allgemeines

7.1.1 Lösungsmittel und Reagenzien

Acetanhydrid: $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ [102.09]; Sdp.: 138-140 °C; d = 1.08
Aldrich Nr. 691275 unter Schutzgas (Stickstoff) destilliert und über Molekularsieb 4Å aufbewahrt.

Acetonitril: $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ [41.05]; Sdp.: 81-82 °C; d = 0.78
technische Qualität; mehrere Tage unter Schutzgas (Stickstoff) und über Calciumhydrid zum Rückfluss erhitzt, destilliert und über Molekularsieb 3Å aufbewahrt.

Acetylchlorid: CH_3COCl [78.50]; Sdp.: 52 °C; d = 1.10
Aldrich Nr. 320129 unter Schutzgas (Stickstoff) destilliert und über Molekularsieb 4Å aufbewahrt.

Alkalische Phosphatase:
aus Kalb-Darm [Grade I]; Roche Applied Science, 4000 Units, 23.4 mg Lyo.

Deuteriochloroform: CDCl_3 [120.38]; Sdp.: 60.9 °C; d = 1.5
Deutero GmbH, über Molekularsieb 4Å getrocknet.

Dichlormethan: CH_2Cl_2 [84.93]; Sdp.: 39-40 °C; d = 1.325
a) technische Qualität; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck destilliert.
b) technische Qualität; mehrere Tage unter Schutzgas (Stickstoff) und über Calciumhydrid getrocknet, destilliert und über Molekularsieb 4Å aufbewahrt.

- Diethylether: $C_4H_{10}O$ [74.12]; Sdp.: 34.5 °C, d = 0.867
a) technische Qualität; destilliert und über KOH aufbewahrt.
b) technische Qualität; 3-4 Stunden unter Schutzgas (Stickstoff) und über Kalium/Benzophenon zum Rückfluss erhitzt, destilliert und über Molekularsieb 4Å aufbewahrt.
- Di-*iso*-propylethylamin: $[(CH_3)_2CH]_2NC_2H_5$ [129.24]; Sdp.: 127 °C; d = 0.742
Aldrich Nr. 387649 unter Schutzgas (Stickstoff) destilliert und über Molekularsieb 4Å aufbewahrt.
- N,N*-Dimethylformamid: $C_3H_7N_1O_1$ [73.09]; Sdp.: 153 °C; d = 0.94
puriss. Absolut, über Molekularsieb, H_2O : 0.001%;
Fluka Nr. 40248.
- 1,4-Dioxan: $C_4H_8O_2$ [88.11]; Sdp.: 101 °C; d = 1.030
technische Qualität; mehrere Tage unter Rückfluss über Natrium getrocknet, destilliert und über Molekularsieb 4Å aufbewahrt.
- Dimethylsulfoxid- d_6 : $(CD_3)_2SO$ [84.17]; Sdp.: 189 °C; d = 1.19
Deutero GmbH, über Molekularsieb 4Å getrocknet.
- Essigsäureethylester: $C_4H_8O_2$ [88.11]; Sdp.: 77 °C; d = 0.902
technische Qualität; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck destilliert.
- n*-Hexan: C_6H_{14} [86.17]; Sdp.: 68.7 °C; d = 0.65
technische Qualität; unter Normaldruck destilliert.
- Methanol: CH_4O [32.04]; Sdp.: 64 °C; d = 0.791
a) puriss. Absolut, über Molekularsieb, Fluka Nr. 65542.
b) technische Qualität; unter Normaldruck destilliert.
- Petrolether (50-70): Sdp.: 50-70 °C
technische Qualität; unter Normaldruck destilliert.

- Phosphor(III)-chlorid: PCl_3 [137.33]; Sdp.: 74-78 °C; d = 1.574
Aldrich 310115, unter Schutzgas (Stickstoff) destilliert und über Molekularsieb 4Å aufbewahrt.
- Pyridin: $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ [79.10]; Sdp.: 115 °C; d = 0.980
puriss. Absolut, über Molsieb, H_2O : 50 ppm; Fluka Nr. 82704.
- Tetrahydrofuran: $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ [72.11]; Sdp.: 65-66 °C; d = 0.890
technische Qualität; 3-4 Stunden unter Schutzgas (Stickstoff) und über Kalium/Benzophenon zum Rückfluss erhitzt, destilliert und über Molekularsieb 4Å aufbewahrt.
- Toluol: C_7H_8 [92.14]; Sdp.: 110 °C; d = 0.990
technische Qualität; über Natrium getrocknet und bei Normaldruck destilliert.
- Triethylamin: $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$ [101.19]; Sdp.: 89 °C; d = 0.72
a) technische Qualität; über KOH gelagert.
b) technische Qualität; mehrere Tage unter Schutzgas (Stickstoff) und über Calciumhydrid zum Rückfluss erhitzt, destilliert und über Molekularsieb 4Å aufbewahrt.
- Triethylammoniumacetat-Puffer (TEAA-Puffer) pH= 6.9 für die HPLC:
Es wurden 5.88 mL Eisessig und 10.12 mL Triethylamin in ca. 900 mL Reinstwasser gelöst und auf einen pH-Wert von 6.9 eingestellt und mit Reinstwasser auf 1000 mL aufgefüllt.
- Triethylammoniumacetat-Puffer (TEAA-Puffer) pH= 8.0 für die HPLC:
Es wurden 3.0 mL Eisessig und 5.0 mL Triethylamin sowie 50 mL Acetonitril in ca. 900 mL Reinstwasser gelöst und auf einen pH-Wert von 8.0 eingestellt und mit Reinstwasser auf 1000 mL aufgefüllt.

7.1.2 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (Merck Nr. 5554; Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Die Platten wurden auf eine Größe von 1-8 x 10 cm zugeschnitten; die Laufstrecke betrug 5-10 cm. Alle R_f -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Als Färbereagenz wurde 10%-ige Schwefelsäure verwendet.

Präparative Säulenchromatographie

Substanzgemische zwischen 0.1 g - 10 g Rohausbeute wurden über eine Säule mit leichtem Überdruck gereinigt. Als Trennmateriale wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 0.035 - 0.070 mm, 60 Å [60.08]; SiO₂ (Acros Organics bzw. Merck) verwendet.

Umkehrphasenchromatographie

Substanzgemische zwischen 20-200 mg Rohausbeute wurden über eine Säule mit leichtem Überdruck gereinigt. Als Trennmateriale wurde Kieselgel LiChroprep RP-18 mit einer Korngröße von 40-63 µm (Merck) verwendet.

Zirkulare präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron)

Unempfindliche Substanzgemische mit 1-4 g Rohausbeute wurden über eine Platte mit einer Schichtdicke von 1-4 mm gereinigt. Als Trennmateriale wurde Kieselgel Merck Typ 7749 mit Gipszusatz und Fluoreszenzindikator [60 PF₂₅₄] verwendet.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungschromatographie wurde an einer Merck-Hitachi-Anlage mit der Software Chromatography Data Station Software HPLC System Manager Version 3.1.1. durchgeführt. Bei dem Interface handelte es sich um das Model L-7000, bei

der Pumpe um das Model L-7100, bei dem automatischen Probenwechsler um das Model L-7200 und bei dem Dioden Array Detektor um das Model L-7455. Es wurde eine RP-18 endcapped 5 μm Li Chrosphor 100, EcoCART 125-3 Säule verwendet.

HPLC-Methode: Acetonitril-Gradient von 0-23% in TEAA-Puffer (pH 6.9) bis 50 Minuten, dann 100% Acetonitril für 5 Minuten und anschließend 100% TEAA-Puffer für 10 Minuten.

7.1.3 Spektroskopie

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden in der spektroskopischen Abteilung der Universität Hamburg an den Instituten für Organische und Anorganische Chemie aufgenommen. Es standen folgende Geräte zur Verfügung:

^1H -NMR: Bruker AMX 400 (400 MHz), Bruker DMX 500 (500 MHz), Bruker AV 400 (400 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO- d_6 (δ = 2.50 ppm), CDCl_3 (δ = 2.50 ppm), CD_3OD (δ = 3.31 ppm) und C_6D_6 (δ = 7.26 ppm). Die Aufnahmen erfolgten bei 400 MHz in 5 mm Röhren über einen Messbereich von -2 bis +14 ppm.

^{13}C -NMR: Bruker AMX 400 (101 MHz), Bruker AV 400 (101 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO- d_6 (δ = 39.52 ppm), CDCl_3 (δ = 77.16 ppm), CD_3OD (δ = 49.00 ppm) und C_6D_6 (δ = 128.00 ppm). Die Aufnahmen erfolgten bei 100.6 MHz in einen Messbereich von 0 bis 200 ppm.

^{31}P -NMR: Bruker DMX 500 (202 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen einen externen Standard (85% Phosphorsäure).

Die Zuordnung der Signale erfolgte durch die Aufnahme zweidimensionaler Spektren (H,H-Cosy, HSQC, HMBC, NOESY).

Massenspektrometrie (MS)

FAB (*Fast Atom Bombardement*):

Die FAB-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg am Institut für Organische Chemie mit einem doppelfokussierenden Spektrometer VG/70-250 F der Firma VG Analytical gemessen. Als Stoßgas wurde Xenon, als Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol verwendet.

EI (Elektronenstoß-Ionisation):

Die EI-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg am Institut für Organische Chemie mit einem doppelfokussierenden VG Analytical VG/70-250S-Spektrometer aufgenommen.

ESI (Elektrospray-Ionisation):

Die ESI-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg am Institut für Organische Chemie mit einem ThermoQuest Spektrometer der Marke Finnigan, Modell MAT 95 XL gemessen.

7.1.4 Geräte

Schmelzpunktgerät

Die Schmelzpunkte wurden in einseitig offenen Schmelzpunktröhrchen mit einem Schmelzpunkt-Bestimmer apotec der Firma Otto Stein ermittelt.

Infrarot-Spektrometer

Die IR-Spektren wurden an einem IR-Spektrometer AVATAR 370 FT-IR und an einem IR-Spektrometer Bruker Alpha P ATR bei Raumtemperatur in einem Messbereich von 400 - 4000 cm^{-1} aufgenommen. Die Substanzen wurden als Pulver, Flüssigkeit, KBr - Presslinge sowie mit Hilfe von NaCl-Platten gemessen.

Polarimeter

Der Drehwert der chiralen Verbindungen wurde an einem Perkin Elmer Polarimeter 341 mit einer Hg-Lampe (546 nm) und an einem Perkin Elmer Polarimeter mit einer Na-Lampe (598 nm, D-Linie) bei Raumtemperatur aufgenommen. Der am Polarimeter abgelesene Wert ist der optische Drehwert α , welcher in den spezifischen Drehwert $|\alpha|_{\lambda}^t$ mit der Formel $|\alpha|_{\lambda}^t = \frac{\alpha * 100}{c * l}$ umgerechnet werden muss.

UV-Spektrometer

Die UV-Spektren wurden an einem UV-Spektralphotometer (CARY 1E) der Firma Varian aufgenommen.

Gefriertrocknung

Wässrige Lösungen wurden an einer Christ-Alpha 2-4 Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

7.2 Synthesen

7.2.1 Synthese der *cycloSal*-Nucleosidmonophosphate

AAV 1. Synthese von 2-Phenyl-4*H*-[1, 3, 2]-benzodioxaborinen

In einer Dean-Stark-Apparatur wurden 1 Äq. Phenol, 1.2 Äq. Phenylboronsäure und 2 Äq. *para*-Formaldehyd in Toluol aufgenommen. Danach wurden 0.5 Äq. Propionsäure zugesetzt und das Reaktionsgemisch unter Rückfluss (Ölbadtemperatur 135 °C) erhitzt. Alle zwei Stunden wurde das Reaktionsgemisch leicht abgekühlt und 2 Äq. *para*-Formaldehyd zugesetzt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Reaktionsgemisch abgekühlt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mit Dichlormethan und Wasser aufgenommen und die wässrige Phase anschließend zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO₃-

Lösung und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt ohne Reinigung weiter eingesetzt.

AAV 2. Synthese von Saligenylchlorphosphiten

Zu einer auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlten Lösung von 1 Äq. Salicylalkohol in 5 mL abs. THF und 30 mL abs. Diethylether wurden unter Stickstoffatmosphäre langsam 1.3 Äq. Phosphortrichlorid zugetropft. Nach 10 min Rühren wurden 2.2 Äq. abs. Pyridin gelöst in 10 mL abs. Diethylether innerhalb von einer Stunde bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ zugetropft. Anschließend wurde das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde die Suspension über Nacht im Kühlschrank zur vollständigen Ausfällung des Pyridiniumchlorids gestellt. Der Niederschlag wurde unter Schutzgasatmosphäre abfiltriert und das Filtrat unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Produkt wurde ohne Reinigung weiter eingesetzt.

AAV 3. Selektive Einführung des Silylethers an der 5'-Position der Nucleoside

In einer Stickstoffatmosphäre wurde 1 Äq. Nucleosid zweimal mit je 20 mL abs. Pyridin coevaporiert und erneut mit abs. Pyridin aufgenommen. Die Suspension wurde mit 1.1 Äq. TBDMS-Cl und 1.1 Äq. Imidazol versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Methanol und Entfernen des Lösungsmittels erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (2.5-10%).

AAV 4.1. Acetylierung der Nucleoside mit Essigsäureanhydrid

Unter Schutzgas wurde 1 Äq. Nucleosid in abs. Pyridin gelöst und auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Danach wurden pro freie Funktionsgruppe 3 Äq. DMAP und 5 Äq. Essigsäureanhydrid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mit Dichlormethan aufgenommen, mehrmals mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und einmal mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und

unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde durch Ausfällen oder säulenchromatographische Reinigung mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-3%) gewonnen.

AAV 4.2. Acetylierung der Nucleoside mit Acetylchlorid

Unter Schutzgas wurde 1 Äq. Nucleosid in abs. Pyridin gelöst und auf 0 °C gekühlt. Danach wurden pro freie Funktionsgruppe 3 Äq. Acetylchlorid langsam zugetropft und die Reaktionslösung 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde durch Ausfällen oder säulenchromatographische Reinigung mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-3%) gewonnen.

AAV 5. Spaltung des Silylethers von Nucleosiden

Unter Schutzgas wurde 1 Äq. des TBDMS-geschützten Nucleosids in abs. THF gelöst und bei 0 °C mit 4 Äq. Triethylamintrihydrofluorid und 3 Äq. Triethylamin versetzt. Nach 6 h Rühren wurde das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan aufgenommen und drei Mal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-5%) säulenchromatographisch gereinigt.

AAV 6. Synthese von *cyclo*Saligenylnucleosidmonophosphaten

Unter Schutzgas wurde 1 Äq. des Nucleosidderivates in einem Schlenkkolben mit 5 Kugeln Molsieb 3 Å in 20 mL abs. Acetonitril gelöst und auf -20 °C abgekühlt. Die Lösung wurde bei -20 °C mit 2 Äq. abs. Diisopropylethylamin versetzt und nach 10 min vorsichtig 2 Äq. Saligenylchlorphosphit gelöst in 5 mL abs. Acetonitril zugetropft. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und bis zum vollständigen Umsatz des Nucleosides bei Raumtemperatur gerührt (18 h). Danach wurde das Gemisch auf -10 °C abgekühlt und mit 4 Äq. Oxone[®] gelöst in kaltem Wasser versetzt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 15 min gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in 30 mL kaltem Wasser aufgenommen und

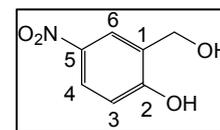
zweimal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit kaltem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Ethylacetates, wurde der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen, filtriert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde entweder als Rohprodukt weiter eingesetzt oder am Chromatotron gereinigt.

Synthese von 2-Hydroxy-5-nitrobenzylalkohol **89**

In einem Rundkolben wurden 3.00 g (17.9 mmol) 2-Hydroxymethyl-5-nitrobenzaldehyd **90** in 40 mL 99.8%-igen Ethanol gelöst und mit 476 mg (12.6 mmol) Natriumborhydrid in kleinen Portionen vorsichtig versetzt. Nach 20 min wurde die Lösung mit 40 mL Wasser versetzt und konz. HCl zugetropft bis die Lösung gelb wurde. Das Lösungsmittel wurde abgetrennt, der Rückstand zweimal mit Methanol coevaporiert und anschließend aus Wasser umkristallisiert.

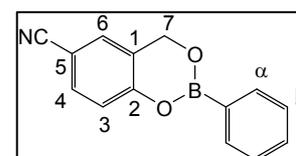
Ausbeute: 2.66 g (15.7 mmol, 88%) eines gelben Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 11.1 (br. s, 1H, phen. OH), 8.21 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 3.1 Hz, H-6), 8.02 (dd, 1H, ⁴J_{HH} = 3.1 Hz, ³J_{HH} = 8.9 Hz, H-4), 6.93 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.9 Hz, H-3), 5.34 (br. s, 1H, benz. OH), 4.50 (s, 2H, CH₂). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 160.4 (C-2), 139.6 (C-5), 130.3 (C-1), 123.9 (C-4), 122.6 (C-6), 114.6 (C-3), 57.3 (CH₂). - IR (KBr) ν [cm⁻¹]: 3565, 3461, 3081, 1619, 1589, 1483, 1440, 1333, 1198, 1177, 988, 816. - MS (FAB, m/z) C₇H₇NO₄: ber.: 169.04, gef.: 170.1 [M+H]⁺. - DC: R_F-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.55. - Smp.: 130.5 °C.



Synthese von 6-Cyano-2-phenyl-4H-[1, 3, 2]-benzodioxaborin **93**

Nach AAV 1 wurden 1.00 g (8.39 mmol) 4-Cyanphenol **91**, 1.23 g (10.1 mmol) Phenylboronsäure und 504 mg (16.8 mmol) *para*-Formaldehyd in 20 mL Toluol aufgenommen



und 340 µL (330 mg, 4.50 mmol) Propionsäure zugesetzt. Alle zwei Stunden wurde das Reaktionsgemisch leicht abgekühlt und weitere 504 mg (16.8 mmol) *para*-Formaldehyd zugesetzt. Nachdem die Prozedur sechsmal wiederholt wurde, wurde

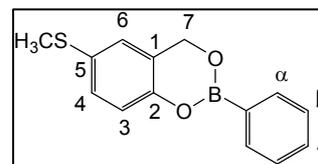
das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand nach AAV 1 aufgearbeitet. Mittels NMR-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, dass das gewünschte Produkt **93** nicht entstanden war, lediglich das Phenol **91** konnte im Spektrum identifiziert werden.

Synthese von 6-Methylmercapto-2-phenyl-4H-[1,3,2]-benzodioxaborin **94**

Nach AAV 1 wurden 15.0 g (110 mmol) 4-Methylmercaptophenol **92**, 14.3 g (120 mmol) Phenylboronsäure und 6.40 g (210 mmol) *para*-Formaldehyd in 200 mL Toluol aufgenommen und 3.20 g (110 μ mol) Propionsäure zugesetzt. Alle zwei Stunden wurde das Reaktionsgemisch leicht abgekühlt und weitere 6.40 g (210 mmol) *para*-Formaldehyd zugesetzt. Nachdem die Prozedur sechsmal wiederholt wurde, wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand nach AAV 1 aufgearbeitet.

Rohausbeute: 26.5 g eines gelben Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.95 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 1.4$ Hz, H_α), 7.51-7.48 (m, 1H, H_γ), 7.43-7.39 (m, 2H, H_β), 7.20-7.17 (m, 1H, H-4), 7.04-7.02 (m, 1H, H-6), 6.95 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, H-3), 5.21 (s, 2H, H-7), 2.47 (s, 3H, CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 134.4 (C_α), 132.3 (C-2), 131.7 (C_γ), 128.6 (C-4), 127.8 (C_β), 125.3 (C-5), 124.5 (C-1), 119.0 (C-6), 62.9 (C-7), 17.4 (CH_3).



Anmerkung: Da es sich um das Rohprodukt handelt, wurden nur ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie angefertigt.

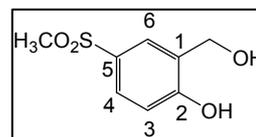
Synthese von 2-Hydroxy-5-methylsulfonylbenzylalkohol **96**

Es wurden 3.00 g (entspricht 12.4 mmol von 4-Methylmercaptophenol **92**) 6-Methylmercapto-2-phenyl-4H-[1,3,2]-benzodioxaborin **94** in 7.5 mL Essigsäure gelöst und mit 12 mL 30 %-iger H_2O_2 -Lösung 20 h bei 45 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktion mit 10 mL Eiswasser abgebrochen und fünf Mal mit je 20 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und anschließend mit 40%-iger NaHSO_3 -Lösung gewaschen. Nach

Trocknung über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohgemisch säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-4%) gereinigt.

Ausbeute: 1.64 g (8.12 mmol, 65% über 2 Stufen) eines gelben Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 8.52 (br. s, 1H, phen. OH), 7.40-7.37 (m, 1H, H-4), 7.27-7.26 (m, 1H, H-6), 6.95 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.4 Hz, H-3), 5.20 (m, 1H, benz. OH), 4.84 (s, 2H, CH₂),



2.67 (s, 3H, CH₃). -¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 159.6 (C-2), 134.4 (C-5), 126.5 (C-1), 125.3 (C-4), 123.5 (C-6), 117.8 (C-3), 64.2 (CH₂), 43.7 (CH₃). - IR (KBr) ν [cm⁻¹]: 3387, 1637, 1591, 1425, 1371, 1280, 1239, 1083, 1009. - MS (FAB, m/z) C₈H₁₀O₄S: ber.: 202.0, gef.: 203.1 [M+H]⁺. – DC: R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.32. - Smp.: 120.1 °C.

Synthese von 5-Cyano-Salicylaldehyd **97** (*ortho*-Formylierung)

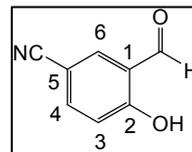
Methode 1 (nach Suzuki)

1.00 g (8.39 mmol) 4-Cyanophenol **91** wurden in 8 mL Trifluoressigsäure gelöst und mit 2.35 g (16.8 mmol) Hexamethylentetramin versetzt. Nachdem die Lösung abkühlte, wurde sieben Stunden bei 100 °C erhitzt. Unter Eiskühlung wurden 3 mL Schwefelsäure (50%) und 15 mL Wasser zugegeben und bei Raumtemperatur 30 Minuten gerührt. Die Reaktionslösung wurde in Ethylacetat aufgenommen und einmal mit Wasser und zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden viermal mit Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abgetrennt, nachdem über Natriumsulfat getrocknet wurde. Das Rohprodukt wurde mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gradienten (50-100%) säulenchromatographisch gereinigt. Das ¹H-NMR-Spektrum des Produktes **97** zeigte eine unbekannte Verunreinigung von ca. 20%.

Ausbeute: 271 mg (1.84 mmol; 22%) eines gelben Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 11.82 (s, 1H, COH), 10.25 (s, 1H, OH), 8.03 (d, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, 1H, H-6), 7.91 (dd, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, ³J_{HH} = 8.7 Hz, 1H, H-4), 7.14 (d,

$^3J_{\text{HH}} = 8.7 \text{ Hz}$, 1H, H-3). - ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 189.1 (C-7), 187.7 (C-2), 138.9 (C-4), 133.5 (C-6), 123.1 (C-1), 188.7 (C-3), 118.4 (C-5). - IR ν [cm^{-1}]: 3304, 2225, 1733, 1705, 1666, 1613, 1552, 1479, 1380, 1290, 1183, 1143, 1110, 1016, 932, 909. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_8\text{H}_5\text{NO}_2$: ber.: 147.03, gef.: 147.0 $[\text{M}]^+$. - DC: R_f -Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.47. - Smp.: 158 °C.



Anmerkung: Erneuter Versuch ergab kein gewünschtes Produkt.

Methode 2 (nach Skattebøl)

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.00 g (8.39 mmol) 4-Cyanophenol **91**, 1.20 g (12.6 mmol) getrocknetes Magnesiumchlorid, 1.70 g (56.6 mmol) *para*-Formaldehyd und 4.40 mL (3.18 g, 31.5 mmol) Triethylamin in 50 mL absolutem Acetonitril gelöst. Die Lösung wurde 44 Stunden bei 95 °C zum Rückfluss erhitzt. Nach einer dünnschichtchromatographischen Kontrolle (DCM/MeOH, 9:1, v/v) wurden erneut 1.70 g (56.6 mmol) *para*-Formaldehyd zugegeben. Nach weiteren 48 Stunden Rühren bei 95 °C konnte mittels Dünnschichtchromatographie (DCM/MeOH, 9:1, v/v) nur eine minimale Umsetzung festgestellt werden. Nach der Zugabe von weiteren 1.70 g (56.6 mmol) *para*-Formaldehyd und weitere 48 Stunden Erhitzen konnte kein Reaktionsvortschritt festgestellt werden. Die Reaktion wurde abgebrochen und auf eine Aufarbeitung verzichtet.

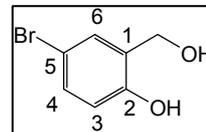
Synthese von 5-Brom-Salicylalkohol **99**

Zu einer Lösung aus 515 mg (13.6 mmol) Lithiumaluminiumhydrid in 50 mL abs. Tetrahydrofuran wurden in einer Stickstoffatmosphäre 3.00 g (14.9 mmol) 5-Brom-2-hydroxybenzaldehyd **98** gelöst in 50 mL abs. Tetrahydrofuran zugetropft. Nachdem die Reaktionslösung zwei Stunden bei Raumtemperatur rührte, erfolgte einstündiges Erhitzen auf 95 °C. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt und mit 37%-iger Salzsäure ein pH-Wert von 4-5 eingestellt. Für die Aufarbeitung wurde die Lösung in Ethylacetat aufgenommen und einmal mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde erneut zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Nach dem

Trocknen über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen unter vermindertem Druck entfernt.

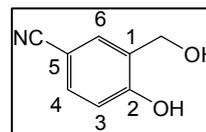
Ausbeute: 2.51 g (12.4 mmol; 82%) eines gelben Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm]: 9.68 (s, 1H, phen. OH), 7.39 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2.2$ Hz, 1H, H-6), 7.19 (dd, $^4J_{\text{HH}} = 2.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 1H, H-4), 6.71 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 1H, H-3), 5.10 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5.6$ Hz, 1H, benz. OH), 4.43 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5.3$ Hz, 2H, CH_2). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm]: 153.2 (C-2), 131.5 (C-1), 129.5 (C-4), 129.3 (C-6), 116.5 (C-3), 109.9 (C-5), 57.5 (C-7). - IR ν [cm^{-1}]: 3134, 1877, 1753, 1604, 1477, 1404, 1352, 1300, 1260, 1175, 1122, 1081, 997, 939. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_7\text{H}_7\text{BrO}_2$: ber.: 201.96, gef.: 202.0 $[\text{M}]^+$. - DC: R_f -Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.59. - Smp.: 164 °C.



Synthese von 5-Cyanosalicylalkohol 95 (Rosemund-von-Braun-Reaktion)

Es wurden 2.48 g (12.2 mmol) 5-Bromsalicylalkohol **99** und 1.32 g (14.8 mmol) Kupfer(I)cyanid in 100 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Nach 20 Stunden Erhitzen auf 150 °C, wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und durch Zugabe von 10%-iger Natronlauge ein stark alkalischer pH-Wert eingestellt. Der ausgefallene Niederschlag wurde filtriert. Das Filtrat wurde mit 37%-iger Salzsäure neutralisiert und der dabei entstandene Niederschlag ebenfalls durch Filtration abgetrennt. Das Filtrat wurde viermal mit Ethylacetat gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (3-10%) gereinigt. Es wurde allerdings nur 5-Bromsalicylalkohol **99** isoliert.



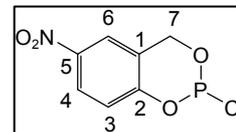
Synthese von 5-Nitrosaligenylchlorphosphit 100

Nach AAV 2 wurden 1.50 g (8.87 mmol) 5-Nitrosalicylalkohol **89**, 1.58 mL (1.60 g, 11.5 mmol) Phosphortrichlorid und 1.58 mL (1.54 g, 19.5 mmol) abs. Pyridin bei -20 °C umgesetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur eine Stunde gerührt. Daraufhin wurde die Suspension über Nacht im Kühlschrank zur

vollständigen Ausfällung des Pyridiniumchlorids gelagert. Die Suspension wurde nach AAV 2 aufgearbeitet.

Ausbeute: 1.84 g (7.85 mmol; 89%) eines gelben Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 8.17 (dd, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, H-4), 7.97 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz, H-6), 7.13 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, H-3), 5.52 (dd, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.8$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 14.6$ Hz, H-7a), 5.14 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 9.8$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 14.6$ Hz, H-7b). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 140.7.



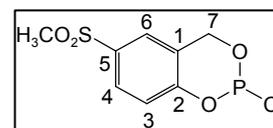
Anmerkung: Aufgrund der Feuchtigkeitsempfindlichkeit des Produktes erfolgte keine weitere Charakterisierung.

Synthese von 5-Methylsulfonylsaligenylchlorphosphit 101

Nach AAV 2 wurden 500 mg (2.47 mmol) 5-Methylsulfonylsalicylalkohol **96**, 439 μL (441 mg, 3.21 mmol) Phosphortrichlorid und 439 μL (449 mg, 5.71 mmol) abs. Pyridin bei -20 °C umgesetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur eine Stunde gerührt. Daraufhin wurde die Suspension über Nacht im Kühlschrank zur vollständigen Ausfällung des Pyridiniumchlorids gelagert. Die Suspension wurde nach AAV 2 aufgearbeitet.

Ausbeute: 447 mg (1.68 mmol; 69%) eines braunen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.84 (dd, $^4J_{\text{HH}} = 4.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 17.2$ Hz, 1H, H-4), 7.61 (d, $^4J_{\text{HH}} = 4.4$ Hz, 1H, H-6), 7.16 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, 1H, H-3), 5.55 (dd, $^4J_{\text{HH}} = 4.8$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 19.6$ Hz, 1H, H-7a), 5.12 (dd, $^3J_{\text{HP}} = 19.6$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 29.6$ Hz, 1H, H-7b), 3.06 (s, 3H, CH_3). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 139.5.



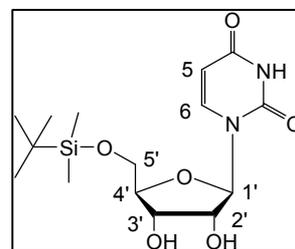
Anmerkung: Auf Grund der Feuchtigkeitsempfindlichkeit des Produktes erfolgte keine weitere Charakterisierung.

Synthese von 5'-O-*tert*-Butyldimethylsilyluridin **105**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 5.00 g (20.5 mmol) Uridin **102** und 3.06 g (45.0 mmol) Imidazol in 30 mL abs. DMF gelöst. Danach wurden 7.85 mL (22.5 mmol) TBDMS-Cl gelöst in Toluol (2.87 M) zugetropft und die Reaktionslösung 1 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Methanol coevaporiert. Das zähflüssige Rohprodukt wurde mit Wasser kristallisiert und säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-5% Methanol) gereinigt.

Ausbeute: 6.61 g (18.4 mmol, 90%) eines weißen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 11.36 (br. s, 1H, NH), 7.77 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-6), 5.76 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.8 Hz, H-1'), 5.56 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-5), 3.99 (t, 1H, ³J_{HH} = 4.8 Hz, H-3'), 3.93 (t, 1H, ³J_{HH} = 4.6 Hz, H-2'), 3.90-3.87 (m, 1H, H-4'), 3.83 (dd, 1H, ³J_{HH} = 2.7 Hz, ³J_{HH} = 11.6 Hz, H-5'a), 3.72



(dd, 1H, ³J_{HH} = 2.9 Hz, ³J_{HH} = 11.6 Hz, H-5'b), 0.88 (s, 9H, *t*Bu), 0.07 (s, 6H, CH₃).
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 163.1 (C-4), 150.6 (C-2), 140.5 (C-6), 101.6 (C-5), 88.0 (C-1'), 84.1 (C-4'), 73.8 (C-3'), 69.6 (C-2'), 62.6 (C-5'), 25.8 (CH₃), 18.1 (C(CH₃)₃). - IR (KBr) ν [cm⁻¹]: 3407, 2928, 1712, 1463, 1398, 1362, 1256, 1113, 1060, 834, 778. - MS (FAB, m/z) C₁₅H₂₆N₂O₆Si: ber.: 358.16, gef.: 359.2 [M+H]⁺. - [α]_D²⁰: +17 ° (c = 0.21, MeOH). - DC: R_F-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.49. - Smp.: 101.7 °C.

Synthese von 2',3'-Di-O-acetyl-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyluridin **108**

Versuch 1.

Nach AAV 4.1 wurden 6.45 g (18.0 mmol) 5'-O-*tert*-Butyldimethylsilyl-uridin **105** und 17.2 mL (18.4 g, 180 mmol) Essigsäureanhydrid umgesetzt. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch nach AAV 4.1 aufgearbeitet und das Rohgemisch säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-3%) gereinigt.

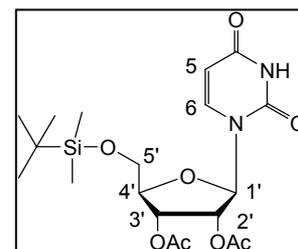
Ausbeute: 7.52 g (17.8 mmol, 92%) eines farblosen Feststoffes.

Versuch 2.

Nach AAV 4.2 wurden 10.2 g (28.4 mmol) 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-uridin **105** und 4.45 mL (4.92 g, 62.6 mmol) Acetylchlorid umgesetzt. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch nach AAV 4.2 aufgearbeitet und das Rohgemisch säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (2-10%) gereinigt.

Ausbeute: 12.2 g (28.4 mmol, 100%) farbloses Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 8.33 (s, 1H, NH), 7.87 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-6), 6.28 (d, 1H, ³J_{HH} = 6.6 Hz, H-1'), 5.73 (dd, 1H, ³J_{HH} = 2.0 Hz, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-5), 5.36-5.30 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.22 (dd, 1H, ³J_{HH} = 1.8 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, H-4'), 3.93 (dd, 1H, ³J_{HH} = 1.9 Hz, ³J_{HH} = 11.6 Hz, H-5'a), 3.84 (dd, 1H, ³J_{HH} = 1.9 Hz, ³J_{HH} = 11.6 Hz, H-5'b), 2.11 (s, 3H, COCH₃), 2.07 (s, 3H, COCH₃), 0.94 (s, 9H, *t*Bu), 0.15 (s, 3H, CH₃), 0.14 (s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 170.0 (COCH₃), 169.7 (COCH₃), 150.4 (C-2), 139.7 (C-6), 103.3 (C-5), 85.4 (C-1'), 83.9 (C-4'), 73.5 (C-3'), 71.9 (C-2'), 63.3 (C-5'), 25.9, 20.8, 20.6 (CH₃). - IR (KBr) ν [cm⁻¹]: 2931, 2858, 1751, 1718, 1460, 1378, 1238, 1125, 1092, 1044, 927. - MS (FAB, m/z) C₁₉H₃₀N₂O₈Si: ber.: 442.17, gef.: 443.2 [M+H]⁺. - [α]_D²⁰: +48 ° (c = 0.11, DCM). – DC: R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.71. - Smp.: 63.5 °C.



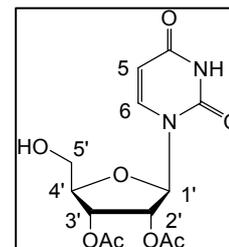
Synthese von 2',3'-Di-O-acetyluridin **111**

Nach AAV 5 wurden 7.38 g (17.5 mmol) 2',3'-Di-O-acetyl-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyluridin **108**, 17.1 mL (16.9 g, 105 mmol) Et₃N*3HF und 9.50 mL (8.85 g, 87.5 mmol) Et₃N versetzt. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch nach AAV 5 aufgearbeitet und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-5%) gereinigt.

Ausbeute: 4.25 g (12.9 mmol, 74%) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 9.28 (s, 1H, NH), 7.75 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-6), 6.08-6.05 (m, 1H, H-1'), 5.78 (dd, 1H, ³J_{HH} = 1.5 Hz, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-5), 5.48-5.46 (m, 2H, H-2',H-3'), 4.21 (d, 1H, ³J_{HH} = 2.3 Hz, H-4'), 3.95-3.84 (m, 2H, H-5'),

2.13 (s, 3H, COCH₃), 2.07 (s, 3H, COCH₃). - ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 170.2, 169.9 (COCH₃), 163.5 (C-4), 150.7 (C-2), 140.9 (C-6), 103.3 (C-5), 87.6 (C-1'), 83.6 (C-4'), 73.1 (C-3'), 71.4 (C-2'), 61.9 (C-5'), 20.8, 20.6 (COCH₃). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 2939, 1750, 1463, 1378, 1240, 1106, 1048, 900, 815. - MS (FAB, m/z)



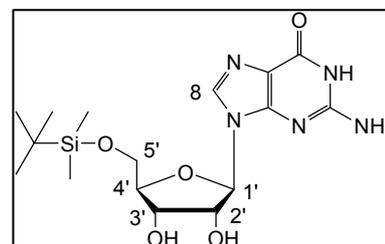
C₁₃H₁₆N₂O₈: ber.: 328.09, gef.: 329.2 [M+H]⁺. - [α]₅₄₆²⁰: +67° (c = 0.23, DCM). - DC: R_F-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.39. - Smp.: 78 °C.

Synthese von 5'-O-tert-Butyldimethylsilylguanosin 106

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 5.81 g (20.5 mmol) Guanosin **103** und 3.06 g (45.0 mmol) Imidazol in 30 mL abs. DMF aufgenommen und zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurden 3.39 g (22.5 mmol) tert-Butyldimethylchlorosilan in 100 mL N,N-Dimethylformamid gelöst und zu der Reaktionslösung getropft. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur gekühlt und 20 h gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch nach AAV 3 aufgearbeitet.

Ausbeute: 4.33 g (10.9 mmol, 53%) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 10.67 (s, 1H, NH), 7.84 (s, 1H, H-8), 6.53 (s, 2H, NH₂), 5.70 (d, ³J_{HH} = 5.3 Hz, 1H, H-1'), 4.33 (t, ³J_{HH} = 5.2 Hz, 1H, H-2'), 4.08 (t, ³J_{HH} = 4.2 Hz, 1H, H-3'), 3.90 (dd, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ³J_{HH} = 3.6 Hz, 1H, H-4'), 3.79 (dd,



³J_{HH} = 3.8 Hz, ²J_{HH} = 11.4 Hz, 1H, H-5'a), 3.71 (dd, ³J_{HH} = 4.0 Hz, ²J_{HH} = 11.4 Hz, 1H, H-5'b), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.05 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 156.7 (C-6), 153.7 (C-2), 151.3 (C-4), 134.8 (C-8), 116.6 (C-5), 86.9 (C-1'), 84.3 (C-4'), 73.8 (C-3'), 72.8 (C-2'), 63.0 (C-5'), 25.8 (SiC(CH₃)₃), -5.5 (Si(CH₃)₂). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 2939, 1750, 1463, 1378, 1240, 1106, 1048, 900, 815.

- MS (FAB, m/z) C₁₆H₂₇N₅O₅Si: ber.: 397.18, gef.: 420.2 [M+Na]⁺. - [α]₅₄₆²⁰: +41.7° (c = 0.06, MeOH). - DC: R_F-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.08. - Smp.: Zersetzung bei 250 °C.

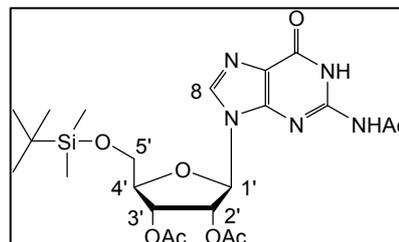
Synthese von N^2 -Acetyl-2',3'-di-O-acetyl-5'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-guanosin **108**

Versuch 1.

Nach AAV 4.1 wurden 6.50 g (16.4 mmol) 5'-O-*tert*Butyldimethylsilyl-guanosin **106**, 14.0 mL (15.0 g, 147 mmol) Essigsäureanhydrid und 5.99 g (49.1 mmol) DMAP umgesetzt. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch nach AAV 4.1 aufgearbeitet und das Rohgemisch säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-3%) gereinigt.

Ausbeute: 7.15 g (13.7 mmol, 84%) eines gelben Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 11.85 (s, 1H, NH), 8.37 (s, 1H, NHAc), 7.96 (s, 1H, H-8), 5.99 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5.5$ Hz, 1H, H-1'), 5.85 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 5.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.26$ Hz, 1H, H-3'), 5.75 (t, $^3J_{\text{HH}} = 4.7$ Hz, 1H, H-2'), 4.24 (m, 1H, H-4'), 3.89 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz,



$^2J_{\text{HH}} = 11.5$ Hz, 1H, H-5'a), 3.80 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 11.5$ Hz, 1H, H-5'b), 2.28 (s, 3H, NHAc), 2.13 (s, 3H, COCH_3), 2.08 (s, 3H, COCH_3), 0.89 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.09, 0.06 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). - $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 171.3, 169.9, 169.3 (3x COCH_3), 155.4 (C-6), 147.9 (C-2), 147.2 (C-4), 85.5 (C-1'), 82.9 (C-4'), 73.8 (C-2'), 70.9 (C-3'), 62.4 (C-5'), 25.8 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 24.3, 20.6, 20.4 (3x COCH_3), -5.5, -5.6 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 2940, 1718, 1468, 1390, 1198, 1087, 915. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +34.7° (c = 0.11, DCM). - DC: R_f -Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.58.

Versuch 2.

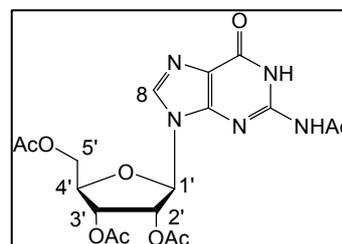
Nach AAV 4.2 wurden 6.36 g (16.0 mmol) 5'-O-*tert*Butyldimethylsilyl-guanosin **106** und 3.76 mL (4.15 g, 52.8 mmol) Acetylchlorid umgesetzt. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch nach AAV 4.2 aufgearbeitet und das Rohgemisch säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol in Gradienten (0-2%) gereinigt. Es konnte kein gewünschtes Produkt isoliert werden.

Synthese von *N*²-Acetyl-2',3',5'-tri-*O*-acetyl-guanosin **115**

Nach AAV 4.1 wurden 5.00 g (17.5 mmol) Guanosin **103**, 30.0 mL (32.1 g, 315 mmol) Essigsäureanhydrid und 17.3 g (141 mmol) DMAP umgesetzt. Nach 20 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Pyridin unter vermindertem Druck entfernt und der Reaktionsansatz nach AAV 4.1 aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-3%) gereinigt.

Ausbeute: 5.64 g (12.5 mmol, 71%) eines gelben Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 12.18 (s, 1H, NH), 10.44 (s, 1H, NHAc), 7.79 (s, 1H, H-8), 5.93-5.88 (m, 2H, H-1', H-2'), 5.58 (t, ³J_{HH} = 4.9 Hz, 1H, H-3'), 4.46 (dd, ³J_{HH} = 4.6 Hz, ²J_{HH} = 11.7 Hz, 1H, H-5'a), 4.37 (dd, ³J_{HH} = 4.7 Hz, ²J_{HH} = 10.6 Hz, 1H, H-4'), 4.46 (dd, ³J_{HH} = 6.3 Hz, ³J_{HH} = 11.7 Hz, 1H, H-5'b), 2.30, 2.07, 2.02, 2.01 (4xs, 4x3H, 4xCOCH₃). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 172.9, 171.0, 169.6, 169.4 (4x COCH₃), 155.7 (C-6), 148.0 (C-2), 147.9 (C-4), 138.5 (C-8), 122.1 (C-5), 87.3 (C-1'), 79.9 (C-4'), 72.6 (C-2'), 70.7 (C-3'), 63.1 (C-5'), 24.2, 20.7, 20.4, 20.3 (4xCOCH₃). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 3281, 1740, 1675, 1608, 1550, 1499, 1456, 1365, 1223, 1132, 1081, 1035, 1018, 993, 954, 913, 892. - MS (FAB, m/z) C₁₈H₂₁N₅O₉: ber.: 451.13, gef.: 452.2 [M+H]⁺. - [α]₅₄₆²⁰: -81.9° (c = 0.53, DCM). - DC: R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.50.- Smp.: 109 °C.



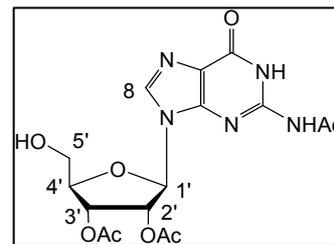
Synthese von *N*²-Acetyl-2',3'-di-*O*-acetylguanosin **112**

Versuch 1. Enzymatisch

In 12 mL DMF wurden 4.00 g (8.87 mmol) *N*²-Acetyl-2',3',5'-tri-*O*-acetyl-guanosin **115** gelöst. Nach der Zugabe von 50 mL frisch angesetztem 0.1 M Phosphatpuffer (pH = 7) wurden 910 mg Subtilisin (91.0 mg/mL) in Propylenglycol zugegeben. Bei 37 °C wurde die Reaktionslösung 96 Stunden gerührt. Anschließend wurden 50 mL Methanol zugegeben und ausgefallener Feststoff wurde abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohgemisch säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-3%) gereinigt.

Ausbeute: 2.54 g (6.22 mmol, 70%) eines farblosen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm]: 12.06 (s, 1H, NH), 11.74 (s, 1H, NHAc), 8.30 (s, 1H, H-8), 6.06 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 1H, H-1'), 5.75 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 5.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 1H, H-2'), 5.45 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 2.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.4$ Hz, 1H, H-3'), 5.40 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5.0$ Hz, 1H, OH),



4.21 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, 1H, H-4'), 3.74-3.63 (m, 2H, H-5'), 2.19, 2.13, 1.99 (3xs, 3x3H, 3xCOCH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm]: 173.5, 169.4, 169.1 (3xCOCH₃), 154.6 (C-6), 148.7 (C-2), 148.2 (C-4), 136.7 (C-8) 120.0 (C-5), 83.8 (C-1'), 83.7 (C-4'), 73.0 (C-3'), 71.3 (C-2'), 60.8 (C-5'), 23.7, 20.4, 20.0 (3xCOCH₃). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 3187, 2945, 1745, 1674, 1608, 1557, 1478, 1402, 1368, 1213, 1135, 1024, 997, 960, 900. - MS (FAB, m/z) C₁₆H₁₉N₅O₈: ber.: 409.12, gef.: 410.2 [M+H]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: -57.5° (c = 0.52, DCM). - DC R_F-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.48. - Smp.: 149 °C.

Versuch 2. Desilylierung

Nach AAV 5 wurden 673 mg (2.05 mmol) *N*²-Acetyl-2',3'-di-*O*-acetyl-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilylguanosin **109**, 870 μL (861 mg, 8.51 mmol) Et₃N und 1.55 mL (1.88 g, 12.3 mmol) Et₃N*3HF versetzt. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch nach AAV 5 aufgearbeitet und säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-5%) gereinigt. Es konnte kein gewünschtes Produkt isoliert werden.

Versuch 3. Selektiv mit einer 2% igen Iod/Methanol-Lösung

In einem Glasrohr mit Deckel wurden 100 mg (2.20 mmol) *N*²-Acetyl-2',3',5'-tri-*O*-acetylguanosin **115** in einer 2%-igen Iod/Methanol-Lösung aufgenommen. Die Reaktion wurde in der Mikrowelle innerhalb kürzester Reaktionszeiten von 2 bis maximal 20 Minuten bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Nach Abkühlen wurde eine Spatelspitze Natriumthiosulfat zugegeben, wobei ein Farbumschlag von dunkelbraun nach schwach gelb stattfand. Das Reaktionsgemisch wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und bis zur Trockne eingengt. Der Rest wurde säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-10%) gereinigt.

Ermittlung der Reaktionstemperatur:

Mikrowelle [W]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Produktbildung
100	100	2	-
100	100	5	-
100	100	15	unvollständig
100	120	20	vollständig

Ermittlung der Reaktionszeiten:

Mikrowelle [W]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Produktbildung
100	120	5	-
100	120	10	unvollständig
100	120	15	unvollständig
100	120	20	unvollständig
100	120	25	vollständig

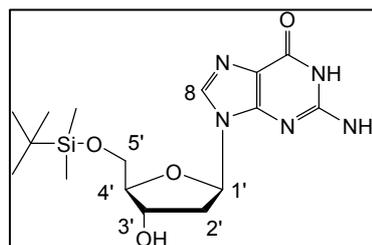
Ausbeute: 3 mg (mmol, 4%) eines farblosen Feststoffes.

Synthese von 5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-2'-desoxyguanosin 107

In einem 100 mL Schlenkkolben wurden 5.30 g (18.6 mmol) 2'-Desoxyguanosinmonohydrat **104**, 3.08 g (20.4 mmol) TBDMS-Cl und 1.39 g (20.5 mmol) Imidazol nach AAV 3 umgesetzt und nach 20 h aufgearbeitet. Anschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-5%) gereinigt.

Ausbeute: 4.86 g (12.7 mmol, 69%) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 10.89 (s, 1H, NH), 7.83 (s, 1H, H-8), 6.75 (s, 2H, NH₂), 6.10 (t, 1H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, H-1'), 4.33-4.29 (m, 1H, H-3'), 3.82 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ³J_{HH} = 4.4 Hz, H-4'), 3.73 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.2 Hz, ³J_{HH} = 4.4 Hz, H-5'a), 3.67 (dd, 1H,



²J_{HH} = 11.2 Hz, ³J_{HH} = 4.4 Hz, H-5'b), 2.48-2.42 (m, 1H, H-2'a), 2.23 (ddd, 1H,

$^2J_{\text{HH}} = 13.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.6$ Hz, H-2'b), 0.85 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.03 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 156.6 (C-2), 153.9 (C-6), 150.8 (C-4), 135.5 (C-8), 116.6 (C-5), 86.9 (C-4'), 82.4 (C-1'), 70.3 (C-3'), 63.3 (C-5'), 40.5 (C-2'), 25.8 (SiC(CH₃)₃), 18.0 (SiC(CH₃)₃), -5.5 (Si(CH₃)₂). - IR (KBr) ν [cm⁻¹]: 3120, 2927, 2852, 1679, 1577, 1530, 1353, 1252, 1066. - MS (FAB, *m/z*) C₁₉H₂₇N₅O₄Si: ber.: 381.18, gef.: 404.3 [M+Na]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: -13.09 (c = 0.28, DMSO). - DC: R_F-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.3. - Smp.: 193 °C.

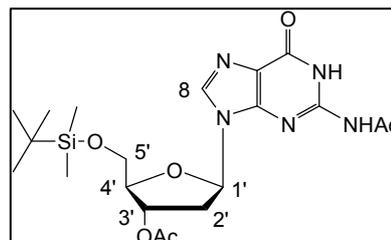
Synthese von **N²-Acetyl-3'-O-acetyl-5'-O-tert-butylidimethylsilyl-2'-desoxyguanosin 110**

Versuch 1.

Nach AAV 4.1 wurden 2.90 g (7.60 mmol) 5'-O-tertButylidimethylsilyl-2'-desoxyguanosin **107** und 4.64 g (38.0 mmol) DMAP und 7.23 mL (7.73 g, 76.0 mmol) Essigsäureanhydrid umgesetzt. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch nach AAV 4.1 aufgearbeitet und das Rohgemisch säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-3%) gereinigt.

Ausbeute: 1.89 g (4.06 mmol, 54%) eines gelben Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 12.16 (s, 1H, NH), 10.13 (s, 1H, NHAc), 8.00 (s, 1H, H-8), 6.21 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, H-1'), 5.41-5.40 (m, 1H, H3'), 4.17 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.8$ Hz, H-4'), 3.85 (ddd, 2H, $^2J_{\text{HH}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.8$ Hz, H-5'ab), 2.64 (ddd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, H-2'a), 2.51 (ddd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 13.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, H-2'b), 2.28 (s, 3H, COCH₃), 2.10 (s, 3H, COCH₃), 0.88 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.08 (s, 6H, Si(CH₃)₂). - $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 172.5, 170.4 (COCH₃), 155.8 (C-2), 148.1 (C-6), 147.7 (C-4), 124.3 (C-8), 121.4 (C-5), 85.6 (C-4'), 84.0 (C-1'), 75.1 (C-3'), 63.5 (C-5'), 39.0 (C-2'), 25.9 (SiC(CH₃)₃), 24.3 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 18.7 (SiC(CH₃)₃), -5.5 (SiCH₃), -5.6 (SiCH₃). - IR (KBr) ν [cm⁻¹]: 3118, 2928, 1679, 1601, 1531, 1407, 1252, 1181, 1066. - MS (FAB, *m/z*) C₂₀H₃₁N₅O₆Si: ber.: 465.20, gef.: 466.3 [M+H]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: 9.15° (c = 0.3, DCM). - DC: R_F-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.5. - Smp.: 165 °C.



Versuch 2.

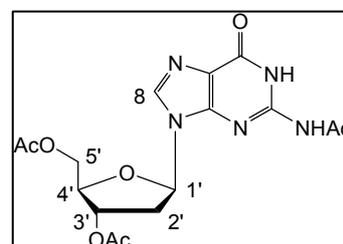
Nach AAV 4.2 wurden 14.3 g (37.4 mmol) 5'-*O*-*tert*Butyldimethylsilyl-2'-desoxyguanosin **107** und 5.85 mL (6.46 g, 82.3 mmol) Acetylchlorid umgesetzt. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch nach AAV 4.2 aufgearbeitet und das Rohgemisch säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-2%) gereinigt. Es konnte kein gewünschtes Produkt isoliert werden.

Synthese von *N*²-Acetyl-3',5'-di-*O*-acetyl-2'-desoxyguanosin **116**

Nach AAV 4.1 wurden 10.0 g (35.1 mmol) 2'-Desoxyguanosinmonohydrat **104**, 30.1 mL (32.2 g, 315 mmol) Essigsäureanhydrid und 12.8 g (105 mmol) DMAP umgesetzt. Nach 20 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde Pyridin unter vermindertem Druck entfernt und der Reaktionsansatz nach AAV 4.1 aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-3%) gereinigt.

Ausbeute: 12.8 g (32.6 mmol, 93%) eines gelben Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 12.18 (s, 1H, NH), 10.10 (s, 1H, NHAc), 8.12 (s, 1H, H-8), 6.22 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ³J_{HH} = 6.0 Hz, H-1'), 5.44-5.42 (m, 1H, H3'), 4.20 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, ³J_{HH} = 2.7 Hz, H-4'), 3.85 (ddd, 2H, ²J_{HH} = 11.5 Hz, ³J_{HH} = 3.6 Hz, ³J_{HH} = 3.0 Hz, H-5'ab), 2.73 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 12.9 Hz, ³J_{HH} = 8.0 Hz, ³J_{HH} = 5.3 Hz, H-2'a), 2.51 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 13.0 Hz, ³J_{HH} = 5.8 Hz, ³J_{HH} = 2.0 Hz, H-2'b), 2.24 (s, 3H, COCH₃), 2.10 (s, 3H, COCH₃), 2.08 (s, 3H, COCH₃). - ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 172.8, 171.9 (COCH₃), 155.6 (C-2), 148.3 (C-6), 147.9 (C-4), 125.1 (C-8), 121.2 (C-5), 85.6 (C-4'), 84.4 (C-1'), 74.9 (C-3'), 63.6 (C-5'), 37.0 (C-2'), 24.7 (COCH₃), 22.5 (COCH₃), 21.7 (COCH₃). - IR (KBr) ν [cm⁻¹]: 3120, 2914, 1690, 1580, 1510, 1389, 1254, 1091, 900. - [α]₅₄₆²⁰: +17.5° (c = 0.2, DCM). - DC: R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.60. - Smp.: 119 °C.



Synthese von *N*²-Acetyl-3'-*O*-acetyl-2'-desoxyguanosin **113**

Versuch 1. Desilylierung

Nach AAV 5 wurden 400 mg (0.886 mmol) *N*²-Acetyl-3'-*O*-acetyl-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyguanosin **110**, 840 μ L (834 mg, 5.18 mmol) Et₃N*3HF und 390 μ L (437 mg, 4.31 mmol) Triethylamin umgesetzt. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch nach AAV 5 aufgearbeitet und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-5%) gereinigt.

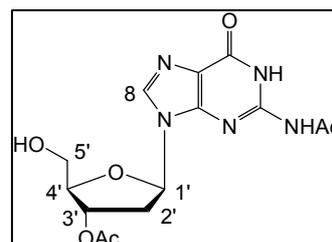
Ausbeute: 260 mg (0.740 mmol, 86%) eines gelben Feststoffes.

Versuch 2. Enzymatisch

In 12 mL DMF wurden 8.20 g (20.8 mmol) *N*²-Acetyl-3',5'-di-*O*-acetyl-2'-desoxyguanosin **116** gelöst. Nach Zugabe von 50 mL frisch angesetzttem 0.1 M Phosphatpuffer (pH = 7) wurden 2.10 g Subtilisin (91 mg/mL) in Propylenglycol zugegeben. Bei 37 °C wurde die Reaktionslösung 96 Stunden gerührt. Anschließend wurden 50 mL Methanol zugegeben und ausgefallener Feststoff abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohgemisch säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-3%) gereinigt.

Ausbeute: 4.83 g (13.7 mmol, 66%) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 12.04 (br. s, 1H, NH), 11.72 (br. s, 1H, NHAc), 8.26 (s, 1H, H-8), 6.19 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.6 Hz, ³J_{HH} = 8.9 Hz, H-1'), 5.32-5.29 (m, 1H, H-3'), 4.04 (dt, 1H, ³J_{HH} = 1.5 Hz, ³J_{HH} = 4.3 Hz, H-4'); 3.60-3.57 (m, 2H, H-5'ab), 2.82 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 14.4 Hz, ³J_{HH} = 8.8 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H-2'a), 2.45-2.43 (m, 1H, H-2'b), 2.18 (s, 3H, COCH₃), 2.08 (s, 3H, COCH₃).



¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 172.8, 171.9 (COCH₃), 155.6 (C-2), 148.3 (C-6), 147.9 (C-4), 125.1 (C-8), 121.2 (C-5), 84.5 (C-4'), 83.3 (C-1'), 75.2 (C-3'), 61.7 (C-5'), 40.5 (C-2'), 24.2, 21.3 (COCH₃).

- IR (KBr) ν [cm⁻¹]: 3209, 2926, 1684, 1559, 1401, 1255, 1146, 1102, 1058.

- MS (FAB, m/z) C₁₄H₁₇N₅O₆: ber.: 351.12, gef.: 352.2 [M+H]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: -1.7 ° (c = 1.3, MeOH).

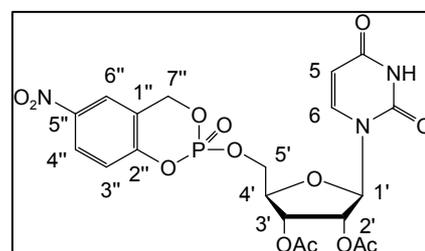
- DC: R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.54. - Smp: 81°C.

Synthese von 5''-Nitro-cycloSaligenyl-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **117**

Nach AAV 6 wurden 300 mg (0.914 mmol) 2',3'-Di-O-acetyluridin **111**, 0.319 mL (237 mg, 1.83 mmol) DIPEA und 427 mg (1.83 mmol) 5-Nitro-cycloSaligenylchlorphosphit bei -20 °C umgesetzt und bis zum vollständigen Umsatz des Nucleosides bei Raumtemperatur gerührt (18 h). Danach wurde das Gemisch mit 2.25 g (3.66 mmol) Oxone[®] oxidiert und nach AAV 6 aufgearbeitet. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung zur Synthese der NDP-Glycoside eingesetzt.

Ausbeute: 413 mg (0.763 mmol, 83%) eines gelben Feststoffes als Diastereomergemisch (1:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 8.82 (s, 2H, 2xNH), 8.26-8.21 (m, 2H, 2xH-4''), 8.09-8.08 (m, 2H, 2xH-3''), 7.37 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-6), 7.35 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-6), 7.23 (dd, 2H, ⁴J_{HH} = 4.6 Hz, ³J_{HH} = 9.2 Hz, 2xH-6''), 5.92 (dd, 2H, ³J_{HH} = 5.5 Hz,



⁴J_{HH} = 6.9 Hz, 2xH-1'), 5.72 (t, 2H, ³J_{HH} = 8.4 Hz, 2xH-5), 5.54-5.46 (m, 4H, 2xH-7''), 5.41-5.26 (m, 4H, 2xH-2', 2xH-3'), 4.62-4.54 (m, 2H, 2xH-5'a), 4.51-4.42 (m, 2H, 2xH-5'b), 4.35-4.28 (m, 2H, 2xH-4'), 2.13, 2.10, 2.09, 2.08 (4xs, 4x3H, 4xCOCH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 169.8, 169.78 (2xCOCH₃), 150.08, 150.04 (2xC-2), 140.29, 140.23 (2xC-6), 125.92 (C-4''), 121.94 (C-3''), 119.96, 119.80 (2xC-6''), 103.51, 103.44 (2xC-5), 88.78, 88.50 (2xC-1'), 80.54, 80.50 (2xC-4'), 72.76, 72.68 (2xC-3'), 69.74 (C-2'), 68.34, 68.13 (2xC-7''), 67.73, 67.70 (2xC-5'), 20.62, 20.60, 20.53, 20.52 (4xCOCH₃). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: -10.35, -10.68.

- IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 1745, 1687, 1527, 1231, 1028, 937, 814. - HRMS (FAB, m/z)

C₂₀H₂₀N₃O₁₃P: ber.: 541.0734, gef.: 542.0812 [M+H]⁺. - [α]₅₄₆²⁰: +4.4 ° (c = 0.23, DCM). - DC: R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.62. - Smp.: 124 °C.

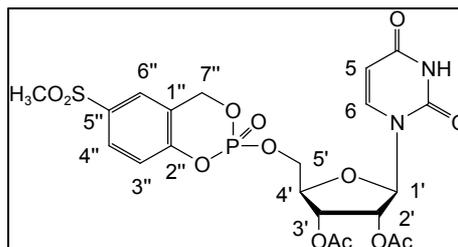
Synthese von 5''-Methylsulfonyl-cycloSaligenyl-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **120**

Nach AAV 6 wurden 530 mg (1.59 mmol) 2',3'-Di-O-acetyluridin **111**, 710 μL (515 mg, 3.97 mmol) DIPEA und 1.06 g (3.97 mmol) 5-Methylsulfonyl-cycloSaligenylchlorphosphit bei -20 °C umgesetzt und bis zum vollständigen Umsatz

des Nucleosides bei Raumtemperatur gerührt (18 h). Danach wurde das Gemisch mit 4.88 g (7.94 mmol) Oxone® oxidiert und nach AAV 6 aufgearbeitet. Das Produkt wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-4%) unter Zusatz von 0.2% Essigsäure gereinigt.

Ausbeute: 551 mg (960 µmol, 60%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerenmisch (1:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 8.72 (s, 1H, NH), 8.70 (s, 1H, NH), 7.86 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 2xH-3''), 7.78 (s, 2H, 2xH-6''), 7.31 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, H-6), 7.29(d, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, H-6), 7.22-7.16 (m, 2H, 2xH-4''), 5.86 (t, 2H, ³J_{HH} = 4.9 Hz, 2xH-1'), 5.63 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, H-5), 5.60 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, H-5), 5.46-5.38 (m, 4H, 2xH-7''), 5.25-5.19 (m, 4H, 2xH-2', 2xH-3'), 4.61-4.54 (m, 2H, 2xH-5'a), 4.51-4.41 (m, 2H, 2xH-5'b), 4.35-4.28 (m, 2H, 2xH-4'), 3.08, 3.07 (2xs, 2x3H, SO₂CH₃), 2.13, 2.11, 2.09, 2.08 (4xs, 4x3H, 4xCOCH₃).



¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 169.8, 169.7 (2xCOCH₃), 163.2, 163.17 (2xC-4), 153.87 (d, ³J_{CP} = 7.1 Hz, C-1''), 153.73 (d, ³J_{CP} = 7.1 Hz, C-1''), 150.2, 150.24 (2xC-2), 140.5 (C-6), 137.1 (C-5''), 129.8 (d, ⁴J_{CP} = 0.6 Hz, C-4''), 129.7 (d, ⁴J_{CP} = 0.6 Hz, C-4''), 125.9 (C-6''), 122.0 (d, ²J_{CP} = 10.2 Hz, C-2''), 121.9 (d, ²J_{CP} = 10.2 Hz, C-2''), 120.1 (d, ³J_{CP} = 9.1 Hz, C-3''), 120.0 (d, ³J_{CP} = 9.1 Hz, C-4''), 103.3, 103.27 (2xC-5), 88.9, 88.7 (2xC-1'), 80.5 (d, ³J_{CP} = 3.7 Hz, C-4'), 80.4 (d, ³J_{CP} = 3.7 Hz, C-4'), 72.8, 72.7 (2xC-2'), 69.7, 69.6 (2xC-3'), 68.6 (d, ²J_{CP} = 7.1 Hz, C-7''), 68.3 (d, ²J_{CP} = 7.1 Hz, C-7''), 67.6 (d, ²J_{CP} = 5.3 Hz, C-5'), 67.4 (d, ²J_{CP} = 5.3 Hz, C-5'), 64.5 (SO₂CH₃), 20.59, 20.56, 20.51 (3xCOCH₃). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: -10.27, -10.69. - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 1747, 1691, 1300, 1231, 1030, 936, 724. - HRMS (FAB, m/z) C₂₁H₂₃N₂O₁₃PS: ber.: 574.0658, gef.: 575.0737 [M+H]⁺. - [α]₅₄₆²⁰: +7.4 ° (c = 0.5, DCM). - DC: R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.46. - Smp.: 138 °C.

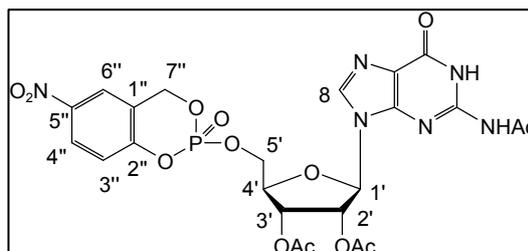
Synthese von 5''-Nitro-cycloSaligenyl-N²-acetyl-2',3'-di-O-acetylguanosin-monophosphat 118

Nach AAV 6 wurden 640 mg (1.56 mmol) N²-Acetyl-2',3'-di-O-acetylguanosin **112**, 604 µL (445 mg, 3.43 mmol) DIPEA und 730 mg (3.13 mmol) 5-Nitro-

cycloSaligenylchlorphosphit bei -20 °C umgesetzt und bis zum vollständigen Umsatz des Nucleosides bei Raumtemperatur gerührt (18 h). Danach wurde das Gemisch mit 3.84 g (6.24 mmol) Oxone[®] oxidiert und nach AAV 6 aufgearbeitet. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung zur Synthese der NDP-Glycoside eingesetzt.

Ausbeute: 850 mg (1.36 mmol, 88%) eines gelben Feststoffes als Diastereomerenmisch (1:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 12.17 (s, 2H, 2xNH), 10.51 (s, 2H, 2xNHAc), 8.26 (d, 1H, ³J_{HH} = 10.1 Hz, H-4''), 8.22 (d, 1H, ³J_{HH} = 10.0 Hz, H-4''), 8.25-8.06 (m, 2H, 2xH-6''), 7.76 (s, 2H, 2xH-8), 7.30 (d, 1H, ³J_{HH} = 9.0 Hz, H-3''), 7.13 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.8 Hz, H-3''), 6.07-5.98 (m, 2H, 2xH-2'), 5.95 (dd, 2H, ⁴J_{HH} = 4.6 Hz, ³J_{HH} = 6.1 Hz, 2xH-1'), 5.71-5.68 (m, 2H, 2xH-3'), 5.55 (d, 2H, ²J_{HH} = 13.8 Hz, H-7''), 5.46 (d, 2H, ²J_{HH} = 14.0 Hz, H-7''), 4.82-4.70 (m, 2H, 2xH-5'a), 4.63-4.55 (m, 1H, H-5'b), 4.54-4.48 (m, 1H, H-5'b), 4.43-4.38 (m, 2H, 2xH-4'), 2.24, 2.23, 2.14, 2.05 (4xs, 4x3H, 4xCH₃).



¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 173.1, 169.9, 169.5 (3xCOCH₃), 155.5 (C-6), 148.17, 147.9 (2xC-2), 139.9 (C-8), 136.3 (C-4), 126.0 (C-4''), 121.93, 121.90 (2xC-6''), 120.0, 119.9 (2xC-3''), 87.95, 87.93 (2xC-1'), 81.18, 81.06 (2xC-4'), 72.0, 71.8 (2xC-2'), 71.1, 71.0 (C-3'), 68.4, 68.1 (2xC-7''), 67.87, 67.82 (2xC-5'), 24.2, 20.7, 20.4 (3xCOCH₃). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: -10.35, -10.72. - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 1747, 1679, 1610, 1525, 1344, 1232, 1024, 995, 937. - HRMS (FAB, m/z) C₂₃H₂₃N₆O₁₃P: ber.: 622.1061, gef.: 623.1139 [M+H]⁺. - [α]_D²⁰: -10.9 ° (c = 0.28, DCM). - DC: R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.64. - Smp.: 129 °C.

Synthese von 5''-Methylsulfonyl-*cycloSaligenyl-N*²-acetyl-2',3'-di-O-acetyl-guanosinmonophosphat 121

Nach AAV 6 wurden 900 mg (2.20 mmol) *N*²-Acetyl-2',3'-di-O-acetylguanosin **112**, 850 μL (628 mg, 4.84 mmol) DIPEA und 1.17 g (4.40 mmol) 5-Methylsulfonyl-*cycloSaligenylchlorphosphit* bei -20 °C umgesetzt und bis zum vollständigen Umsatz des Nucleosides bei Raumtemperatur gerührt (18 h). Danach wurde das Gemisch mit 5.41 g (8.80 mmol) Oxone[®] oxidiert und nach AAV 6 aufgearbeitet. Das Produkt

wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-4%) unter Zusatz von 0.2% Essigsäure gereinigt.

Ausbeute: 850 mg (1.30 mmol, 59%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomergemisch (1:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 12.14

(s, 1H, NH), 12.23 (s, 1H, NH), 10.39 (s, 1H,

NHAc), 10.37 (s, 1H, NHAc), 7.96 (d, 1H,

³J_{HH} = 8.8 Hz, H-4''), 7.92 (d, 1H,

³J_{HH} = 8.8 Hz, H-4''), 7.76 (dd, 2H,

⁴J_{HH} = 2.1 Hz, ³J_{HH} = 4.6 Hz, 2xH-6''), 7.66 (s, 2H, 2xH-8), 7.35 (d, ³J_{HH} = 8.6 Hz, 1H,

H-3''), 7.15 (d, ³J_{HH} = 8.6 Hz, 1H, H-3''), 6.08-6.02 (m, 2H, 2x H-2''), 5.92 (dd, 2H,

⁴J_{HH} = 4.9 Hz, ³J_{HH} = 6.9 Hz, 2xH-1''), 5.73 (dd, 1H, ³J_{HH} = 2.4 Hz, ³J_{HH} = 5.4 Hz, 1H,

H-3'), 5.70 (dd, 1H, ³J_{HH} = 2.1 Hz, ³J_{HH} = 5.4 Hz, H-3'), 5.52 (d, 2H, ²J_{HH} = 13.8 Hz,

2xH-7''a), 5.43 (dd, 2H, ³J_{HP} = 5.6 Hz, ²J_{HH} = 13.9 Hz, 2x H-7''b), 4.79-4.73 (m, 2H,

2xH-5'a), 4.62-4.57 (m, 1H, H-5'b), 4.53-4.47 (m, 1H, H-5'b), 4.45-4.38 (m, 2H, 2xH-

4'), 3.09 (s, 3H, -SO₂CH₃), 3.08 (s, 3H, -SO₂CH₃), 2.25, 2.24, 2.16, 2.15, 2.07, 2.06

(6xs, 6x3H, 6xCOCH₃). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 172.9, 169.8, 169.3

(3xCOCH₃), 155.4 (C-6), 153.7 (C-2), 147.9 (C-4), 137.2 (C-8), 130.0, 129.9 (C-4''),

125.7, 125.6 (C-6''), 12.1 (d, ³J_{CP} = 9.4 Hz, C-3''), 119.9 (d, ²J_{CP} = 9.2 Hz, C-2''), 87.8,

87.7 (C-1'), 81.1 (d, ³J_{CP} = 8.4 Hz, C-4'), 80.9 (d, ³J_{CP} = 8.4 Hz, C-4'), 71.8, 71.7 (C-

2'), 70.9 (C-3'), 68.3 (d, ³J_{CP} = 6.7 Hz, C-7''), 68.3 (d, ³J_{CP} = 7.0 Hz, C-7''), 67.6 (d,

²J_{CP} = 5.6 Hz, C-5'), 67.4 (d, ²J_{CP} = 6.1 Hz, C-5'), 44.5 (SO₂CH₃), 24.0, 20.6, 20.3

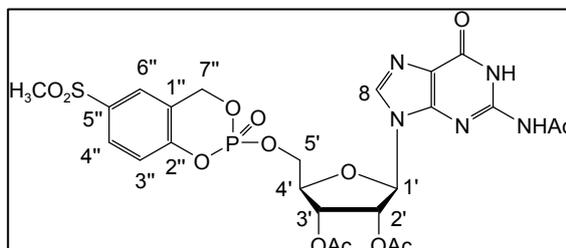
(3xCOCH₃). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: -10.17, -10.54. - IR (ATR) ν [cm⁻¹]:

2928, 1747, 1681, 1610, 1558, 1485, 1406, 1372, 1295, 1225, 1142, 1117, 1084,

1025, 934, 808, 766, 726. - HRMS (FAB, m/z) C₂₄H₂₆N₅O₁₃PS: ber.: 655.0985, gef.:

656.1064 [M+H]⁺. - [α]₅₄₆²⁰: -7.4 ° (c = 1, DCM). - DC: R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v):

0.44. - Smp.: 168 °C.



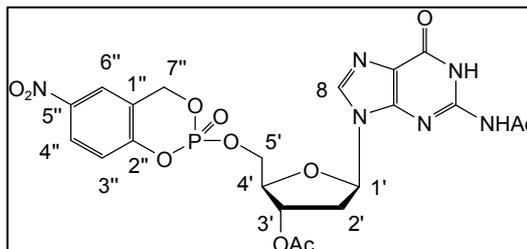
Synthese von 5''-Nitro-cycloSaligenyl-N²-acetyl-3'-O-acetyl-2'-desoxyguanosinmonophosphat 119

Nach AAV 6 wurden 404 mg (1.15 mmol) N²-Acetyl-3'-O-acetyl-2'-desoxyguanosin **113**, 403 μL (299 mg, 2.31 mmol) DIPEA und 350 mg (1.50 mmol)

5-Nitro-*cycloSaligenyl*chlorphosphit bei -20 °C umgesetzt und bis zum vollständigen Umsatz des Nucleosides bei Raumtemperatur gerührt (18 h). Danach wurde das Gemisch mit 2.84 g (4.62 mmol) Oxone[®] oxidiert und nach AAV 6 aufgearbeitet. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung zur Synthese der NDP-Glycoside eingesetzt.

Ausbeute: 293 mg (506 µmol, 50%) eines gelben Feststoffes als Diastereomerenmisch (1:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 12.10 (s, 2H, 2xNH), 10.36 (s, 2H, 2xNHAc), 8.27 (dd, 1H, ⁴J_{HH} = 2.8 Hz, ³J_{HH} = 9.0 Hz, H-4''), 8.24 (dd, 1H, ⁴J_{HH} = 2.8 Hz, ³J_{HH} = 9.0 Hz, H-4''), 8.10 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.8 Hz, H-6''), 8.09 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.8 Hz, H-6''), 7.67 (s, 1H, H-8), 7.66 (s, 1H, H-8), 7.28 (d, 1H, ³J_{HH} = 9.0 Hz, H-3''), 7.13 (d, 1H, ³J_{HH} = 9.0 Hz, H-3''), 6.21-6.10 (m, 2H, 2xH-1'), 5.64-5.41 (m, 6H, 2xH-7'', 2xH-3'), 5.09 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ³J_{HH} = 10.5 Hz, H-4'), 4.90 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ³J_{HH} = 10.5 Hz, H-4'), 4.54 (dt, 1H, ³J_{HH} = 5.9 Hz, ²J_{HH} = 10.5 Hz, H-5'a), 4.41 (dt, 1H, ³J_{HH} = 5.9 Hz, ²J_{HH} = 10.5 Hz, H-5'a), 4.35-4.29 (m, 2H, 2xH-5'b), 3.46 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ³J_{HH} = 8.6 Hz, ²J_{HH} = 14.6 Hz, H-2'a), 3.39 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 5.9 Hz, ³J_{HH} = 8.6 Hz, ²J_{HH} = 14.5 Hz, H-2'a), 2.49-2.40 (m, 2H, 2xH-2'b), 2.24, 2.13, 2.12 (3xs, 12H, 4xCOCH₃). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 173.5, 169.9 (COCH₃), 155.5 (C-6), 148.0 (C-4), 147.7 (C-2), 125.8 (C-1''), 121.7 (C-3''), 119.9 (C-5), 87.1 (C-1'), 82.8 (d, ³J_{CP} = 2.3 Hz, C-4'), 74.6 (C-3'), 68.2 (d, ²J_{CP} = 7.7 Hz, C-7''), 67.6 (d, ²J_{CP} = 6.1 Hz, C-5'), 35.4 (C-2'), 24.16, 20.91 (COCH₃). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: -9.89, -10.36. - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 1677, 1609, 1556, 1529, 1482, 1229, 1088, 995, 936. - HRMS (FAB, m/z) C₂₁H₂₁N₆O₁₁P: ber.: 564.1006, gef.: 565.1084 [M+H]⁺. - [α]₅₄₆²⁰: +3.3 ° (c = 0.33, CHCl₃). - DC: R_F-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.53. - Smp.: 138 °C.



Synthese von 5''-Methylsulfonyl-*cycloSaligenyl*-N²-acetyl-3'-O-acetyl-2'-desoxyguanosinmonophosphat 122

Nach AAV 6 wurden 200 mg (0.569 mmol) N²-Acetyl-3'-O-acetyl-2'-desoxyguanosin **113**, 200 µL (148 mg, 1.14 mmol) DIPEA und 303 mg (1.14 mmol) 5-Methylsulfonyl-*cycloSaligenyl*chlorphosphit bei -20 °C umgesetzt und bis zum

vollständigen Umsatz des Nucleosides bei Raumtemperatur gerührt (18 h). Danach wurde das Gemisch mit 1.40 g (2.28 mmol) Oxone[®] oxidiert und nach AAV 6 aufgearbeitet. Das Produkt wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-4%) unter Zusatz von 0.2% Essigsäure gereinigt.

Ausbeute: 126 mg (211 μ mol, 37%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomergemisch (1:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 12.12

(s, 2H, 2xNH), 10.41 (s, 2H, 2xNHAc), 7.97-

7.89 (m, 2H, 2xH-4''), 7.79-7.76 (m, 2H,

2xH-6''), 7.68 (s, 2H, 2xH-8), 7.31 (d, 1H,

³J_{HH} = 8.6 Hz, H-3''), 7.16 (d, 1H,

³J_{HH} = 8.6 Hz, H-3''), 6.18 (dd, 2H, ³J_{HH} = 6.1 Hz, ³J_{HH} = 8.7 Hz, 2xH-1'), 5.57-5.48

(m, 4H, H-7''), 2xH-3'), 5.47-5.39 (m, 2H, H-7''), 5.06-4.98 (m, 1H, H-5'a), 4.89-4.82

(m, 1H, H-5'a), 4.52 (dt, 1H, ³J_{HH} = 5.8 Hz, ²J_{HH} = 10.5 Hz, H-5'b), 4.40 (p, 1H,

³J_{HH} = 5.4 Hz, H-5'b), 4.35-4.28 (m, 2H, 2xH-4'), 3.49-3.33 (m, 2H, 2xH-2'a), 3.07 (s,

6H, 2xSO₂CH₃), 2.43 (dt, 2H, ³J_{HH} = 4.5 Hz ³J_{HH} = 14.2 Hz, 2xH-2'b), 2.24, 2.13, 2.12

(3xs, 12H, 4xCOCH₃). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 172.8, 172.7

(2xCOCH₃), 170.4, 170.3 (2xNHCOCH₃), 155.6 (2xC-6), 153.8, 153.7 (2xC-5), 147.8,

147.7 (2xC-4), 147.53, 147.50 (2xC-2), 129.9, 129.8 (2xC-4''), 125.74, 125.70 (2xC-

6''), 123.1, 123.0 (2xC-1''), 121.7, 121.6 (2xC-2''), 120.0 (d, ²J_{CP} = 2.0 Hz, C-3''),

119.9 (d, ²J_{CP} = 2.0 Hz, C-3''), 117.3 (2xC-5), 87.0 (2xC-1'), 82.7 (d, ³J_{CP} = 6.7 Hz,

2xC-4'), 74.8, 74.7 (2xC-3'), 68.3 (d, ²J_{CP} = 5.2 Hz, C-7''), 68.0 (d, ²J_{CP} = 5.4 Hz, C-

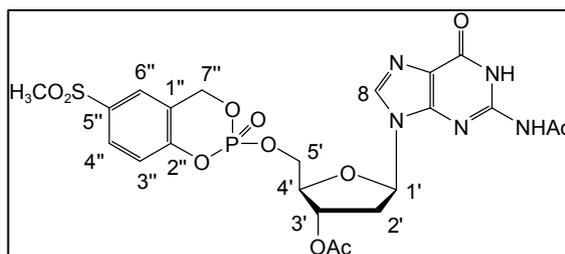
7''), 67.9 (d, ²J_{CP} = 4.9 Hz, C-5'), 67.5 (d, ²J_{CP} = 4.9 Hz, C-5'), 44.6 (SO₂CH₃), 35.5,

35.1 (2xC-2'), 24.1, 21.0 (COCH₃). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: -9.84, -

10.21. - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 2926, 1678, 1590, 1488, 14.26, 1370, 1282, 1231, 1139,

1111, 1084, 1028, 959, 893. - $[\alpha]_{546}^{20}$: -4.4 ° (c = 1.5, CH₂Cl₂). - DC: R_f-

Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.59. - Smp.: 193 °C.



Synthese von 5''-Methylsulfonyl-cycloSaligenyl-2'-desoxyguanosinmonophosphat 123

Versuch 1.

Nach AAV 6 wurden 300 mg (1.04 mmol) 2'-Desoxyguanosin **104** in 30 mL abs. Acetonitril, 240 μ L (176 mg, 1.36 mmol) DIPEA und 306 mg (1.15 mmol) 5-Methylsulfonyl-cycloSaligenylchlorphosphit bei -20 °C umgesetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Gemisch mit 2.57 g (4.18 mmol) Oxone[®] oxidiert und nach AAV 6 aufgearbeitet.

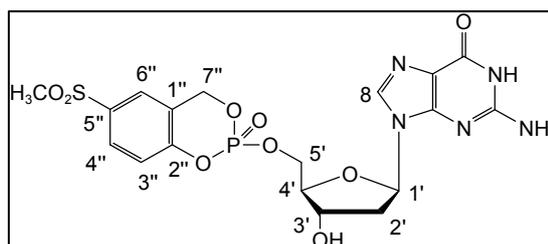
Ausbeute: 10 mg (19.4 μ mol, 2%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch (1:1).

Versuch 2.

Nach AAV 6 wurden 300 mg (1.04 mmol) 2'-Desoxyguanosin **104** in 30 mL abs. DMF, 240 μ L (176 mg, 1.36 mmol) DIPEA und 306 mg (1.15 mmol) 5-Methylsulfonyl-cycloSaligenylchlorphosphit bei -20 °C umgesetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Gemisch mit 2.57 g (4.18 mmol) Oxone[®] oxidiert und nach AAV 6 aufgearbeitet.

Ausbeute: 33 mg (64.8 μ mol, 6%) eines farblosen Feststoffes als Diastereomerengemisch (1:1).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: -9.55, -10.60. - DC: R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.64.



Anmerkung: Aufgrund der kleinen Mengen und vielen Verunreinigungen konnte ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum nicht ausgewertet werden.

7.2.2 Synthese der Glycosyl-1-phosphate

AAV 7. Acetylierung der Glycoside

In 200 mL Pyridin wurden 10 Äq. Essigsäureanhydrid vorgelegt und portionsweise 1 Äq. Glycosid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde nach 24 h mit 400 mL Dichlormethan aufgenommen und drei Mal mit je 50 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Der peracetylierte Zucker wurde entweder im Wasser umkristallisiert oder mit abs. Methanol kristallisiert.

AAV 8. Selektive Deacetylierung des anomeren Kohlenstoffes von Glycopyranosen

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 1 Äq. des peracetylierten Glycosids in 5 mL abs. DMF gelöst und auf 50 °C erwärmt. Es wurden 1.2 Äq. Hydraziniumacetat dazugegeben und das Gemisch 3 min bei 50 °C und anschließend 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in 50 mL Ethylacetat aufgenommen und drei Mal mit je 20 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-30%) gereinigt.

AAV 9. Synthese von Glycosylbromiden

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 1 Äq. des peracetylierten Glycosids in 40 mL abs. Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Langsam wurden unter starkem Rühren 3 Äq. HBr in Essigsäure zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 20 h gerührt. Anschließend wurde Eiswasser zugegeben und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (4:5, v:v) gereinigt.

AAV 10.1. Synthese von Glycosyl-1-dibenzylphosphaten (Phosphoramiditmethode)

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1 Äq. Glycopyranose und 3 Äq. Dicyanoimidazol in 50 mL abs. Dichlormethan gelöst und 2.5 Äq. Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit langsam zugetropft. Die Lösung wurde 3 h bei Rt gerührt und nach vollständiger Umsetzung des Eduktes wurden 3 Äq. *m*CPBA in kleinen Portionen zugegeben. Nach vollständigem Umsatz wurde die Lösung in Ethylacetat aufgenommen und solange mit gesättigter NaHSO₃-Lösung gewaschen, bis in der organischen Phase keine Peroxide mehr vorhanden waren. Die peroxidfreie organische Phase wurde anschließend mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, gesättigter NaCl-Lösung und Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (1:1, v:v) gereinigt.

AAV 10.2. Synthese von Glycosyl-1-dibenzylphosphaten (Koenigs-Knorr-Methode)

In einem Schlenkkolben mit Molsieb wurden 1.8 Äq. Dibenzylphosphat in je 30 mL abs. Dichlormethan und abs. Acetonitril gelöst. Bei 0 °C wurde unter starkem Rühren 1 Äq. Glycosylbromid gelöst in 15 mL abs. Dichlormethan zugetropft und anschließend 1.8 Äq. Ag₂CO₃ zugesetzt. Nach 20 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch über Celite[®] filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (1:1 v:v).

AAV 11. Synthese von Glycosyl-1-phosphaten

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 1 Äq Glycosyl-1-dibenzylphosphat in 20 mL abs. Dioxan gelöst und 2 Äq. Et₃N und Pd/C (5% mit 55% Wasser) zugesetzt. Die Suspension wurde 5 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 20 h in einer Wasserstoffatmosphäre hydriert. Nachdem das Edukt vollständig umgesetzt war, wurde die Suspension über mit Dioxan vorgewaschene Celite[®] filtriert. Der Rest

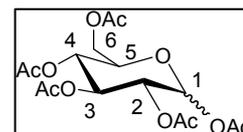
wurde mit Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 50 mL Wasser extrahiert. Das Produkt konnte aus vereinigten wässrigen Fraktionen durch Gefriertrocknung gewonnen werden.

Synthese von 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-glucopyranose 128

Die Synthese erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 7. Es wurden 5.00 g (27.7 mmol) D-Glucose **2**, 27.5 mL (300 mmol) Essigsäureanhydrid und 40 mL Pyridin eingesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und nach AAV 7 aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 8.22 g (21.1 mmol, 80%) eines farblosen Feststoffes als Anomerengemisch $\alpha/\beta = 9:1$.

- α -¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 6.33 (d, 1H, ³J_{HH} = 3.8 Hz, H-1), 5.47 (dd, 1H, ³J_{HH} = 9.8 Hz, ³J_{HH} = 9.8 Hz, H-3), 5.17-5.05 (m, 2H, H-2, H-4), 4.26 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.0 Hz, ²J_{HH} = 12.6 Hz, H-6a), 4.15-4.06 (m, 2H, H-5, H-6b), 2.18, 2.09, 2.04, 2.02, 2.01 (5xs, 5x3H, COCH₃). - α -¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 170.8, 170.4, 169.8, 169.5, 168.9 (5xCOCH₃), 89.2 (C-1), 70.0 (C-5), 69.9 (C-3), 69.4 (C-2), 68.1 (C-4), 61.6 (C-6), 21.0, 20.8, 20.78, 20.7, 20.6 (5xCOCH₃). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 1737, 1368, 1217, 1067, 1033, 981, 946, 911. - MS (FAB, m/z) C₁₆H₂₂O₁₁: ber.: 390.12, gef.: 331.1 [M-OAc]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +59.8° (c = 0.5, CHCl₃). - DC: R_f-Wert (EE/PE 2:3 v/v): 0.45. - Smp.: 71 °C.

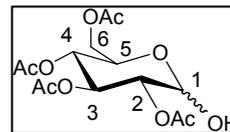


Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-glucopyranose 135

Die Synthese erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 8. Es wurden 9.00 g (23.0 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-glucopyranose **128**, 2.54 g (27.6 mmol) Hydraziniumacetat und 15 mL abs. DMF eingesetzt. Die abschließende Säulenchromatographie erfolgte mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (1-30%).

Ausbeute: 7.12 g (20.4 mmol, 89%) eines farblosen Feststoffes als Anomerengemisch $\alpha/\beta = 8:1$.

- α - $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 5.48 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 9.7$ Hz, H-3), 5.38 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, H-1), 5.02 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 9.7$ Hz, H-4), 4.93-4.85 (m, 1H, H-2), 4.29-4.21 (m, 2H, H-5, H-6a), 4.13-4.08 (m, 1H, H-6b), 2.03, 2.02, 1.97, 1.95 (4xs, 4x3H, COCH_3). - α - $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 171.0, 170.3, 169.8, 168.8 (4x COCH_3), 90.0 (C-1), 71.2 (C-5), 70.0 (C-2), 68.5 (C-4), 67.0 (C-3), 62.0 (C-6), 20.7, 20.6, 20.5 (4x COCH_3). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 2961, 1741, 1435, 1366, 1213, 1030. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$: ber.: 348.11, gef.: 331.2 [M-OH] $^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +32.2 $^\circ$ (c = 1, DCM). - DC: R_f -Wert (EE/PE 1:1 v/v): 0.19.

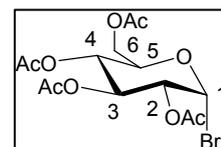


Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl-1-bromid **152**

Die Synthese wurde nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 9 durchgeführt. Es wurden 29.2 g (74.7 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-glucopyranose **128** und 8.39 mL (11.6 g, 104 mmol) Bromwasserstoffsäure (33% in Eisessig) umgesetzt. Nach Aufarbeitung erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (4:5 v/v).

Ausbeute: 28.6 g (69.6 mmol, 93%) eines farblosen Feststoffes.

- $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 6.55 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.9$ Hz, H-1), 5.49 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.9$ Hz, H-3), 5.09 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 9.6$ Hz, H-4), 4.77 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.1$ Hz, H-2), 4.30-4.20 (m, 2H, H-5, H-6a), 4.05-4.02 (m, 1H, H-6b), 2.04, 1.99, 1.97 (3xs, 12H, COCH_3). - $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 170.3, 169.8, 169.5, 168.8 (4x COCH_3), 90.3 (C-1), 72.1 (C-5), 71.1 (C-3), 70.3 (C-2), 68.7 (C-4), 60.4 (C-6), 20.6, 20.57, 20.51, 20.5 (4x COCH_3). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1737, 1363, 1223, 1106, 1035, 992. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{BrO}_9$: ber.: 410.03, gef.: 411.0 [M+H] $^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +192.1 $^\circ$ (c = 1, CHCl_3). - DC: R_f -Wert (EE/PE 1:1 v/v): 0.40. - Smp.: 68 $^\circ\text{C}$.

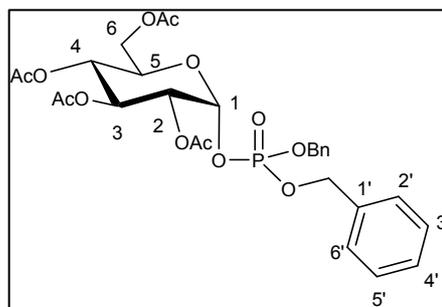


Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl-1-dibenzylphosphat **141a**

Die Synthese erfolgte nach AAV 10.1. Es wurden 4.50 g (12.9 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-glucopyranose **135**, 4.58 g (38.8 mmol) DCI und 11.1 g (32.3 mmol) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit in 50 mL abs. DCM umgesetzt. Nach 2 h wurden 3.34 g (19.4 mmol) *m*CPBA zur Oxidation verwendet, wobei ein Anomerengemisch von $\alpha/\beta = 6:1$ entstand. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (1:1 v/v) konnten 61% des α -Anomers und 6% des β -Anomers isoliert werden.

Ausbeute: 4.81 g (7.90 mmol, 61 %) eines farblosen Öls.

- $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.38-7.35 (m, 10H, H_{arom}), 5.90 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 6.8$ Hz, H-1), 5.48 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 9.9$ Hz, H-3), 5.14-5.03 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$, H-2), 5.01-4.96 (m, 1H, H-4), 4.17 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.1$ Hz, H-6a), 4.07-4.04 (m, 1H, H-5), 3.92 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, H-6b), 2.03, 2.02, 2.01 (3xs, 9H, COCH_3), 1.89 (s, 3H, COCH_3). - $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 170.5, 170.0, 169.8, 169.4 (4x COCH_3), 128.8 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.8$ Hz, C-2'), 128.7 (d, $^4J_{\text{CP}} = 1.9$ Hz, C-6'), 128.1 (C-3'), 128.0 (C-5'), 128.0 (C-4'), 93.9 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.4$ Hz, C-1), 69.8 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.2$ Hz, C-2), 69.7 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 69.4 (C-5), 69.3 (C-3), 67.6 (C-4), 61.2 (C-6), 20.65, 20.62, 20.5, 20.3 (4x COCH_3). - $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: -2.71. - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1748, 1368, 1213, 948, 734, 696. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{O}_{13}\text{P}$: ber.: 608.16, gef.: 609.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +63° (c = 0.16, CHCl_3). - DC: R_f -Wert (EE/PE 1:1 v/v): 0.36.



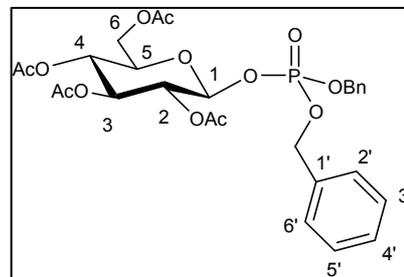
Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl-1-dibenzylphosphat **141b**

Die Synthese wurde gemäß AAV 10.2 durchgeführt. Es wurden 2.50 g (5.66 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-glucose-1-bromid **152**, 3.15 g (11.3 mmol) Dibenzylphosphat, 3.13 g (11.3 mmol) Silbercarbonat in 25 mL abs. Dichlormethan und

25 mL abs. Acetonitril eingesetzt. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (1:1 v/v).

Ausbeute: 3.13 g (5.06 mmol, 89%) eines farblosen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.30-7.19 (m, 10H, Arom.), 5.27 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, H-4), 5.17-5.11 (m, 1H, H-3), 5.08-4.99 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$, H-2), 4.93 (d, 1H, $^3J_{\text{HP}} = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.25 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.0$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 12.6$ Hz, H-1), 4.14 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.8$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 12.5$ Hz, H-6a), 4.11 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.2$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 12.5$ Hz, H-6b), 3.81 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 9.8$ Hz, H-5), 1.96, 1.95, 1.93, 1.92 (4xs, 12H, COCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 170.3, 169.8, 169.5, 168.8 (4x COCH_3), 135.7 (C-1'), 128.5 (C-3'), 128.4 (C-4'), 127.8 (C-2'), 95.5 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.4$ Hz, C-1), 71.0 (C-4), 69.7 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 69.1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 68.5 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.8$ Hz, C-2), 68.2 (C-5), 67.5 (C-3), 61.7 (C-6), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (4x COCH_3). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: -3.34. - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1742, 1725, 1365, 1217, 1098, 991, 883. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{O}_{13}\text{P}$: ber.: 608.16, gef.: 609.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +17.3° (c = 1, CHCl_3). - DC: R_f -Wert (EE/PE 1:1 v/v): 0.28.



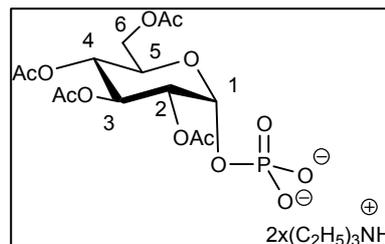
Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl-1-phosphat als Triethylammoniumsalz **147a**

Die Reaktion erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 11. Es wurden 2.61 g (4.29 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl-1-dibenzylphosphat **141a** in Gegenwart von 1.19 mL (884 mg, 8.60 mmol) Triethylamin und 429 mg Pd/C in Dioxan hydriert. Nach einer Reaktionszeit von 24 h und Aufarbeitung wurde das Produkt durch Gefriertrocknung gewonnen.

Ausbeute: 2.10 g (3.97 mmol, 93%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 5.68 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.8$ Hz, H-1), 5.49 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.7$ Hz, H-3), 5.15 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.7$ Hz, H-4), 5.04 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 10.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^4J_{\text{HP}} = 2.0$ Hz, H-2), 4.46-4.37 (m, 2H, H-5, H-6a), 4.20 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, $^2J_{\text{HP}} = 12.3$ Hz, H-6b), 3.20 (q, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz,

$\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$, 2.13, 2.12, 2.10, 2.08 (4xs, 4x3H, COCH_3), 1.28 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). ^{-13}C -NMR (101 MHz, D_2O) δ [ppm]: 173.7, 173.3, 172.8 (4x COCH_3), 91.3 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, C-1), 70.6 (C-3), 69.7 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, C-2), 68.1 (C-5), 67.7 (C-4), 61.7 (C-6),



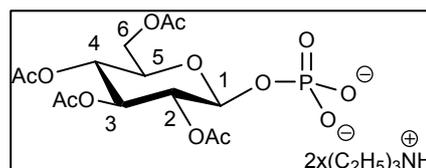
46.6 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 20.14, 20.11, 20.09, 20.0 (4x COCH_3), 8.2 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). ^{-31}P -NMR (162 MHz, D_2O) δ [ppm]: 0.05. - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1742, 1725, 1365, 1217, 1098, 991, 883. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_{13}\text{P}$: ber.: 426.05, gef.: 427.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +90.4 $^\circ$ (c = 1, H_2O). - DC: R_f -Wert ($i\text{PrOH}/\text{AcNH}_4$ (1M) 2:1 v/v): 0.14.

Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl-1-phosphat als Triethylammoniumsalz **147b**

Die Reaktion erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 11. Es wurden 2.20 g (3.61 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl-1-dibenzylphosphat **141b** in Gegenwart von 730 μL (532 mg, 7.21 mmol) Triethylamin und 361 mg Pd/C in Dioxan hydriert. Nach einer Reaktionszeit von 24 h und Aufarbeitung wurde das Produkt durch Gefriertrocknung gewonnen.

Ausbeute: 1.67 g (3.16 mmol, 88%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

^{-1}H -NMR (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 5.33 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, H-3), 5.19 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.7$ Hz, H-1), 5.07 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.5$ Hz, H-4), 4.97-4.90 (m, 1H, H-2), 4.33 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, H-



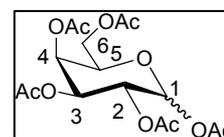
6a), 4.15 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.3$ Hz, H-6b), 4.07-4.00 (m, 1H, H-5), 3.20 (q, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 2.05, 2.01, 1.98 (3xs, 12H, COCH_3), 1.28 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). ^{-13}C -NMR (101 MHz, D_2O) δ [ppm]: 169.8, 170.2, 170.3, 170.9 (4x COCH_3), 95.1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.8$ Hz, C-1), 71.8 (C-3), 70.3 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.5$ Hz, C-2), 70.5 (C-5), 60.7 (C-4), 60.4 (C-6), 46.6 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 20.7, 20.9, 21.0 (3x COCH_3), 8.2 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). ^{-31}P -NMR (162 MHz, D_2O) δ [ppm]: -1.85. - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 2943, 1742, 1367, 1211, 1033, 908, 832. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_{13}\text{P}$: ber.: 426.05, gef.: 473.1 $[\text{M}+\text{K}]^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: -4.56 $^\circ$ (c = 1.03, H_2O). - DC: R_f -Wert ($i\text{PrOH}/\text{AcNH}_4$ (1M) 2:1 v/v): 0.14.

Synthese von 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-galactopyranose **129**

Die Synthese erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 7. Es wurden 5.29 g (29.3 mmol) D-Galactose **124**, 28.0 mL (30.0 g, 300 mmol) Essigsäureanhydrid und 40 mL Pyridin eingesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und nach AAV 7 aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 9.58 g (24.5 mmol, 84%) eines farblosen Feststoffes als Anomerengemisch $\alpha/\beta = 4:1$.

- α - $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 6.37 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, H-1), 5.50 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, H-4), 5.35-5.32 (m, 2H, H-2, H-3), 4.34 (dt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 0.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, H-5), 4.10 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, H-6a, H-6b), 2.17, 2.16, 2.04, 2.02, 2.01 (5xs, 5x3H, COCH_3). - α - $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 170.5, 170.3, 170.0, 169.5, 169.1 (5x COCH_3), 89.8 (C-1), 68.9 (C-5), 67.5 (C-4), 67.5 (C-2), 66.6 (C-3), 61.4 (C-6), 21.0, 20.8, 20.76, 20.72, 20.6 (5x COCH_3). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1736, 1370, 1205, 1040, 1007, 950, 898. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$: ber.: 390.12, gef.: 331.1 [M-OAc] $^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +77.9 $^\circ$ (c = 1, CHCl_3). - DC: R_f -Wert (EE/PE 2:3 v/v): 0.67. - Smp.: 71 $^\circ\text{C}$.

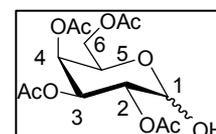


Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-galactopyranose **136**

Die Synthese erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 8. Es wurden 3.00 g (7.69 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-galactopyranose **129**, 850 mg (9.23 mmol) Hydrazinacetat und 7 mL abs. DMF eingesetzt. Die abschließende Säulenchromatographie erfolgte an Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (1-30%).

Ausbeute: 2.19 g (6.29 mmol, 61%) eines gelben Öls als Anomerengemisch $\alpha/\beta = 4:1$.

- α - $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 5.52 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, H-1), 5.48 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, H-4), 5.42 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.8$ Hz, H-3), 5.17 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.2$ Hz, H-2), 4.48 (dt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, H-5), 4.13-4.09 (m,



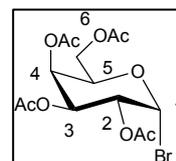
2H, H-6a, H-6b), 2.14, 2.09, 2.04, 1.99 (4xs, 4x3H, COCH₃). - α -¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 171.0, 170.3, 169.8, 168.8 (4xCOCH₃), 90.8 (C-1), 68.5 (C-4), 68.4 (C-2), 67.4 (C-3), 66.5 (C-5), 61.9 (C-6), 23.44, 23.40, 21.0, 20.7 (4xCOCH₃). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 2110, 1735, 1654, 1437, 1373, 1234, 1155, 1127, 1049. - MS (FAB, m/z) C₁₄H₂₀O₁₀: ber.: 348.11, gef.: 331.2 [M-OH]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: -51 ° (c = 0.13, MeOH). - DC: R_F-Wert (DCM/MeOH 30:1 v/v): 0.39.

Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl-1-bromid 153

Die Synthese wurde nach dem allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 9 durchgeführt. Es wurden 2.00 g (5.10 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-galactopyranose **129** und 4.12 mL (5.68 g, 15.3 mmol) Bromwasserstoffsäure (33% in Eisessig) umgesetzt. Nach Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographische Reinigung mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (4:5 v/v).

Ausbeute: 1.95 g (4.29 mmol, 84%) eines gelben Öls.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 6.70 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.0 Hz, H-1), 5.52 (dd, 1H, ³J_{HH} = 1.3 Hz, ³J_{HH} = 3.3 Hz, H-4), 5.40 (dd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ³J_{HH} = 10.7 Hz, H-3), 5.05 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.0 Hz, ³J_{HH} = 10.5 Hz, H-2), 4.49 (t, 1H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, H-5), 4.15 (dd, 2H, ³J_{HH} = 6.5 Hz, ²J_{HH} = 11.5 Hz, H-6a, H-6b), 2.15, 2.11, 2.06, 2.01 (4xs, 4x3H, COCH₃). -¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 170.5, 170.2, 170.0, 169.9 (4xCOCH₃), 88.1 (C-1), 71.2 (C-5), 68.1 (C-4), 67.9 (C-2), 67.1 (C-3), 60.9 (C-6), 20.9, 20.8, 20.73, 20.7 (4xCOCH₃). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 2988, 1739, 1368, 1207, 1073, 1010, 910. - MS (FAB, m/z) C₁₄H₁₉BrO₉: ber.: 410.03, gef.: 411.1 [M+H]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +191 ° (c = 1, CHCl₃). - DC: R_F-Wert (EE/PE 5:4 v/v): 0.83.



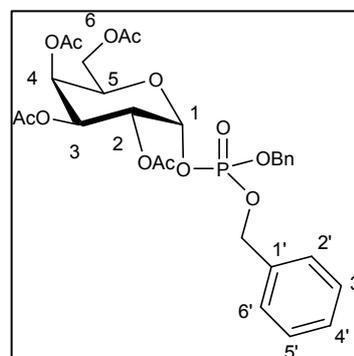
Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl-1-dibenzylphosphat 142a

Die Synthese erfolgte nach AAV 10.1. Es wurden 1.60 g (4.60 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-galactopyranose **136**, 978 mg (14.0 mmol) DCI und 3.80 mL (3.95 g, 11.0 mmol) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit in 50 mL abs. DCM umgesetzt.

Nach 2 h wurden 1.89 g (11.0 mmol) *m*CPBA zur Oxidation verwendet. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (1:1 v/v) konnten 63% des α -Anomers und 16% des β -Anomers isoliert werden.

Ausbeute: 1.78 g (2.92 mmol, 63%) eines farblosen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.37-7.35 (m, 10H, H_{arom}), 5.95 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, H-1), 5.45 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, H-4), 5.33 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.9$ Hz, H-3), 5.22 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.7$ Hz, $^4J_{\text{HP}} = 2.6$ Hz, H-2), 5.08 (dd, 4H, $^3J_{\text{HP}} = 7.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.30 (dt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 0.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, H-5), 4.06 (dd, 1H,



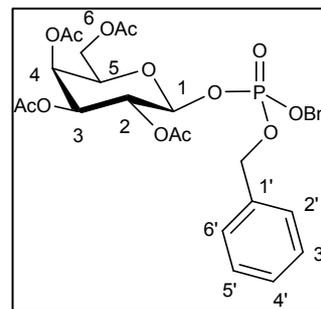
$^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 11.3$ Hz, H-6a), 3.96 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 11.4$ Hz, H-6b), 2.14, 2.00, 1.92, 1.90 (4xs, 12H, COCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 170.4, 170.2, 170.0, 169.8 (4x COCH_3), 135.5 (C-1'), 128.92 (C-3'), 128.90 (C-5'), 128.2 (C-4'), 128.2 (C-2'), 128.1 (C-6'), 94.6 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.3$ Hz, C-1), 77.2 (C-2), 69.8 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 69.7 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 68.5 (C-4), 67.6 (C-5), 67.0 (C-3), 61.4 (C-6), 21.2, 20.7, 20.67, 20.6 (4x COCH_3). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 0.89. - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1741, 1369, 1212, 1152, 1012, 946. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{O}_{13}\text{P}$: ber.: 608.17, gef.: 609.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +67.5 $^\circ$ (c = 0.16, CHCl_3). - DC: R_f -Wert (EE/PE 1:1 v/v): 0.41.

Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-1-dibenzylphosphat **142b**

Die Synthese wurde gemäß AAV 10.2. Es wurden 1.80 g (3.97 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-galactose-1-bromid **153**, 1.99 g (7.15 mmol) Dibenzylphosphat, 1.97 g (7.15 mmol) Silbercarbonat in 25 mL abs. Dichlormethan sowie 25 mL abs. Acetonitril eingesetzt. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (1:1 v/v).

Ausbeute: 2.20 g (3.61 mmol, 91%) eines farblosen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.35-7.29 (m, 10H, H_{arom}), 5.41 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.6$ Hz, H-4), 5.33-5.20 (m, 2H, H-2, H-3), 5.07 (dd, 2H, $^3J_{\text{HP}} = 1.2$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 5.04-5.01 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$, H-1), 4.12-4.05 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.01 (dt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, H-5), 2.14, 2.00, 1.94, 1.88 (4xs, 12H, COCH_3).



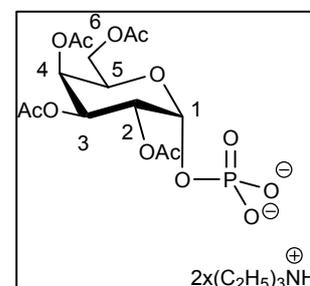
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 170.4, 170.2, 170.1, 169.6 (4x COCH_3), 135.5 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.6$ Hz, C-1'), 135.3 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.6$ Hz, C-1'), 128.8 (C-3', C-5'), 128.0 (C-4'), 127.9 (C-2', C-6'), 96.9 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.6$ Hz, C-1), 70.6 (C-4), 69.8 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 69.7 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 68.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, C-2), 66.8 (C-3), 61.2 (C-6), 20.8, 20.7, 20.6, 20.5 (4x COCH_3). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: -3.01. - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1738, 1371, 1218, 1152, 995. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{O}_{13}\text{P}$: ber.: 608.17, gef.: 609.4 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: -38 $^\circ$ (c = 0.3, CHCl_3). - DC: R_f -Wert (EE/PE 1:1 v/v): 0.39.

Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl-1-phosphat als Triethylammoniumsalz 148a

Die Reaktion erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 11. Es wurden 1.89 g (3.11 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl-1-dibenzylphosphat **142a** in Gegenwart von 629 μL (459 mg, 6.21 mmol) Triethylamin und 311 mg Pd/C in Dioxan hydriert. Nach einer Reaktionszeit von 24 h und Aufarbeitung wurde das Produkt durch Gefriertrocknung gewonnen.

Ausbeute: 1.59 g (3.01 mmol, 97%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 5.55 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.9$ Hz, H-1), 5.34 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, H-4), 5.23 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.9$ Hz, H-3), 4.89 (ddd, 1H, $^4J_{\text{HP}} = 1.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.9$ Hz, H-2), 4.36 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, H-5), 4.04 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 11.1$ Hz, H-6a), 3.96 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz,



$^2J_{\text{HH}} = 10.9$ Hz, H-6b), 2.99 (q, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); 2.10, 2.00, 1.97, 1.94 (4xs, 4x3H, COCH_3); 1.18 (t, 9H, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O) δ [ppm]: 170.1; 169.9; 169.8; 169.6 (4x COCH_3), 90.5 (d, $^2J_{\text{CP}} = 17.5$ Hz, C-1),

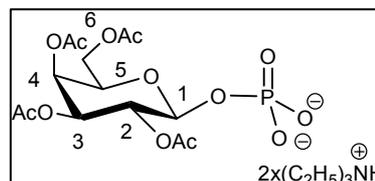
67.7 (C-4), 67.6 (d, $^3J_{CP} = 7.6$ Hz, C-2), 66.8 (C-3), 66.2 (C-5), 61.0 (C-6), 45.1 (N(CH₂CH₃)₃); 20.5; 20.4; 20.4; 20.3 (4xCOCH₃); 8.4 (N(CH₂CH₃)₃). $^{-31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D₂O) δ [ppm]: -1.98. - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 1738, 1448, 1370, 1216, 1047, 919. - HRMS (FAB, m/z) C₁₄H₂₁O₁₃P: ber.: 428.0731, gef.: 451.0639 [M+Na]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +79 ° (c = 0.6, H₂O). - DC: R_f-Wert (iPrOH/AcNH₄ (1M) 2:1 v/v): 0.14.

Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-1-phosphat als Triethylammoniumsalz 148b

Die Reaktion erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 11. Es wurden 2.20 g (3.61 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-1-dibenzylphosphat **142b** in Gegenwart von 730 μL (533 mg, 7.21 mmol) Triethylamin und 361 mg Pd/C in Dioxan hydriert. Nach einer Reaktionszeit von 24 h und Aufarbeitung wurde das Produkt durch Gefriertrocknung gewonnen.

Ausbeute: 1.67 g (3.16 mmol, 88%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^{-1}\text{H-NMR}$ (400 MHz, D₂O) δ [ppm]: 5.77 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 3.4$ Hz, $^3J_{HP} = 7.4$ Hz, H-1), 5.46 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 1.1$ Hz, $^3J_{HH} = 3.4$ Hz, H-4), 5.43 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 3.4$ Hz, $^3J_{HH} = 10.7$ Hz, H-3), 5.13 (ddd, 1H, $^3J_{HH} = 3.3$ Hz, $^3J_{HH} = 10.6$ Hz, $^4J_{HP} = 2.3$ Hz, H-2), 4.01 (t, 1H, $^3J_{HH} = 7.3$ Hz, H-5), 4.15 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 7.8$ Hz, $^2J_{HH} = 10.8$ Hz, H-6a), 4.04 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 6.0$ Hz, $^2J_{HH} = 10.8$ Hz, H-6b), 3.06 (q, 6H, $^3J_{HH} = 7.3$ Hz, N(CH₂CH₃)₃), 2.12, 2.06, 2.01, 1.97 (4xs, 4x3H, COCH₃), 1.33 (t, 9H, $^3J_{HH} = 7.2$ Hz, N(CH₂CH₃)₃). $^{-13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D₂O) δ [ppm]: 170.9, 170.7, 170.5, 170.2 (4xCOCH₃), 92.2 (d, $^2J_{CP} = 18.2$ Hz, C-1), 68.2 (C-4), 68.0 (d, $^3J_{CP} = 7.6$ Hz, C-2), 67.7 (C-3), 66.8 (C-5), 61.2 (C-6), 45.7 (N(CH₂CH₃)₃), 21.0, 20.9, 20.84, 20.80 (COCH₃), 8.6 (N(CH₂CH₃)₃). $^{-31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D₂O) δ [ppm]: -0.23. - IR: (ATR) ν [cm⁻¹]: 1740, 1450, 1367, 1214, 1039, 922. - HRMS (FAB, m/z) C₁₄H₂₁O₁₃P: ber.: 428.0731, gef.: 530.2001 [M+Et₃NH]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +12.3 ° (c = 1.36, H₂O). - DC: R_f-Wert (iPrOH/AcNH₄ (1M) 2:1 v/v): 0.14.

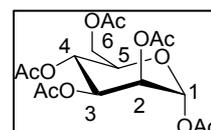


Synthese von 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-mannopyranose 130

Die Synthese erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 7. Es wurden 3.97 g (22.0 mmol) D-Mannose **125**, 20.8 mL (22.5 g, 220 mmol) Essigsäureanhydrid und 40.0 mL Pyridin eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 24 h wurde das Rohprodukt aufgearbeitet und aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 6.38 g (16.4 mmol, 74%) eines farblosen Öls als Anomerengemisch $\alpha/\beta = 4:1$.

- α - $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 6.02 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, H-1), 5.30-5.26 (m, 2H, H-3, H-4), 5.20-5.18 (m, 1H, H-2), 4.21 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.8$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 12.3$ Hz, H-6a), 4.06-3.98 (m, 2H, H-5, H-6b), 2.16, 2.15, 2.08, 2.04, 1.99 (5xs, 5x3H, COCH_3). - α - $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 170.7, 170.0, 169.8, 169.6, 168.2 (5x COCH_3), 90.7 (C-1), 70.7 (C-5), 68.8 (C-3), 68.4 (C-2), 65.6 (C-4), 62.2 (C-6), 20.9, 20.8, 20.78, 20.73, 20.7 (5x COCH_3). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1739, 1368, 1206, 1146, 1047, 1024, 970. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$: ber.: 390.12, gef.: 331.1 $[\text{M-OAc}]^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +24.4° (c = 1.15, CHCl_3). - DC: R_f -Wert (PE/EE 1:1 v/v): 0.40.

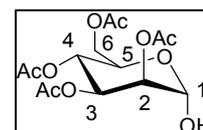


Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-mannopyranose 137

Die Synthese erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 8. Es wurden 6.36 g (16.3 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-mannopyranose **130**, 1.90 g (21.0 mmol) Hydraziniumacetat und 17 mL abs. DMF eingesetzt. Die abschließende Säulenchromatographie erfolgte mit Dichlormethan/Methanol-Gradienten (1-30%).

Ausbeute: 4.30 g (12.3 mmol, 76%) eines gelben Öls.

- α - $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 5.36 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.1$ Hz, H-3), 5.22-5.16 (m, 3H, H-1, H-2, H-4), 4.21-4.14 (m, 2H, H-5, H-6a), 4.10-4.04 (m, 1H, H-6b), 2.10, 2.04, 1.99, 1.94 (4xs, 4x3H, COCH_3). - α - $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 170.9, 170.3, 170.1, 169.9 (4x COCH_3), 92.2 (C-1), 70.1 (C-2), 68.8 (C-5), 68.4 (C-3), 66.2 (C-4), 62.6 (C-6), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (4x COCH_3). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1737, 1662, 1434, 1370, 1214,



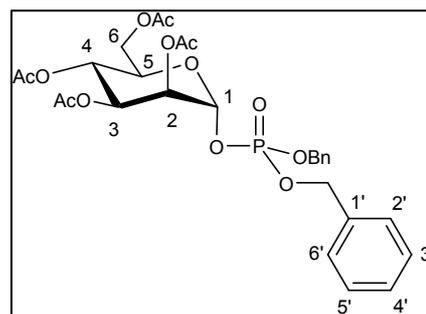
1127, 1042. - MS (FAB, m/z) C₁₄H₂₀O₁₀: ber.: 348.11, gef.: 331.2 [M-OH]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +22.3 ° (c = 1, CHCl₃). - DC: R_f-Wert (DCM/MeOH 30:1 v/v): 0.40.

Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl-1-dibenzylphosphat 143

Die Synthese erfolgte nach AAV 10.1. Es wurden 400 mg (1.15 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-mannopyranose **137**, 211 mg (3.45 mmol) DCI und 400 μ L (552 mg, 2.87 mmol) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit in 50 mL abs. DCM umgesetzt. Nach 2 h wurden 570 mg (3.45 mmol) *m*CPBA zur Oxidation verwendet. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (1:1 v/v) konnte nur das α -Anomer isoliert werden.

Ausbeute: 2.55 g (4.19 mmol, 77%) eines farblosen Öls.

- α -¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.34-7.37 (m, 10H, H_{arom}), 5.60 (dd, 1H, ³J_{HH} = 1.8 Hz, ³J_{HP} = 6.5 Hz, H-1), 5.28-5.29 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 5.07-5.10 (m, 4H, 2xCH₂-Benzyl), 4.24-4.25 (m, 1H, H-6), 4.00-4.06 (m, 1H, H-5), 3.92 (dd, 1H, ³J_{HH} = 2.5 Hz, ²J_{HH} = 12.6 Hz, H-6), 1.99, 2.03, 2.04,



2.15 (4xs, 4x3H, COCH₃). - α -¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 170.5, 169.7, 169.6, 20.6 (4xCOCH₃), 128.9 (C-1'), 128.8 (C-3', C-5'), 128.3 (C-2', C-6'), 128.1 (C-4'), 94.7 (d, ²J_{CP} = 5.1 Hz, C-1), 70.3 (C-5), 70.1 (d, ²J_{CP} = 5.1 Hz, CH₂-Benzyl), 69.9 (d, ²J_{CP} = 5.6 Hz, CH₂-Benzyl), 68.8 (d, ³J_{CP} = 11.7 Hz, C-2), 68.3 (C-3), 65.3 (C-4), 61.8 (C-6), 20.9, 20.8, 20.7, 20.5 (4xCOCH₃). - ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O) δ [ppm]: -0.23. - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 1735, 1664, 1438, 1365, 1209, 1122, 1042. - MS (FAB, m/z) C₂₈H₃₃O₁₃P: ber.: 608.17, gef.: 609.3 [M+H]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +40.2 ° (c = 1, CHCl₃). - DC: R_f-Wert (PE/EE 1:1 v/v): 0.35.

Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl-1-phosphat als Triethylammoniumsalz 149

Die Reaktion erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 11. Es wurden 120 mg (0.197 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl-1-

dibenzylphosphat **143** in Gegenwart von 55 μL (39.9 mg, 0.394 mmol) Triethylamin und 20 mg Pd/C in Dioxan hydriert. Nach einer Reaktionszeit von 24 h und Aufarbeitung wurde das Produkt durch Gefriertrocknung gewonnen.

Ausbeute: 852 mg (1.61 mmol, 98%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 5.54 (d, 1H,

$^3J_{\text{HP}} = 6.3$ Hz, H-1), 3.80-4.37 (m, 4H, H-5, H-6, H-2, H-

4), 3.64-3.68 (m, 1H, H-6), 3.10 (q, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz,

$\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1.95, 2.02, 2.08, 2.13 (4xs, 4x3H, COCH_3),

1.36 (t, 9H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$

(101 MHz, D_2O) δ [ppm]: 171.9, 171.8, 171.7, 169.9 (4x COCH_3), 94.1 (d,

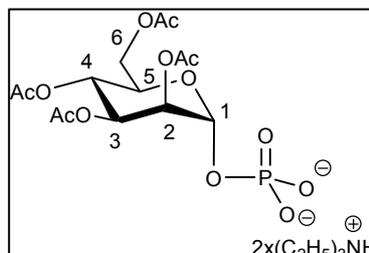
$^2J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, C-1), 77.4 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, C-2), 69.7 (C-3), 69.3 (C-4), 66.4 (C-5),

62.6 (C-6), 46.1 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 21.3, 21.2, 21.1, 21.0 (4x COCH_3), 8.9 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ [ppm]: -2.13. - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1738, 1448, 1370,

1216, 1047, 919. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}_{13}\text{P}$: ber.: 428.07, gef.: 451.1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

- $[\alpha]_{546}^{20}$: +23 $^\circ$ (c = 1.0, H_2O). - DC: R_f -Wert ($i\text{PrOH}/\text{AcNH}_4$ (1M) 2:1 v/v): 0.14.



Synthese von 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranose **131**

Die Synthese erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 7. Es wurden 5.00 g (23.2 mmol) D-Glucosamin Hydrochlorid **126**, 23.7 mL (25.6 g, 232 mmol) Essigsäureanhydrid und 35 mL Pyridin umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und aufgearbeitet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das ölige Rohprodukt in einer kleinen Menge abs. Methanol bei 2 $^\circ\text{C}$ kristallisiert. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 7.66 g (19.7 mmol, 85%) eines farblosen Feststoffes.

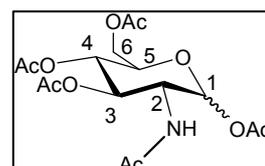
- α - $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 6.11 (d, 1H,

$^3J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, H-1), 6.02 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.0$ Hz, NH), 5.20 (t, 1H,

$^3J_{\text{HH}} = 10.0$ Hz, H-3), 5.14 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.5$ Hz, H-4), 4.44 (ddd,

1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.$, $^3J_{\text{HH}} = 9.3$, $^3J_{\text{HH}} = 10.5$, H-2), 4.18 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 4.1$ Hz,

$^2J_{\text{HH}} = 12.4$ Hz, H-6a), 4.00 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 2.4$, $^2J_{\text{HH}} = 12.4$, H-6b), 3.95 (ddd, 1H,



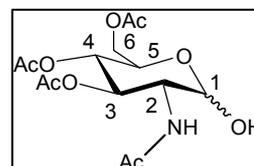
$^3J_{\text{HH}} = 2.5$, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$, $^3J_{\text{HH}} = 9.7$, H-5), 2.11, 2.02, 1.98, 1.97, 1.87 (5xs, 5x3H, COCH₃). - α - ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 171.5, 170.7, 170.4, 169.1, 168.7 (5xCOCH₃), 90.6 (C-1), 70.7 (C-5), 69.7 (C-4), 67.7 (C-3), 61.6 (C-6), 51.0 (C-2), 22.8, 20.8, 20.63, 20.61, 20.5 (5xCOCH₃). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 2960, 1754, 1653, 1466, 1372, 1228, 1138, 1074. - MS (FAB, m/z) C₁₆H₂₃NO₁₀: ber.: 389.13, gef.: 330.0 [M-OAc]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +63 ° (c = 0.1, CHCl₃). - DC: R_f-Wert (EE/PE 2:3 v/v): 0.45. - Smp.: 131 °C.

Synthese von 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranose **138**

Die Synthese erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 8. Es wurden 1.00 g (2.57 mmol) 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-desoxy-D-glucose **131**, 284 mg (3.08 mmol) Hydraziniumacetat und 10 mL abs. DMF eingesetzt. Die abschließende Säulenchromatographie erfolgte mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (1-30%).

Ausbeute: 583 mg (1.68 mmol, 65%) eines amorphen Feststoffes.

- α - ^1H -NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 5.84 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.2$ Hz, NH), 5.32-5.27 (m, 2H, H-1, H-4), 5.13 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.0$ Hz, H-3), 4.33-4.27 (m, 1H, H-2), 4.23-4.18 (m, 2H, H-5, H-6a), 4.16-4.11 (m, 1H, H-6b), 2.09, 2.03, 2.02, 1.96 (4xs, 4x3H, COCH₃). - α - ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 171.5, 170.7, 170.4, 169.1 (COCH₃), 91.7 (C-1), 70.9 (C-4), 68.2 (C-5), 67.6 (C-3), 62.1 (C-6), 52.3 (C-2), 23.2, 20.8, 20.7, 20.6 (COCH₃). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 3349, 2960, 1746, 1659, 1541, 1436, 1374, 1239, 1125, 1045. - MS (FAB, m/z) C₁₄H₂₁NO₉: ber.: 347.12, gef.: 348.2 [M-H]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +63 ° (c = 0.1, CHCl₃). - DC: R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.13.



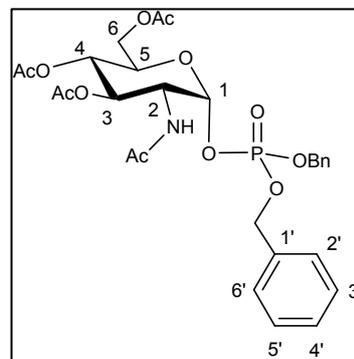
Synthese von 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl-1-dibenzylphosphat **144**

Die Synthese erfolgte nach AAV 10.1. Es wurden 500 mg (1.44 mmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **138**, 509 mg (4.32 mmol) DCI und 898 μL (1.24 g, 3.60 mmol) Dibenzyl-N,N-diisopropylphosphoramidit in 40 mL abs.

DCM umgesetzt. Nach 2 h wurden 807 mg (3.60 mmol) *m*CPBA zur Oxidation verwendet. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (1:1 v/v) konnte nur das α -Anomer isoliert werden.

Ausbeute: 637 mg (1.05 mmol, 73%) eines amorphen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.40-7.34 (m, 10H, H_{arom}), 5.68-5.61 (m, 2H, NH, H-1), 5.17-5.00 (m, 6H, H-3, H-4, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.40-4.33 (m, 1H, H-2), 4.13 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 3.9$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 12.5$ Hz, 1H, H-6a), 4.00-3.96 (m, 1H, H-5), 3.91 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 2.2$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 12.5$ Hz, 1H, H-6b), 2.03 (s, 3H, COCH_3), 2.01 (s, 6H, $2\times\text{COCH}_3$), 1.7 (s, 3H, COCH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]:



171.5, 170.7, 170.4, 169.1 (COCH_3), 129.0, 128.9, 128.8, 128.1, 128.0 (C_{arom}), 96.2 (d, $2J_{\text{CP}} = 6.4$ Hz, C-1), 70.1 (C-3), 70.0 (t, $^2J_{\text{CP}} = 5.0$ Hz, $2\times\text{CH}_2$), 69.6 (C-5), 67.3 (C-4), 61.3 (C-6), 51.8 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.8$ Hz, C-2), 22.7, 20.63, 20.60, 20.5 ($4\times\text{COCH}_3$). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: -0.1. - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 3282, 1739, 1676, 1547, 1499, 1456, 1365, 1240, 1131, 1081, 1035, 1017, 992, 953, 913. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{NO}_{12}\text{P}$: ber.: 607.18, gef.: 608.3 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +62.7° ($c = 0.51$, CH_2Cl_2). - DC: R_f -Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.63.

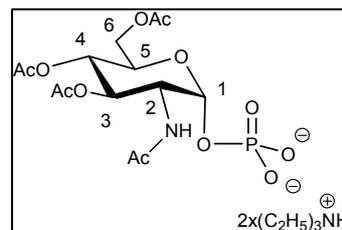
Synthese von 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucosyl-1-phosphat als Triethylammoniumsalz **150**

Die Reaktion erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 11. Es wurden 2.24 g (3.68 mmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl-1-dibenzylphosphat **144** in Gegenwart von 1.02 mL (745 mg, 7.36 mmol) Triethylamin und 36.8 mg Pd/C in Dioxan hydriert. Nach einer Reaktionszeit von 24 h und Aufarbeitung wurde das Produkt durch Gefriertrocknung gewonnen.

Ausbeute: 1.94 g (3.34 mmol, 91%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 5.47 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, 1H, H-1), 5.32 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 9.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.4$ Hz, 1H, H-3), 5.11 (t, $^3J_{\text{HH}} = 9.8$ Hz, 1H, H-4), 4.43 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 3.0$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 12.5$ Hz, 1H, H-6a), 4.39 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz,

$^3J_{\text{HH}} = 10.3 \text{ Hz}$, 1H, H-5), 4.29 (ddd, $^3J_{\text{HH}} = 2.3 \text{ Hz}$,
 $^3J_{\text{HH}} = 3.3 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 10.6 \text{ Hz}$, 1H, H-2), 4.18 (dd,
 $^3J_{\text{HH}} = 2.0 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{HH}} = 12.5 \text{ Hz}$, 1H, H-6b), 3.20 (q, 12H,
 $^3J_{\text{HH}} = 7.3 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$, 2.13, 2.09, 2.05, 2.00 (4xs,
4x3H, COCH_3), 1.28 (t, 18H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). -



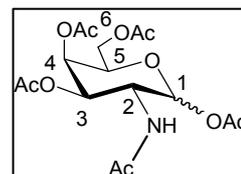
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O) δ [ppm]: 174.5, 173.9, 173.5, 172.9 (COCH_3), 93.0 (d,
 $^2J_{\text{CP}} = 5.7 \text{ Hz}$, C-1), 71.8 (C-3), 68.5 (C-4), 67.9 (C-5), 62.0 (C-6), 51.9 (d,
 $^3J_{\text{CP}} = 7.9 \text{ Hz}$, C-2), 46.7 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 21.9; 20.18; 20.15; 20.1 (COCH_3), 8.2
($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). - $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ [ppm]: -0.3. - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1741,
1672, 1545, 1366, 1222, 1124, 1034, 915, 837, 806, 732, 680. - HRMS (FAB, m/z)
 $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_{12}\text{P}$: ber.: 427.0734, gef.: 529.2149 [$\text{M}+\text{Et}_3\text{NH}$] $^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +99.4 $^\circ$ (c = 0.54,
 H_2O). - DC: R_f -Wert ($i\text{PrOH}/\text{AcNH}_4$ (1M) 2:1 v/v): 0.14.

Synthese von 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-desoxy-D-galactose 132

Die Synthese erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 7. Es wurden 6.20 g (28.0 mmol) D-Galactosamin Hydrochlorid **127**, 26.7 mL (28.8 g, 280 mmol) Essigsäureanhydrid und 40 mL Pyridin eingesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und aufgearbeitet.

Ausbeute: 10.6 g (27.3 mmol, 97%) eines farblosen Feststoffes als Anomerengemisch $\alpha/\beta = 9:1$.

- α - $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 6.21 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.6 \text{ Hz}$,
H-1), 5.41 (m, 1H, NH), 5.37 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 0.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 3.3 \text{ Hz}$,
H-3), 5.22 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 11.4 \text{ Hz}$, H-4), 4.76-4.70
(m, 1H, H-2), 4.25-4.21 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.09 (t, 1H,
 $^3J_{\text{HH}} = 1.9 \text{ Hz}$, H-5), 2.17, 2.09, 2.03, 1.95 (4s, 15H, COCH_3). - α - $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz,
 CDCl_3) δ [ppm]: 169.9, 169.7, 169.6, 169.5, 168.9 (5x COCH_3), 90.6 (C-1), 68.2 (C-5),
67.1 (C-4), 66.6 (C-3), 61.3 (C-6), 46.2 (C-2), 22.7, 22.3, 20.7, 20.6, 20.53
(5x COCH_3). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1753, 1647, 1569, 1433, 1375, 1308, 1222, 1118,
1077, 1041. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_{10}$: ber.: 389.13, gef.: 330.0 [M-OAc] $^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$:
+77.7 $^\circ$ (c = 0.5, CHCl_3). - DC: R_f -Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.50. - Smp.: 148 $^\circ\text{C}$.

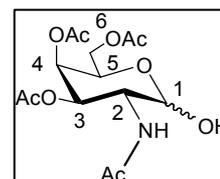


Synthese von 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-D-galactopyranose 139

Die Synthese erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 8. Es wurden 4.00 g (10.3 mmol) 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-desoxy-D-galactose **132**, 1.13 g (12.3 mmol) Hydraziniumacetat und 15 mL abs. DMF eingesetzt. Die abschließende Säulenchromatographie erfolgte mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (1-30%).

Ausbeute: 2.56 g (7.35 mmol, 72%) eines amorphen Feststoffes.

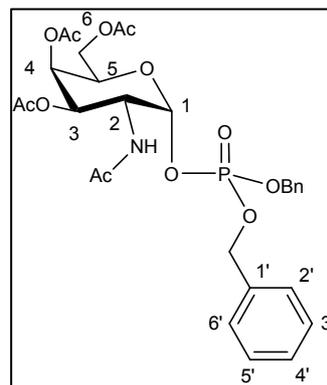
- α - $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 5.71 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.7$ Hz, NH), 5.40 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.1$ Hz, H-4), 5.33 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.6$ Hz, H-1), 5.25 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 11.5$ Hz, H-3), 4.56 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 9.6$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 11.5$ Hz, H-2), 4.41 (dt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 0.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Hz, H-5), 4.13-4.04 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.16, 2.06, 2.00, 1.98 (4xs, 4x3H, COCH_3). - α - $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 170.5, 170.4 (COCH_3), 92.5 (C-1), 68.1 (C-3), 67.7 (C-4), 66.9 (C-5), 62.2 (C-6), 48.2 (C-2), 23.5, 20.93, 20.90 (COCH_3). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1744, 1658, 1374, 1241, 1080, 1047. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_9$: ber.: 347.12, gef.: 348.2 $[\text{M-H}]^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +23° (c = 0.7, CHCl_3). - DC: R_f -Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.26.

**Synthese von 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl-1-dibenzylphosphat 145**

Die Synthese erfolgte nach AAV 10.1. Es wurden 500 mg (1.44 mmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-D-galactopyranose **139**, 274 mg (4.32 mmol) DCI und 869 μL (1.20 g, 3.65 mmol) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit in 50 mL abs. DCM umgesetzt. Nach 2 h wurden 888 mg (3.65 mmol) *m*CPBA zur Oxidation verwendet. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (1:1 v/v) konnte nur das α -Anomer isoliert werden.

Ausbeute: 591 mg (0.971 mmol, 67%) eines amorphen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.37-7.36 (m, 10H, H_{arom}), 5.73 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.2$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 5.6$ Hz, H-1), 5.53 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.4$ Hz, NH), 5.38 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, H-4), 5.11-5.03 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$, H-3), 4.64-4.58 (m, 1H, H-2), 4.25 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, H-5), 4.07 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 11.2$ Hz, H-6a), 3.94 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 11.2$ Hz, H-6b), 2.14, 1.99, 1.93, 1.73 (4s, 12H, $4 \times \text{COCH}_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 170.3



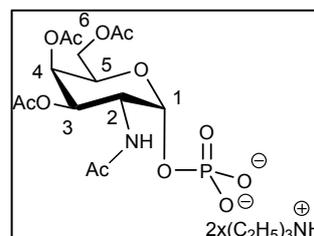
(COCH_3), 129.1, 129.0, 128.9, 128.3, 128.2 (C_{arom}), 115.2 (C-1'), 97.2 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.1$ Hz, C-1), 70.1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 68.8 (C-5), 67.4 (C-3), 66.9 (C-4), 61.5 (C-6), 47.7 (d, $^4J_{\text{CP}} = 7.6$ Hz, C-2), 23.0, 20.8, 20.79, 20.7 ($4 \times \text{COCH}_3$). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: -2.30. - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1746, 1637, 1618, 1595, 1560, 1371, 1233. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{NO}_{12}\text{P}$: ber.: 607.18, gef.: 647.1 [$\text{M}+\text{K}$] $^+$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +35 $^\circ$ ($c = 0.17$, CHCl_3). - DC: R_f -Wert (EE/PE 1:1 v/v): 0.27.

Synthese von 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactosyl-1-phosphat als Triethylammoniumsalz **151**

Die Reaktion erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 11. Es wurden 1.26 g (2.07 mmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl-1-dibenzylphosphat **145** in Gegenwart von 449 μL (328 mg, 4.14 mmol) Triethylamin und 207 mg Pd/C in Dioxan hydriert. Nach einer Reaktionszeit von 24 h und Aufarbeitung wurde das Produkt durch Gefriertrocknung gewonnen.

Ausbeute: 1.05 g (1.66 mmol, 80%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 5.51 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.2$ Hz, H-1), 5.48 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.8$ Hz, NH), 5.23 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 11.2$ Hz, H-3), 4.57 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, H-5), 4.45 (td, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 11.3$ Hz, H-2), 4.25 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 11.4$ Hz, H-6a), 3.96 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 11.6$ Hz, H-6b), 3.18 (q, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, $2 \times \text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 2.21, 2.07, 1.99, 1.99 (4xs, $4 \times 3\text{H}$, $4 \times \text{COCH}_3$), 1.26 (t, 18H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $2 \times \text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz,



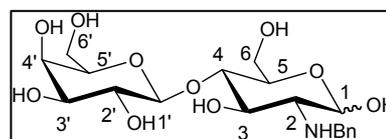
D₂O) δ [ppm]: 174.7; 173.7; 173.5; 173.1 (4xCOCH₃), 93.5 (d, ²J_{CP} = 5.5 Hz, C-1); 69.0 (C-3), 68.2 (C-4), 66.9 (C-5), 62.1 (C-6), 48.0 (d, ³J_{CP} = 8.2 Hz, C-2), 46.7 (N(CH₂CH₃)₃), 21.9; 20.2; 20.1; 20.0 (4xCOCH₃), 8.2 (N(CH₂CH₃)₃). -³¹P-NMR (162 MHz, D₂O) δ [ppm]: -0.24. - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 1740, 1667, 1546, 1396, 1218, 1039, 957, 916. - HRMS (FAB, m/z) C₁₄H₂₂NO₁₂P: ber.: 427.0734, gef.: 450.0777 [M+Na]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +35 ° (c = 1.33, H₂O). - DC: R_f-Wert (iPrOH/AcNH₄ (1M) 2:1 v/v): 0.14.

Synthese von *N*-Benzylactosamin **161**

Zu 50.0 g (146 mmol) Lactulose **159** wurden bei 0 °C 125 mL (123 g, 114 mol) Benzylamin zugegeben. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend 3 d bei 40 °C gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 125 mL Methanol versetzt. Diese Mischung wurde bei 0 °C unter langsamen Rühren zu 3.5 L Diethylether getropft und der entstandene Feststoff abfiltriert (R_f-Wert: 0.81 MeOH/CHCl₃/NH₄Ac (1M) 2:2:1 v/v/v). Das *N*-Benzylactulosylamin **160** (71.9 g) wurde in einem 8:1 Methanol/Essigsäure-Gemisch aufgenommen und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde erneut zu 4.0 L Diethylether getropft und der Feststoff bei 0 °C abfiltriert. Das entstandene *N*-Benzylactosamin **161** wurde als Rohprodukt weiter eingesetzt.

Ausbeute: 66.8 g eines gelben Feststoffes.

- DC R_f-Wert (MeOH/CHCl₃/NH₄Ac (1M) 2:2:1 v/v/v): 0.74.



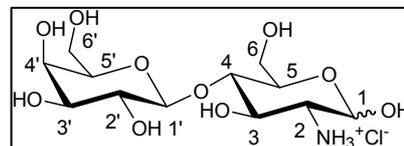
Synthese von Lactosamin Hydrochlorid **162**

Das Rohgemisch von *N*-Benzylactosamin **161** (66.8 g) wurde in 330 mL Wasser gelöst und ein pH-Wert von 1 mit konz. HCl eingestellt. Nach Zugabe von 3.30 g (23.5 mmol) des Pearlman-Katalysators Pd(OH)₂/C (5 gew.%) wurde das Reaktionsgemisch 3 d bei Raumtemperatur hydriert. Danach wurde der Katalysator über Celite[®] abfiltriert und das Filtrat unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde in einem Benzol/Ethanol-Gemisch 1:1 aufgenommen

und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das entstandene Lactosamin Hydrochlorid **162** wurde ohne Reinigung weiter eingesetzt.

Ausbeute: 60.4 g eines braunen Feststoffes.

- DC R_f -Wert (MeOH/CHCl₃/NH₄Ac (1M) 2:2:1 v/v/v):
0.37.

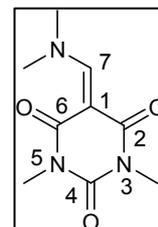


Synthese von 5-Dimethylaminomethylen-1,3-dimethylpyrimidin-2,4,6-trion **193**

In einem 500 mL-Rundkolben wurden 25.0 mL (22.4 g, 188 mmol) *N,N*-Dimethylformamid dimethylacetal **194** in 50 mL Chloroform gelöst und auf 0 °C gekühlt. Innerhalb von 2 h wurden 21.9 g (140.2 mmol) 1,3-Dimethylbarbitursäure **195** in 150 mL Chloroform zugetropft. Anschließend wurde die gelbe Lösung drei Mal mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in Diethylether suspendiert, erneut filtriert und mit Diethylether gewaschen.

Ausbeute: 23.3 g (110.3 mmol, 79%) eines hell-gelben Feststoffes.

-¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 8.11 (s, 1H, H-7), 3.39 (s, 3H, NCH₃), 3.36 (s, 3H, NCH₃), 3.28 (s, 6H, barb. NCH₃). -¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 162.1 (C-7), 152.5 (C-2, C-4, C-6), 48.9 (NCH₃), 44.8 (NCH₃), 27.9 (barb. NCH₃). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 1624,



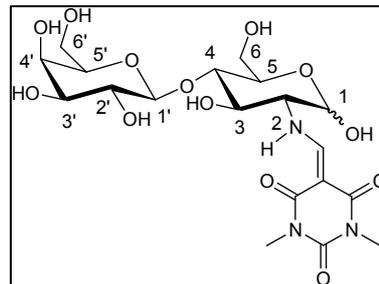
1596, 1429, 1372, 1322, 1187, 1073, 1050, 971. - MS (FAB, m/z) C₉H₁₃N₃O₃: ber.: 211.10, gef.: 212.1 [M+H]⁺. - DC: R_f -Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.75. - Smp.: 106 °C.

Synthese von *N*-(1,3-Dimethyl-2,4,6-trioxopyrimidin-5-yliden)methyl-lactosamin **133**

Das Rohgemisch von Lactosaminhydrochlorid **162** (60.4 g) wurde in 120 mL Methanol gelöst und mit 41.1 mL (29.6 g, 292 mmol) Triethylamin versetzt. Anschließend wurden 33.9 g (161 mmol) DTPM-Reagenz **193** gelöst in 50 mL Methanol zugegeben und der ausgefallener Niederschlag nach 2 h abfiltriert. Dieser wurde mit 200 mL Methanol gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

Ausbeute: 19.7 g (38.9 mmol, 27% bezogen auf Lactulose **159**) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 10.21 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, ³J_{HH} = 13.9 Hz, NH), 8.22 (d, 1H, ³J_{HH} = 14.6 Hz, =CH), 5.13 (d, 1H, ³J_{HH} = 15.3 Hz, H-1), 4.92 (s, 1H, H-3), 4.66 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H-4'), 4.60 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H-2'), 4.50 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.4 Hz, H-3'), 4.23 (d, 1H, ³J_{HH} = 6.37 Hz, H-1'), 3.81-3.74 (m, 1H, H-6)



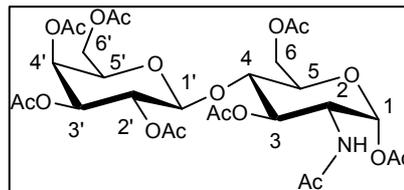
3.74-3.66 (m, 2H, H-6b, H-6'a), 3.63-3.55 (m, 2H, H-5, H-6'b), 3.52-3.48 (m, 2H, H-2, H-4), 3.40 (t, 1H, ³J_{HH} = 8.5 Hz, H-5'), 3.14 (s, 6H, NCH₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 164.2, 162.1, 159.60, 151.5 (DTPM), 103.9 (C-1'), 90.0 (C-1), 89.8 (DTPM), 80.6 (C-4'), 75.7 (C-5'), 73.2 (C-3'), 70.7, 70.2, 69.7 (C-2', C-3, C-5), 68.2 (C-4), 63.5 (C-2), 60.5, 60.4 (C-6, C-6'), 27.3, 26.6 (2xNCH₃). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 1626, 1473, 1362, 1332, 1249, 1205, 1124, 1095, 1059, 1038. - MS (FAB, m/z) C₁₉H₂₉N₃O₁₃: ber.: 507.17, gef.: 547.2 [M+K]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +53 ° (c = 0.7, DMSO). - DC: R_F-Wert (MeOH/CHCl₃/NH₄Ac (1M) 2:2:1 v/v/v): 0.74. - Smp.: 269 °C.

Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-1,3,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **134**

Bei Raumtemperatur wurde 1.00 g (1.97 mmol) *N*-(1,3-Dimethyl-2,4,6-trioxypyrimidin-5-yliden)methylactosamin **133** in 10 mL 25%-iger Ammoniaklösung aufgenommen und für 10 min gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels vom Filtrat wurde der Rückstand in 10 mL Pyridin aufgenommen und mit 4.51 mL (4.87 g, 47.3 mmol) Essigsäureanhydrid unter Zusatz einer Spatelspitze DMAP entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 7 acetyliert. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Ethylacetat/Methanol-Gradienten (0-2%) gereinigt.

Ausbeute: 469 mg (692 μmol, 35%) eines farblosen Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 6.10 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.6$ Hz, H-1), 5.59 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, NH), 5.36 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.3$ Hz, H-4'), 5.23 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 11.1$ Hz, H-3), 5.13 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$, $^3J_{\text{HH}} = 10.3$, H-2'), 4.97 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$, $^3J_{\text{HH}} = 10.4$, H-3'), 4.52 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, H-1'), 4.46-4.35 (m, 2H, H-2, H-6'a), 4.20 (m, 4H, H-5, H-6'b, H-6ab), 3.93-3.82 (m, 2H, H-4, H-5'), 2.18, 2.15, 2.11, 2.10, 2.06, 2.05, 1.97, 1.94 (8xs, 8x3H, 8xCOCH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 170.3, 170.1, 169.9, 168.8 (COCH₃), 101.2 (C-1'), 90.4 (C-1), 75.2 (C-5'), 70.9 (C-3), 70.7 (C-4), 70.4 (C-3'), 69.0 (C-2'), 66.5 (C-4'), 61.8 (C-6'), 60.9 (C-6), 51.2 (C-2), 20.5, 20.33, 20.31, 20.29 (COCH₃). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 2924, 1748, 1667, 1538, 1432, 1370, 1222, 1050, 944. - MS (FAB, m/z) C₂₈H₃₉NO₁₈: ber.: 677.22, gef.: 663.8 [M-CH₃]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +2.6° (c = 0.35, CHCl₃). - DC: R_F-Wert (EE/MeOH 9:1 v/v): 0.83.

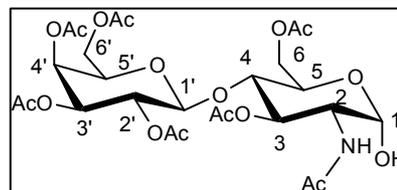


Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **140**

Die Synthese erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 8. Es wurden 300 mg (443 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1,3,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **134**, 49 mg (531 μmol) Hydraziniumacetat und 1 mL abs. DMF eingesetzt. Die anschließende Säulenchromatographie erfolgte mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (1-4% v/v).

Ausbeute: 196 mg (308 μmol , 70%) eines amorphen Feststoffes.

- α - $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 6.77 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.8$ Hz, NH), 5.52 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 9.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.8$ Hz, 1H, H-3), 5.34 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, H-4'), 5.17 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, H-1), 5.06 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.5$ Hz, 1H, H-2'), 4.98 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.5$ Hz, H-3'), 4.43-4.37 (m, 2H, H-1', H-6'a), 4.24 (dt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.3$ Hz, H-2), 4.16-3.98 (m, 4H, H-5, H-6'b, H-6ab), 3.88-3.83 (m, 1H, H-5'), 3.75 (t, $^3J_{\text{HH}} = 9.4$ Hz, 1H, H-4), 2.12, 2.08, 2.05, 2.04, 2.02, 1.99, 1.94 (7xs, 7x3H, 7xCOCH₃). - α - $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 171.1, 170.9, 170.8, 170.4,



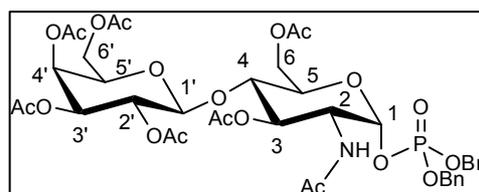
170.3, 170.0, 169.9 (7xCOCH₃), 100.9 (C-1'), 91.5 (C-1), 75.8 (C-4), 71.1 (C-3), 70.7 (C-5'), 70.4 (C-3'), 69.7 (C-2'), 68.3 (C-5), 66.6 (C-4'), 62.2 (C-6'), 60.7 (C-6), 52.1 (C-2), 22.9, 21.0, 20.9, 20.8, 20.7, 20.6, 20.4 (7xCOCH₃). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 1740, 1664, 1533, 1431, 1368, 1218, 1125, 1044, 907. - MS (FAB, m/z) C₂₆H₃₇NO₁₇: ber.: 635.21, gef.: 636.4 [M-H]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +51.7° (c = 0.75, CHCl₃). - DC: R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.29.

Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranosyl-1-dibenzylphosphat **146**

Die Synthese erfolgte nach AAV 10.1. Es wurden 150 mg (0.236 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **140**, 84.0 mg (708 μ mol) DCI und 173 μ L (204 mg, 590 μ mol) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit in 10 mL abs. DCM umgesetzt. Nach 30 min wurden 122 mg (708 μ mol) *m*CPBA zur Oxidation verwendet. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (1:1 v/v) konnte nur das α -Anomer isoliert werden.

Ausbeute: 198 mg (0.221 mmol, 94%) eines amorphen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.41–7.32 (m, 10H, H_{arom}), 5.62 (dd, 1H, ³J_{HH} = 3.3 Hz, ³J_{HH} = 5.9 Hz, H-1), 5.56 (d, 1H, ³J_{HH} = 9.4 Hz, NH), 5.34 (d, 1H, ³J_{HH} = 2.5 Hz, H-4'), 5.19–5.00



(m, 6H, 2xCH₂, H-3, H-2'), 4.94 (dd, 1H, ³J_{HH} = 3.3 Hz, ³J_{HH} = 10.4 Hz, H-3'), 4.49 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, H-1'), 4.33–4.23 (m, 2H, H-2, H-6a), 4.15–4.07 (m, 2H, H-6'ab), 4.00 (dd, 1H, ³J_{HH} = 3.8 Hz, ²J_{HH} = 12.1 Hz, 1H, H-6b), 3.96–3.92 (m, 1H, H-5), 3.88–3.79 (m, 2H, H-4, H-5'), 2.15, 2.06, 2.05, 2.04, 2.02, 1.97, 1.69 (7xs, 7x3H, 7xCOCH₃). -¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 171.1, 170.9, 170.8, 170.4, 170.3, 170.0, 169.9 (7xCOCH₃), 129.0, 128.9, 128.8, 128.1, 128.0 (C_{arom}), 101.3 (C-1'), 95.6 (C-1), 75.3 (C-4), 70.9 (C-3'), 70.8 (C-5'), 70.4 (C-5), 70.3 (C-2'), 69.5 (CH₂), 68.3 (C-3), 66.6 (C-4'), 61.2 (C-6), 60.7 (C-6'), 51.9 (C-2), 22.8, 21.1, 20.66–20.46 (7xCOCH₃). -³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: -2.21. - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 2925, 2853, 1748, 1683, 1558, 1456, 1370, 1224, 1052, 954. - MS (FAB, m/z)

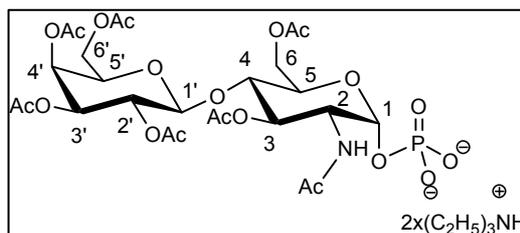
C₄₀H₅₀NO₂₀P: ber.: 895.79, gef.: 918.3 [M+Na]⁺. - [α]₅₄₆²⁰: +7.0 ° (c = 1.15, CHCl₃).
 - DC: R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.69.

Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranosyl-1-phosphat als Triethylammoniumsalz 67a

Die Reaktion erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 11. Es wurden 100 mg (112 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranosyl-1-dibenzylphosphat **146** in Gegenwart von 100 μL (73 mg, 0.223 mmol) Triethylamin und 11.2 mg Pd/C in Dioxan hydriert. Nach einer Reaktionszeit von 24 h und Aufarbeitung wurde das Produkt durch Gefriertrocknung gewonnen.

Ausbeute: 95.0 mg (0.104 mmol, 92%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]: 5.50-5.46 (m, 1H, H-1), 5.28-5.13 (m, 2H, H-3, H-4'), 5.06-4.97 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.80-4.73 (m, 1H, H-1'), 4.51-4.46 (m, 1H, H-6a), 4.32-4.10 (m, 4H, H-2, H-6b, H-6'ab), 3.92-3.80 (m, 1H, H-5')



3.78 (m, 2H, H-4, H-5), 3.21 (q, 12H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, N(CH₂CH₃)₃), 2.22, 2.19, 2.13, 2.12, 2.01 (5xs, 21H, 7xCOCH₃), 1.29 (t, 18H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, N(CH₂CH₃)₃).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) δ [ppm]: 174.4, 173.9, 173.5, 173.4, 173.3, 172.7, 172.6 (7xCOCH₃), 100.2 (C-1'), 92.7 (d, ²J_{CP} = 5.5 Hz, C-1), 75.5 (C-4), 72.2 (C-3'), 71.4 (C-5'), 70.3 (C-5), 69.8 (C-2'), 68.6 (C-3), 67.9 (C-4'), 62.4 (C-6), 61.8 (C-6'), 51.9 (d, ³J_{CP} = 7.7 Hz, C-2), 46.6 (N(CH₂CH₃)₃), 21.8; 20.5; 20.2; 20.14, 20.13, 19.9 (7xCOCH₃), 8.2 (N(CH₂CH₃)₃).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O) δ [ppm]: -1.86. - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 2984, 1738, 1672, 1544, 1449, 1367, 1217, 1125, 1039, 946, 907.

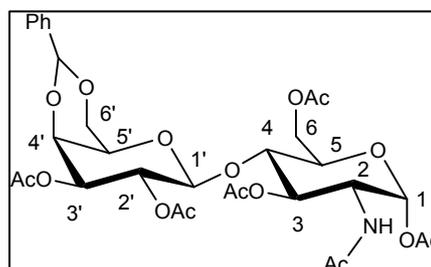
- HRMS (FAB, m/z) C₂₆H₃₈NO₂₀P: ber.: 715.1730, gef.: 714.1646 [M+Et₃NH]⁺. - [α]₅₄₆²⁰: +6.8 ° (c = 1.65, H₂O). - DC: R_f-Wert (iPrOH/AcNH₄ (1M) 2:1 v/v): 0.15.

Synthese von 4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1,3,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **165**

Zu der Lösung von 1.00 g (1.97 mmol) *N*-(1,3-Dimethyl-2,4,6-trioxypyrimidin-5-yliden)methylactosamin **133** in 10 mL abs. DMF wurden bei 0 °C 366 mg (1.58 mmol) Camphersulfonsäure und 740 μ L (4.93 mmol) Benzaldehyddimethylacetal zugegeben. Die Lösung wurde 2 h bei 50 °C erhitzt und die Reaktion anschließend mit 5 mL Triethylamin abgebrochen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 10 mL 25%-iger Ammoniaklösung aufgenommen und für 10 min gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 10 mL Pyridin aufgenommen und mit 2.82 mL (3.04 g, 29.6 mmol) Essigsäureanhydrid unter Zusatz einer Spatelspitze DMAP entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 7 acetyliert und nach 24 h aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Dichlormethan gereinigt.

Ausbeute: 560 mg (822 μ mol, 42%) eines gelben Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.28-7.23 (m, 5H, H_{arom}), 6.22-6.10 (m, 1H, H-1), 5.51-5.40 (m, 2H, NH, CHPh), 5.26-5.20 (m, 2H, H-2', H-3), 4.88 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.4$ Hz, H-3'), 4.48 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$, H-1'), 4.43-4.38 (m, 2H, H-2, H-6a), 4.35-4.31 (m, 1H, H-4'), 4.30-4.26 (m, 1H, H-6'a), 4.11-4.03 (m, 2H, H-6b, H-6'b), 3.88-3.82 (m, 1H, H-4), 3.40-3.34 (m, 1H, H-5), 3.28-3.23 (m, 1H, H-5'), 2.13, 2.08, 2.06, 2.04, 2.02, 2.00 (6xs, 6x3H, 6xCOCH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 171.8, 170.6, 170.31, 170.27, 169.1, 168.9 (6xCOCH₃), 149.8, 135.9, 128.3, 126.4 (C_{arom}), 101.2 (C-1'), 90.5 (C-1), 75.6 (C-4), 73.1 (C-5'), 72.0 (C-4'), 70.7 (C-3), 70.47 (C-5), 68.9 (C-3'), 68.5 (C-6'), 66.4 (C-2'), 61.6 (C-6), 51.0 (C-2), 22.9, 20.9, 20.8, 20.77, 20.72, 20.71 (6xCOCH₃). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 1709, 1642, 1623, 1472, 1363, 1331, 1245, 1206, 1079, 1028, 974. - MS (FAB, m/z) $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{NO}_{16}$: ber.: 681.23, gef.: 622.2 [M-COCH_3]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +22.1 ° ($c = 0.35$, CHCl_3). - DC: R_f Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.72.

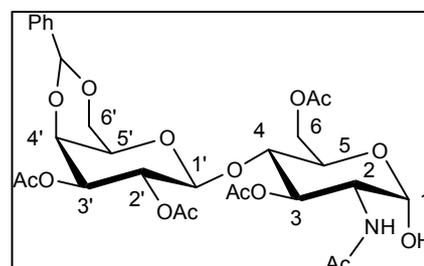


Synthese von 4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **166**

Die Synthese erfolgte entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV 8. Es wurden 500 mg (731 μ mol) 4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1,3,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **165**, 74.0 mg (807 μ mol) Hydraziniumacetat und 1 mL abs. DMF eingesetzt. Die anschließende Säulenchromatographie erfolgte mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (1-4%).

Ausbeute: 280 mg (438 μ mol, 60%) eines amorphen Feststoffes.

- α - 1 H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.42-7.27 (m, 15H, H_{arom}), 5.62-5.58 (m, 2H, NH, H-3), 5.56-5.49 (m, 1H, H-4'), 5.47-5.41 (m, 1H, H-1), 5.22-5.09 (m, 2H, H2', H-3'), 4.44-4.24 (m, 3H, H-1', H-2, H-6'a), 4.14-3.93 (m, 4H, H-5, H-6'b, H-6ab), 3.82-3.74 (m, 1H, H-5'), 3.65-3.56 (m, 1H, H-4), 2.08, 2.05, 2.04, 2.03, 1.99 (5xs, 15H, 5xCOCH₃). - 13 C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 171.3, 171.0, 170.9, 170.7, 170.5 (5xCOCH₃), 128.7, 128.6, 128.4, 128.2, 126.3 (C_{arom}), 101.3, 100.8 (C-1'), 91.6 (C-1), 76.0 (C-4), 73.1 (C-3), 71.5 (C-5'), 71.4 (C-3'), 69.6 (C-2'), 69.5 (C-5), 68.5 (C-6'), 68.2 (C-4'), 62.4 (C-6), 52.0 (C-2), 29.2, 29.1, 28.9, 28.3, 28.2 (COCH₃). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 1738, 1682, 1654, 1536, 1495, 1369, 1291, 1225, 1046, 914. - MS (FAB, m/z) C₂₉H₃₇NO₁₅: ber.: 639.22, gef.: 640.5 [M+H]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +54.5 ° (c = 0.85, CHCl₃). - DC: R_F-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.28.



Synthese von 4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranosyl-1-dibenzylphosphat **167**

Die Synthese erfolgte nach AAV 10.1. Es wurden 200 mg (313 μ mol) 4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **166**, 110 mg (939 μ mol) DCI und 196 μ L (270 mg, 782 μ mol) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit in 10 mL abs. DCM umgesetzt. Nach 30 min wurden 162 mg (939 μ mol) *m*CPBA zur Oxidation verwendet. Nach

säulenchromatographischer Reinigung mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (1:1 v/v) konnte nur das α -Anomer isoliert werden.

Ausbeute: 240 mg (267 μ mol, 85%) eines gelben Öls.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.41-7.31

(m, 15H, H_{arom}), 5.68-5.59 (m, 2H, H-1, NH),

5.41 (s, 1H, CHPh), 5.27 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.9$ Hz,

$^3J_{\text{HH}} = 9.2$ Hz, H-2'), 5.16 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz,

H-3), 5.14-5.00 (m, 4H, 2x CH_2), 4.88 (dd, 1H,

$^3J_{\text{HH}} = 3.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.3$ Hz, H-3'), 4.46 (d, 1H,

$^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, H-1'), 4.36-4.24 (m, 4H, H-2, H-4', H-6a, H-6'a), 4.35-4.09 (m, 1H, H-

6'b), 4.07-3.98 (m, 2H, H-5', H-6b), 3.96-3.92 (m, 1H, H-5), 3.88-3.73 (m, 1H, H-4),

2.044, 2.042, 2.03, 2.01 (4xs, 15H, 5x COCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 171.3, 170.7, 170.3, 170.2, 168.9 (5x COCH_3), 137.4, 135.3, 129.2, 128.9, 128.8,

128.5, 128.1, 127.1, 126.4 (C_{arom}), 101.2 (CHPh), 101.1 (C-1'), 96.1 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz,

C-1), 75.1 (C-4), 73.1 (C-4'), 72.1 (C-3'), 70.6 (C-5), 69.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.6$ Hz, CH_2), 69.8

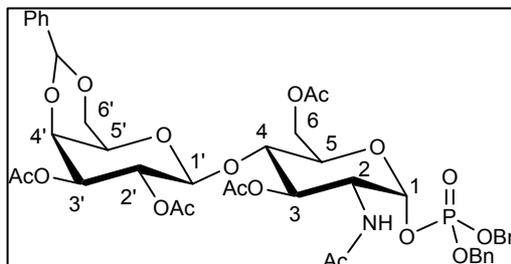
(C-3), 69.76 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.6$ Hz, CH_2), 68.9 (C-2'), 68.5 (C-6'), 61.3 (C-6), 51.9 (d,

$^3J_{\text{CP}} = 7.7$ Hz, C-2), 22.8, 20.8, 20.7, 20.6 (5x COCH_3).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: -2.21. - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 2925, 2853, 1748, 1683, 1558, 1456,

1370, 1224, 1052, 954. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +47.5 $^\circ$ (c = 0.55, CHCl_3). - DC: R_f -Wert (DCM/MeOH

9:1 v/v): 0.68.



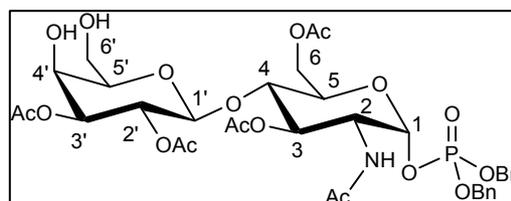
Versuch zur Darstellung von 2,3-Di-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranosyl-1-dibenzylphosphat **163**

In einem Rundkolben wurden 140 mg

(156 μ mol) 4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-acetyl- β -

D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-

O-acetyl-2-desoxy-D-gluco-pyranosyl-1-



dibenzylphosphat **167** mit 5 ml 60%-iger Essigsäure gelöst und unter Rühren 2 h auf

90 $^\circ\text{C}$ erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch in 30 mL Ethylacetat

aufgenommen und mehrmals mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen, dabei

wanderte das vermeintliche Produkt in die wässrige Phase. Wässrige Fraktionen

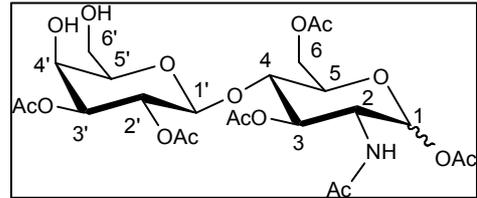
wurden gefriergetrocknet, in Ethylacetat aufgenommen und NaHCO_3 abfiltriert. Das

Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und von dem Rückstand ^1H - sowie ^{31}P -NMR angefertigt. Es konnten keine Produktsignale gefunden werden.

Versuch zur Darstellung von 2,3-Di-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-1,3,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose 168

Versuch 1 und 2.

In einem Rundkolben wurden 100 mg (147 μmol) 4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **165** mit 5 ml



60%-iger Essigsäure gelöst und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Da mittels Dünnschichtchromatographie (EE/MeOH, 4:1, v/v) keine Umsetzung beobachtet wurde, wurde der Reaktionsansatz 2 h auf 90 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde Essigsäure unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 30 mL Ethylacetat aufgenommen und mehrmals mit Wasser extrahiert. Wässrige Fraktionen wurden gefriergetrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch mit einem Ethylacetat/Methanol-Gemisch (4:1, v/v) gereinigt. Es konnte allerdings kein gewünschtes Produkt isoliert werden.

Versuch 3.

In einem Rundkolben wurden 100 mg (147 μmol) 4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **165** mit 5 ml 80%-iger Essigsäure gelöst und 30 Minuten auf 60 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde Essigsäure im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 30 mL Ethylacetat aufgenommen und mehrmals mit Wasser extrahiert. Wässrige Fraktionen wurden gefriergetrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch mit einem Ethylacetat/Methanol-Gemisch (4:1, v/v) gereinigt. Es konnte allerdings kein gewünschtes Produkt isoliert werden.

Versuch 4.

In einem Reagenzglas wurden 100 mg (147 μmol) 4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **165** in 3 ml eines Wasser/Acetonitril-Gemisches (30:70, v/v) gelöst und mit

drei Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 30 sek zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden weitere 15 mL Wasser zugegeben und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden gefriergetrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch mit einem Ethylacetat/Methanol-Gemisch (4:1, v/v) gereinigt. Es konnte allerdings kein gewünschtes Produkt isoliert werden.

Versuch 5.

In einem Reagenzglas wurden 277 mg (333 μ mol) 4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **165** in 10 mL Ethanol für Hydrierungen (99.8%) gelöst und 33 mg Pd/C (5% mit 55% Wasser) wurden zugesetzt. Die Suspension wurde 5 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 24 h in einer Wasserstoffatmosphäre hydriert. Es konnte allerdings mittels Dünnschichtchromatographie (EE/MeOH, 4:1, v/v) keine Umsetzung beobachtet werden.

Versuch 6.

In einem Reagenzglas wurden 277 mg (333 μ mol) 4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranose **165** in abs. THF gelöst und 33 mg Pd/C (5% mit 55% Wasser) wurden zugesetzt. Die Suspension wurde 5 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 24 h in einer Wasserstoffatmosphäre hydriert. Es konnte allerdings mittels Dünnschichtchromatographie (EE/MeOH, 4:1, v/v) keine Umsetzung beobachtet werden.

7.2.3 Synthese der Nucleosiddiphosphatglycoside

AAV 12 Synthese der NDP-Glycoside

12.1 1 Äquivalent chromatographiertes 5''-Methylsulfonyl-cycloSal-Nucleosidmonophosphat und 2 Äquivalenten Glycosyl-1-phosphat wurden für zwei Tage in Ölpumpenvakuum und anschließend zwei Stunden in abs. DMF über Molekularsieb vorgetrocknet. Unter Schutzgasatmosphäre wurde das Triester zum Zuckerphosphat über zwei Stunden getropft und das Reaktionsgemisch für 48-72 h

bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mit einem Triethylamin/Wasser/Methanol-Gemisch (1:3:7, v/v/v) 24 h bei Raumtemperatur behandelt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde Zuckerphosphat säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent abgetrennt. Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, wurden gefriergetrocknet und erneut in Wasser aufgenommen. Mit Triethylamin wurde ein pH-Wert von 8 eingestellt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 7 U (pro 0.1 mmol eingesetzter Phosphateinheit) alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand erneut säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

12.2 Unter Stickstoffatmosphäre wurde 1 Äquivalent 5'-Nitro-cycloSal-Nucleosidmonophosphat in abs. DMF gelöst und mit 1.2 Äq. Triethylammoniumsalz des Glycosyl-1-phosphates versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 50°C gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v) und nach vollständiger Umsetzung des Triesters das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser extrahiert. Der nach Entfernen von Wasser gebildete Rückstand wurde in einem Triethylamin/Wasser/Methanol-Gemisch (1:3:7, v/v/v) aufgenommen und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt. Die Detektion der Produktfraktionen erfolgte dünnschichtchromatographisch mit einem Gemisch aus iso-Propanol und 1 molarem Ammoniumacetat (2:1, v/v).

12.3 Es wurden zwei Tage in Ölpumpenvakuum und anschließend zwei Stunden in abs. DMF über Molekularsieb 1 Äquivalent cycloSal-Nucleosidmonophosphat und 2-3 Äquivalenten Glycosyl-1-phosphat vorgetrocknet. Anschließend wurde unter Stickstoffatmosphäre das Triester zum Zuckerphosphat über zwei Stunden getropft und das Reaktionsgemisch für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser extrahiert. Der nach Entfernen von Wasser gebildete Rückstand wurde in einem Triethylamin/Wasser/Methanol-Gemisch (1:3:7, v/v/v) aufgenommen und 24 h bei

Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

12.4 Es wurden zwei Tage in Ölpumpenvakuum und anschließend zwei Stunden in abs. DMF über Molekularsieb 1 Äquivalent *cycloSal*-Nucleosidmonophosphat und 2 Äquivalenten Glycosyl-1-phosphat getrocknet. Anschließend wurde unter Stickstoffatmosphäre das Triester zum Zuckerphosphat über zwei Stunden getropft und das Reaktionsgemisch für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser extrahiert. Der nach Entfernen von Wasser gebildete Rückstand wurde in einem Triethylamin/Wasser/Methanol-Gemisch (1:3:7, v/v/v) aufgenommen und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Triethylamin ein pH-Wert von 8 eingestellt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 7 bzw. 25 U (pro 0.1 mmol eingesetzter Phosphateinheit) alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde Reaktionsansatz eingeeengt und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Synthese der Uridin-5'-diphospho- α -D-glucose 1a

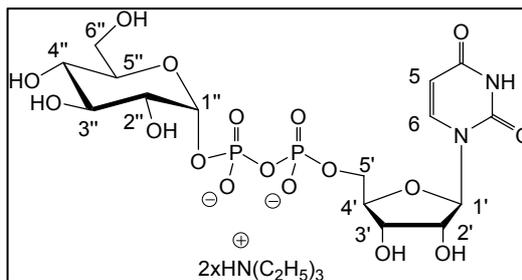
Versuch 1.

Nach AVV 12.1 wurden 50.0 mg (87.0 μ mol) 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal*-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **120** und 92.0 mg (174 μ mol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -glucosyl-1-phosphat **147a** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 6 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 52.8 mg (68.7 μ mol, 80%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 7.94 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz; H-5), 5.99-5.94 (m, 2H, H-6, H-1'), 5.58 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.3$ Hz, H-1''), 4.39-4.33 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.29-4.25 (m, 1H, H-4'), 4.23-4.15 (m, 2H, H-5'ab), 3.90-3.87 (m, 1H, H-4''),

3.86-3.81 (m, 1H, H-6''a), 3.78-3.73 (m, 2H, H-3'', H-6''b), 3.50 (dt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 9.8$ Hz, H-2''), 3.44 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.6$ Hz, H-5''), 3.19 (q, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1.26 (t, 18H, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{-13}\text{C-NMR}$ (101 MHz,



D_2O) δ [ppm]: 141.6 (C-5), 102.7 (C-6), 95.6 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.5$ Hz, C-1''), 88.3 (C-1'), 83.3 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.1$ Hz, C-4'), 73.8 (C-3'), 72.9 (C-3''), 72.78 (C-4''), 71.6 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.3$ Hz, C-2''), 69.6 (C-2'), 69.2 (C-5''), 64.9 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.4$ Hz, C-5'), 60.3 (C-6''), 46.7 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 8.2 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{-31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ [ppm]: -11.29 (d, $^2J_{\text{PP}} = 21.3$ Hz, P_α), -12.93 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.2$ Hz, P_β). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 3006, 2363, 1933, 1697, 1421, 1072, 934. - HRMS (FAB, m/z) $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{P}_2$: ber.: 566.0561, gef.: 565.0476 [M-H]. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +42° (c = 0.3, H_2O). - DC: R_f -Wert ($i\text{PrOH}/1\text{M NH}_4\text{OAc}$ 2:1v/v): 0.35.

Versuch 2.

Nach AAV 12.3 wurden 50.0 mg (92.0 μmol) 5''-Nitro-cycloSal-2,3-di-O-acetyluridinmonophosphat **117** und 65.7 mg (0.184 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -glucosyl-1-phosphat **147a** getrocknet und unter Stickstoffatmosphäre für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Reaktionsgemisch nach AAV 13.3 aufgearbeitet und die Acetylschutzgruppen abgespalten. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch eingengt und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 28.6 mg (43.7 μmol , 47%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

Versuch 3.

Nach AVV 12.4 wurden 100 mg (185 μmol) 5''-Nitro-cycloSal-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **117** und 135 mg (379 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -glucosyl-1-phosphat **147a** umgesetzt. Danach wurden Acetylschutzgruppen abgespalten und das Reaktionsgemisch mit 141 U alkalischer Phosphatase versetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 18.5 mg (23.6 μmol , 13%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

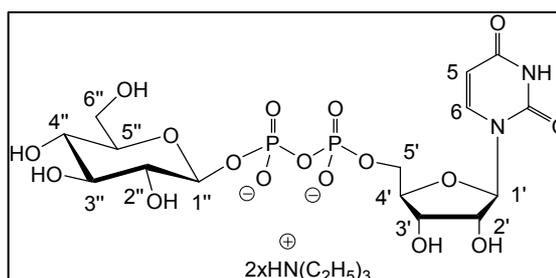
Synthese der Uridin-5'-diphospho- β -D-glucose **1b**

Versuch 1.

Nach AVV 12.1 wurden 100 mg (174 μmol) 5''-Methylsulfonyl-*cyclo*Sal-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **120** und 184 mg (348 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -glucosyl-1-phosphat **147b** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 24 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 118 mg (151 μmol , 87%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 7.95 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz; H-5), 6.02-5.96 (m, 2H, H-6, H-1'), 5.01 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, H-1''), 4.41-4.35 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.31-4.26 (m, 1H, H-4'), 4.25-4.16 (m, 2H, H-5'ab), 3.90 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 12.4$ Hz, H-



6''a), 3.70 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 12.4$ Hz, H-6''b), 3.57-3.49 (m, 2H, H-3'', H-5''), 3.43-3.34 (m, 2H, H-2'', H-4''), 3.20 (q, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1.28 (t, 18H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O) δ [ppm]: 141.7 (C-5), 102.8 (C-6), 98.0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.9$ Hz, C-1''), 88.3 (C-1'), 83.4 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.5$ Hz, C-4'), 76.6 (C-5''), 75.3 (C-4''), 73.8 (C-3'), 73.7 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.3$ Hz, C-2''), 69.8 (C-3''), 69.6 (C-2'), 65.1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.8$ Hz, C-5'), 60.9 (C-6''), 46.8 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 8.3 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ [ppm]: -11.37 (d, $^2J_{\text{PP}} = 21.8$ Hz, P_α), -13.08 (d, $^2J_{\text{PP}} = 21.8$ Hz, P_β). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 2361, 2190, 1906, 1680, 1229, 1070, 944. - HRMS (FAB, m/z) $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{P}_2$: ber.: 566.0561, gef.: 565.0479 [M-H] $^-$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: -34 $^\circ$ (c = 0.3, H_2O). - DC: R_f -Wert ($i\text{PrOH}/1\text{M NH}_4\text{OAc}$ 2:1v/v): 0.41.

Versuch 2.

Nach AAV 12.3 wurden 50.0 mg (92.0 μmol) 5'-Nitro-*cycloSal*-2,3-di-O-acetyluridinmonophosphat **117** und 97.0 mg (184 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -glucosyl-1-phosphat **147b** getrocknet und unter Stickstoffatmosphäre für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung und Abspaltung der Acetylschutzgruppen wurde das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 33.6 mg (43.6 μmol , 48%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

Versuch 3.

Nach AAV 12.3 wurden 50.0 mg (92.0 μmol) 5'-Nitro-*cycloSal*-2,3-di-O-acetyluridinmonophosphat **117** und 146 mg (276 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -glucosyl-1-phosphat **147b** vorgetrocknet und unter Stickstoffatmosphäre für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung und Abspaltung der Acetylschutzgruppen wurde das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 28.0 mg (36.8 μmol , 40%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

Versuch 4.

Nach AAV 12.3 wurden 200 mg (348 μmol) nicht chromatographiertes 5'-Methylsulfonyl-*cycloSal*-2,3-di-O-acetyluridinmonophosphates **120** und 368 mg (696 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -glucosyl-1-phosphat **147b** getrocknet unter Stickstoffatmosphäre für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung und Abspaltung der Acetylschutzgruppen wurde das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 92.8 mg (0.118 mmol, 34%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

Versuch 5.

Nach AAV 12.3 wurden 50.0 mg (87.0 μmol) chromatographiertes 5'-Methylsulfonyl-*cycloSal*-2,3-di-O-acetyluridinmonophosphat **120** und 92.0 mg (174 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -glucosyl-1-phosphat **147b** getrocknet unter Stickstoffatmosphäre für

48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung und Abspaltung der Acetylschutzgruppen wurde das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 41.0 mg (52.0 μmol , 60%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

Versuch 6.

Nach AVV 12.4 wurden 143 mg (264 μmol) 5''-Nitro-*cycloSal*-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **117** und 280 mg (528 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -glucosyl-1-phosphat **147b** umgesetzt. Danach wurden Acetylschutzgruppen abgespalten und das Reaktionsgemisch mit 55 U alkalischer Phosphatase versetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

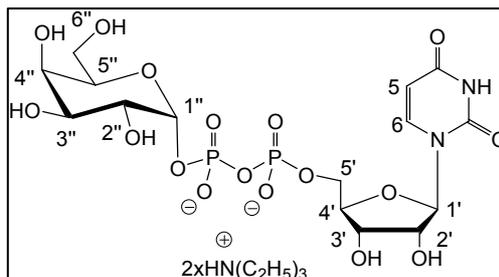
Ausbeute: 143 mg (182 μmol , 69%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

Synthese der Uridin-5'-diphospho- α -D-galactose **57a**

Nach AVV 12.1 wurden 30.0 mg (52.0 μmol) 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal*-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **120** und 92 mg (174 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -galactosyl-1-phosphat **148b** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 4 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 28.4 mg (36.9 μmol , 71%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 7.97 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz; H-5), 6.01-5.96 (m, 2H, H-6, H-1'), 5.64 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.6$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.2$ Hz, H-1''), 4.39-4.36 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.31-4.27 (m, 1H, H-4'), 4.26-4.21 (m, 2H, H-5'ab), 4.20-4.05 (m, 1H, H-5''), 4.03 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.7$ Hz; H-4''), 3.92 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 10.26$ Hz, H-3''), 3.81 (dt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.2$ Hz,



$^3J_{\text{HH}} = 10.6 \text{ Hz}$, H-2''), 3.77-3.70 (m, 2H, H-6''ab), 3.21 (q, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3 \text{ Hz}$, N(CH₂CH₃)₃), 1.29 (t, 18H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3 \text{ Hz}$, N(CH₂CH₃)₃). -¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) δ [ppm]: 141.7 (C-5), 102.8 (C-6), 95.9 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.8 \text{ Hz}$, C-1''), 88.4 (C-1'), 83.4 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2 \text{ Hz}$, C-4'), 73.8 (C-3'), 71.9 (C-5''), 69.8 (C-2'), 69.4 (C-3''), 69.2 (C-4''), 68.5 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.3 \text{ Hz}$, C-2''), 65.0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.4 \text{ Hz}$, C-5'), 61.1 (C-6''), 46.8 (N(CH₂CH₃)₃), 8.3 (N(CH₂CH₃)₃). -³¹P-NMR (162 MHz, D₂O) δ [ppm]: -11.22 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.3 \text{ Hz}$, P _{α}), -12.75 (d, $^2J_{\text{PP}} = 19.6 \text{ Hz}$, P _{β}). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 3243, 2983, 2498, 1679, 1460, 1390, 1226, 1069, 917. - HRMS (FAB, m/z) C₁₅H₂₄N₂O₁₇P₂: ber.: 566.0561, gef.: 668.1835 [M+Et₃NH]⁺. - $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +45° (c = 0.18, H₂O). - DC: R_f-Wert (iPrOH/1M NH₄OAc 2:1v/v): 0.29.

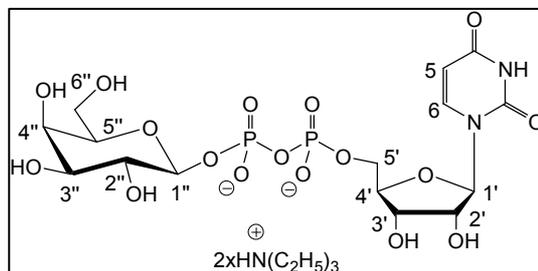
Synthese der Uridin-5'-diphospho- β -D-galactose 57b

Versuch 1.

Nach AVV 12.1 wurden 50.0 mg (87.0 μmol) 5''-Methylsulfonyl-cycloSal-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **120** und 92 mg (174 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -galactosyl-1-phosphat **148b** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 4 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 55.0 mg (71.6 μmol , 82%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

-¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]: 7.93 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1 \text{ Hz}$; H-5), 6.00-5.92 (m, 2H, H-6, H-1'), 4.92 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8 \text{ Hz}$, H-1''), 4.38-4.34 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.28-4.23 (m, 1H, H-4'), 4.22-4.14 (m, 2H, H-5''ab), 3.88 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.3 \text{ Hz}$, H-4''), 3.79 (dd, 1H,



$^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, $^2J_{\text{HH}} = 10.8 \text{ Hz}$, H-6''a), 3.73-3.65 (m, 2H, H-5'', H-6''b), 3.65 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.2 \text{ Hz}$, H-3''), 3.58 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 10.0 \text{ Hz}$, H-2''), 3.18 (q, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3 \text{ Hz}$, N(CH₂CH₃)₃), 1.25 (t, 18H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3 \text{ Hz}$, N(CH₂CH₃)₃). -¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) δ [ppm]: 141.6 (C-5), 102.7 (C-6), 98.5 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.2 \text{ Hz}$, C-1''), 88.2 (C-1'), 83.4 (d, $^3J_{\text{CP}} = 10.1 \text{ Hz}$, C-4'), 75.8 (C-5''), 73.7 (C-3'), 72.3 (C-3''), 71.2 (d,

$^3J_{CP} = 8.6$ Hz, C-2''), 69.8 (C-2'), 68.6 (C-4''), 65.0 (d, $^2J_{CP} = 5.1$ Hz, C-5'), 61.2 (C-6''), 46.7 (N(CH₂CH₃)₃), 8.2 (N(CH₂CH₃)₃). - $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D₂O) δ [ppm]: -11.36 (d, $^2J_{PP} = 20.7$ Hz, P _{α}), -12.98 (d, $^2J_{PP} = 20.8$ Hz, P _{β}). - IR ν [cm⁻¹]: 3235, 2691, 2499, 1680, 1460, 1388, 1227, 1035, 939. - HRMS (FAB, m/z) C₁₅H₂₄N₂O₁₇P₂: ber.: 566.0561, gef.: 668.1833 [M+Et₃NH]⁺. - $[\alpha]_{546}^{20}$: 35.3 ° (c = 0.17, H₂O). - DC: R_f-Wert (iPrOH/1M NH₄OAc 2:1v/v): 0.41.

Versuch 2.

Nach AAV 12.2 wurden 90.0 mg (166 μmol) 5''-Nitro-cycloSal-2,3-di-O-acetyluridinmonophosphat **117** und 106 mg (199 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -galactosyl-1-phosphat **148b** bei 50 °C umgesetzt. Eine vollständige Umsetzung des Triesters wurde nach 3 Stunden beobachtet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand aufgearbeitet und die Acetylschutzgruppen mit einem Triethylamin/Wasser/Methanol-Gemisch (1:3:7, v/v/v) abgespalten. Danach wurde das Reaktionsgemisch eingeeengt und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 37.0 mg (48.1 μmol , 29%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

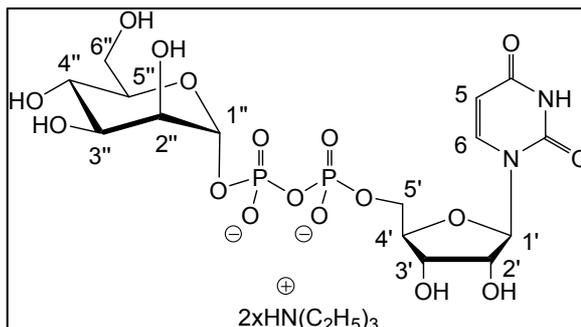
Synthese der Uridin-5'-diphospho- α -D-mannose **52**

Nach AVV 12.1 wurden 60.0 mg (104 μmol) 5''-Methylsulfonyl-cycloSal-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **120** und 110 mg (208 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -mannosyl-1-phosphat **149** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 8 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 58.0 mg (75.5 μmol , 72%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D₂O) δ [ppm]: 7.95 (d, 1H, $^3J_{HH} = 8.1$ Hz; H-5), 6.00-5.92 (m, 2H, H-6, H-1'), 5.48 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 1.8$ Hz, $^3J_{HP} = 7.9$ Hz, H-1''), 4.37-4.31 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.28-4.23 (m, 1H, H-4'), 4.21-4.13 (m, 2H, H-5'ab), 4.02 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 2.2$ Hz, $^3J_{HH} = 3.1$ Hz, H-2''), 3.89 (dd, 1H, $^3J_{HH} = 3.4$ Hz, $^3J_{HH} = 9.8$ Hz, H-4''), 3.86-3.80 (m,

2H, H-3'', 6''a), 3.77-3.71 (m, 1H, H-6''b),
 3.69-3.62 (m, 1H, H-5''), 3.18 (q, 12H,
 $^3J_{\text{HH}} = 7.3 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1.25 (t, 18H,
 $^3J_{\text{HH}} = 7.3 \text{ Hz}$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$).



$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O) δ [ppm]: 141.7 (C-5),
 102.7 (C-6), 96.5 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.9 \text{ Hz}$, C-1''),
 88.4 (C-1'), 83.3 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.1 \text{ Hz}$, C-4'), 73.8 (C-3'), 73.7 (C-3''), 70.3 (d,
 $^3J_{\text{CP}} = 8.9 \text{ Hz}$, C-2''), 69.9 (C-4''), 69.7 (C-2'), 66.5 (C-5''), 64.9 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.4 \text{ Hz}$, C-
 5'), 60.8 (C-6''), 46.7 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 8.2 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz,
 D_2O) δ [ppm]: -11.65 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.9 \text{ Hz}$, P_α), -13.94 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.9 \text{ Hz}$, P_β). - IR (ATR)
 ν [cm^{-1}]: 3253, 2985, 2683, 2494, 1680, 1458, 1385, 1227, 1068, 1003, 931, 804. -
 HRMS (FAB, m/z) $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{P}_2$: ber.: 566.0561, gef.: 565.0480 [M-H] $^-$. - $[\alpha]_{546}^{20}$:
 +16.5 $^\circ$ ($c = 0.2$, H_2O). - DC: R_f -Wert ($i\text{PrOH}/1\text{M NH}_4\text{OAc}$ 2:1v/v): 0.55.

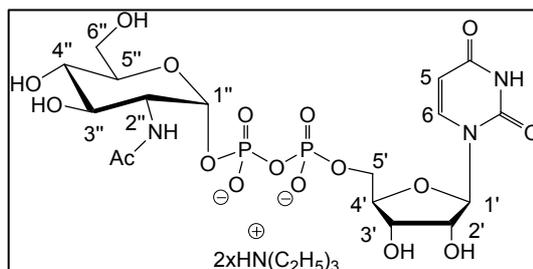
Synthese der Uridin-5'-diphospho-2''-acetamido-2''-desoxy- α -D-glucose 7

Versuch 1.

Nach AVV 12.1 wurden 50.0 mg (87.0 μmol) 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal*-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **120** und 109 mg (174 μmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -glucosyl-1-phosphat **150** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 6 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 50.0 mg (66.1 μmol , 76%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 7.95 (d,
 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1 \text{ Hz}$; H-5), 6.00-5.93 (m, 2H,
 H-6, H-1'), 5.50 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.1 \text{ Hz}$,
 $^3J_{\text{HP}} = 7.1 \text{ Hz}$, H-1''), 4.39-4.33 (m, 2H, H-2',
 H-3'), 4.30-4.24 (m, 1H, H-4'), 4.23-4.15 (m,
 2H, H-5'ab), 3.98 (dt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 10.5 \text{ Hz}$, H-2''), 3.92 (ddd, 1H,
 $^4J_{\text{HH}} = 2.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 4.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 10.1 \text{ Hz}$, H-4''), 3.86 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.1 \text{ Hz}$,
 $^2J_{\text{HH}} = 12.4 \text{ Hz}$, H-6''a), 3.83-3.77 (m, 2H, H-3'', H-6''b), 3.54 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.6 \text{ Hz}$, H-



5''), 3.20 (q, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 2.07 (s, 3H, COCH_3), 1.27 (t, 18H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). ^{13}C -NMR (101 MHz, D_2O) δ [ppm]: 174.8 (COCH_3), 166.2 (C-2), 151.8 (C-4), 141.7 (C-5), 102.7 (C-6), 94.6 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.0$ Hz, C-1''), 88.5 (C-1'), 83.3 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.1$ Hz, C-4'), 73.8 (C-2'), 73.1 (C-4''), 71.0 (C-3''), 69.7 (C-3'), 69.6 (C-5''), 65.0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, C-5'), 60.4 (C-6''), 53.7 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.3$ Hz, C-2''), 46.7 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 22.1 (COCH_3), 8.3 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). ^{31}P -NMR (162 MHz, D_2O) δ [ppm]: -11.46 (d, $^2J_{\text{PP}} = 22.0$ Hz, P_α), -13.16 (d, $^2J_{\text{PP}} = 21.8$ Hz, P_β). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 2986, 2362, 1653, 1433, 1110, 613. - HRMS (FAB, m/z) $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{17}\text{P}_2$: ber.: 607.0827, gef.: 606.0728 $[\text{M}-\text{H}]^-$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +47° ($c = 0.3$, H_2O). - DC: R_f -Wert ($i\text{PrOH}/1\text{M NH}_4\text{OAc}$ 2:1v/v): 0.51.

Versuch 2.

Nach AAV 12.2 wurden 100 mg (369 μmol) 5'-Nitro-*cycloSal*-2,3-di-O-acetyluridinmonophosphat **117** und 234 mg (443 μmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucosyl-1-phosphat **150** bei 50 °C umgesetzt. Eine vollständige Umsetzung des Triesters wurde nach 3 h beobachtet. Nach Aufarbeitung und Abspaltung der Acetylschutzgruppen wurde das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt. Es konnte kein gewünschtes Produkt isoliert werden.

Versuch 3.

Nach AAV 12.3 wurden 50.0 mg (92.0 μmol) 5'-Nitro-*cycloSal*-2,3-di-O-acetyluridinmonophosphat **117** und 116 mg (184 μmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -glucosyl-1-phosphat **150** vorgetrocknet und unter Stickstoffatmosphäre für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung und Abspaltung der Acetylschutzgruppen wurde das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 23.3 mg (35.8 μmol , 39%) eines farblosen kristallinen Feststoffes

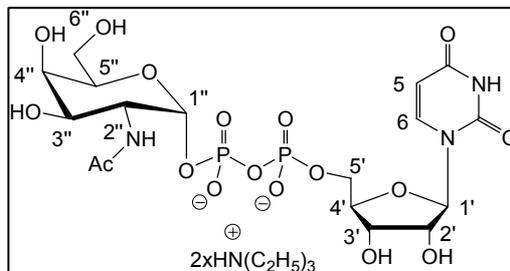
Synthese der Uridin-5'-diphospho-2''-acetamido-2''-desoxy- α -D-galactose 177

Versuch 1.

Nach AVV 12.1 wurden 30.0 mg (52.0 μ mol) 5''-Methylsulfonyl-*cyclo*Sal-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **120** und 66 mg (104 μ mol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -galactosyl-1-phosphat **151** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 4 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 28.5 mg (43.5 μ mol, 84%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 7.96 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz; H-5), 5.99-5.96 (m, 2H, H-6, H-1'), 5.54 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.2$ Hz, H-1''), 4.39-4.36 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.30-4.26 (m, 2H, H-4', H-5'a), 4.25-4.23 (m, 1H, H-5'b), 4.22-4.18 (m, 2H, H-5'', H-2''), 4.02 (m, 1H, H-4''), 3.97 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.8$ Hz, H-3''), 3.79-3.73 (m, 2H, H-6''ab), 3.20 (q, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 2.09 (s, 3H, COCH_3), 1.28 (t, 18H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O) δ [ppm]: 175.0 (COCH_3), 141.7 (C-5), 102.7 (C-6), 94.7 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.6$ Hz, C-1''), 88.5 (C-1'), 83.3 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.8$ Hz, C-4'), 73.8 (C-3'), 72.1 (C-5''), 69.7 (C-2'), 68.4 (C-4''), 67.7 (C-3''), 65.0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.9$ Hz, C-5'), 61.1 (C-6''), 49.8 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, C-2''), 46.6 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 22.2 (COCH_3), 8.3 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ [ppm]: -11.25 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.7$ Hz, P_α), -12.97 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.7$ Hz, P_β). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 3414, 2934, 2491, 1684, 1639, 1575, 1533, 1472, 1399, 1251, 1090, 931. - HRMS (FAB, m/z) $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{17}\text{P}_2$: ber.: 607.0827, gef.: 606.0745 [M-H] 20 . - $[\alpha]_{546}^{20}$: +23 $^\circ$ ($c = 0.14$, H_2O). - DC: R_f -Wert ($i\text{PrOH}/1\text{M NH}_4\text{OAc}$ 2:1v/v): 0.3.



Versuch 2.

Nach AAV 12.2 wurden 258 mg (0.477 mmol) 5''-Nitro-*cyclo*Sal-2,3-di-O-acetyluridinmonophosphat **117** und 360 mg (0.572 mmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactosyl-1-phosphat **151** bei 50 $^\circ\text{C}$ umgesetzt. Eine

vollständige Umsetzung des Triesters wurde nach 3 h beobachtet. Nach Aufarbeitung und Abspaltung der Acetylschutzgruppen wurde das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 95 mg (0.117 mmol, 25%) eines farblosen kristallinen Feststoffes und 109 mg (0.135 mmol, 28%) des Produktes verunreinigt mit UMP.

Versuch 3.

Es wurden zwei Tage in Ölpumpenvakuum und anschließend zwei Stunden in abs. DMF über Molekularsieb 400 mg (739 μ mol) 5''-Nitro-*cycloSal*-2,3-di-O-acetyluridinmonophosphat **117** und 558 mg (887 μ mol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactosyl-1-phosphat **151** vorgetrocknet. Anschließend wurde Zuckerphosphat zum Triester über eine Stunde getropft und das Reaktionsgemisch für 40 Stunden bei 50°C gerührt. Nach Aufarbeitung und Abspaltung der Acetylschutzgruppen wurde das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 201 mg (248 μ mol, 34%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

Versuch 4.

Nach AAV 12.3 wurden 37.0 mg (69.0 μ mol) 5''-Nitro-*cycloSal*-2,3-di-O-acetyluridinmonophosphat **117** und 77.0 mg (139 μ mol) 2-Acetamido-2-desoxy- α -D-galactosyl-1-phosphat **179** umgesetzt. Nach Aufarbeitung und Abspaltung der Acetylschutzgruppen wurde das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 22.5 mg (27.8 μ mol, 40%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

Versuch 5.

Nach AAV 12.3 wurden 50.0 mg (92.0 μ mol) 5''-Nitro-*cycloSal*-2,3-di-O-acetyluridinmonophosphat **117** und 116 mg (184 mmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -galactosyl-1-phosphat **151** vorgetrocknet und unter Stickstoffatmosphäre für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung und

Abspaltung der Acetylschutzgruppen wurde das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 36.7 mg (56.5 μmol , 61%) eines farblosen kristallinen Feststoffes

Synthese der Uridin-5'-diphospho-2''-acetamido-2''-desoxy- α -D-lactose **8**

Nach AVV 12.1 wurden 10.0 mg (17.4 μmol) 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal*-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **120** und 30.0 mg (32.9 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-O-acetyl-2-desoxy-D-glucopyranosyl-1-phosphat **67a** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 4 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 13.7 mg (15.7 μmol , 90%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

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

D_2O) δ [ppm]: 8.03 (d, 1H,

$^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz; H-5), 6.03-5.96

(m, 2H, H-6, H-1'), 5.54 (dd, 1H,

$^3J_{\text{HH}} = 3.0$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 6.8$ Hz, H-

1''), 4.49 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz;

H-1^{gal}), 4.40-4.37 (m, 2H, H-2', H-3'),

4.36-4.27 (m, 2H, H-4', H-5'a), 4.25-4.18 (m,

1H, H-5'b), 4.09-4.01 (m, 2H, H-2'', H-5^{gal}),

3.95-3.91 (m, 3H, H-4^{gal}, H-6^{gal}ab), 3.87-

3.74 (m, 5H, H-3'', H-4'', H-5'', H-6''),

3.70 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 9.9$ Hz, H-

3^{gal}), 3.65-4.58 (m, 1H, H-2^{gal}), 3.23 (q, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, N(CH₂CH₃),

2.10 (s, 3H, COCH₃), 1.31 (t, 9H, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, N(CH₂CH₃)₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O) δ [ppm]:

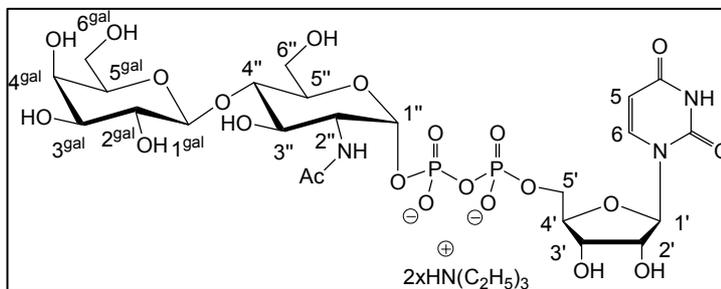
103.1 (C-1^{gal}), 102.5 (C-6), 94.3 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.4$ Hz, C-1''), 88.8 (C-1'), 83.0 (d,

$^3J_{\text{CP}} = 9.8$ Hz, C-4'), 78.3 (C-4''), 75.3 (C-5''), 74.0 (C-2'), 72.5 (C-3^{gal}), 71.7 (C-5^{gal}),

70.9 (C-2^{gal}), 69.7 (C-3''), 69.1 (C-3'), 68.6 (C-4^{gal}), 64.2 (C-5'), 60.9 (C-6''), 59.6 (C-

6^{gal}), 53.1 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.9$ Hz, C-2''), 46.7 (N(CH₂CH₃)₃), 24.7 (COCH₃), 8.2

(N(CH₂CH₃)₃).



$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ [ppm]: -11.44 (d, $^2J_{\text{PP}} = 21.6$ Hz, P _{α}), -13.19 (d, $^2J_{\text{PP}} = 22.7$ Hz, P _{β}). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 3224, 1668, 1556, 1456, 1380,

1222, 1054, 921, 810. - HRMS (FAB, m/z) $C_{23}H_{35}N_3O_{22}P_2$: ber.: 769.1355, gef.: 768.1257 [M-H]⁻. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +53 ° (c = 0.4, H₂O). - DC: R_F-Wert (iPrOH/1M NH₄OAc 2:1v/v): 0.38

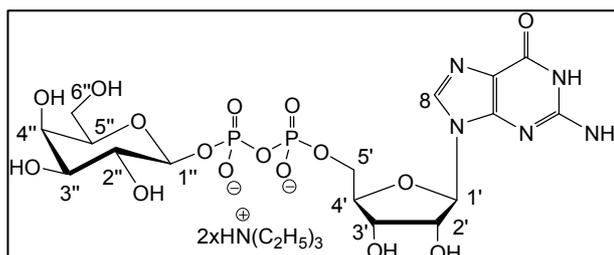
Synthese der Guanosin-5'-diphospho-β-D-galactose 186b

Nach AVV 12.1 wurden 50.0 mg (76.3 μmol) 5''-Methylsulfonyl-cycloSal-N²-acetyl-2',3'-di-O-acetylguanosinmonophosphat **120** und 81.0 mg (153 μmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galactosyl-1-phosphat **148b** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 6 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 41.0 mg (50.8 μmol, 67%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]: 8.14

(s, 1H, H-8), 5.95 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.1 Hz, H-1'), 4.98 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-1''), 4.81-4.74 (m, 1H, H-2'), 4.59-4.51 (m, 1H, H-3'), 4.41-4.34 (m, 1H, H-4'), 4.28-



4.19 (m, 2H, H-5'ab), 3.96-3.88 (m, 1H, H-4''), 3.86-3.79 (m, 1H, H-5''), 3.78-3.68 (m, 3H, H-3'', H-6''ab), 3.67-3.50 (m, 1H, H-2''), 3.20 (q, 12H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, N(CH₂CH₃)₃), 1.29 (t, 18H, ³J_{HH} = 6.6 Hz, N(CH₂CH₃)₃). -¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) δ [ppm]: 158.9 (C-6), 153.9 (C-4), 145.1 (C-8), 118.5 (C-5), 98.5 (d, ²J_{CP} = 6.0 Hz, C-1''), 86.8 (C-1'), 83.9 (d, ³J_{CP} = 9.2 Hz, C-4'), 73.9 (C-2'), 73.6 (C-3''), 72.3 (C-3'), 71.3 (d, ³J_{CP} = 8.6 Hz, C-2''), 70.5 (C-4''), 68.6 (C-5''), 65.4 (C-5'), 61.2 (C-6''), 46.7 (N(CH₂CH₃)₃), 8.2 (N(CH₂CH₃)₃). -³¹P-NMR (162 MHz, D₂O) δ [ppm]: -

11.27 (d, ²J_{PP} = 20.4 Hz, P_α), -12.96 (d, ²J_{PP} = 20.4 Hz, P_β). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 3139, 1721, 1691, 1637, 1599, 1476, 1397, 1227, 1032, 938. - HRMS (ESI, m/z) $C_{16}H_{25}N_5O_{16}P_2$: ber.: 605.0782, gef.: 604.0685 [M-H]⁻. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +14.8 ° (c = 0.1, H₂O).

- DC: R_F-Wert (iPrOH/1M NH₄OAc 2:1v/v): 0.40.

Synthese der Guanosin-5'-diphospho- α -D-mannose **187**

Nach AVV 12.1 wurden 50.0 mg (76.3 μ mol) 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal*-N²-acetyl-2',3'-di-O-acetylguanosinmonophosphat **120** und 81.0 mg (153 μ mol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannosyl-1-phosphat **149** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 6 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 53.1 mg (65.8 μ mol, 86%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]: 8.11

(s, 1H, H-8), 5.93 (d, 1H, ³J_{HH} = 6.2 Hz, H-1'),

5.51 (dd, 1H, ³J_{HH} = 1.6 Hz, ³J_{HP} = 7.7 Hz, H-1''),

4.81-4.74 (m, 1H, H-2'),

4.51 (dd, 1H, ³J_{HH} = 3.6 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H-3'),

4.37-4.34 (m, 1H, H-4'),

4.21 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.1 Hz, ³J_{HH} = 4.7 Hz, H-5'ab),

4.05 (dd, 1H, ³J_{HH} = 2.0 Hz, ³J_{HH} = 3.0 Hz, H-2''),

3.92 (dd, 1H, ³J_{HH} = 3.6 Hz, ³J_{HH} = 9.8 Hz, H-3''),

3.89-3.83 (m, 2H, H-5'', H-6''a),

3.78-3.72 (m, 1H, H-6''b),

3.68 (t, 1H, ³J_{HH} = 10.0 Hz, H-4'),

3.19 (q, 12H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, N(CH₂CH₃)₃),

1.27 (t, 18H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, N(CH₂CH₃)₃). ¹³C-

NMR (101 MHz, D₂O) δ [ppm]: 158.9 (C-6), 153.9 (C-4), 145.1 (C-8), 134.8 (C-2),

116.2 (C-5), 96.4 (d, ²J_{CP} = 5.5 Hz, C-1''),

86.8 (C-1'), 83.8 (d, ³J_{CP} = 9.6 Hz, C-4'),

73.7 (C-2'), 73.6 (C-5''), 70.4 (C-3'),

70.3 (d, ³J_{CP} = 9.1 Hz, C-2''), 69.8 (C-3''),

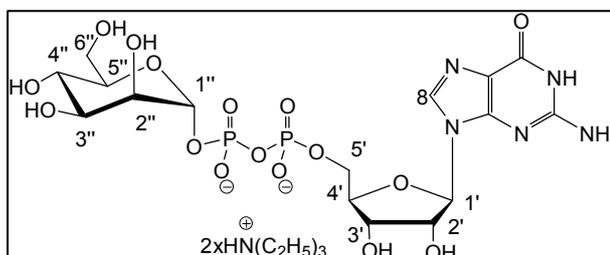
66.4 (C-4''), 65.3 (d, ³J_{CP} = 5.6 Hz, C-5'),

60.8 (C-6''), 46.6 (N(CH₂CH₃)₃), 8.2 (N(CH₂CH₃)₃). ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O) δ [ppm]: -11.32 (d, ²J_{PP} = 21.3 Hz, P _{α}),

-12.97 (d, ²J_{PP} = 21.2 Hz, P _{β}). - IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 3116, 1686, 1603, 1533, 1477,

1398, 1227, 1067, 1005, 933. - HRMS (ESI, m/z) C₁₆H₂₅N₅O₁₆P₂: ber.: 605.0782,

gef.: 604.0687 [M-H]⁻. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +3.5° (c = 0.2, H₂O). - DC: R_F-Wert (iPrOH/1M NH₄OAc 2:1v/v): 0.39.



Synthese von Guanosin-5'-diphospho-2''-acetamido-2'''-desoxy- α -D-glucose 188

Nach AVV 12.1 wurden 100 mg (156 μ mol) 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal-N*²-acetyl-2',3'-di-O-acetylguanosinmonophosphat **120** und 181 mg (313 μ mol) 2-Acetamido-3,4,5-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl-1-phosphat **150** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 11 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 77.2 mg (117 μ mol, 75%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]:

8.11 (s, 1H, H-8), 5.92 (d, 1H,

³J_{HH} = 6.1 Hz, H-1'), 5.51 (dd, 1H,

³J_{HH} = 3.2 Hz, ³J_{HP} = 7.2 Hz, H-1''),

4.81-4.74 (m, 1H, H-2'), 4.51 (dd, 1H,

³J_{HH} = 3.6 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, H-3'),

4.36-4.33 (m, 1H, H-4'), 4.24-4.17 (m, 2H, H-5'), 3.98 (dt, 1H, ³J_{HH} = 2.8 Hz,

³J_{HH} = 10.5 Hz, H-2''), 3.95-3.90 (m, 1H, H-3''), 3.87-3.73 (m, 3H, H-5'', H-6''), 3.53 (t,

1H, ³J_{HH} = 9.6 Hz, H-4''), 3.19 (q, 12H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, N(CH₂CH₃)₃), 2.09 (s, 3H,

COCH₃), 1.27 (t, 18H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, N(CH₂CH₃)₃). ¹³C-NMR (101 MHz,

D₂O) δ [ppm]: 174.7(COCH₃), 158.9 (C-2), 153.9 (C-4), 137.1 (C-8), 116.7 (C-5), 94.5

(d, ²J_{CP} = 6.3 Hz, C-1''), 86.8 (C-1'), 83.7 (d, ³J_{CP} = 9.1 Hz, C-4'), 73.5 (C-2'), 73.0 (C-

3''), 71.0 (C-5''), 70.4 (C-3'), 69.5 (C-4''), 65.3 (d, ²J_{CP} = 5.7 Hz, C-5'), 60.3 (C-6''),

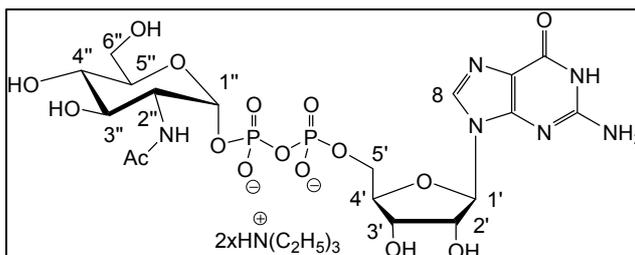
53.6 (d, ³J_{CP} = 8.4 Hz, C-2''), 46.6 (N(CH₂CH₃)₃), 8.2 (N(CH₂CH₃)₃). ³¹P-NMR

(162 MHz, D₂O) δ [ppm]: -11.3 (d, ²J_{PP} = 20.7 Hz, P _{α}), -13.1 (d, ²J_{PP} = 20.1 Hz, P _{β}). -

IR (ATR) ν [cm⁻¹]: 3139, 1749, 1690, 1646, 1533, 1478, 1372, 1225, 1109, 1075,

921, 871, 811, 780. - HRMS (ESI, m/z) C₁₈H₂₈N₆O₁₆P₂: ber.: 646.1048, gef.: 645.0961 [M-H]⁻. - $[\alpha]_{546}^{20}$: -3.7° (c = 0.25, H₂O). - DC: R_f-Wert (iPrOH/1M NH₄OAc

2:1v/v): 0.38.



Synthese von Guanosin-5'-diphospho-2''-acetamido-2''-desoxy- α -D-galactose 189

Nach AVV 12.1 wurden 50 mg (76.0 μ mol) 5''-Methylsulfonyl-cycloSal- N^2 -acetyl-2',3'-di-O-acetylguanosenmonophosphat **120** und 96.0 mg (153 μ mol) 2-Acetamido-3,4,5-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl-1-phosphat **151** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 6 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 57.8 mg (68.2 μ mol, 89%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 8.11

(s, 1H, H-8), 5.93 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz,

H-1'), 5.54 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz,

$^3J_{\text{HP}} = 7.2$ Hz, H-1''), 4.81-4.74 (m, 1H,

H-2'), 4.52 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.6$ Hz,

$^3J_{\text{HH}} = 5.1$ Hz, H-3'), 4.37-4.32 (m, 1H, H-

4'), 4.25 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.1$ Hz, H-2''), 4.24-4.19 (m, 2H, H-5'ab), 4.16 (t, 1H,

$^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, H-5''), 3.99 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.9$ Hz, H-4''), 3.93 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.0$ Hz,

$^3J_{\text{HH}} = 10.8$ Hz, H-3''), 3.76 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 11.7$ Hz, H-6'a), 3.71 (dd,

1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 11.8$ Hz, H-6'b'), 3.21 (q, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$),

2.06 (s, 3H, COCH_3), 1.28 (t, 18H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz,

D_2O) δ [ppm]: 174.9 (COCH_3), 158.9 (C-6), 153.9 (C-4), 145.1 (C-8), 137.4 (C-2),

116.3 (C-5), 94.7 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.3$ Hz, C-1''), 86.9 (C-1'), 83.7 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, C-4'),

73.5 (C-2'), 72.0 (C-5''), 70.4 (C-3'), 68.3 (C-4''), 67.6 (C-3''), 65.3 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.5$ Hz,

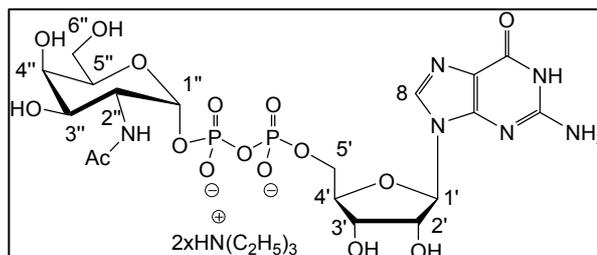
C-5'), 61.0 (C-6''), 49.7 (C-2'), 46.6 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 8.2 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{31}\text{P-NMR}$

(162 MHz, D_2O) δ [ppm]: -11.31 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.9$ Hz, P_α), -12.96 (d, $^2J_{\text{PP}} = 21.3$ Hz, P_β).

- IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 3256, 1744, 1688, 1650, 1533, 1477, 1369, 1213, 1046, 910. -

HRMS (ESI, m/z) $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_{16}\text{P}_2$: ber.: 646.1048, gef.: 645.0954 [M-H]. - $[\alpha]_{546}^{20}$:

+36.4 $^\circ$ (c = 0.1, H_2O). - DC: R_f -Wert ($i\text{PrOH}/1\text{M NH}_4\text{OAc}$ 2:1v/v): 0.41.



Synthese der 2'-Desoxyguanosin-5'-diphospho- β -D-glucose 180

Nach AAV 12.3 wurden 50.0 mg (86.4 μ mol) 5''-Nitro-cycloSal-N²-acetyl-3'-O-acetyl-2'-desoxyguanosinmonophosphat **117** und 91.5 mg (173 μ mol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -glucosyl-1-phosphat **147b** vorgetrocknet und unter Stickstoffatmosphäre für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung und Abspaltung der Acetylschutzgruppen wurde das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 23.4 mg (29.6 μ mol, 39%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

- ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]:

8.10 (s, 1H, H-8), 6.34 (t, 1H,

³J_{HH} = 7.0 Hz, H-1'), 5.03 (t, 1H,

³J_{HH} = 7.9 Hz, H-1''), 4.80 (s, 1H, H-

3'), 4.32-4.23 (m, 1H, H-4'), 4.22-

4.16 (m, 2H, H-5'), 3.91 (dd, 1H, ³J_{HH} = 1.5 Hz, ³J_{HH} = 12.3 Hz, H-5''), 3.70 (dd, 1H,

³J_{HH} = 6.0 Hz, ³J_{HH} = 12.5 Hz, H-4'), 3.59-3.48 (m, 2H, H-3'', H-6''a), 3.45-3.37 (m,

2H, H-2'', H-6''b), 3.22 (q, 12H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, HN(CH₂CH₃)₃), 2.90-2.79 (m, 1H, H-

2'a), 2.53 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 13.8 Hz, ³J_{HH} = 6.2 Hz, ³J_{HH} = 3.0 Hz, H-2'b), 1.30 (t,

³J_{HH} = 7.3 Hz, 18H, HN(CH₂CH₃)₃). - ¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) δ [ppm]: 97.9 (d,

²J_{CP} = 5.9 Hz, C-1''), 85.6 (d, ³J_{CP} = 9.5 Hz, C-4'), 83.7 (C-1'), 76.5 (C-3''), 75.2 (C-

3'), 73.7 (d, ³J_{CP} = 8.8 Hz, C-2''), 71.5 (C-5''), 69.5 (C-4''), 65.6 (d, ³J_{CP} = 5.9 Hz, C-

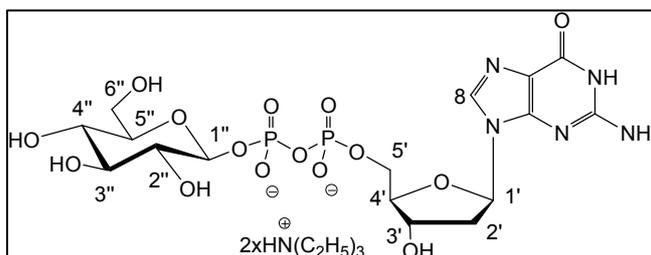
5'), 60.8 (C-6''), 46.7 (HN(CH₂CH₃)₃), 38.5 (C-2'); 8.2 (HN(CH₂CH₃)₃). - ³¹P-NMR

(162 MHz, D₂O) δ [ppm]: -11.23 (d, ²J_{PP} = 20.2 Hz, P _{α}), -13.08 (d, ²J_{PP} = 20.2 Hz, P _{β}).

(ATR) ν [cm⁻¹]: 3203, 2985, 2706, 2497, 2364, 1654, 1437, 1047, 942, 838.

- HRMS (ESI, m/z) C₁₆H₂₅N₅O₁₅P₂: ber.: 589.0833, gef.: 588.0750 [M-H]⁻. - $[\alpha]_{546}^{20}$:

-18 ° (c = 0.14, H₂O). - DC: R_f-Wert (iPrOH/1M NH₄OAc 2:1v/v): 0.60.



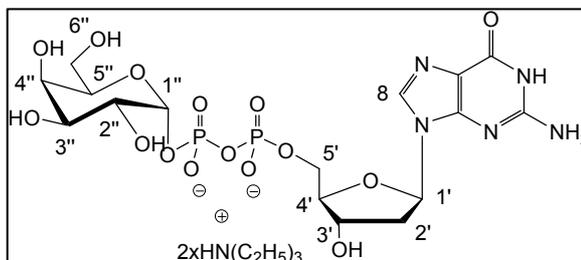
Synthese der 2'-Desoxyguanosin-5'-diphospho- α -D-galactose 175

Nach AAV 12.3 wurden 50.0 mg (86.4 μ mol) 5''-Nitro-cycloSal-N²-acetyl-3'-O-acetyl-2'-desoxyguanosinmonophosphat **117** und 91.5 mg (173 μ mol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -galactosyl-1-phosphat **148a** vorgetrocknet und unter Stickstoffatmosphäre

für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung und Abspaltung der Acetylschutzgruppen wurde das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 19.8 mg (25.0 μmol , 29%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 8.08 (s, 1H, H-8), 6.31 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, H-1'), 5.61 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.1$ Hz, H-1''), 4.74 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, H-3'), 4.24-4.23 (m, 1H, H-4'), 4.15-4.11 (m, 3H, H-5', H-5''), 3.97 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.8$ Hz, H-4''), 3.87 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10.3$ Hz, H-3''), 3.79-3.77 (m, 1H, C-2''), 3.76-3.68 (m, 2H, H-6''), 3.18 (q, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 2.81 (ddd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, H-2'a), 2.49 (ddd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, H-2'b), 1.27 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 18H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O) δ [ppm]: 96.1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.4$ Hz, C-1''), 86.0 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, C-4'), 84.0 (C-1'), 72.2 (C-5''), 71.7 (C-3'), 69.6 (C-4''), 69.4 (C-3''), 68.7 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.7$ Hz, C-2''), 65.1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.6$ Hz, C-5'), 61.4 (C-6''), 47.0 ($\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 38.8 (C-2'); 8.6 ($\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ [ppm]: -11.39 (d, $^2J_{\text{PP}} = 22.7$ Hz, P_α), -13.21 (d, $^2J_{\text{PP}} = 22.7$ Hz, P_β). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 3414, 2359, 2340, 1772, 1700, 1696, 1684, 1635, 1617, 1237, 1081. - MS (ESI, m/z) $\text{C}_{28}\text{H}_{55}\text{N}_7\text{O}_{15}\text{P}_2$: ber.: 791.32, gef.: 792.6 $[\text{M-H}]^-$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: -10° (c = 0.28, H_2O). - DC: R_f -Wert (*i*PrOH/1M NH_4OAc 2:1v/v): 0.69.



Synthese der 2'-Desoxyguanosin-5'-diphospho- α -D-mannose 190

Nach AVV 12.1 wurden 30.0 mg (50.2 μmol) 5''-Methylsulfonyl-cycloSal- N^2 -acetyl-3'-O-acetyl-2'-desoxyguanosinmonophosphat **120** und 53.2 mg (100 μmol) 2,3,4,5-Tetra-O-acetyl- α -D-mannosyl-1-phosphat **149** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 6 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 24.3 mg (30.5 μmol , 61%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 8.12

(s, 1H, H-8), 5.33 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz,

H-1'), 5.51 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, H-1''),

4.77-4.73 (m, 1H, H-3'), 4.29-4.24 (m,

1H, H-4'), 4.21-4.13 (m, 2H, H-5'ab),

4.07-4.04 (m, 1H, H-2''), 3.92 (dd, 1H,

$^3J_{\text{HH}} = 2.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 9.8$ Hz, H-3''), 4.89-4.83 (m, 2H, H-5'', H-6''a), 3.75 (dd, 1H,

$^3J_{\text{HH}} = 4.8$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 11.8$ Hz, H-6''b), 3.68 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 10.1$ Hz, H-4''), 3.20 (q,

12H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 2.83 (qi, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, H-2'a), 2.55-2.48 (m,

1H, H-2'b), 1.28 (t, 18H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz,

D_2O) δ [ppm]: 96.5 (C-1''), 85.7 (C-4'), 83.7 (C-1'), 74.9 (C-5''), 73.7 (C-3'), 71.4 (C-

2''), 69.8 (C-3''), 66.5 (C-4''), 62.9 (C-5'), 60.8 (C-6''), 46.7 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 38.4 (C-2'),

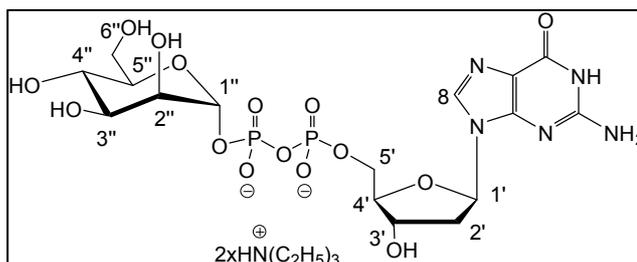
8.2 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ [ppm]: -11.23 (d, $^2J_{\text{PP}} = 19.4$ Hz, P_α),

-13.03 (d, $^2J_{\text{PP}} = 19.4$ Hz, P_β). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 3099, 2323, 1687, 1605, 1532,

1478, 1398, 1360, 1227, 1051, 1001, 930. - HRMS (ESI, m/z) $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_{15}\text{P}_2$: ber.: 589.0833,

gef.: 588.0735 [M-H] $^-$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +31.7 $^\circ$ ($c = 1.05$, H_2O). - DC: R_f -

Wert ($i\text{PrOH}/1\text{M NH}_4\text{OAc}$ 2:1v/v): 0.36.



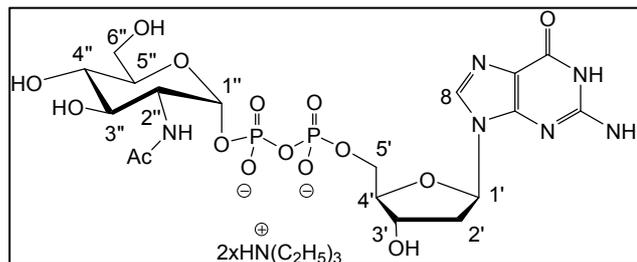
Synthese von 2'-Desoxyguanosin-5'-diphospho-2''-acetamido-2''-desoxy- α -D-glucose 191

Nach AVV 12.1 wurden 30.0 mg (50.2 μmol) 5''-Methylsulfonyl-*cycloSal*- N^2 -acetyl-3'-O-acetyl-2'-desoxyguanosinmonophosphat **120** und 63.0 mg (100 μmol) 2-Acetamido-3,4,5-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl-1-phosphat **150** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 6 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 28.0 mg (33.6 μmol , 67%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 8.17

(s, 1H, H-8), 6.32 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, H-1'), 5.51-5.49 (m, 1H, H-1''), 4.75-4.70 (m, 1H, H-3'), 4.29-4.22 (m, 1H, H-4'), 4.20-4.10 (m, 2H, H5'ab), 3.97 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.4$ Hz, H-2'')



(m, 1H, H-4''), 3.87-3.82 (m, 2H, H-6''ab), 3.81-3.74 (m, 1H, H3''), 3.54 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.6$ Hz, H5''), 3.21 (q, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 2.84 (qi, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, H-2'a), 2.52 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 13.9$ Hz, H-2'b), 2.04 (s, 3H, COCH_3), 1.27 (t, 18H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O) δ [ppm]: 174.7 (COCH_3), 158.9 (C-2), 153.8 (C-4), 137.1 (C-8), 116.7 (C-5), 94.5 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.2$ Hz, C-1''), 85.5 (C-4'), 83.7 (C-1'), 73.0 (C-4''), 71.3 (C-3''), 70.9 (C-3'), 69.5 (C-5''), 65.5 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.2$ Hz, C-5'), 60.3 (C-6''), 53.6 (d, $^3J_{\text{CP}} = 4.6$ Hz, C-2''), 46.7 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 38.5 (C-2'), 22.0 (COCH_3), 8.2 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ [ppm]: -11.22 (d, $^2J_{\text{PP}} = 22.6$ Hz, P_α), -12.91 (d, $^2J_{\text{PP}} = 22.6$ Hz, P_β). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 3215, 2696, 2502, 1679, 1636, 1477, 1361, 1225, 1052, 919. - HRMS (ESI, m/z) $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{P}_2$: ber.: 630.1099, gef.: 629.1003 [M-H] $^-$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +35.5 $^\circ$ (c = 1.35, H_2O). - DC: R_f -Wert ($i\text{PrOH}/1\text{M NH}_4\text{OAc}$ 2:1v/v): 0.39.

Synthese von 2'-Desoxyguanosin-5'-diphospho-2''-acetamido-2''-desoxy- α -D-galactose **192**

Nach AVV 12.1 wurden 30.0 mg (50.2 μmol) 5''-Methylsulfonyl-cycloSal- N^2 -acetyl-3'-O-acetyl-2'-desoxyguanosinmonophosphat **120** und 63.0 mg (104 μmol) 2-Acetamido-3,4,5-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl-1-phosphat **151** umgesetzt. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Abtrennen des Zuckerphosphates wurden Fraktionen, die NDP-Zucker enthielten, mit 6 U alkalischer Phosphatase versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 31.0 mg (37.2 μmol , 74%) eines farblosen kristallinen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]: 8.10

(s, 1H, H-8), 6.31 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, H-

1'), 5.53 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.2$ Hz,

$^3J_{\text{HP}} = 5.5$ Hz, H-1''), 4.80-4.70 (m, 1H, H-

3'), 4.27-4.21 (m, 2H, H-4', H-2''), 4.20-

4.13 (m, 3H, H-5'ab, H-5''), 4.02-3.97 (m, 1H, H-4''), 3.95-3.89 (m, 1H, H-3''), 3.80-

3.68 (m, 2H, H-6''ab), 3.19 (q, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 2.84 (qi, 1H,

$^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, H-2'a), 2.52 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 13.5$ Hz, H-

2'b), 2.05 (s, 3H, COCH_3), 1.27 (t, 18H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{13}\text{C-NMR}$

(101 MHz, D_2O) δ [ppm]: 174.9 (COCH_3), 158.9 (C-6), 153.8 (C-4), 145.1 (C-8),

137.4 (C-2), 116.3 (C-5), 94.7 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.0$ Hz, C-1''), 85.6 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.8$ Hz, C-4'),

83.6 (C-1'), 72.0 (C-5''), 71.3 (C-3'), 68.4 (C-4''), 67.6 (C-3''), 65.5 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.6$ Hz,

C-5'), 61.0 (C-6''), 49.7 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.0$ Hz, C-2''), 46.6 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 38.4 (C-2'), 8.2

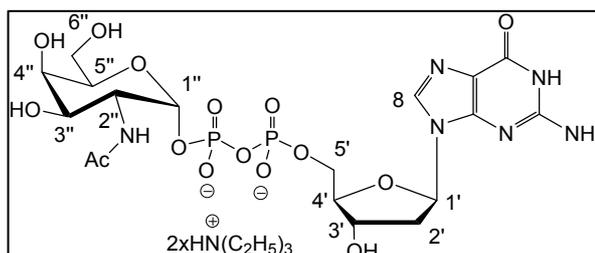
($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ [ppm]: -11.27 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.1$ Hz, P_α), -

13.00 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.1$ Hz, P_β). - IR (ATR) ν [cm^{-1}]: 3230, 2695, 2502, 1684, 1638,

1566, 1532, 1477, 1229, 1037, 982, 919. - HRMS (ESI, m/z) $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{P}_2$: ber.:

630.1099, gef.: 629.0999 [M-H] $^-$. - $[\alpha]_{546}^{20}$: +25.2 $^\circ$ ($c = 1.45$, H_2O). - DC: R_f -

Wert ($i\text{PrOH}/1\text{M NH}_4\text{OAc}$ 2:1v/v): 0.37.



8. GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS

Das folgende Verzeichnis umfasst Verbindungen und Lösemittel, mit denen während dieser Promotion gearbeitet wurde. Die Gefahrstoffe sind mit den jeweiligen Gefahrensymbolen sowie P-Sätzen und S-Sätzen gekennzeichnet. Die Substanzen, für die keine Gefahreinschätzung bekannt ist, sind als gefährlich einzustufen. Es ist zu vermeiden, sich oder eine andere Person mit diesen Substanzen zu kontaminieren und diese Stoffe in die Umwelt einzubringen.

Substanz	GHS	H-Sätze	P-Sätze	KMR
Acetanhydrid	02-05-07	226-302-314- 332	280-305/351/338-312	
Aceton	02-07	225-319-336	210-305/351/338- 403/233	
Acetonitril	02-07	319-332-312- 225-302	210-312-363	
Acetylchlorid	02-05	314-325	210-310- 305/351/338-403	
Ammoniak (25%ige Lösung)	04-05-06-09	331-400-314- 221-280	210-273-280- 305/351/338-310-403	
Ammoniumacetat	-	-	-	-
Benzaldehyddimethyl- acetal	07	302	-	
Benzophenon	07-09	410-400-335- 319-315	273-305/351/338- 280-501	
Benzylamin	05-07	314-312-302	280-305/351/338-310	
5-Bromsalicylaldehyd	-	-	-	-
Calciumhydrid	02	260	370/378-402/404	
Celite	08	371	260	
Chloroform	07-08	302-315-351- 373	280	1B
3-Chlorperbenzoesäure	02-07	242-315-319- 335	220-280-411	
4-Cyanophenol	02	302-315-319- 335	280-305/351/338	
2'Desoxyguanosin	-	-	-	
Deuteriumoxid	-	-	-	

Gefahrstoffverzeichnis

Dibenzyl- <i>N,N</i> - diisopropylphosphoramidit	07	315-319-335	280-305/351/338
Dibenzylphosphat	-	-	-
Dicyanoimidazol	07	302	260-262
Dichlormethan	08	351	281-308/313 2
Diethylether	02-07	224-302-336	210-240-403/235
Dimethylbarbitursäure	05-07	302-318	305/351/338-313
Dimethylformamid	02-07	225-315-319- 332	210-302/352- 305/351/338 1B
<i>N,N</i> -Dimethylformamid- dimethylacetal	02-07	225-315-319- 322	210-302/352- 305/351/338
Dimethylsulfoxid	-	-	-
1,4-Dioxan	02-07-08	225-319-335- 351	210-281- 305/351/338-308/313 2
DIPEA	02-05-06	225-301-314- 412	210-273-280- 305/351/338- 301/330/331
Essigsäure	02-05	226-314	280-301/330/331- 305/351/338
Ethanol	02	225	210
Ethylacetat	02-07	225-319-336	210-240-305/351/338
Galactose	-	-	-
Galactosamin	-	-	-
Glucose	-	-	-
Glucosamin	-	-	-
Guanosin	-	-	-
Hexamethylentetramin	02-07	228-317	280-302/352
Hydraziniumacetat	07	315-319	302/352-305/351/338
Iod	07-02	312-332-400	273-302/352
<i>iso</i> -Propanol	02-07	225-319-336	210-233-305/351/338
Kaliumhydroxid	05-07	290-302-314	280-301/330/331- 305/351/338
Kieselgel	-	-	260
Kupfer(I)cyanid	06-09	300/310/330-410	273-280-302/352- 304/340
Lactulose	-	-	-
Mannose	-	-	-
Methanol	02-06-08	225-301-311- 331-370	210-233-280- 302/352

Gefahrstoffverzeichnis

4-Methylmercaptophenol	07	225-313-319	305/351/338	
Natriumchlorid	-	-	-	
Natriumborhydrid	02-05-06	260-301/311-314	280-301/330/331- 302/352- 305/351/338-402/404	
Natriumhydrogen- carbonat	-	-	-	
Natriumdihydrogen- phosphat	-	-	-	
Natriumdisulfit	05-07	302-318	280-305/351/338-313	
Natriumhydroxid	05	290-314	280-301/330/331- 305/351/338	
Natriumsulfat	-	-	-	
5-Nitrosalicylaldehyd	07	302-315-319	302/352-305/351/338	
<i>para</i> -Formaldehyd	02-07-08	228-302/332- 315-317-319- 335-351	281-302/352- 305/351/338- 308/313-304/340	2
Petrolether 50/70	02-07-09	225-304-336- 411	210-243-273- 301/310-331	
Phenylboronsäure	07	315-319	302/352-305/351/338	
Phosphortrichlorid	05-06-08	300/330-314-373	280-301/330/331- 304/340-305/351/338	
Propionsäure	05	314	280-301/330/331- 305/351/338	
Pyridin	02-07	225-302/312/332	210-233-302/352	
Salzsäure	05-07	290-314-335	280-301/330/331- 305/351/338	
Schwefelsäure	05	290-314	280-301/330/331- 309-310-305/351/338	
Silbercarbonat	05	318	260-305/351/338-313	
<i>tert</i> -Butyldimethylchlorsilan	02-05	228-314	210-280- 301/330/331- 305/351/338	
Tetrahydrofuran	02-07	225-319-335	210-233-243- 305/351/338	
Toluol	05-07-08	225-304-315- 336-361-373	210-301/310-331- 302/332	2
Triethylamin	02-05-07	225-302-312- 314-332-335	210-280- 301/330/331- 302/352-305/351/338	

Gefahrstoffverzeichnis

Triethylamintrihydrofluorid	05-06	300/330-310-314	280-301/330/331- 302/352-304/340- 305/351/338-309-310
Trifluoressigsäure	05-07	314-332-412	271-273- 301/330/331- 305/351/338
Uridin	-	-	-
Wasserstoffperoxid	05-07	302-318	280-313-305/351/338

9. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 A. Varki, Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130.
- 2 G. Habermehl, P. E. Hammann, H. C. Krebs, *Naturstoffchemie*, 2. Auflage, Springer, Heidelberg **2002**, 377-393.
- 3 S. Alban, B. Classen, G. Brunner, W. Blaschek, Haemolytic complement assay for the differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin, *Planta Med.* **2002**, 68, 1118-1124.
- 4 P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman, Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 15. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**, 91.
- 5 L. F. Leloir, Two Decades of Research on the Biosynthesis of Saccharides, *Science* **1971**, 172, 1299-1303.
- 6 D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, 2. Auflage, Wiley & Sons, New York, **1995**, 491.
- 7 K. Ohtsubo, J. D. Marth, Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease, *Cell* **2006**, 126, 855-867.
- 8 A. W. Barb, T. M. Leavy, L. I. Robins, Z. Guan, D. A. Six, P. Zhou, C. R. Bertozzi, C. R. H. Raetz, Uridine-Based Inhibitors as New Leads for Antibiotics Targeting *Escheria coli* LpxC, *Biochemistry* **2009**, 48, 3068-3077.
- 9 H. Yuasa, M. M. Palcic, O. Hindsgaul, Synthesis of the carbocyclic analog of uridine 5'-(α -D-galactopyranosyl diphosphate) (UDP-Gal) as an inhibitor of β (1 \rightarrow 4)-galactosyltransferase, *Can. J. Chem.* **1995**, 73, 2190-2195.
- 10 S. Löbau, W. Brabetz, L. Brade, H. Brade, Glycosyltransferasen der frühen Lipopolysaccharid-Biosynthese, *Chemotherapie Journal* **1999**, 5, 183-186.
- 11 G. W. Jourdian, F. Shimizu, S. Roseman, Isolation of nucleotide-oligosaccharide containing sialic acid, *Fed. Proc.* **1961**, 20, 161.
- 12 A. Kobata, S. Zir, The acid-soluble nucleotides of milk III. occurrence of UDP-*N*-acetyllactosamine and UDP-D-xylose in pig's milk and colostrum, *Biochim. Biophys. Acta* **1965**, 107, 405-413.

- 13 R. E. Denamur, P. J.-B. Gaye, Isoelement et identification de 4 UDP-trisaccharides dans la glande mammaire et le colostrum de brebis, *Eur. J. Biochem.* **1971**, *19*, 23-35.
- 14 a) A. Kobata, Isolation and identification of two novel uridine nucleotide oligosaccharide conjugates from human milk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1962**, *7*, 346-350. b) A. Kobata, The Acid-Soluble Nucleotides of Milk II. Isolation and Identification of Two Novel Uridine Nucleotide Oligosaccharide Conjugates from Human Milk and Colostrum, *J. Biochem.* **1963**, *53*, 167-175. c) A. Kobata, The Acid-soluble Nucleotides of Milk IV. The Chemical Structure of UDP-X₃, *J. Biochem.* **1966**, *59*, 63-66.
- 15 S. Suzuki, A Novel Uridine Nucleotide Containing N-Acetylglucosamine and Galactose, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 1393-1399.
- 16 Y. Nakanishi, S. Shimizu, N. Takahashi, M. Sugiyama, S. Suzuki, Structure and Distribution of a Disaccharide-carrying Nucleotide and Related Nucleotides in Hen Oviduct, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 967-976.
- 17 E. Hartmann, H. König, Comparison of the biosynthesis of the methanobacterial pseudomurein and the eubacterial murein, *Naturwissenschaften* **1990**, *77*, 472-475.
- 18 E. Hartmann, P. Messner, G. Allmeier, H. König, Proposed pathway for biosynthesis of the S-layer glycoprotein of *Bacillus alvei*, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 4515-4519.
- 19 G. K. Wagner, T. Pesnot, R. A. Field, A survey of chemical methods for sugar-nucleotide synthesis, *Nat. Pro. Rep.* **2009**, *26*, 1172-1194.
- 20 A. Munch-Petersen, H. M. Kalckar, E. Cutolo, E. E. B. Smith, Uridyl Transferases and the Formation of Uridine Triphosphate: Enzymic Production of Uridine Triphosphate: Uridine Diphosphoglucose Pyrophosphorolysis, *Nature* **1953**, *172*, 1036-1037.
- 21 A. Munch-Petersen, Reversible Enzymic Synthesis of Guanosine Diphosphate Mannose from Guanosine Triphosphate and Mannose-1-Phosphate, *Acta Chem. Scand.* **1956**, *10*, 928-934.
- 22 C.-H. Wong, S. L. Haynie, G. M. Whitesides, Preparation of a mixture of nucleoside triphosphates from yeast RNA: use in enzymatic synthesis

- requiring nucleoside triphosphate regeneration and conversion to nucleoside Diphosphate sugar, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 115-117.
- 23 E. S. Simon, S. Grabowski, G. M. Whitesides, Convenient syntheses of cytidine 5'-triphosphate, guanosine 5'-triphosphate, and uridine 5'-triphosphate and their use in the preparation of UDP-glucose, UDP-glucuronic acid, and GDP-mannose, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1834-1841.
- 24 B. Kneidinger, M. Graninger, M. Puchberger, P. Kosma, P. Messner, Biosynthesis of nucleotide-activated D-glycero-D-manno-heptose, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20935-20944.
- 25 R. Stiller, J. Thiem, Enzymatic Synthesis of β -L-Fucose-1-phosphate and GDP-fucose, *Liebigs. Ann. Chem.* **1992**, 467-471.
- 26 J. G. Moffatt, H. G. Khorana, Nucleoside Polyphosphates. VIII. New and Improved Synthesis of Uridine Diphosphate Glucose and Flavin Adenin Dinucleotide Using Nucleoside-5'-Phosphoramidates, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3756-3761.
- 27 J. G. Moffatt, H. G. Khorana, Nucleoside Polyphosphates. X. The Synthesis and Some Reactions of Nucleoside-5' Phosphomorpholidates and Related Compounds. Improved Methods for Preparation of Nucleoside-5' Polyphosphates, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 649-658.
- 28 S. Roseman, J. J. Distler, J. G. Moffatt, H. G. Khorana, Nucleoside Polyphosphates. XI. An Improved General Method for the Synthesis of Nucleotide Coenzymes. Synthesis of Uridine-5', Cytidine-5' and Guanosine-5' Diphosphate Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 659-663.
- 29 V. Wittmann, C.-H. Wong, 1H-Tetrazole as Catalyst in Phosphomorpholidate Coupling Reaktionen: Efficient Synthesis of GDP-Fucose, GDP-Mannose, and UDP-Galactose, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2144-2147.
- 30 R. Chang, A. R. Yeager, N. S. Finney, Probing the mechanism of a fungal Glycosyltransferase essential for cell wall biosynthesis. UDP-Chitobiose is not a substrate for chitin synthase, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 39-41.
- 31 F. Schweizer, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, Synthesis of Internally Fluorescence-Quenched Sugar Nucleotides, *Synlett* **2004**, 1784-1788.

- 32 J. Lee, H. Churchil, W.-B. Choi, J. E. Lynch, F. E. Roberts, R. P. Volante, P. J. Reider, A chemical Synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), *Chem. Commun.* **1999**, 729-730.
- 33 A. Collier, G. K. Wagner, A fast synthetic route to GDP-sugars modified at the nucleobase, *Chem. Commun.* **2008**, 178-180.
- 34 T. Pesnot, G. K. Wagner, Novel derivatives of UDP-glucose: concise synthesis and fluorescent properties, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 2884-2891.
- 35 F. Cramer, H. Neunhoeffer, K. H. Scheit, G. Schneider, J. Tennigkeit, New Phosphorylation Reaktionen and Protecting Groups for Nucleotides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, 6, 331.
- 36 Y. Zhao, J. S. Thorson, A Methodological Comparison: The Advantage of Phosphorimidates in Expanding the Sugar Nucleotide Repertoire, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7568-7572.
- 37 G. Baisch, R. Oehrlein, Convenient chemoenzymatic synthesis of β -Purine-diphosphate Sugars (GDP-fucose-analogues), *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 383-391.
- 38 T. Ishimizu, T. Uchida, K. Sano, S. Hase, Chemical synthesis of uridine 5'-diphospho- α -D-xylopyranose, *Tetrahedron: Asymmetrie* **2005**, 16, 309-311.
- 39 H. Ko, I. Fricks, A. A. Ivanov, T. Kendall Harden, K. A. Jacobson, Structure-Activity Relationship of Uridine 5'-Diphosphoglucose Analogues as Agonists of the Human P2Y₁₄ Receptor, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 2030-2039.
- 40 V. S. Bogachev, Synthesis of deoxynucleoside 5'-triphosphates using trifluoroacetic anhydride as an activating reagent, *Bioorg. Khim.* **1996**, 22, 699.
- 41 S. C. Timmons, D. L. Jakeman, Stereospecific synthesis of sugar-1-phosphates and their conversion to sugar nucleotides, *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 865-874.
- 42 A. L. Marlow, L. L. Kiessling, Improved Chemical Synthesis of UDP-Galactofuranose, *Org. Lett.* **2001**, 3, 2517-2519.
- 43 C. L. Freel Meyers, R. F. Borch, A Novel Method for the Preparation of Nucleoside Diphosphate, *Org. Lett.* **2001**, 3, 3765-3768.
- 44 H. Gold, P. van Delft, N. Meeuwenoord, J. D. C. Codée, D. V. Filippov, G. Eggink, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel, Synthesis of Sugar Nucleotides by Application of Phosphoramidites, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 9458-9460.

- 45 M. Arlt, O. Hindsgaul, Rapid Chemical Synthesis of Sugar Nucleotides in a Form Suitable for Enzymatic Oligosaccharide Synthesis, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 14-15.
- 46 T. Uchiyama, O. Hindsgaul, Rapid Conversion of Unprotected Galactose Analogs to their UDP-Derivatives for Use in the Chemo-Enzymatic Synthesis of Unnatural Oligosaccharides, *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, *17*, 1181-1190.
- 47 S. C. Timmons, D. L. Jakeman, Stereoselective Chemical Synthesis of Sugar Nucleotides via Direct Displacement of Acylated Glycosyl Bromides, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1227-1230.
- 48 S. Hanessian, P.-P. Lu, H. Ishida, One-Step Stereocontrolled Synthesis of Glycosyl 1-Phosphates, Uridine-5'-diphosphogalactose, and Uridine-5'-diphosphoglucose from Unprotected Glycosyl Donors, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13296-13300.
- 49 P. Peltier, R. Daniellou, C. Nugier-Chauvin, V. Ferrieres, Versatile Synthesis of Rare Nucleotide Furanoses, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5227-5230.
- 50 O. J. Plante, R. B. Andrade, P. H. Seeberger, Synthesis and Use of Glycosyl Phosphates as Glycosyl Donors, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 211-214.
- 51 C. Ernst, W. Klaffke, A short route to nucleoside diphosphate activated D- and L-hexoses, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2973-2975.
- 52 C. Ernst, W. Klaffke, Chemical Synthesis of Uridine Diphospho-d-xylose and UDP-l-arabinose, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5780-5783.
- 53 L. Elling, A. Zervosen, R. G. Gallego, V. Nieder, M. Malissard, E. G. Berger, J. F. G. Vliegthart, J. P. Kamerling, UDP-N-Acetyl- α -D-glucosamine as acceptor substrate of β -1,4-galactosyltransferase. Enzymatic synthesis of UDP-N-acetyllactosamine, *Glycoconjugate J.* **1999**, *16*, 327-336.
- 54 A. Zervosen, V. Nieder, R. G. Gallego, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegthart, L. Elling, Synthesis of nucleotide-activated oligosaccharides by β -galactosidase from *Bacillus circulans*, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 299-311.
- 55 H. Takaku, J. Sato, H.-K. Ishida, T. Inazu, H. Ishida, M. Kiso, A chemical synthesis of UDP-LacNAc and its regioisomer for finding 'oligosaccharide transferases', *Glycoconjugate J.* **2006**, *23*, 565-573.
- 56 C. Meier, 2-Nucleos-5'-O-yl-4H-1,2,3-benzodioxaphosphin-2-oxides – A New Concept for lipophilic, potential Prodrugs of biologically active Nucleoside

- Monophosphates, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 77-79, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 70-73.
- 57 C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini, Cyclosaligenyl-2'-3'-dideoxy-2'-3'-didehydrothymidine Monophosphate (*cycloSal-d4TMP*): Synthesis and antiviral Evaluation of a new d4TMP delivery system, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417-1427.
- 58 C. Meier, *cycloSal*-Pronucleotides-Design of the Concept, Chemistry and Antiviral Activity, *Advances in Antiviral Drug Design* (Ed. Erik De Clercq) **2004**, *4*, 147-213.
- 59 C. Meier; *cycloSal* Phosphates as Chemical Trojan Horses for Intracellular Nucleotide and Glycosylmonophosphate Delivery-Chemistry Meets Biology, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2*, 1081-1102.
- 60 N. Gisch, Synthese und Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung enzymatisch aktivierbarer *cycloSal*-Pronucleotide, *Dissertation*, Hamburg, **2008**.
- 61 S. Wendicke, S. Warnecke, C. Meier, Efficient Synthesis of Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1523-1525, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1500-1502.
- 62 S. Warnecke, C. Meier, Synthesis of Nucleoside Di- and Triphosphates and Dinucleoside Polyphosphates with *cycloSal*-Nucleotides, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3024-3030.
- 63 S. Warnecke, Neue Synthese phosphorylierter Biokonjugate aus *cycloSal*-aktivierten Nucleotiden, *Dissertation*, Hamburg, **2010**.
- 64 C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini, Cyclic Saligenylphosphotriesters of 2'-3'-Dideoxy-2'-3'-didehydrothymidine (d4T) – A New Pro-Nucleotide Approach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 99-104.
- 65 S. Wendicke, Neue Synthese von Nucleosiddiphosphatpyranosen mit Hilfe von *cycloSal*-aktivierten Phosphatdonatoren, *Dissertation*, Hamburg, **2007**.
- 66 T. Zismann, Synthese von Guanosindiphosphatglycopyranosen mit Hilfe von *cycloSal*-aktivierten Phosphatdonatoren, *Diplomarbeit*, Hamburg, **2007**.
- 67 J. Huchting, *cycloSal*-Nucleotide zur Synthese von Nucleosiddiphosphat-Disacchariden, *Diplomarbeit*, Hamburg, **2010**.

- 68 C. Meier, *cycloSal*-Pronucleotides-Design of the Concept, Chemistry and Antiviral Activity, *Advances in Antiviral Drug Design*, Elsevier **2004**, 4, 147-213.
- 69 C. Arenz, A. Giannis, Synthesis of the First Selective Irreversible Inhibitor of Neutral Sphingomyelinase, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 137-140.
- 70 W. Nagata, K. Okada, T. Aoki, *ortho*-Specific α -Hydroxyalkylation of Phenols with Aldehydes. An Efficient Synthesis of Saligenol Derivatives, *Synthesis* **1979**, 365-368.
- 71 H.-D. Becker, A. Björk, E. Adler, Quinone Dehydrogenation. Oxidation of Benzylic Alcohols with 2,3-Dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1596-1600.
- 72 Y. Suzuki, H. Takahashi, *Pharm. Soc. Jap.* **1982**, 31, 1751-1753.
- 73 N. U. Hofsløkken, L. Skattebøl, Convenient Method for the *ortho*-Formylation of Phenols, *Acta Chem. Scand.* **1999**, 53, 258-262.
- 74 T. Yaegashi, S. Nunomura, T. Okutome, T. Nakayama, M. Kurmi, Y. Sakurai, T. Aoyama, S. Fujii, Synthesis and Structure-Activity Study of Protease Inhibitors. III. Amidinophenols and Their Benzoyl Ester, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, 32, 4466-4477.
- 75 Brückner, *Reaktionsmechanismen*, **2004**, 3. Auflage, 692.
- 76 S. Warnecke, unveröffentlichte Ergebnisse, *Dissertation*, **2010**.
- 77 H. J. Jessen, Synthesis and Characterisation of Fluorescent *cycloSal*-Nucleotide Analogues, *Diplomarbeit*, Hamburg, **2005**.
- 78 M. Lorey, *cycloSaligenyl*-Nucleosidomophosphat, ein neues Pro-Nucleotid-Konzept für antiviral and antitumor aktive Nucleosidanaloga, *Dissertation*, Würzburg, **1999**.
- 79 a) A. Stutz, C. Höbartner, S. Pitsch, Novel Fluorid-Labile Nucleobase-Protecting Groups for the Synthesis of 3'(2')-O-Aminoacetylated RNA Sequences, *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83, 2477-2503. b) R. Lohrmann, H. G. Khorana, Polynucleotides. XXXIV. Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. Chemical synthesis of an icosadeoxynucleotide corresponding to the nucleotide sequence 21 to 40, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 4188-4194. c) M. C. Pirrung, S. W. Shuey, D. C. Lever, L. Fallon, A convenient procedure for the deprotection of silylated

- nucleosides and nucleosides using triethylamine trihydrofluoride, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1345-1346.
- 80 H. K. Singh, G. L. Cote, R. S. Sikorski, Enzymatic Regioselective Deacetylation of 2',3',5'-Tri-O-Acylribo-nucleosides: Enzymatic Synthesis of 2',3'-Di-O-Acylribonucleosides, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5201-5204.
- 81 M. Terreni, R. Salvetti, L. Linati, R. Fernandez-Lafuente, G. Fernandez-Lorente, A. Bastida, J. M. Guisan, Regioselective enzymatic hydrolysis of acetylated pyranoses and pyranosides using immobilized lipases. An easy chemoenzymatic synthesis of α - and β -D-glycopyranose acetates bearing a free secondary C-4 hydroxyl group, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1615-1621.
- 82 A. Bastida, R. Fernandez-Lafuente, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, G. Pagani, M. Terreni, Regioselective hydrolysis of peracetylated α -D-glycopyranose catalysed by immobilized lipases in aqueous medium. A facile preparation of useful intermediates for oligosaccharide synthesis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 633-636.
- 83 T.-C. Chien, J.-W. Chern, A convenient preparation of 1,2,3-tri-O-acetyl- β -D-ribofuranose by enzymatic regioselective 5-O-deacetylation of the peracetylated ribofuranose, *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1215-1217.
- 84 B. Ren, L. Cai, L.-R. Zhang, Z.-J. Yang, L.-H. Zhang, Selective deacetylation using iodine-methanol reagent in fully acetylated nucleosides, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8083-8086.
- 85 R. Roy, F. D. Tropper, C. Grand-Maitre, Synthesis of Glycosyl Phosphates by Phase Transfer Catalysis, *Can. J. Chem.* **1991**, *69*, 1462-1467.
- 86 a) J. Coniche, G. A. Levy, Aryl Glycopyranosides by the Helferich Method, *Methods Carbohydr. Res.* **1963**, *2*, 345-347. b) I. M. Lagoja, S. Pochet, V. Boudou, R. Little, E. Lescrinier, J. Rozenski, P. Herdewijn, A short path synthesis of [$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$] multilabeled Pyrimidine Nucleosides starting from Glycopyranose Nucleosides, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1867-1871.
- 87 G. Excoffier, D. Gagnaire, J.-P. Utile, Coupure selective par l'hydrazine des groupements acetyles anomeres de residus glycosyles acetyles, *Carbohydr. Res.* **1975**, *39*, 368-373.

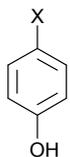
- 88 M. M. Sim, H. Kondo, C.-H. Wong, Synthesis and use of Glycosyl Phosphites: An effective Route to glycosyl Phosphates, Sugar Nucleotides and Glycosides, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2260-2267.
- 89 G. Baisch, R. Öhrlein, Convenient chemoenzymatic synthesis of β -Purine-diphosphate Sugars (GDP-fucose-analogues), *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 383-391.
- 90 R. Kuhn, P. Lutz, D. L. MacDonald, Synthesis of anomeric sialic acid methyl ketosides, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 611-617.
- 91 J. Rothermel, H. Faillart, Phase-Transfer-catalyzed synthesis of aryl α -ketosides of N-acetylneuraminic acid. A 2-methylfluoran-6-yl glycoside of N-acetylneuraminic acid, 2-methyl-6-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-nonulopyranosylonic acid)-xanthene-9-spiro-1'-isobenzofuran-3'-one, a new substrate for neuraminidase assay, *Carbohydr. Res.* **1990**, *196*, 29-40.
- 92 K. Furuhata, K. Anazawa, M. Itoh, Y. Shitori, H. Ogura, Studies on Sialic Acids. V. Synthesis of α - and β -D-Neu5Acp-(2 \rightarrow 6)-lactose, *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2725-2731.
- 93 T. M. Wrodnigg, A. E. Stütz, The Heyns Rearrangement Revisited: An Exceptionally Simple Two-Step Chemical Synthesis of D-Lactosamine from Lactulose, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 827-828.
- 94 A. E. Stütz, G. D. Dekany, B. Eder, C. Illaszewicz, T. M. Wrodnigg, An Exceptionally Simple Chemical Synthesis of O-Glycosylated D-Glycosamine Derivatives by Heyens Rearrangement of the Corresponding O-Glycosyl Fructoses, *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, *22*, 253-265.
- 95 G. D. Dekany, L. Bornaghi, J. Papageorgiou, S. Taylor, A novel amino protecting group: DTPM, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3129-3132.
- 96 Y. Kajihara, H. Hashimoto, H. Kodama, T. Wakabayashi, K. Sato, Synthesis of methyl 6'-deoxy- and 6'-thio-lactosaminides and their inhibitory activity toward CMP-NeuNAc: D-galactoside-(2 \rightarrow 6)- α -D-sialyltransferase, *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, *12*, 991-995.
- 97 Y. Kajihara, H. Kodama, T. Wakabayashi, K. Sato, H. Hashimoto, Characterisation of inhibitory activities and binding mode of synthetic 6'-

- modified methyl *N*-acetyl- β -lactosaminide toward rat liver CMP-D-Neu5Ac: D-galactoside-(2 \rightarrow 6)- α -D-sialyltransferase, *Carbohydr. Res.* **1993**, *247*, 179-193.
- 98 K. Laesecke, A. Köhn, R. R. Schmidt, α -Glucosidasen-Inhibitoren, 1. Synthese von modifizierten Maltosen *Liebigs. Ann. Chem.* **1983**, *8*, 1429-1438.
- 99 H. J. Jessen, Investigations of the Intracellular Release of Nucleoside Phosphates, *Dissertation*, Hamburg, **2008**.
- 100 L. Zarvas, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1931**, *64*, 2289-2296.
- 101 X. Su, D. S. Surry, R. J. Spandl, D. R. Spring, Total Synthesis of Sanguiin H-5, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2593-2596.
- 102 K. S. Feldman, M. D. Lawlor, K. Sahasrabudhe, Ellagitannin Chemistry. Evolution of a Three-Component Coupling Strategy for the Synthesis of the Dimeric Ellagitannin Coriariin A and a Dimeric Gallotannin Analogue, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8011-8019.
- 103 W. A. Szarek, A. Zamojski, K. N. Tiwari, E. R. Ison, A new, facile Method for cleavage of acetals and dithioacetals in carbohydrate derivatives, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3827-3830.
- 104 a) K. Tanemura, T. Suzuki, T. Horaguchi, ChemInform Abstract: 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone as a Mild and Efficient Catalyst for the Deprotection of Acetals, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, *14*, 979-980.
b) M-D. Desruet, C. Morin, L. Ogier, Synthesis of iodobenzylidene and iodoethylidene acetals of D-glucose, *Carbohydr. Res.* **1997**, *301*, 225-229.
- 105 L. I. Zakharkin, I. M. Khorlina, Reduction of substituted amides of acids to aldehydes and amines by means of diisobutylaluminium hydride, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1959**, 2255-2257.
- 106 L. I. Zakharkin, V. I. Stanko, Y. A. Chapovskii, Reaction of acetals and ortho esters with decaborane and diacetonitriledecaborane, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1962**, 1118-1119.
- 107 E. Frainnet, R. Calas, A. Bazouin, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1960**, 1480-1481.
- 108 B. Fleming, H. I. Bolker, Reductive Cleavage of Acetals and Ketals by Borane. Part II. The Kinetics of the Reaction, *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 888-893.
- 109 a) E. L. Eliel, V. G. Badding, M. N. Rerick, Reduction with Metal Hydrides. XII. Reduction of Acetals and Ketals with Lithium Aluminum Hydride-Aluminum

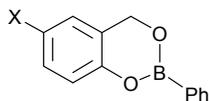
- Chloride, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 2371-2377. b) B. E. Leggetter, R. K. Brown, The influence of substituents on the ease and direction of ring opening in the $\text{LiAlH}_4\text{-AlCl}_3$ reductive cleavage of substituted 1,3-dioxolanes, *Can. J. Chem.* **1964**, *62*, 990-1004.
- 110 A. Liptak, I. Jodal, P. Nanasi, Stereoselective ring-cleavage of 3-O-benzyl- and 2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzylidenehexopyranoside derivatives with the $\text{LiAlH}_4\text{-AlCl}_3$ reagent, *Carbohydr. Res.* **1975**, *44*, 1-11.
- 111 H. Yuasa, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, Chemical-enzymatic synthesis of 5'-thio-*N*-acetylactosamine: the first disaccharide with sulfur in the ring of the non-reducing sugar, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5891-5892.
- 112 a) D. B. Boyd, W. Lipscomb, *J. Theor. Biol.* **1969**, *25*, 403-420. b) D. G. Watson, O. Kennard, The structure of 'high-energy' phosphate compounds. II. An X-ray analysis of the cyclohexylammonium phosphoenolpyruvate, *Acta Crystallogr. B*, **1973**, *29*, 2358-2364. c) H.-J. Haupt, P. Balsaa, U. Flörke, Neuer Typ eines ungesättigten *triangulo*-Übergangsmetallclusters und Homogenkatalysators, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 280-281.
- 113 V. Tonn, *Dissertation in Vorbereitung*, Hamburg, **2007-2010**.
- 114 S. Wolf, Synthese von Cytidindiphosphatglycopyranosen mit Hilfe von *cycloSal*-aktivierten Phosphatdonatoren, *Diplomarbeit*, Hamburg, **2008**.
- 115 C. D. Poulter, D. T. Fox, Synthesis of (E)-4-Hydroxydimethylallyl Diphosphate. An Intermediate in the Methyl Erythriol Phosphate Branch of the Isoprenoid Pathway, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5009-5410.
- 116 M.-C. Chapeau, P. A. Frey, Synthesis of UDP-4-Hydroxydimethylallyl Diphosphate. An Intermediate in the Methyl Erythriol Phosphate Branch of the Isoprenoid Pathway, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6994-6998.
- 117 J. Gardiner, R. W. Horobin, Determination of the Molecular Weights of Dyes by Thin-Layer Gel Filtration on Sephadex LH-20, *J. Chromatogr.* **1969**, *44*, 509-521.
- 118 M. Joustra, B. Söderqvist, L. Fischer, Gel Filtration in Organic Solvents, *J. Chromatogr.* **1967**, *28*, 21-25.
- 119 O. Hindsgaul, G. Srivastavo, G. Alton, Combined Chemical-enzymatic Synthesis of Deoxygenated Oligosaccharide Analogs: Transfer of Deoxygenated D-GlcpNAc Residues from their UDP-GlcpNAc Derivatives

- using N-Acetylglucosaminyltransferase I, *Carbohydr. Res.* **1990**, *207*, 259-276.
- 120 a) G. Burnett, E. P. Kennedy, The enzymatic phosphorylation of proteins, *J. Biol. Chem.* **1954**, *211*, 969–980. b) A. J. Cozzone, Protein phosphorylation in prokaryotes, *Annu. Rev. Microbiol.* **1988**, *42*, 97–125. c) J. B. Stock, A. J. Ninfa, A. M. Stock, Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria, *Microbiol. Rev.* **1989**, *53*, 450–490. d) C. Chang, R. C. Stewart, The two-component system: Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes, *Plant Physiol.* **1998**, *117*, 723–31. e) D. Barford, A. K. Das, M. P. Egloff, The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 133–164.
- 121 K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, 5. Auflage, Springer-Verlag, **2004**, 105-108.
- 122 D. M. Burns, I. R. Beacham, Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *E. coli* ushA gene, encoding periplasmic UDP-sugar hydrolase (5'-nucleotidase): regulation of the ushA gene, and the signal sequence of its encoded protein product, *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 4325-4342.
- 123 N. Sträter, W. N. Lipscomb, T. Klabunde, B. Krebs, Enzymatische Acyl- und Phosphoryltransferreaktionen unter Beteiligung von zwei Metallionen, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2158-2191, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2024-2055.
- 124 C. R. Faltynek, J. E. Silbert, L. Hof, Inhibition of the Action of Pyrophosphatase and Phosphatase on Sugar Nucleotides, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 7139-7141.
- 125 A. Kobata, The Acid-Soluble Nucleotides of Milk: II. Isolation and Identification of Two Novel Uridine Nucleotide Oligosaccharide Conjugates from Human Milk and Colostrum, *J. Biochem.* **1963**, *53*, 167-175.
- 126 J. F. Aparicio, P. Caffrey, J. A. Gil, S. B. Zotchev, Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 179.
- 127 N. Palaniappan, S. Ayers, S. Gupta, E. S. Habib, K. A. Reynolds, Production of hygromycin A analogues in *Streptomyces hygrosopicus* NRRL 2388 through identification and manipulation of the biosynthetic gene cluster, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 753.

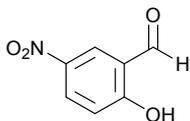
Verbindungsübersicht



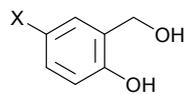
91 X: -CN
92 X: -SCH₃



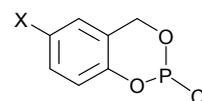
93 X: -CN
94 X: -SCH₃



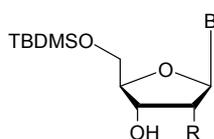
90 X: -NO₂
97 X: -CN
98 X: -Br



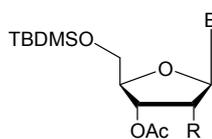
89 X: NO₂
95 X: -CN
96 X: -SO₂CH₃
99 X: -Br



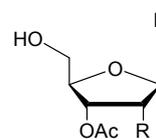
100 X: -NO₂
101 X: -SCH₃



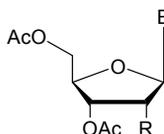
105 B = U, R = OH
106 B = G^{NHAc}, R = OH
107 B = G^{NHAc}, R = H



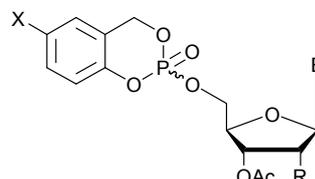
108 B = U, R = OAc
109 B = G^{NHAc}, R = OAc
110 B = G^{NHAc}, R = H



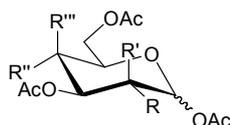
111 B = U, R = OAc
112 B = G^{NHAc}, R = OAc
113 B = G^{NHAc}, R = H



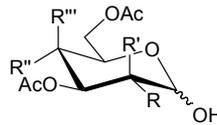
115 B = G^{NHAc}, R = OAc
116 B = G^{NHAc}, R = H



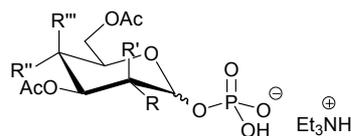
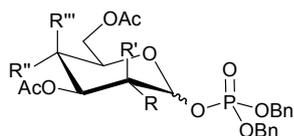
117 B = U, R = OAc, X = NO₂
118 B = G^{NHAc}, R = OAc, X = NO₂
119 B = G^{NHAc}, R = H, X = NO₂
120 B = U, R = OAc, X = CH₃SO₂
121 B = G^{NHAc}, R = OAc, X = CH₃SO₂
122 B = G^{NHAc}, R = H, X = CH₃SO₂



128 Glc R' = R''' = H, R = R'' = OAc
129 Gal R' = R''' = H, R = R'' = OAc
130 Man R = R''' = H, R' = R'' = OAc
131 GlcNAc R' = R''' = H, R'' = OAc, R = NHAc
132 GalNAc R' = R'' = H, R''' = OAc, R = NHAc
134 LacNAc R' = H, R'' = OAc, R = NHAc,
R''' = TetraOAcGal-β-

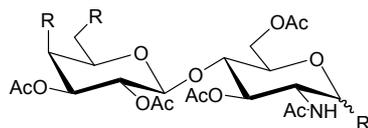
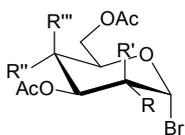


135 Glc R' = R''' = H, R = R'' = OAc
136 Gal R' = R'' = H, R = R''' = OAc
137 Man R = R''' = H, R' = R'' = OAc
138 GlcNAc R' = R''' = H, R'' = OAc, R = NHAc
139 GalNAc R' = R'' = H, R''' = OAc, R = NHAc
140 LacNAc R' = H, R'' = OAc, R = NHAc,
R''' = TetraOAcGal-β-



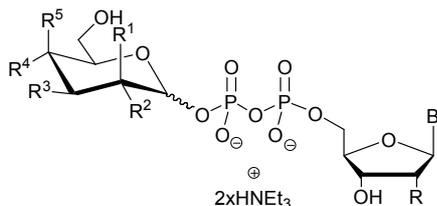
- 141a/b** α/β -Glc R' = R''' = H, R = R'' = OAc
142a/b α/β -Gal R' = R''' = H, R = R'' = OAc
143 α -Man R = R''' = H, R' = R'' = OAc
144 α -GlcNAc R' = R''' = H, R'' = OAc, R = NHAc
145 α -GalNAc R' = R''' = H, R''' = OAc, R = NHAc
146 α -LacNAc R' = H, R'' = OAc, R = NHAc,
 R''' = TetraOAcGal- β -

- 147a/b** α/β -Glc R' = R''' = H, R = R'' = OAc
148a/b α/β -Gal R' = R''' = H, R = R'' = OAc
149 α -Man R = R''' = H, R' = R'' = OAc
150 α -GlcNAc R' = R''' = H, R'' = OAc, R = NHAc
151 α -GalNAc R' = R''' = H, R''' = OAc, R = NHAc
67 α -LacNAc R' = H, R'' = OAc, R = NHAc,
 R''' = TetraOAcGal- β -



- 152** Glc R' = R''' = H, R = R'' = OAc
153 Gal R' = R''' = H, R = R'' = OAc
154 GlcNAc R' = R''' = H, R'' = OAc, R = NHAc

- 165** R = 4',6'-OCHPh, R' = OAc
166 R = 4',6'-OCHPh, R' = OH
167 R = 4',6'-OCHPh, R' = OPO(OBn)₂
163 R = OH, R' = OPO(OBn)₂
168 R = OH, R' = OAc



B = U, R = OH:

- 1a** UDP- α -Glc R¹ = R⁵ = H, R² = R³ = R⁴ = OH
1b UDP- β -Glc R¹ = R⁵ = H, R² = R³ = R⁴ = OH
57a UDP- α -Gal R¹ = R⁴ = H, R² = R³ = R⁵ = OH
57b UDP- β -Gal R¹ = R⁴ = H, R² = R³ = R⁵ = OH
52 UDP- α -Man R² = R⁵ = H, R¹ = R³ = R⁴ = OH
7 UDP- α -GlcNAc R¹ = R⁵ = H, R³ = R⁴ = OH, R² = NHAc
177 UDP- α -GalNAc R¹ = R⁴ = H, R³ = R⁵ = OH, R² = NHAc
8 UDP- α -LacNAc R¹ = R⁵ = H, R³ = OH, R² = NHAc, R⁴ = Gal- β -

B = G, R = OH:

- 186b** GDP- β -Gal R¹ = R⁴ = H, R² = R³ = R⁵ = OH
187 GDP- α -Man R² = R⁵ = H, R¹ = R³ = R⁴ = OH
188 GDP- α -GlcNAc R¹ = R⁵ = H, R³ = R⁴ = OH, R² = NHAc
189 GDP- α -GalNAc R¹ = R⁴ = H, R³ = R⁵ = OH, R² = NHAc

B = G, R = H:

- 180** dGDP- β -Glc R¹ = R⁵ = H, R² = R³ = R⁴ = OH
175 dGDP- α -Gal R¹ = R⁴ = H, R² = R³ = R⁵ = OH
190 dGDP- α -Man R² = R⁵ = H, R¹ = R³ = R⁴ = OH
191 dGDP- α -GlcNAc R¹ = R⁵ = H, R³ = R⁴ = OH, R² = NHAc
192 dGDP- α -GalNAc R¹ = R⁴ = H, R³ = R⁵ = OH, R² = NHAc

Lebenslauf

Persönliche Daten

Tanja Zismann

geboren am 11. August 1981 in Pawlodar

Schul- und Hochschulausbildung

09/1988-07/1998	Gesamtschule Nr. 29 in Pawlodar
09/1998-06/2000	Studium der Chemischen Technologien Anorganischer Substanzen, Staatliche Universität in Pawlodar
10/2001-02/2007	Studium der Chemie, Universität Hamburg
04/2005-07/2005	Praktikum in der Arbeitsgruppe von Prof. M. McGlinchey, University College Dublin
05/2006-02/2007	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Meier, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg
04/2007-07/2011	Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Meier, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg

Zusatzstudium

2009-2010	Gewerblicher Rechtsschutz für Ingenieure und Naturwissenschaftler, FernUniversität Hagen
-----------	--

Studentische Tätigkeit

10/2006-03/2007	Betreuung der Übungen „Grundlagen der Allgemeinen Chemie“ für Studierende der Nebenfächer, Betreuung des Chemischen Praktikums für Mediziner, Betreuung des Ferienpraktikums Organische Chemie für Schülerinnen und Schüler
-----------------	---

Universitäre Tätigkeit

2007-2010	Betreuung des Integrierten Fortgeschrittenenpraktikums für Studierende des Höheren Lehramtes, Betreuung des Grundpraktikums der Organischen Chemie für Studierende des Hauptfaches Chemie, Betreuung des Chemischen Praktikums für Zahnmediziner
-----------	--

Publikationen

T. Zismann, C. Meier, Improved Synthesis of Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, 52, 563-564.

S. Wolf, T. Zismann, N. Lunau, C. Meier, Reliable Synthesis of Various Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 7656-7664.

S. Wolf, T. Zismann, N. Lunau, S. Warnecke, S. Wendicke, C. Meier, A convenient synthesis of nucleoside diphosphate glycopyranoses and other phosphorylated bioconjugates, *Eur. J. Cell Biol.* **2010**, 89, 63-75.

Posterbeiträge

T. Zismann, C. Meier, Improved Synthesis of Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses, The Joint Symposium of the 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and the 35th Symposium on Nucleic Acids Chemistry, September 2008, Kyoto, Japan.

S. Wolf, N. Lunau, T. Zismann, C. Meier, Synthesis of Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses, 15th European Carbohydrate Symposium, Juli 2009, Wien, Austria.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwandt habe.

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

Ich habe früher außer mit den im Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Hamburg, den 15.04.2011