

**Chemo-enzymatische Synthese neuartiger
Di- und Trisaccharid-Mimetika als Liganden für das
NKR-P1-Rezeptorprotein Natürlicher Killerzellen**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Saskia Weingarten

aus Hamburg

Hamburg 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Thiem
 2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Francke
- Tag der Disputation: 14.11.2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1999 bis August 2003 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Thiem am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Joachim Thiem möchte ich nicht nur für die interessante Themenstellung, die großzügige Unterstützung und die freundliche Betreuung im Verlauf dieser Arbeit, sondern auch für den wissenschaftlichen Freiraum bei der Ausgestaltung des Themas und insbesondere für die Möglichkeit, an mehreren Fachkonferenzen teilnehmen zu können, danken.

Für Ulrich

1	Einleitung	1
1.1	Liganden für NKR-P1	3
2	Zielsetzung	6
3	Kenntnisstand	8
3.1	Glycomimetika	8
3.1.1	Strategien zur Imitation der glycosidischen Bindung.....	8
3.2	Reduktive Aminierung von Kohlenhydraten.....	12
3.3	Enzymatische Glycosylierungen	14
3.3.1	β -Galactosidase aus <i>Bacillus circulans</i>	15
4	Syntheseplan	27
5	Reaktionsfolge A: Glycosylierung mit folgender Derivatisierung des Di-	
	saccharids	30
5.1	Galactose-Oxidase	31
6	Reaktionsfolgen B und C: Derivatisierung des Monosaccharids.....	34
6.1	Synthese von Donoren mit Aldehydprecursor-Funktionalität.....	34
6.1.1	Synthese von 4-Nitrophenyl- β -D-galacto-hept-6-eno-1,5-pyranosid (56) und 4-Nitrophenyl-6-O-allyl- β -D-galactopyranosid (57).....	36
6.2	Synthese eines Donors mit Aldehyd-Funktionalität.....	43
6.2.1	Selektive chemische Oxidation.....	44
6.2.2	Enzymatische Oxidation.....	46
6.2.3	Nicht-selektive Oxidationsversuche an <i>p</i> NP-Gal	48
6.3	Synthese von Donoren mit Aminvorläufer- und Amin-Funktionalität	54
7	Reaktionsfolgen B und C: β-Galactosidase-katalysierte Glycosylierungen mit neuen Glycosyldonoren.....	57
7.1	Precursor-funktionalisierte Donoren	58
7.2	Aldehyd- und Amin-funktionalisierte Donoren	59
7.3	Weitere chemo-enzymatische Glycosylierungen	61
8	Enzymkinetik	64
9	Reduktive Aminierung.....	84
9.1	Synthese der Aminosucker	84
9.2	Testumsätze mit einem Modell-Aldehyd	88
9.3	Reduktive Aminierungen mit dem Aldehyd-funktionalisierten Disaccharid	90
10	Zusammenfassung	92
11	Experimenteller Teil.....	98

Inhalt

11.1	Allgemeine Arbeitsmethoden	98
11.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	100
11.3	Spezielle Arbeitsvorschriften	102
11.4	Kinetische Messungen	164
12	Gefahrenhinweise	168
13	Literatur	172

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
AcCl	Acetylchlorid
AG	Antigen
AIBN	Azoisobutyronitril, 2,2'-Azobis(2-methylpropionitril)
AK	Antikörper
All	Allyl
Alloc	Allyloxycarbonyl
<i>n</i> BuOH	<i>n</i> -Butanol
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DLNN	Degalactosyliertes Lacto- <i>N</i> -neotetrasaccharid, GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMP	Dess-Martin-Periodinan, 1,1,1-Triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3-(1 <i>H</i>)-on
2,2-DMP	2,2-Dimethoxypropan
DMSO	Dimethylsulfoxid
EE	Ethylacetat
Et	Ethyl
f	furanosid
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin, 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin, 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose
GM2	Tetrasaccharid des Gangliosidtyps, GalNAcβ1→4(NeuAcα1→3)Galβ1→4Glc
GO	Galactose-Oxidase
HTS	High Throughput Screening
IS	Heparin-verwandtes Disaccharid, (2HSO ₃)ΔUA1→4(2,6HSO ₃)GlcN
LacNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin

Abkürzungsverzeichnis

kD	Kilodalton, 1 kD entspricht 1000 g/mol
Man	Mannose
Me	Methyl
Mip	Methoxyisopropyl, 1-Methoxy-1-methylethyl
Ms	Mesyl, Methansulfonyl
MU	Methylumbelliferyl
NK-Zelle(n)	Natürliche Killerzelle(n)
<i>o</i> NP	<i>ortho</i> -Nitrophenyl
p	pyranosid
PE	Petrolether
Ph	Phenyl
Phth	Phthalimid(o)
<i>p</i> NP	<i>para</i> -Nitrophenyl
<i>p</i> NP-OH	<i>para</i> -Nitrophenol
<i>p</i> NP-Gal	<i>para</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
<i>p</i> NP-Man	<i>para</i> -Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid
<i>p</i> -TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
Py	Pyridin
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TCA	Trichloracetonitril
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Troc	Trichlorethoxycarbonyl
Ts	Tosyl, <i>p</i> -Toluolsulfonyl
U	Units

1 Einleitung

Den Tod körpereigener Zellen, die Virus befallen oder zu malignen Zellen mutiert sind, lösen in einem ersten Angriff des Immunsystems Natürliche Killerzellen^{1,2} aus. Diese sind Teil einer faszinierenden und umfangreichen Verteidigungsstrategie, die Wirbeltiere im Laufe der Evolution gegen Fremdkörper, die die Barriere der Haut oder Schleimhäute überwunden haben, und schadhafte Zellen entwickelt haben. Das Immunsystem umfasst auf der Zellebene Makrophagen, Granulocyten, verschiedene Lymphocyten-Typen sowie Plasmazellen. Auf molekularer Ebene nehmen vor allem die Immunglobuline eine herausragende Position ein. Je nach Art der verteidigenden Elemente unterteilt man das Immunsystem in einen humoralen und einen zellulären Part, die sich auch in der Art der zu bekämpfenden Krankheitserreger unterscheiden. In die Blutbahn oder in das Gewebe eingedrungene Bakterien und Toxine werden über bestimmte antigene Strukturelemente, in der Regel Kohlenhydratepitope von bis zu sieben Monosaccharidresten oder Peptide in der Größe von maximal 30 Aminosäuren, die einem höhermolekularen Polysaccharid bzw. Protein angehören, erkannt, indem induzierbare Zellen des Immunsystems, genauer B-Lymphocyten, die über hochspezifische Rezeptoren mit Antikörper-Struktur verfügen, diese binden. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Differenzierung der B-Lymphocyten mit „passendem“ Antikörper zu B-Gedächtniszellen, die im Fall einer wiederholten Infektion mit genau dem gleichen Erreger schnell reagieren können, einerseits und zu Plasmazellen, die den Rezeptor monoklonal in Form frei zirkulierender, Membran unabhängiger Antikörper (Immunglobuline) in großer Menge produzieren und sekretieren, andererseits. Schätzungen zufolge sekretiert eine einzige Plasmazelle während der wenigen Tage ihrer Lebensdauer 2000 Antikörper pro Sekunde.³ In der folgenden, reversiblen AG-AK-Reaktion werden kleinere Toxine blockiert oder präzipitiert und damit unschädlich gemacht, während von AK markierte Zellen agglutiniert werden, was entweder deren Lyse durch nachfolgende unspezifische Komplementbindung einleitet oder zu einer erleichterten Phagocytose der Konglomerate führt.

Viren verbringen einen großen Teil ihres Reproduktionscyclus innerhalb der Wirtszelle, weshalb ihr Ausfällen mit Hilfe von Immunglobulinen den größten Teil der Zeit nicht möglich ist. Eine dennoch wirkungsvolle Bekämpfung ermöglicht das zelluläre Immunsystem, das auch die Abwehr von Fremdgewebe, Pilz befallenen oder Tumorzellen übernimmt. Nach dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle verdaut diese dasselbe und präsentiert bestimmte Fragmente, gebunden an Proteine der MHC1-Klasse, auf ihrer Oberfläche, wo der MHC1-Virusfragment-Komplex ein nun zugängliches Antigen bildet. Um

die Virenproduktion vollständig zu unterbinden, muss die kranke Zelle zerstört werden, was die Aufgabe von cytotoxischen T-Zellen (T-Killerzellen) ist. Deren ähnlich den Antikörpern der B-Zellen Antigen spezifische Rezeptoren vermitteln eine enge Anbindung der Killerzelle an die kranke Zelle, woraufhin erstere dann Perforin^{4,5} und Leukalexerin^{6,7} freisetzt, Proteine, die in die Membran der Zielzelle aufgenommen werden und sich dort in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen derart zu Oligomeren anordnen, dass große Löcher oder Poren entstehen, die Wasser und Salze ungehindert eindringen lassen, was die befallene Zelle schließlich zum Platzen bringt.^{8,9} Einem ähnlichen Prinzip liegt die Wirkweise der eng mit den cytotoxischen T-Zellen verwandten Natürlichen Killerzellen, die 5-10 % der gesamten Lymphocytenpopulation ausmachen,¹⁰ zugrunde, mit dem gravierenden Unterschied, dass diese keine Antigen spezifischen Rezeptoren besitzen. Cytokin-stimuliert erfolgt der Angriff vielmehr recht unspezifisch, über ein C-Lectin-artiges Rezeptorprotein, auf verschiedene Zellen. Gesunde Körperzellen verhindern ihre Austilgung, indem sie, bevor der Prozess ihrer Lyse einsetzen kann, die Killerzellen durch Bindung an ein zweites Rezeptorprotein, Ly-49 genannt, das ein stärkeres, negatives Lyse-Signal aussendet, stoppen (Abb. 1).¹¹

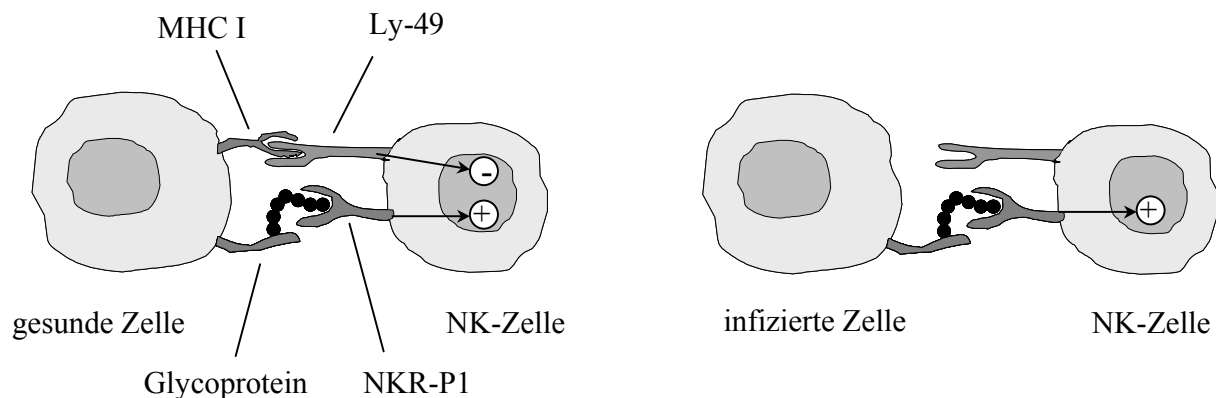


Abb. 1 Zwei-Rezeptor-Modell: Eine gesunde Zelle bindet an NKR-P1 und sendet damit ein positives Signal zur Lyse aus, was jedoch durch die gleichzeitige Bindung an Ly-49, die ein negatives Lyse-Signal bewirkt, überdeckt wird. Einer infizierten oder Tumor-Zelle fehlen die Strukturelemente, um an den Ly-49-Rezeptor zu binden, so dass das positive Lyse-Signal zur Wirkung kommt.

Als bindende Liganden für Ly-49 wurden bestimmte Glycoproteine des MHC-I-Typs identifiziert.¹² Dass die Zelloberflächenstrukturen virusinfizierter oder maligner Zellen weniger MHC-1-Moleküle präsentieren als gesunde Zellen¹⁰ und charakteristische Veränderungen im Glycosylierungsmuster aufweisen,¹³ ist bekannt. Das Fehlen solcher Strukturmerkmale bewirkt, dass eine Anbindung an den Ly-49-Rezeptor der NK-Zelle und damit das Aussenden des die Lyse unterdrückenden Signals nicht erfolgen, und in Konsequenz die kranke Zelle zerstört wird.¹⁴

Die Stimulierung der NK-Zellen erfolgt über die Wechselwirkung zwischen einem C-Lectin-artigen Transmembranprotein, NKR-P1,^{15,16} auf Seiten der Killerzelle und bestimmten Kohlenhydratstrukturen, die in Kombination mit Ca^{2+} -Ionen binden, auf der Zelloberfläche der entarteten Körperzellen.^{14,17} Als natürliche Liganden für NKR-P1 werden Oberflächen-Ganglioside und -Proteoglycane vermutet,¹⁴ was durch die Beobachtung untermauert wird, dass NK-resistente Tumorzellen, die also durch NK-Zellen nicht zerstört werden, derartige Strukturen kaum besitzen.¹⁸ Die Resistenz lässt sich folglich darauf zurückführen, dass diesen Zellen nicht nur die Liganden für den negativen Rezeptor, sondern auch die zur Anbindung an den das positive Lyse-Signal vermittelnden fehlen.¹⁸ Genauere Untersuchungen der Bindung zwischen Tumor- und NK-Zelle wurden möglich, nachdem es *Bezouška et al.*¹⁷ gelungen ist, eine lösliche Form des Rezeptorproteins NKR-P1 zu klonieren und in *E. coli* zu exprimieren, womit ein System zur Verfügung steht, das die Ermittlung der Bindungsaffinität verschiedener Kohlenhydratstrukturen zu NKR-P1 *in vitro* erlaubt.

Mit dem Forschungsziel, ein genügend genaues Verständnis des molekularen Mechanismus der NK-Zell-Aktivität zu erhalten, um das gewonnene Wissen für gezielte Anti-Tumor und antivirale Immuntherapien einsetzen zu können, wurden verschiedenste Liganden im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Natürliche Killerzellen zu aktivieren, untersucht.^{17,18,19, 20,21,22,23}

1.1 Liganden für NKR-P1

Die höchste Affinität der zahlreichen getesteten Kohlenhydrate zu NKR-P1 zeigen verschiedene sulfatierte Polysaccharide des Glycosaminoglycan-Typs: Die Chondroitinsulfate A, B und C, Keratansulfat (Abb. 2) und Heparin (Abb. 3) weisen IC_{50} -Werte von 10^{-12} bis $5 \cdot 10^{-5}$ g/ml auf (ermittelt gegen DLNN), was bei einer angenommenen Molmasse von 10 000 g/mol einem IC_{50} -Wert von 10^{-16} bis $5 \cdot 10^{-9}$ M entspricht.¹⁸ Für therapeutische Zwecke sind jedoch weniger große Moleküle als Polysaccharide besser geeignet, da letztere üblicherweise zu geringe *in-vivo*-Halbwertszeiten aufweisen. Dementsprechend durchgeführte Affinitäts-experimente mit verschiedensten Oligosacchariden zeigen, dass bereits kleine Kohlenhydrate des Chondroitinsulfat- und des Heparin-Typs (solche des Keratansulfat-Typs wurden nicht getestet) genügend stark, also mit Inhibitionswerten im höchstens nanomolaren Bereich, binden. Dabei nimmt die Affinität zu NKR-P1 zwar vom Tetra- zum Disaccharid ab, ebenso wie jede formale Substitution einer Sulfat- durch eine Hydroxylgruppe in einer verringerten Bindungsstärke resultiert, dennoch zeigen bereits Disaccharide mit nur einer Sulfat-Funktionalität IC_{50} -Werte im weniger als nanomolaren Bereich. Grundsätzlich wirken sich

anionische Funktionalitäten in 3-, 4- und/oder 6-Position des Zuckers positiv auf die Affinität aus, wie auch 2-Acetamido-Substituenten im Vergleich zu Hydroxylgruppen zu verbesserten Bindungseigenschaften führen. So haben sich neben sulfatierten kleinen Oligosacchariden als gute Liganden auch solche des Gangliosid-Typs (z. B. Abb. 4),¹⁸ ebenso wie nicht-natürlicherweise auf der Zelloberfläche vorkommende kleine Chitooligomere sowie bestimmte andere 2-Acetamido-2-desoxyglycosid-haltige Oligosaccharide erwiesen.²⁴

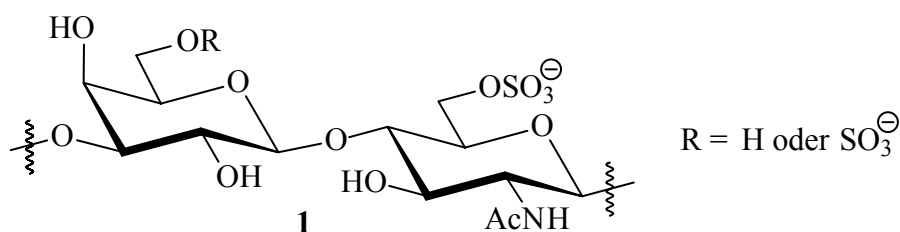


Abb. 2 Disacchariduntereinheit des Keratansulfats

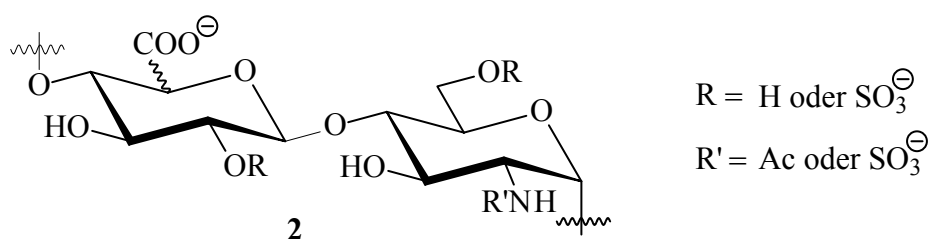


Abb. 3 Disacchariduntereinheit des Heparins (IS: $R, R' = SO_3^-$)

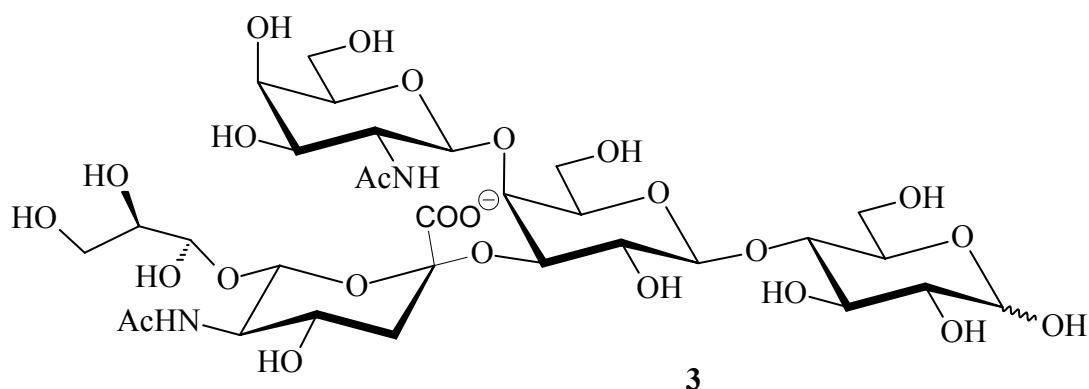


Abb. 4 GM2, ein Ligand des Gangliosidtyps

Über die Messung der Bindungsaffinitäten hinaus wurde am Beispiel zweier der untersuchten Kohlenhydratstrukturen, IS (Abb. 3), einem Disaccharid des Heparin-Typs, und GM2 (Abb. 4), einem Tetrasaccharid des Gangliosid-Typs, die prinzipielle Möglichkeit nachgewiesen, durch das Aufbringen der Liganden auf die Zelloberfläche NK-resistenter Tumorzellen diese in NK-zugängliche zu transformieren und somit einer Lyse durch die Killerzellen auszusetzen. Das Einbringen der Kohlenhydratstrukturen in die Tumorzelle solcherart, dass

diese jene auf ihrer Zelloberfläche präsentiert, erfolgte durch Einschluss der Liganden in Liposomen, die antikörpergeleitet zu den Tumorzellen geführt und dort durch Fusion mit der Plasmamembran der Zelle aufgenommen wurden. In *in-vitro*-Experimenten wurden NK-resistente Tumorzellen mit den präparierten Liposomen vorinkubiert und dann mit NK-Zellen inkubiert, was, wie angestrebt, die Lyse ersterer bewirkte. Ein Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und der Inositolphosphat-Produktion bestätigte die Aktivierung der NK-Zellen.¹⁸

Die Anwendbarkeit der Methode wurde auch in *in-vivo*-Experimenten unter Beweis gestellt, in denen eine intravenöse oder auch intraperitoneale Applikation ebenso präparierter Liposomen das Ausbrechen eines induzierten Dickdarmkrebses bei Ratten merklich unterdrücken konnte. Im Falle einer Behandlung mit IS verringerte sich die Zahl der krebsskranken Tiere um 41 %, im Falle von GM2 um 47 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.²⁵ Während *in vitro* IS den besseren Liganden darstellte ($\text{IC}_{50}(\text{IS}) = 10^{-11} \text{ M}$, $\text{IC}_{50}(\text{GM2}) = 10^{-8} \text{ M}$), erwies sich *in vivo* somit interessanterweise GM2 als wirksamer.

2 Zielsetzung

Mit den bisherigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass bestimmte Kohlenhydrate gute Liganden für NKR-P1 darstellen, dass sie Natürliche Killerzellen stimulieren, dass und wie Kohlenhydrate in NK-resistente Tumorzellen eingebracht werden können und dass durch diese Behandlung eine Tumorbildung merklich zu stoppen ist – kurz, eine prinzipielle Eignung von Kohlenhydratstrukturen als Immunomodulatoren ist belegt und auch eine Methodik, diese therapeutisch zu nutzen, liegt vor. Notwendig ist es nun, verbesserte Ligandenstrukturen zu gestalten. Bei den bisher gefundenen Strukturen wirkt sich nachteilig aus, dass die sehr gut an das Lectin bindenden Moleküle zum einen *in vivo* ziemlich instabil und zum anderen ausgesprochen teuer sind. Wünschenswert sind kleine Moleküle, die über mehrere Stunden metabolisch stabil sind, die eine (noch) höhere Affinität, Aktivität und letztendlich Wirksamkeit *in vivo* aufweisen, die schnell, einfach und kostengünstig zugänglich sind, und die hinsichtlich ihrer Toxizität natürlich unbedenklich sind.

Verursacht wird eine kurze *in-vivo*-Halbwertszeit überwiegend durch Glycosidasen, die das Molekül durch Hydrolyse seiner glycosidischen Bindungen in seine Bestandteile zersetzen. Während die glycosidische Bindung im physiologischen pH-Bereich in Abwesenheit von Enzymen mit einer Halbwertszeit von ca. 5 Mio Jahren die stabilste aller natürlichen Verknüpfungen von Biopolymeren darstellt, bewirken Glycosidasen eine Beschleunigung der Hydrolyse etwa um den Faktor 10^{17} , so dass die Halbwertszeit auf $1.6 \cdot 10^{-3}$ s fällt.²⁶ Hinsichtlich der metabolischen Stabilität gilt es demnach, diese besonders prädestinierten Angriffspunkte im Molekül zu kaschieren. Eine Maskierung der terminalen Monosaccharideinheit oder eine Imitation der glycosidischen Bindung, wie sie in einer Reihe von Glycomimetika-Klassen verwirklicht ist, vermag dem Abbau entgegenzuwirken.

Die Affinität und Aktivität anbelangend hat es sich *in vitro* von Vorteil erwiesen, negative Ladung in Form von Sulfat- oder Carboxylatgruppen im Molekül zu platzieren, für eine gute *in-vivo*-Wirksamkeit scheint dies jedoch nicht ganz so entscheidend zu sein. In jedem Fall sollte das Molekül aus GlcNAc-, Glc-, GalNAc- und/oder Gal-Einheiten zusammengesetzt sein. Da Heparin, Chondroitinsulfat und Keratansulfat hochaffine Liganden mit sehr guten Bindungseigenschaften darstellen und auch den untersuchten Disacchariden mit Heparin- und Chondroitinsulfat-Struktur diese Eigenschaft innewohnt, ist es zum einen vielversprechend, den Disaccharid-Untereinheiten des Keratansulfats ähnliche Leitstrukturen für eine Synthese zu wählen. Zum anderen haben sich neutrale 2-Acetamido-substituierte Glycoside als

wirksame Liganden erwiesen, so dass es ebenso aussichtsreich erscheint, an die erfolgreich getesteten Gangliosid-Strukturen frei angelehnte Trisaccharide darzustellen.

Im Zuge einer schnellen, einfachen und kostengünstigen Synthese ist es zweckmäßig, die Moleküle in wenigen Stufen und durch Reaktionen in wässrigen Systemen zu bilden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Methode ausgearbeitet werden, die die flexible Darstellung von Glycomimetika als Liganden für NKR-P1 ermöglicht. Aufbauend auf *N*-Acetyl-lactosamin (LacNAc) als Grundgerüst sollen Kohlenhydrate synthetisiert werden, die in C-6'-Position entweder einen Substituenten mit Säurefunktionalität oder einen dritten Monosaccharidrest, vorzugsweise GlcNAc, tragen. Um einem enzymatischen Abbau vorzubeugen, sollten die Substituenten auf unnatürliche Weise mit dem Disaccharid verknüpft sein. Besonders attraktiv erscheint hierbei eine Verbrückung in Form eines Amins, da sich Liganden mit stickstoffhaltigen Substituenten stets als affiner gezeigt haben als ihre rein hydroxylierten Pendants und da sekundäre Amine metabolisch verhältnismäßig stabil sind.

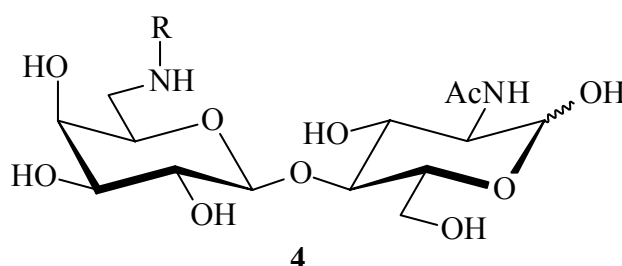


Abb. 5 Zielstrukturen: R = Substituent mit Säurefunktionalität oder Monosaccharidrest

Eine effiziente Synthese lässt sich durch Einführung der Amino-Substituenten mittels reduktiver Aminierung am entsprechend derivatisierten Disaccharid einerseits sowie durch Nutzung chemo-enzymatischer Glycosylierungstechniken zum Aufbau der Disaccharid-Grundstruktur andererseits verwirklichen. Die Bedingungen der enzymatischen Glycosylierung und die Fähigkeiten des die Glycosylierung katalysierenden Enzyms zu erforschen, bildet den Schwerpunkt der Arbeit.

3 Kenntnisstand

3.1 Glycomimetika

Die Entwicklung neuer Glycomimetika²⁷ ist ein aktuelles Forschungsgebiet der modernen Kohlenhydratchemie. So behandelte auf der jüngsten Fachkonferenz (*12th European Carbohydrate Symposium, 6.-11.7.2003*) etwa die Hälfte aller Beiträge im Themenkomplex „Kohlenhydratsynthese“ die Synthese von Glycomimetika.

Der Begriff „Glycomimetika“ bezeichnet Substanzen, die natürliche Kohlenhydrate, oft mit dem Ziel einer pharmazeutischen Anwendung, in ihrer biochemischen Funktion imitieren.²⁸

Eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Mutter-Verbindungen ist häufig vorhanden, jedoch nicht zwingend. Für eine Nutzung als Therapeutikum ist vor allem entscheidend, dass die synthetisierten Analoga eine höhere Aktivität, größere Stabilität, bessere biologische Verfügbarkeit und/oder leichtere Zugänglichkeit besitzen als die natürlichen Produkte, was in der Regel durch eine Veränderung der chemischen Struktur zu erreichen versucht wird, welche als gezieltes rationales Design und/oder – oftmals unter Anwendung kombinatorischer Techniken in Verbindung mit HTS-Verfahren – in Form eines Aufbaus von Substanzbibliotheken mit einer großen Bandbreite von Modifikationen ausgeführt werden kann.²⁹ Im weiteren Sinne zählen natürliche Kohlenhydratstrukturen, die zweckentfremdet in einer Anwendung, die nicht ihrer eigentlichen biologischen Funktion entspricht, eingesetzt werden, auch zu den Glycomimetika. Zumeist beinhaltet die Darstellung eines Mimetikums jedoch den Aufbau eines artifiziellen Kohlenhydrats, in dessen Rahmen die synthetische Anstrengung insbesondere einer Imitation der glycosidischen Bindung in der einen oder anderen Form gilt. Während die Synthese von Polysacchariden in diesem Zusammenhang eher wenig Aufmerksamkeit erhält, ist die Synthese sowohl einfacher Monosaccharide als auch komplexerer Oligosaccharide, die gute therapeutische Eigenschaften aufweisen können, Gegenstand der Forschung.²⁷

3.1.1 Strategien zur Imitation der glycosidischen Bindung

Zwei verschiedene Strategien zur Imitation der glycosidischen Bindung werden üblicherweise verfolgt:

Den Ring-Sauerstoff des Zuckers gegen Stickstoff^{30,31} oder Kohlenstoff,³² seltener Schwefel, auszutauschen, stellt eine etablierte Methode vor allem zur Synthese von Monosaccharid-

Mimetika dar. Die erhaltenen Aza- (d. i. Imino-) oder Carbazucker werden zur Inhibition von Glycosidasen im Zusammenhang mit der Behandlung von Diabetes,^{33,34} Krebs³⁵ und viralen Infektionen³⁶ genutzt oder dienen als Bausteine von Oligosaccharid-Mimetika.³⁷

Ein zweites gängiges Konzept besteht in einem Austausch der Lactolgruppe, so dass die natürliche acetalische Bindung durch eine C-, S- oder N-glycosidische ersetzt ist. Dabei ist die Bindung nicht nur in Form von unsubstituierten Alkylketten, O,S-³⁸ bzw. O,N-Acetalen verwirklicht, sondern wird zumeist über Amid-,³⁹ Harnstoff-, Thioharnstoff-⁴⁰ oder ähnliche Brücken an C-1 erzielt. Diese Methode wird vereinzelt zur Synthese von Monosaccharid-Mimetika⁴¹ und vielfach zur Imitation von Glycopeptiden (Abb. 6) genutzt,^{42,43} außerdem sind zahlreiche Oligosaccharid-Mimetika⁴⁴ nach diesem Prinzip aufgebaut. Vielfach werden die beiden Konzepte kombiniert, so dass Carba-N-⁴⁵ oder Aza-C-glycoside⁴⁶ synthetisiert werden (Abb. 6).

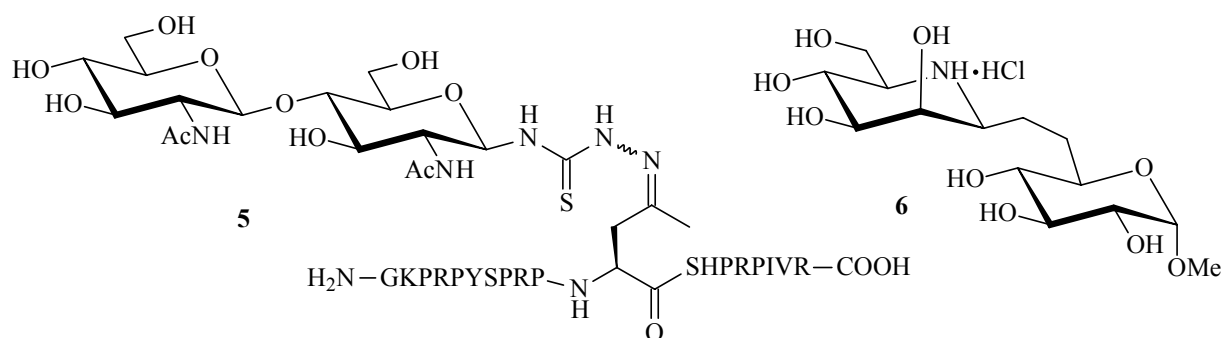


Abb. 6 Thiosemicarbazone-Neoglycopeptid (5) nach Bertozzi *et al.*⁴⁰ und Aza-C-glycosid (6) nach Johnson *et al.*⁴⁷

Eine unkonventionelle, dritte Strategie zur Imitation der glycosidischen Bindung beschreibt Oligosaccharid-Mimetika, die ohne eine Beteiligung des anomeren Zentrums aufgebaut sind, deren Kohlenhydratbausteine also über untypische Positionen miteinander verknüpft sind und in denen eine Verbrückung unabhängig von der glycosidischen Bindung vorhanden ist.

Während überwältigend viele Beispiele für die ersten zwei Konzepte bekannt sind, beinhaltet das dritte Modell eine Idee, die nahezu ausschließlich zur Imitation der natürlichen 3'→5'-Phosphatbrücke im Kontext der Oligonucleotid-Mimetika-Synthese⁴⁸ verwirklicht wurde. Darüber hinaus gibt es für Mimetika mit Strukturelementen dieser Art nur sehr wenige Beispiele: Wessel *et al.*⁴⁹ haben sogenannte Polyamidzucker entwickelt, in denen Zucker-Aminosäuren peptidisch miteinander verbunden sind (Abb. 7). Anreiz war hierbei die Kopplung von Zucker-Bausteinen zu höheren Oligosaccharid-Mimetika nach den etablierten Techniken der Peptid-Synthese. Auch die Gruppe um Kessler⁵⁰ beschäftigt sich mit solchen

Zucker-Peptid-Hybriden. Einige ähnliche Analoga sind bekannt, beispielsweise stammen von *Bundle et al.*⁵¹ über Amid-Linker verknüpfte cyclische Moleküle (Abb. 7) mit dem Ziel, als Alternative zum Multivalenz-Konzept⁵² univalente Strukturen aufzubauen, die vorbestimmte, organisierte räumliche Anordnungen enthalten.

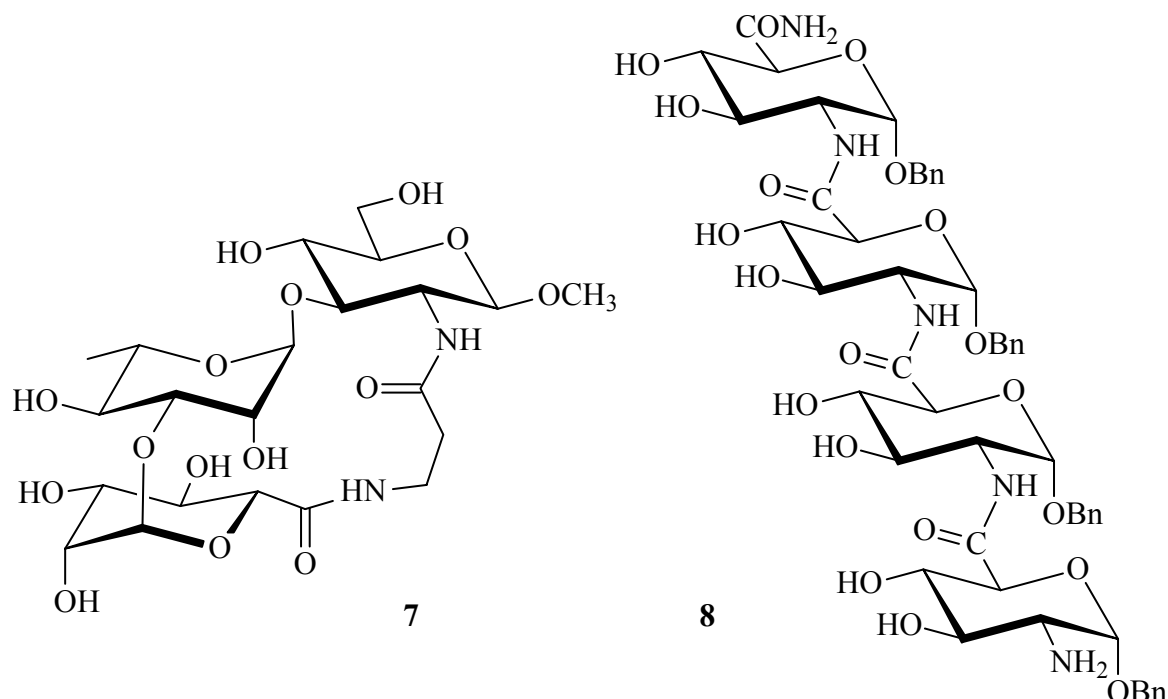


Abb. 7 Amid-verbrücktes cyclisches Oligosaccharid-Mimetikum nach *Bundle et al.*⁵¹ und Amid-verbrücktes Tetrasaccharid nach *Wessel et al.*⁴⁹

*Tronchet et al.*⁵³ haben verschiedene Verbrückungsmöglichkeiten zur Synthese ungewöhnlicher Disaccharid-Mimetika erforscht und in diesem Zusammenhang Diglycosyldiine, -thiophene, -aziridine, -dioxolane, und -nitronen dargestellt (Abb. 8).

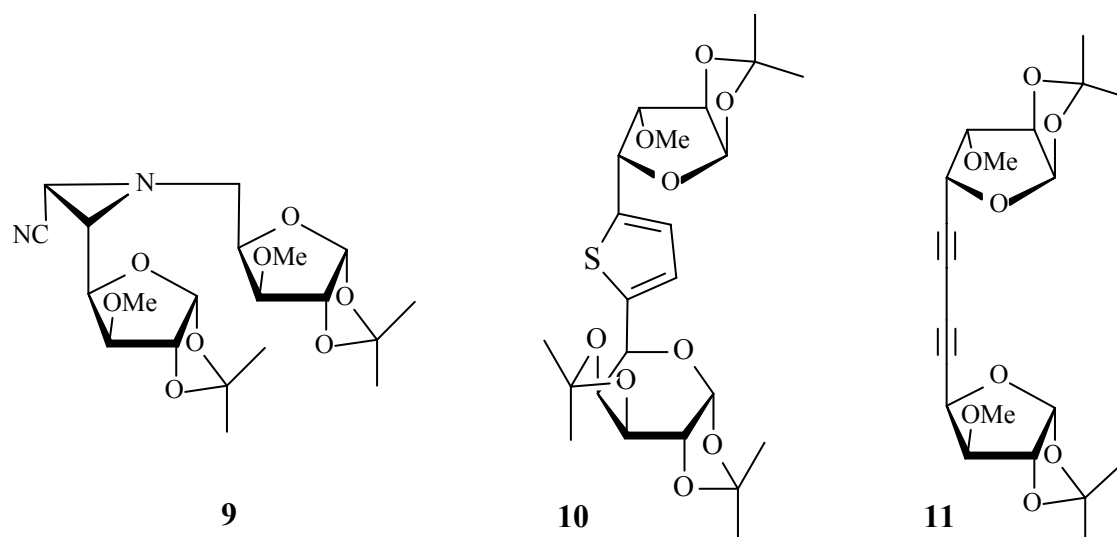


Abb. 8 Ausgewählte untypisch verbrückte Disaccharid-Mimetika nach *Tronchet et al.*⁵³

In Form eines Amins miteinander verknüpfte Glycopyranoside sind vereinzelt in der Kohlenhydratforschung beschrieben worden, dabei in frühen Arbeiten ausschließlich als Nebenprodukte der Synthese von Aminoazuckern,^{54,55,56} in einigen wenigen Fällen hingegen auch als erwünschte Produkte synthetischer Anstrengungen, jedoch nicht mit der Absicht, natürliche Strukturen zu mimikrieren. Gezielt dargestellt wurden Diglycosylamine im Zusammenhang mit der Erforschung der Addition von Nukleophilen an Kohlenhydrat-Nitroolefine,^{57,58} als Modellsysteme für Additionsreaktionen mit dem Ziel einer Quervernetzung von Cellulose⁵⁹ und wiederum bei Untersuchungen von *Tronchet et al.*⁶⁰, in denen erstmals die Technik der reduktiven Aminierung auf Carbonyl-funktionalisierte Kohlenhydrate übertragen wurde (Abb. 9).

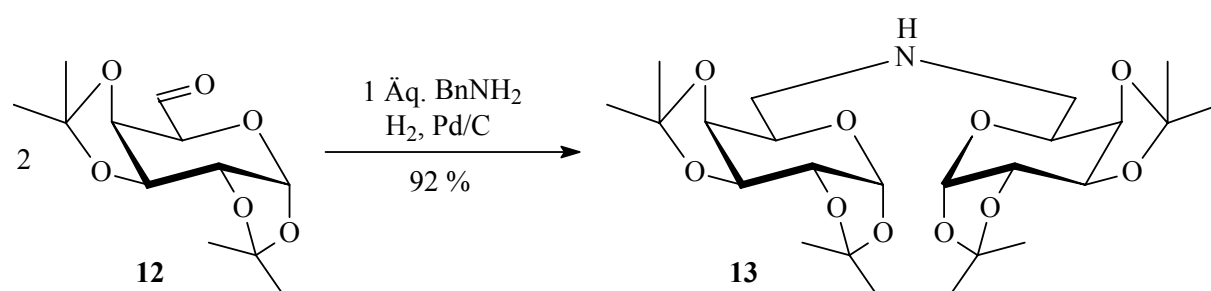


Abb. 9 Darstellung eines Diglycosylamins mittels reduktiver Aminierung nach *Tronchet et al.*⁶⁰

Bis dahin war die Anwendung dieser Reaktion auf Zucker ausschließlich unter Ausnutzung der natürlichen Carbonylfunktion in der offenkettigen Konstitution und dies auch nur in wenigen Arbeiten^{61,62,63} erfolgt. Obwohl sehr viele Beiträge zu reduktiven Aminierungen von Kohlenhydraten unter Nutzung verschiedenster Amine folgten, ist eine Oligosaccharid-Mimetika-Synthese mittels dieser Methode nicht bekannt. Die Reaktion wurde jedoch zur Darstellung von Antisense-Oligonucleotiden, die anstelle der natürlichen 3'→5'-*P*-Brücken *N*-haltige Isostere enthalten, angewandt (Abb. 10).^{64,65}

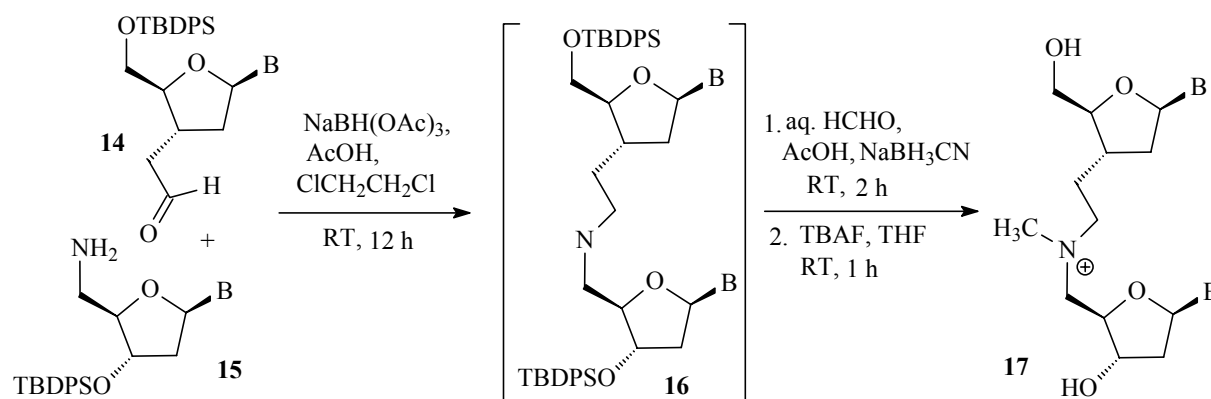


Abb. 10 „Dinucleotid“-Synthese mittels reduktiver Aminierung nach *Sanghvi et al.*⁶⁵, B = T, C, 5-MeC, A, G, U oder 5-MeU

3.2 Reduktive Aminierung von Kohlenhydraten

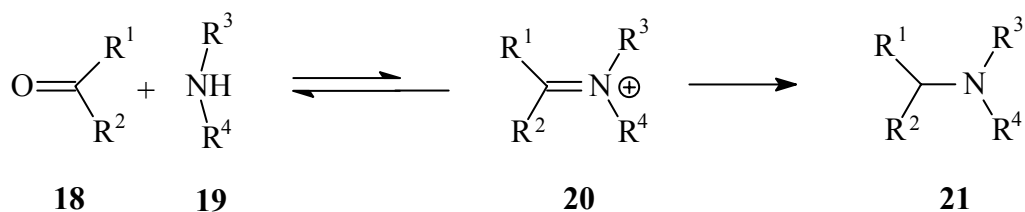


Abb. 11 Reduktive Aminierung

Die reduktive Aminierung,^{66,67,68} also die Kondensation zwischen einem Aldehyd oder Keton einerseits und Ammoniak, einem primären oder einem sekundären Amin andererseits zu einer Schiff'schen Base, die im Folgeschritt zu dem korrespondierenden primären, sekundären oder tertiären Amin reduziert wird (Abb. 11), stellt eine ausgesprochen häufig in der organischen Chemie und auch in der Kohlenhydrat-Synthese gern angewandte Reaktion dar, da sie gleich mehrere Vorteile bietet:

1. Die Reaktion ermöglicht aufgrund ihrer Selektivität eine ausgesprochen schnelle Einführung von Substituenten. Andere eventuell vorhandene Funktionalitäten beeinträchtigen die Reaktion nicht, auch potenziell reduzierbare Gruppen, wie Amide, Lactone, Carbonsäuren, Ester, Nitrile, Ether oder Nitrogruppen, bleiben unversehrt.⁶⁷ Die Einführung eines Substituenten ist damit in einem Schritt aus Amino- bzw. Carbonyl-funktionalisierten Zuckern möglich, ohne die Alkoholfunktionen der reagierenden Kohlenhydrate blockieren zu müssen.
2. Eine beachtliche Flexibilität ist dadurch vorhanden, dass unterschiedlichste primäre oder sekundäre Amine eingesetzt werden können. Neben Ammoniak sind einfache Alkyl- und Arylamine ebenso verwendbar wie Hydroxylamine, Aminosäuren, Aminozucker oder Aminosterioide.^{60,69,70} Desgleichen sind die verwendeten Aldehyde und Ketone kaum Einschränkungen unterworfen.⁶⁷
3. Die Reaktionsführung ist außergewöhnlich anspruchslos. Sowohl eine Reihe von Lösungsmitteln, wie Wasser,⁷¹ Acetonitril,⁷⁰ Methanol⁶⁷ oder Dichlormethan,⁶⁵ als auch verschiedene Reduktionsmittel, wie Wasserstoff mit Palladium/Aktivkohle-,⁶⁰ Raney-Nickel- oder Platin-Katalyse,⁶⁶ Natriumborhydrid, Natriumcyanoborhydrid⁶⁷ oder Natriumtriacetoborhydrid,⁶⁵ recht variable pH-Werte von 4⁷² bis 8⁷³ sowie Reaktionstemperaturen von 20⁶⁵ bis 100 °C⁷⁴ sind beschrieben worden.
4. Zudem ist die Durchführung preisgünstig, da weder teure Katalysatoren noch spezielle Reagenzien notwendig sind.

Da die Reaktion eine leichte Einführung von Substituenten mit hoher Diversität ermöglicht, ist sie auch ideal für automatisierte Parallelsynthesen mit anschließendem HTS geeignet, um Leitstrukturen für pharmazeutische Wirkstoffe schnell und umfangreich zu modifizieren.

Kohlenhydrate werden aufgrund ihrer natürlichen Aldehyd- oder Keton-Funktionalität meist als Carbonyl-Komponente in der reduktiven Aminierung eingesetzt. Die Reaktion wird zum einen unspezifisch genutzt, aufgrund der leichten Verknüpfungsmöglichkeiten, die sie bietet. So wird durch Anbringen von Glycosideinheiten die Löslichkeit von Polymeren erhöht,⁷⁵ ebenso werden lipophile Moleküle durch hydrophile Zuckerreste in bioabbaubare Tenside überführt – das industriell wichtigste Produkt der reduktiven Aminierung von Kohlenhydraten ist *N*-Methylglucamin, das weiter mit Fettsäuren zu *N*-Methylglucamiden umgesetzt wird, deren jährliche Produktion 5000 t beträgt.⁶⁹ Auch bioabbaubare Polymere^{76,77} werden durch Verknüpfung der Monomere bzw. Co-Monomere mittels reduktiver Aminierung gestaltet. Andersherum kann das Kohlenhydrat selbst mit bestimmten, beispielsweise fotoaktiven Funktionen⁷⁸ oder Spin-Label-Markern⁷⁹ versehen werden. Durch Kupplung mit Peptiden und Proteinen sind genügend große Konjugate für Affinitätsexperimente mit Lectinen herstellbar,⁸⁰ und auch geclusterte Heptene sind so synthetisiert worden.⁸¹

Zum anderen wird die reduktive Aminierung gezielt genutzt, um Amino- bzw. Iminogruppen in den Zucker einzubringen, wie dies bei Kohlenhydrat-Aminosäure-Konjugaten und Azazuckern gewünscht ist. Zur Synthese von Azazuckern ist die reduktive Aminierung (neben der intramolekularen *N*-Alkylierung) die Methode der Wahl. Ausgehend von einer Azido-Aldose³⁰ oder -Ketose⁸² erfolgt der Ringschluss nach Reduktion mittels einfacher, ausgehend von einer Dicarbonylglycose plus Ammoniak oder auch einem primären Alkylamin⁸³ mittels doppelter, intramolekularer reduktiver Aminierung. Auch die Synthese von Kohlenhydrat-Aminosäure-Konjugaten als Glycopeptid-Mimetika erfährt viel Aufmerksamkeit. Zum Studium des biosynthetischen Prozesses der sogenannten nicht-enzymatischen Glycierung von Proteinen, die für einige der im Zusammenhang mit Diabetes auftretenden gesundheitlichen Komplikationen verantwortlich ist, und unter der man die Reaktion der *N*-terminalen oder ϵ -Aminogruppe von Lysinresten eines Proteins mit D-Glucose zu einer Schiff'schen Base, die im Folgenden einer Amadori-Umlagerung zum *N*-(1-Desoxy-D-fructose-1-yl)-Derivat des Proteins unterliegt, versteht, haben *Walton et al.*⁷⁴ unter Ausnutzung der natürlichen Aldehydfunktion in Hexosen verschiedene *N*-(1-Desoxyhexitol-1-yl)-Aminosäuren dargestellt. Kohlenhydrat-Aminosäure-Konjugate unter Erhalt des cyclischen Zuckergerüsts sind beispielsweise von *Wong et al.*^{84,85} und in der eigenen

Diplomarbeit⁸⁶ synthetisiert worden, indem Aldehydfunktionen in das Glycosid-Grundgerüst eingeführt und dann reduktiv aminiert wurden.

Zur Realisierung eines kurzen Synthesewegs bei der Darstellung der Zielverbindungen (**4**) ist eine Anwendung der reduktiven Amininierung insofern besonders praktikabel, als dass sie, da die Kohlenhydrate ohne Schutzgruppen eingesetzt werden können, gut mit einer Enzym-katalysierten Glycosylierung kombinierbar ist.

3.3 Enzymatische Glycosylierungen

Das aus dem Verständnis der biochemischen Bedeutung von Kohlenhydraten^{87,88,89} gewachsene Interesse an Oligosaccharid- und Glycokonjugatsynthesen hat die Entwicklung neuer leistungsfähiger Glycosylierungsmethoden, verschiedenste Verfahren zur Aktivierung des anomeren Zentrums^{90,91,92,93,94,95,96} und der Katalyse^{97,98,99,100,101} beinhaltend, erheblich vorangetrieben. Unter den verwendeten Katalysatoren nehmen Glycosyltransferasen^{102,103} und -hydrolasen^{104,105} als Biokatalysatoren eine Sonderstellung ein, nicht nur aufgrund ihres natürlichen Ursprungs oder ihrer chemischen Struktur, sondern auch hinsichtlich der Art und Weise ihres Gebrauchs und ihrer Anwendungsmöglichkeiten. So unterscheiden sich die Reaktionsbedingungen klassisch-chemischer Glycosylierungen zumeist erheblich von denen chemo-enzymatischer. Während erstere Reaktionen in der Regel wasserfreie Lösungsmittel, saure pH-Werte und Temperaturen zwischen –50 und 150 °C erfordern, laufen letztere gewöhnlich in wässrigen Systemen, bei neutralem oder mild saurem pH und Temperaturen zwischen 15 und 55 °C ab. Zunehmend Anwendung als Katalysatoren in der organischen Synthese^{106,107,108} haben Enzyme aufgrund ihrer charakteristischen Regio- und Stereoselektivität, die die Nutzung ungeschützter Glycosyldonoren und -akzeptoren und damit das Vermeiden einer Folge von zeit- und arbeitsaufwendigen Blockierungs- und Deblockierungsschritten ermöglichen, gefunden. Sowohl Glycosyltransferasen (EC 2.4) als auch -hydrolasen (EC 3.2) katalysieren stereospezifisch hinsichtlich der Anomerität der zu knüpfenden glycosidischen Bindung, überdies zeichnen sich die Erstgenannten durch eine ausgeprägte Substratspezifität und die regiospezifische Bildung eines bestimmten Produkts, verbunden mit sehr guten Ausbeuten aus.¹⁰⁹ Allerdings sind Transferasen oft recht empfindlich und daher schwierig zu handhaben, benötigen Nukleotid-aktivierte Donorsubstrate und zeigen Produkthemmung durch das abgespaltene Nucleosiddiphosphat. Glycosidasen nutzen einfachere Donorsysteme, beispielsweise Arylglycoside, Disaccharide oder Fluoride, und sind

zudem verhältnismäßig stabil.¹¹⁰ Sie zeigen jedoch die angestrebte Regioselektivität oft nicht im gewünschten Ausmaß und erbringen außerdem meist geringere Ausbeuten (20 – 40 %), was im Zusammenhang damit steht, dass sie die gebildeten Produkte entsprechend ihrer natürlichen Funktion leicht hydrolysieren. Von Vorteil ist dagegen ihre Akzeptanz sowohl einer großen Auswahl an Donor-Aglyconen als auch unterschiedlichster Akzeptorsubstrate,¹¹¹ dank derer ein synthetischer Einsatz in einer gewissen Breite erfolgen kann.¹¹²

Zur Übertragung von Galactosyleinheiten stehen je nach Struktur des Akzeptors sowie gewünschter Anomerität und Stellungsisomerie im Produkt eine Reihe von Enzymen zur Verfügung. Speziell die Knüpfung einer β -(1 $\rightarrow$ 4)-Bindung zu GlcNAc (Abb. 12) katalysieren neben β -(1 $\rightarrow$ 4)-Galactosyltransferasen (EC 2.4.1.22) verschiedenener Quellen die β -Galactosidasen Gly001-06, Gly001-07 und Gly001-09 der kommerziell¹¹³ erhältlichen CLONEZYMETM Glycosidase-Bibliothek¹¹⁴ sowie β -Galactosidase aus *Diplococcus pneumoniae*,¹¹⁵ *Bifidobacterium bifidus*,¹¹⁶ *Streptococcus 6646K*,¹¹⁶ *Lactobacillus bifidus*¹¹⁷ und *Bacillus circulans*.¹¹⁸ Bemerkenswert positive Ergebnisse bei der Synthese von LacNAc oder auch *N*-Acetyllactosaminiden sind darunter mit der β -Galactosidase aus *Bacillus circulans* erzielt worden.

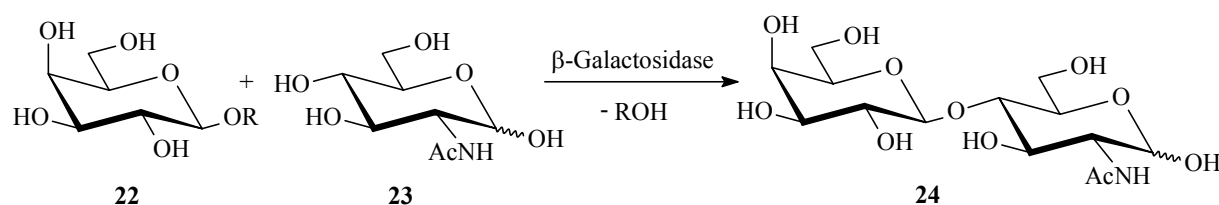


Abb. 12 β -(1 $\rightarrow$ 4)-Galactosylierung von GlcNAc

3.3.1 β -Galactosidase aus *Bacillus circulans*

1992 haben *Usui et al.*¹¹⁸ erstmalig über die Anwendung einer β -Galactosidase aus *B. circulans* für die Synthese von β 1 $\rightarrow$ 4-verknüpften Disacchariden berichtet. Die dort beobachtete für Hydrolasen außergewöhnliche Regioselektivität – das 1 $\rightarrow$ 4-Isomer wurde mit einem Anteil von 96 % an insgesamt erhaltenen Disacchariden gebildet, obwohl Glycosidasen sonst typischerweise eine Übertragung des Glycosyldonors auf die primäre Alkoholfunktion des Akzeptors bevorzugen – hat maßgeblich Anlass zu weiterer Erforschung der katalytischen Eigenschaften dieses Enzyms gegeben. Bevor auf deren einzelne Ergebnisse eingegangen wird, sei angemerkt, dass aus *B. circulans* verschiedene β -Galactosidasen gewonnen werden,

die den Galactosyltransfer jeweils mit einer anderen Regio-Bevorzugung katalysieren.¹⁰⁴ Bei dem hier beschriebenen Enzym handelt es sich um jenes, das auch unter dem Namen Biolacta[®], Lactase (EC 3.2.1.23) im Handel¹¹⁹ ist. Im Folgenden werden die Begriffe „ β -Galactosidase aus *B. circulans*“ und „Biolacta[®]“ synonym verwendet.

Die kommerziell erhältliche β -Galactosidase aus *B. circulans* besteht aus zwei Isoenzymen, die sowohl von *Mozzafer et al.*¹²⁰ als auch *Usui et al.*¹²¹ chromatographisch getrennt werden konnten und deren molare Massen mittels Gelfiltration auf 160 kD und 240 kD (*Mozzafer et al.*) bzw. mittels Gelfiltration und SDS-PAGE abweichend vom ersten Ergebnis auf 205 kD und 247 kD (*Usui et al.*) bestimmt wurden. Ebenso wie die Proteinstruktur der Isoenzyme nicht bekannt ist, ist auch deren Rolle in der Katalyse noch ungeklärt. Für synthetische Anwendungen wird gewöhnlich das ungetrennte Rohenzym eingesetzt.

Bei Biolacta[®] handelt es sich nicht nur um ein sehr stabiles Enzym, dessen Halbwertszeit bei 22 °C und pH 7.0 in Phosphatpuffer $t_{1/2} = 262$ h beträgt, sondern auch um eines, das einen großen Toleranzbereich Temperatur und pH-Wert gegenüber hat. Eine deutliche Verringerung der Aktivität wird erst unterhalb von pH 5.0 und oberhalb von pH 9.5 beobachtet (jeweils bei 30 °C und nach einer Inkubationszeit von 1 h gemessen). Bei Temperaturen bis zu 55 °C kann eine konstante Hydrolyseaktivität über mindestens eine Stunde (bei pH 6.0) verzeichnet werden. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse ist am größten bei 65 °C, das Enzym ist bei dieser Temperatur jedoch nach 20 Minuten vollständig denaturiert.¹¹⁹

Die Toleranz der β -Galactosidase aus *B. circulans* gegenüber einem Zusatz verschiedener organischer Lösungsmittel, welcher bei Transglycosylierungen prinzipiell wünschenswert ist, um die konkurrierende Hydrolyse zurückzudrängen, haben *Priya et al.*¹²² untersucht und festgestellt, dass DMSO und Aceton nur einen geringen Rückgang der Aktivität bewirken. Acetonitril verursacht dagegen einen starken Aktivitätsverlust (Tab. 1), der jedoch durch längere Reaktionszeiten ausgeglichen werden kann.

Tab. 1 Aktivität der β -Galactosidase aus *B. circulans* nach 1 h bei pH 7.0 und 30 °C in Puffer mit Zusatz von 30 % (v/v) organischem Lösungsmittel in Prozent der Enzymaktivität in reinem Puffer.¹²²

Lösemittel	DMSO	Aceton	DMF	Dioxan	Acetonitril
Aktivität (%)	85	70	67	59	12

3.3.1.1 Transgalactosylierung: Einfluss der Reaktionsbedingungen

Ausbeute und Regioselektivität einer Transglycosylierung mit Biolacta[®] hängen zum einen von den Strukturen der zu verknüpfenden Kohlenhydrate selbst und zum anderen von verschiedenen veränderbaren Faktoren, darunter Donor/Akzeptor-Verhältnis, Abgangsgruppe, pH-Wert, Temperatur, Reaktionszeit und Lösemittel, ab. Die bezüglich dieser Einflüsse in der Literatur dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich die optimalen Reaktionsbedingungen hinsichtlich hoher Ausbeute und Regiospezifität in Abhängigkeit von der Struktur des Akzeptors unterscheiden, wobei entscheidendes Kriterium ist, ob dieser reduzierende oder nicht-reduzierende Eigenschaften besitzt. Im Folgenden werden die vorhandenen Literaturergebnisse erst für den Fall nicht-reduzierender, dann für den Fall reduzierender Akzeptoren dargestellt.

Den Einfluss des Lösungsmittels auf den Ablauf der Transglycosylierung haben *Usui et al.*^{118,123} zu Beginn der Untersuchung dieses Enzyms ermittelt. Am Beispiel der Galactosylierung von *p*NP- β -D-GlcNAc (**25**) haben sie gezeigt, dass durch Zusatz von Acetonitril oder DMSO zum Puffersystem nicht nur die Sekundärhydrolyse des produzierten LacNAc-Derivats **26** unterdrückt, sondern gleichzeitig auch die Bildung des *allo*LacNAc-Derivats **27** verringert werden kann, was zu einem signifikanten Überschuss an β 1 $\rightarrow$ 4-verknüpftem Disaccharid führt (Abb. 13). Die besten Ergebnisse wurden dabei mit einem Anteil von 50 % Acetonitril erreicht. Die Ausbeute an Gesamtglycosylierungsprodukt war unter den anfangs gewählten Bedingungen (Lactose (**28**) als Donor, Donor/Akzeptor-Verhältnis 5:1, pH 7.0, 30 °C, 8 h) jedoch generell gering, und das Entstehen eines zweifach galactosylierten Trisaccharids **29** konnte in keinem Fall verhindert werden.

Wie sich eine Umkehrung bzw. allgemeine Änderung des Donor/Akzeptor-Verhältnisses auf die Transglycosylierung auswirkt, haben *Crout et al.*¹²⁴ vier Jahre später beschrieben. Bei Einsatz von 3 Äquivalenten Akzeptor in Bezug auf *p*NP-Gal als Donor konnten sie Disaccharid in 30 %iger Ausbeute isolieren, wovon 83 % 1 $\rightarrow$ 4-verbunden waren. Bei Steigerung auf 6 Äquivalente Akzeptor wurde Disaccharid zu 40 % gewonnen, mit einem Lactose-Derivat-Anteil von 93 %.

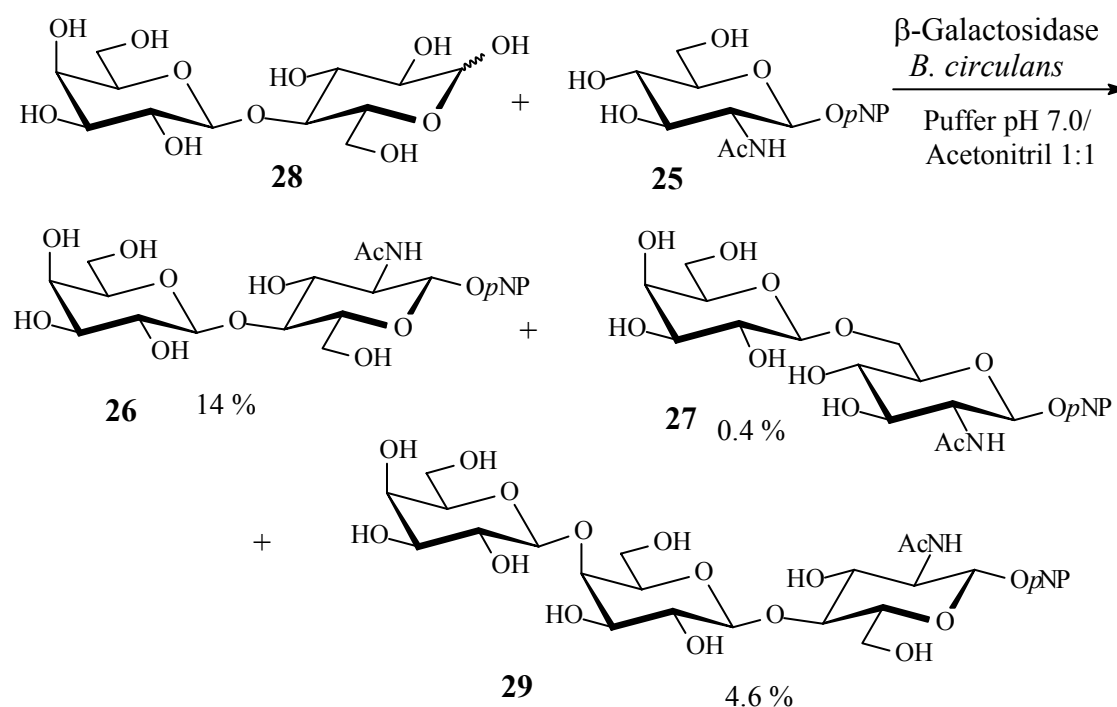


Abb. 13 Erste Transgalactosylierungen mit $\beta\text{-Galactosidase}$ aus *B. circulans*. $pNP\text{-}\beta\text{-D-LacNAc}$ (26) ist, bezogen auf die Summe an isolierten $pNP\text{-}\beta\text{-D-LacNAc}$ (26) und $pNP\text{-}\beta\text{-D-alloLacNAc}$ (27), mit einem Anteil von 96 % gebildet worden.¹²³

Mit einem Donor/Akzeptor-Verhältnis von 1:10, kombiniert mit einem Austausch des Donor-Aglycons durch pNP , ist es *Wong et al.*¹²⁵ im selben Jahr gelungen, zum einen die Bildung des Nebenprodukts aus zweifacher Galactosylierung zu verhindern und zum anderen die Ausbeute an $N\text{-Acetyllactosaminid}$ auf 57 % zu steigern. Das erwünschte Ausmaß der 1 $\rightarrow$ 4-Regioselektivität ging unter diesen Bedingungen selbst bei einer Reaktion in reinem Puffer nicht verloren. Zur Erhöhung der Ausbeute hat sich die Verwendung eines 1:1 Gemisches aus Acetonitril und Puffer dennoch als sinnvoll erwiesen, auch wenn sie außerdem eine etwas größere Katalysatormenge und eine Ausdehnung der Reaktionszeit auf 4 ½ Tage erfordert.

Diese Ergebnisse konnten im Wesentlichen durch *Thiem et al.*¹²⁶ am Beispiel verschiedener $N\text{-Acetylglucosaminide}$ als Akzeptoren in einer ausführlicheren Untersuchung der Auswirkung von Donor/Akzeptor-Verhältnis, pH-Wert, Reaktionstemperatur und -zeit auf die Ausbeute bestätigt werden. Die besten Ergebnisse, mit Ausbeuten bis zu 66 %, sind mit einem Donor/Akzeptor-Verhältnis von 1:7.5 bei pH 7.0, 30 °C und einer Reaktionszeit von 3 Tagen erlangt worden.

In Synthesen mit GlcNAc als Akzeptor sind anfangs dieselben Reaktionsbedingungen – Lactose als Donor, Donor/Akzeptor-Verhältnis 5:1, pH 7.0, 30 °C – wie mit $N\text{-Acetylglucosaminiden}$ angewandt worden, was zu noch geringeren Umsätzen als mit letzteren

föhrte: Die auf diese Art und Weise von *Usui et al.*¹²³ erzielten Ausbeuten lagen bei 8 %. *Vetere et al.*¹²⁷ haben in Untersuchungen zum Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf Regioselektivität und Ausbeute festgestellt, dass die Konzentration an produziertem Disaccharid generell in leicht sauren Systemen größer als in neutralen oder leicht basischen ist, wobei allerdings mit steigender Temperatur der Anteil an unerwünschtem 1→6-Isomer zunimmt. Die besten Ergebnisse in der Synthese von LacNAc verzeichneten sie, bei einem nicht variierten Donor/Akzeptor-Verhältnis von 3:1 und in reinem Puffer, bei pH 5.0 und 15 °C mit einer Reaktionszeit von 3 h. Unter diesen Bedingungen wurde eine Ausbeute von 42 % LacNAc erzielt, mit einem Anteil von 98 % an den insgesamt gebildeten Disacchariden. In von *Schmidt*¹²⁸ durchgeführten Synthesen hat sich dagegen, bei einem Donor/Akzeptor-Verhältnis von 1:10, eine Temperatur von 55 °C als am erfolgreichsten erwiesen. Nach dieser Methodik wurden bei Verwendung von Isomaltitol, Isomaltulose, Raffinose oder Kestose als Akzeptor die entsprechenden Produkte in Ausbeuten von 59 %, 59 %, 38 % bzw. 32 % isoliert. Der entgegen den Beschreibungen von *Vetere et al.* trotz höherer Temperatur nicht beobachtete Verlust des deutlichen Überschusses an 1→4-Isomer mag an den verwendeten Akzeptoren liegen, wie Befunde von *Crout et al.*¹²⁹ andeuten, nach denen das Ausmaß der selektiven Glycosylierung mit steigender Anzahl der Kohlenhydrateinheiten im Akzeptor zunimmt, so dass die Größe des Akzeptors dem Temperatureffekt bezüglich der Regioselektivität hier entgegenwirkt. Die zuvor für den Einsatz von *N*-Acetylglucosaminiden berichteten Ergebnisse von *Wong et al.* deuten außerdem darauf hin, dass auch das geänderte Donor/Akzeptor-Verhältnis Ausbeute und Regioselektivität positiv beeinflusst.

Dies wird bestätigt durch eine spätere Studie von *Vetere et al.*¹³⁰, die sich eigentlich mit dem Einfluss der Abgangsgruppe beschäftigt. In den dort – bei einem Donor/Akzeptor-Verhältnis von 1:13 und verschiedenen Temperaturen – durchgeführten Glycosylierungen von GlcNAc wurden die höchsten Ausbeuten mit allen drei untersuchten Arylaglyconen bei 55 °C verzeichnet, übereinstimmend mit den Beobachtungen von *Schmidt*, trotz des kleinen Akzeptors. Die Abgangsgruppe betreffend haben die unternommenen Synthesen gezeigt, dass mit *p*NP als Aglycon die besten Ergebnisse erreicht werden. Dass *p*NP-Gal als Donor zu höheren Ausbeuten als Lactose föhrt, überrascht nicht, da *p*NP-OH eine sehr viel bessere Abgangsgruppe als Glucose darstellt. Gleichwohl haben sich andere Arylaglycone in der Studie von *Vetere et al.* als weniger vorteilhaft erwiesen. Nur mit *p*NP als Aglycon verläuft die Glycosylierung stereospezifisch, während mit *o*NP-OH oder Phenol als Abgangsgruppe sowohl geringere Ausbeuten als auch eine geringere β 1→4 Selektivität selbst im Vergleich zu Glucose als Aglycon hingenommen werden müssen (Tab. 2).

Tab. 2 Einfluss verschiedener Aglycone auf Ausbeute und Regioselektivität der LacNAc-Synthese bei pH 5.0, 55 °C und einem Donor/Akzeptor-Verhältnis von 1:13.¹³⁰

	<i>p</i> NP	<i>o</i> NP	Ph	Glc
Ausbeute (%)	74	46	14	42
β 1→4/[β 1→4 + β 1→6] (%)	100	95	88	98

Mit einem etwas geringeren Akzeptorüberschuss (10 Äquivalente) konnten diese Resultate für die Aglycone *p*NP und Glc von May¹³¹ reproduziert und darüber hinaus durch 2-Chlor-4-nitrophenol, 2,4-Dinitrophenol und 2-Aceto-3-hydroxyfuran als Abgangsgruppen ergänzt werden. Während die Substitution des 4-Nitrophenols mit einer weiteren Nitrogruppe einen erheblichen Ausbeuteverlust verursachte (4 % isoliertes LacNAc), blieb die Substitution mit Chlor praktisch ohne Auswirkungen. Das Furanderivat führte zu ähnlichen Ausbeuten wie sie mit Glucose oder 2-Nitrophenol erhalten wurden.

Zusammenfassend sind in Tab. 3 die bisher erfolgreichsten Reaktionsbedingungen für eine stereo- und regiospezifische β 1→4-Galactosylierung mit den höchsten Ausbeuten bei gleichzeitiger Minimierung der Bildung des zweifach galactosylierten Nebenprodukts dargestellt. Auf diese Art und Weise konnte das gewünschte Produkt in bis zu 74 %iger (im Falle eines reduzierenden Akzeptors) bzw. bis zu 66 %iger (im Falle eines nicht-reduzierenden Akzeptors) Ausbeute erhalten werden. Die produzierten Absolutmengen betragen dabei nach herkömmlicher Methodik üblicherweise um 100 mg. Mit Gestaltung der Reaktion in einem Enzym-Membran-Reaktor ist auch die Darstellung von 11.3 g LacNAc gelungen, wobei eine lineare Maßstabsvergrößerung des Reaktors theoretisch Zugang zu 376 g des Disaccharids bei Einsatz von 1 g Biolacta[®] gewährt.¹³² In einem anderen Ansatz konnte das Enzym erfolgreich zur mehrfachen Nutzung auf Eupergit C immobilisiert werden.¹³³

Tab. 3 Optimierte Reaktionsbedingungen für die Biolacta[®]-katalysierte Synthese von *N*-Acetyllactosamin bzw. *N*-Acetyllactosaminiden.

Akzeptor	GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosaminid
Donor	<i>p</i> NP-Gal	<i>p</i> NP-Gal
Donor/Akzeptor-Verhältnis	1:10 bis 1:13	1:7.5 bis 1:10
pH	5.0	7.0
Lösungsmittel	Natriumacetatpuffer	Phosphatpuffer/Acetonitril 1:1
Temperatur	55 °C	20-30 °C
Reaktionszeit	2-3 h	3-4 d

3.3.1.2 Substratspezifität und Einfluss der Akzeptorstruktur auf die Regioselektivität

Wie alle Glycosylhydrolasen zeigt die β -Galactosidase aus *B. circulans* eine gewisse Flexibilität hinsichtlich der Erkennung verschiedener Substratstrukturen. Diesbezügliche Forschungen befassen sich überwiegend mit einer Veränderung des Akzeptors, dessen Derivatisierungen sich in Substitutionen am Kohlenhydratgerüst zum einen und Austausch der Aglyconstruktur zum anderen einteilen lassen. Bisherige Variationen des Donors beschränken sich dagegen fast ausschließlich auf einen Austausch der Aglyconstruktur.

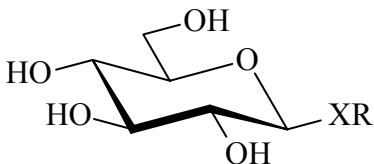
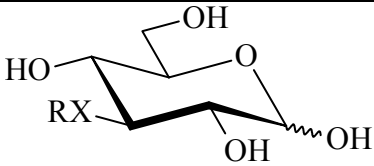
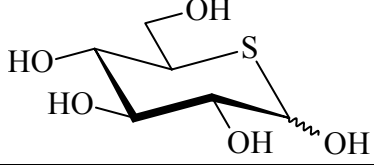
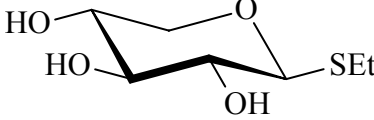
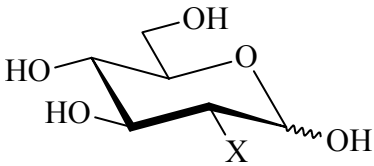
Neben vielen Untersuchungen, die sich damit befassen, ob das Enzym ungewöhnliche oder derivatisierte Substrate grundsätzlich umsetzt, wird in einigen Publikationen darüber hinaus die Fragestellung, welche Wirkung die durchgeführte Derivatisierung auf die Regioselektivität der Glycosylierung hat, behandelt. Eine Einordnung aller Ergebnisse in ein diesbezügliches Gesamtkonzept gestaltet sich jedoch schwierig, da andere die Regioselektivität beeinflussende Faktoren wie Donor/Akzeptor-Verhältnis, Lösungsmittelsystem usw. nicht einheitlich gewählt wurden, was die Zuordnung von Ursache und Wirkung meist nicht eindeutig erlaubt. Es ist jedoch tendenziell erkennbar, dass der Einfluss der Akzeptorstruktur umso bedeutender wird, je geringer die Konzentration des Akzeptors im Vergleich zu der des Donors ist. Eine Strukturveränderung, die der Bevorzugung der 4-OH-Gruppe entgegenwirkt, scheint sich umso mehr bemerkbar zu machen, je weniger Akzeptoräquivalente eingesetzt werden.

Generell erkennt die β -Galactosidase aus *B. circulans* Akzeptoren mit Glucose- oder Galactose-Konfiguration. Die Ausbildung der glycosidischen Bindung erfolgt in beiden Fällen bevorzugt zur Hydroxylgruppe in 4-Position, unabhängig von deren äquatorialer Stellung im einen und axialer Stellung im anderen Zucker. Weitere Epimere sind bislang nicht auf ihre Substrateigenschaften geprüft worden, doch gibt es interessante Versuche mit Inositolen als Akzeptoren, die belegen, dass das der D-Galactopyranose ähnliche 1D-Chiroinositol (**30**) und das dem Methyl- β -D-galactopyranosid ähnliche 1D-Pinitol (**31**) glycosyliert werden, während das eher α -D-Mannopyranose oder, je nach Ausrichtung, β -D-Gulopyranose entsprechende 1L-Chiroinositol (**34**) und sein 2-O-Methylether 1L-Quebrachitol (**35**) nicht umgesetzt werden (Abb. 14).¹³⁴

Das Erreichen der 1→4 Regiospezifität hängt bei *gluco*-Akzeptoren, insbesondere wenn der Donor im Überschuss eingesetzt wird, in auffallendem Maße vom Vorhandensein einer Acetamido-Gruppe an C-2 ab. Für underivatisierte D-Glucose wurde die Bildung der 1→2-, 1→3-, 1→4- und 1→6-verknüpften Disaccharide in einem Verhältnis von 1.0 : 7.6 : 8.2 : 3.0 gefunden.¹³⁷ Methyl-β-D-glucopyranosid¹²¹ und *p*NP-β-D-glucopyranosid¹³⁸ liefern ein ähnliches Gemisch der 1→3-, 1→4- und 1→6-Regioisomeren, mit Verlängerung der Reaktionszeit gewinnt allerdings das 1→6-verknüpfte Derivat an Anteil, bis nach 2 Tagen schließlich nur noch Methyl- bzw. *p*NP-β-D-*allolactopyranosid* nachgewiesen werden kann. Befindet sich die Acetamidogruppe statt an C-2 an C-1, liegt also *N*-Acetyl-β-D-glucopyranosylamin vor, so wird ebenfalls eine vermehrte Ausbildung der 1→3- und 1→4-Bindung beobachtet, so dass nach 1 h Reaktionszeit Lactose-, *iso*Lactose- und *allo*Lactose-Derivat im Verhältnis 2:2:1 detektiert werden. Eine Verringerung des Akzeptorüberschusses bewirkt eine Verlagerung des Verhältnisses zu Gunsten des *iso*- und auf Kosten des 1→4-Isomeren.¹²² Ein formales Verschieben der Acetamidogruppe zur 3-Position (*N*-Acetylkanosamin) führt zu der ausschließlichen Bildung der 1↔1- und 1→6-Stellungsisomeren, die Positionen 4 und 2 werden offenbar abgeschirmt.¹²¹ Dies wird durch die Glycosylierung von 3-*O*-Methyl-D-glucose bestätigt, für die 1→6-Selektivität berichtet wird, sogar mit einem dreifachen Überschuss an Akzeptor.¹¹⁵ Im Falle von 5-Thio-D-glucopyranose¹³⁵ sowie von α- und β-konfiguriertem Ethyl-1-thio-D-glucopyranosid als Akzeptor wurde mit einem Donor/Akzeptor-Verhältnis von 1:3 bzw. 1:6 dagegen ausschließlich das Lactose-Derivat isoliert, während mit Ethyl-1-thio-β-D-xylopyranosid trotz Vorliegen von 6 Äquivalenten Akzeptor nur die 1→3-Bindung ausgebildet wurde.¹²⁴

Verschiedene Variationen des Acetylsubstituenten am Stickstoffatom zeigen keine Auswirkungen auf die Regioselektivität: D-Glucosamin,¹³⁹ 2-Azido-2-desoxy-D-glucose,^{135,140} Benzyl-2-azido-2-desoxy-β-D-glucopyranosid,¹²⁵ *N*-Alloc-¹⁴⁰, *N*-Troc-¹⁴⁰ und Phthalimido-substituiertes Glucosamin¹³¹ bilden das 1→4-verknüpfte Disaccharid auch bei einer größeren Menge an Donor in großem Überschuss.

Tab. 4 Strukturveränderungen des Akzeptors und deren Einfluss auf die Regioselektivität

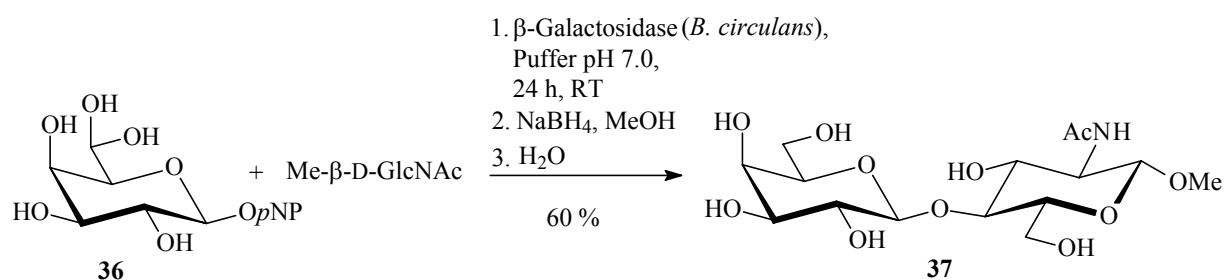
Grundgerüst des Akzeptors	XR	Überwiegend gebildete Regioisomere	Donor/Akzeptor-Verhältnis, Reaktionszeit
	OH ¹³⁷	1→3, 1→4	2:1
	OMe ¹²¹	1→3, 1→4	2:1, ≤ 8 h
	OMe ¹²¹	1→6	2:1, > 24 h
	NHAc ¹²²	1→3	1:2, 1.5 h
	NHAc ¹²²	1→3, 1→4	1:5, 1 h
	SEt ¹²⁴	1→4	1:6, 8 h
	NHAc ¹²¹	1↔1, 1→6	4:1, 8 h
	OMe ¹¹⁵	1→6	1:3, 2 h
	¹³⁵	1→4	1:3, > 24 h
	¹²⁴	1→3	1:6, 28 h
	NH ₃ ⁺ ¹³⁹	1→4	10:1, 2 h
	N ₃ ^{135,140}	1→4	1:3, > 24 h
	NHAlloc ¹⁴⁰	1→4	1:1, 2 h
	NHTroc ¹⁴⁰	1→4	1:1, 2 h
	NPhth ¹³¹	1→4	1:10, > 24 h

Im Falle eines *galacto*-konfigurierten Akzeptors ist sowohl mit einer Acetamido- als auch mit einer Alkoholfunktionalität an C-2 eine deutlichere Bevorzugung der 1→4-Glycosylierung zu erkennen, wie auch schon die Bildung des ausschließlich 1→4-verknüpften Trisaccharid-Nebenprodukts bei der Transglycosylierung zeigt. Im Falle von GalNAc und *p*NP-β-D-GalNAc wird bis zu einer Reaktionszeit von 15 h nur das 1→4-verknüpfte Disaccharid detektiert, danach wird auch 1→6-Isomer gebildet. Mit Methyl-β-D-Gal überwiegt das 1→4-Isomer in den ersten 5 h der Reaktion, dann gewinnt das 1→3-Isomer an Anteil, bis nach 2 d fast ausschließlich 1→3-Isomer vorliegt.¹²³ Über die gesamte Zeit wurde praktisch keine 1→6-Glycosylierung beobachtet. Werden die Reaktionen dagegen mit einem Akzeptorüberschuss durchgeführt, so wird auch nach 3 d Reaktion mit Allyl-β-D-Gal, Allyl-α-D-Gal, SPh-β-D-Gal und SEt-β-D-Gal lediglich das jeweilige 1→4-verknüpfte Isomer isoliert.¹²⁶

Die Erkennung der Donor-Aglyconstruktur anbelangend, ist die β -Galactosidase aus *B. circulans* zwar nicht so flexibel wie einige andere Galactosidasen, hydrolysiert aber dennoch neben Galactosiden mit den typischen Abgangsgruppen Glucose, *p*NP, *o*NP, Phenyl und 4-Methylumbelliferyl einige weniger häufige Galactopyranoside. Sowohl aliphatische Alkohole wie in 3-Hydroxybutyl- β -D-galactopyranosid,¹⁴¹ als auch mit Kohlenhydratstrukturen derivatisierte Nitrophenole¹⁴⁰ werden gespalten. Selbst die Esterbindung in 1-*O-p*-Hydroxybenzoyl- β -D-galactopyranose¹⁴² wird hydrolysiert, wenn auch mit geringem Umsatz.

Über eine Derivatisierung direkt am Kohlenhydratgerüst des Donors gibt es bisher nur zwei Veröffentlichungen. *Wong et al.*¹⁴³ haben *p*NP-Gal an C-6 zum Aldehyd bzw. Hydrat oxidiert und die Verwendung des Derivats **36** als Glycosyldonor geprüft. Die Verbindung wurde erkannt und umgesetzt, obwohl sie, gemessen an den Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion, ein relativ schlechtes Substrat für β -Galactosidase darstellt. Dennoch konnte mit ihrem Einsatz als Donor eine kinetische Bevorzugung der Transglycosylierung gegenüber der Hydrolyse und eine Verringerung der Sekundärhydrolyse erreicht werden. Da dies das Ziel der Untersuchung darstellte, wurde das gebildete Disaccharid nicht isoliert, sondern *in situ* zum *N*-Acetyllactosaminid **37**, das so in 60 %iger Ausbeute gewonnen wurde, reduziert.

*Usui et al.*¹⁴⁴ haben über eine Sulfatierung an C-6 bzw. an C-3 des Galactosyldonors berichtet. Beim Versuch der Biolacta[®]-katalysierten Hydrolyse dieser Derivate stellten sie mittels DC fest, dass an Position 3 substituiertes *p*NP-Gal nicht umgesetzt wurde, während an C-6 funktionalisiertes *p*NP- und 4-MU-Gal überraschend hydrolysiert wurden. Eine kinetische Untersuchung des 6-sulfatierten 4-MU-Gal zeigte, dass dieses zwar ein sehr schlechtes Substrat für die β -Galactosidase darstellt, eine Transglycosylierung mit GlcNAc ergab im präparativen Maßstab aber immerhin mit 18 %iger Ausbeute ein Disaccharidgemisch, das das Lactosederivat zu 45 % und das *allo*Lactosederivat zu 55 % enthielt (Abb. 16).



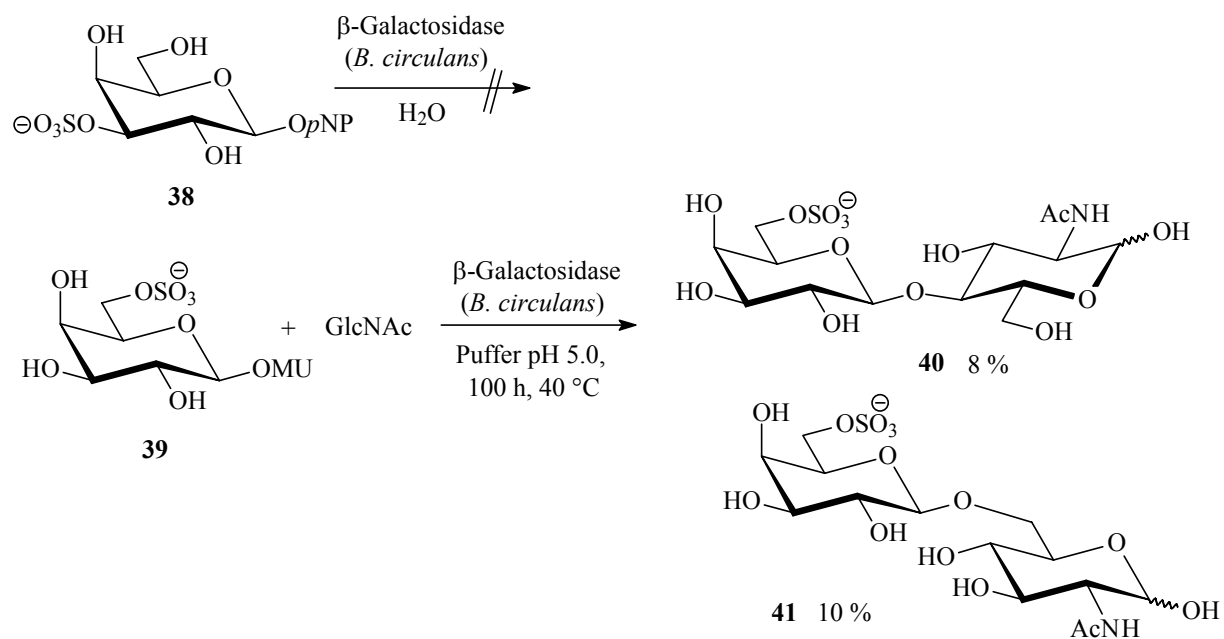


Abb. 16 Glycosylierungen mit derivatisierten Donoren nach Wong *et al.*¹⁴³ bzw. Usui *et al.*¹⁴⁴

4 Syntheseplan

Prinzipiell setzt sich die Synthese der Zielverbindungen **42** aus den drei Reaktionen 1) Galactosylierung von *N*-Acetylglucosamin, 2) Einführung der Amino- oder Aldehyd-Funktionalität an C-6 des Galactosylrests und 3) reduktive Aminierung mit einer Amino- bzw. Oxocarbonsäure oder einem Amino- bzw. Carbonyl-funktionalisierten Zucker zusammen. Die Reihenfolge dieser Syntheseschritte ist theoretisch frei wählbar, abgesehen von der offensichtlichen Einschränkung, dass die reduktive Aminierung nicht vor der Funktionalisierung an C-6 der Galactosyleinheit stattfinden kann. Zweckmäßig erscheint die Ausführung der reduktiven Aminierung am Schluss der Synthese (Abb. 17), als dritter Reaktionsschritt, da andernfalls die chemo-enzymatische Glycosylierung den letzten Schritt beschreiben muss, und es eher unwahrscheinlich ist, dass die β -Galactosidase das dann vorliegende komplex derivatisierte Galactosid als Substrat erkennt und umsetzt.

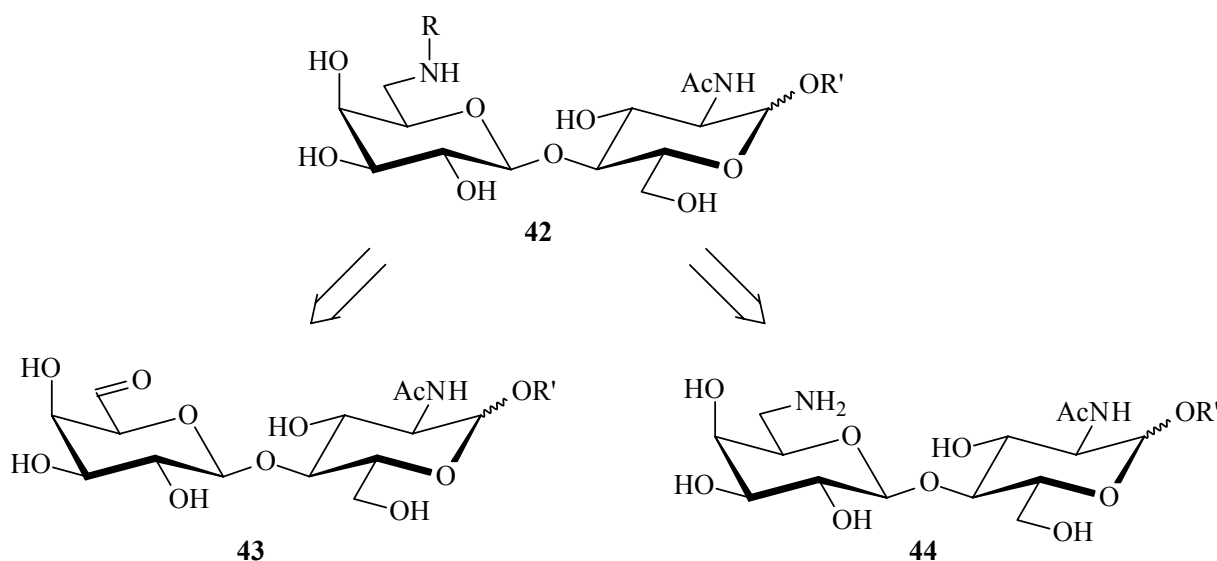


Abb. 17 Retrosynthese. Die Darstellung der Zielverbindungen (**42**) soll durch reduktive Aminierung geeignet funktionalisierter Disaccharide (**43** und **44**) erfolgen. **R** stellt einen Alkylrest mit Säurefunktion oder einen Kohlenhydratrest, **R'** eine beliebige Schutzgruppe zur Maskierung der Carbonylfunktion des Zuckers dar.

Die derivatisierten Disaccharide **43** und **44** sind ausgehend von einem Galactosyldonor und einem *N*-Acetylglucosaminid-Akzeptor über β -Galactosidase-*(B. circulans)*-katalysierte Glycosylierung und anschließende Funktionalisierung von C-6' (Weg A) oder alternativ über vorausgehende Derivatisierung des Monosaccharids mit folgender chemo-enzymatischer Glycosylierung (Weg C) zugänglich (Abb. 18). Unbedingt muss die Lactolgruppe des Akzeptormoleküls bzw. des Disaccharids geschützt sein, um unter den Bedingungen der

reduktiven Aminierung eine Reaktion an der in der offenkettigen Konstitution präsenten Aldehydgruppe zu vermeiden. Wie im vorigen Kap. 3.3.1 wiedergegeben wurde, zeigt das Akzeptor-Aglycon keinen Einfluss auf den Verlauf der chemo-enzymatischen Glycosylierung, so dass als Schutzgruppen verschiedenste Alkyl- oder Arylreste in Betracht kommen. Aufgrund der Möglichkeit zur Abspaltung unter milden Bedingungen und der sehr guten Darstellbarkeit des entsprechenden *N*-Acetylglucosaminids wurde als R' die Allylgruppe gewählt.

Da in den literaturbekannten β -Galactosidase vermittelten Glycosylierungen (Kap. 3.3.1) sehr gute Ergebnisse mit *para*-Nitrophenol als Abgangsgruppe erzielt wurden, soll auch hier *p*NP-Gal (**45**) als Donor zur Anwendung kommen.

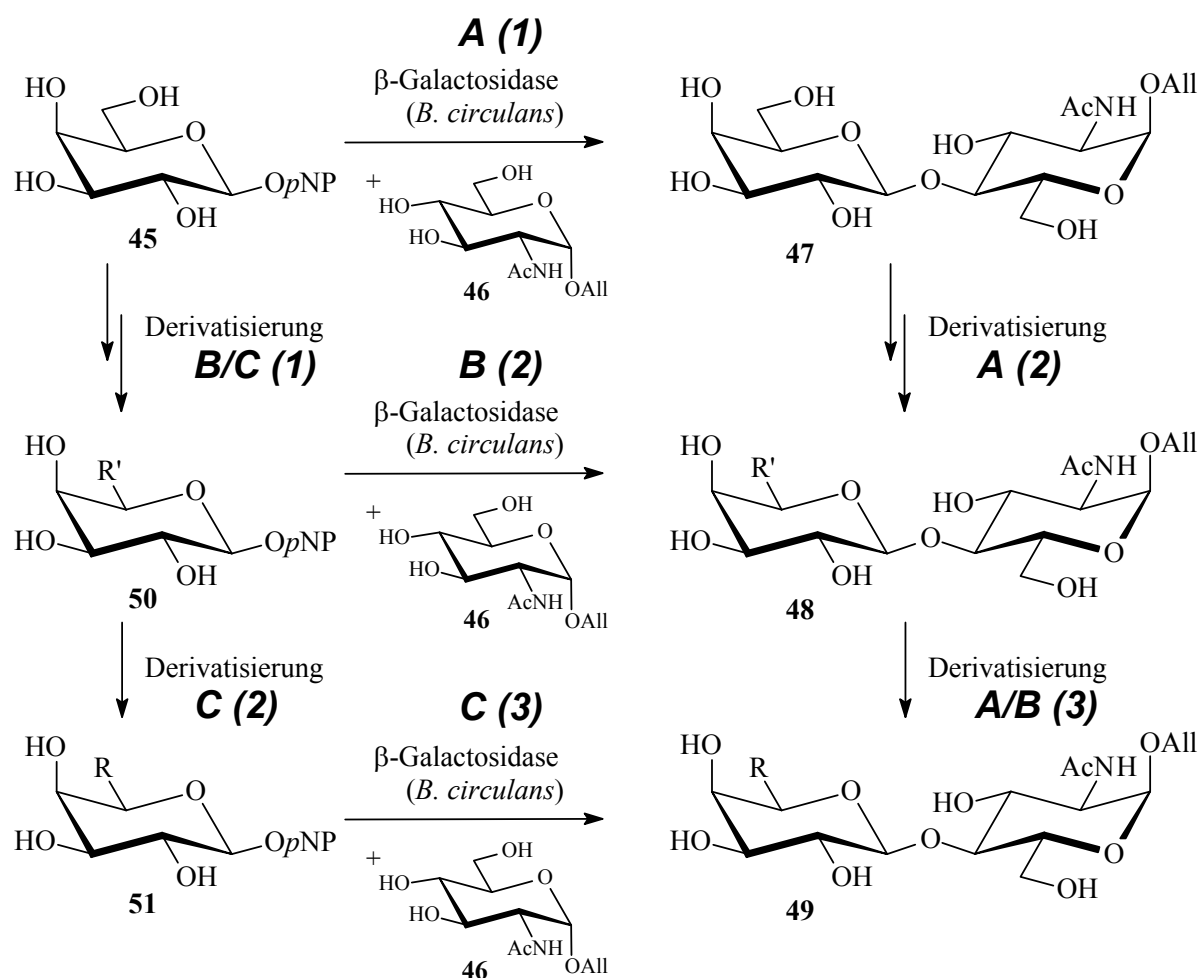


Abb. 18 Synthesewege zum Aldehyd- oder Amino-funktionalisierten Disaccharid: Variante A verläuft von 45 über 47 und 48 zu 49, Variante B verläuft von 45 über 50 und 48 zu 49, Variante C gibt den Reaktionsweg von 45 über 50 und 51 zu 49 an. R = CHO oder CH₂NH₂, R' steht für eine geeignete Aldehyd- bzw. Aminprecursor-Funktionalität.

Fraglich ist bei der in Abb. 18 als Variante C dargestellten Synthese-Route, ob die β -Galactosidase aus *B. circulans* die modifizierten Donorstrukturen als Substrat akzeptiert. Variante A ist in dieser Hinsicht unproblematisch, allerdings muss dort die Derivatisierung am Disaccharid durchgeführt werden, was insbesondere durch die vorangegangene chemo-enzymatische Umsetzung, die in ihrer Ansatzgröße limitiert ist, ungünstig sein kann. Als Variante B ist zudem das Beschreiten eines Mittelwegs denkbar, bei dem das Monosaccharid noch nicht vollständig derivatisiert ist, sondern eine Precursor-Funktionalität trägt, die sich nach erfolgter Glycosylierung in einem Schritt in die benötigte Aldehyd- oder Aminogruppe überführen lässt. Allerdings bleibt auch hier zu klären, ob das Enzym die veränderten Donoren erkennt.

Die Ergebnisse bei den Durchführungen der Synthesen von Aldehyd- oder Amin-funktionalisiertem Disaccharid nach diesen drei Wegen werden im Folgenden (Kap.5-7) vorgestellt und diskutiert.

5 Reaktionsfolge A:

Glycosylierung mit folgender Derivatisierung des Disaccharids

Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (**46**), der Glycosylakzeptor, wurde mittels einer Fischer-Glycosylierung synthetisiert, wie sie bereits von *Lee et al.*¹⁴⁵ oder auch von *Warren et al.*¹⁴⁶ beschrieben wurde. Die Ausbeute an Allylglucosid **46** konnte im Vergleich zu den Literaturwerten (31 % bzw. 55 %) jedoch beachtlich, auf 93 %, erhöht werden (Abb. 19), indem die dreifache Menge Katalysator (0.5 anstelle von 0.16 Äquivalenten) zugesetzt und das Produkt statt durch Kristallisation säulenchromatographisch gereinigt wurde.

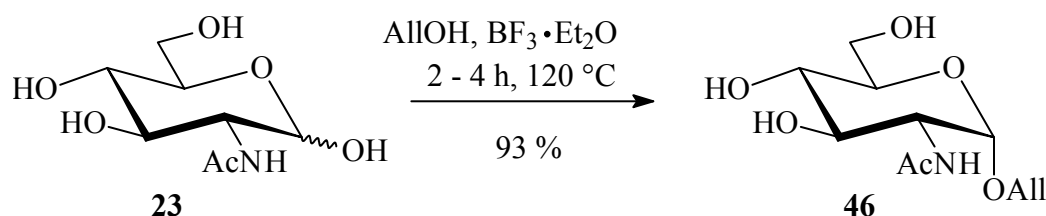


Abb. 19 Synthese des Glycosylakzeptors

Die folgende β -Galactosidase-katalysierte Glycosylierung wurde unter - nach dem Stand der Technik (Tab. 3) - optimalen Reaktionsbedingungen mit *p*NP-Gal als Galactosyldonor durchgeführt (Abb. 20). Recht zeitaufwendig gestaltete sich, bedingt durch den großen Akzeptorüberschuss, die saubere Isolierung des Disaccharids **47**, welches an sich in hervorragenden Ausbeuten erhalten wurde. Die Reinigung gelang durch mehrfache Gelpermeationschromatographie an Biogel P2 und Sephadex G10.

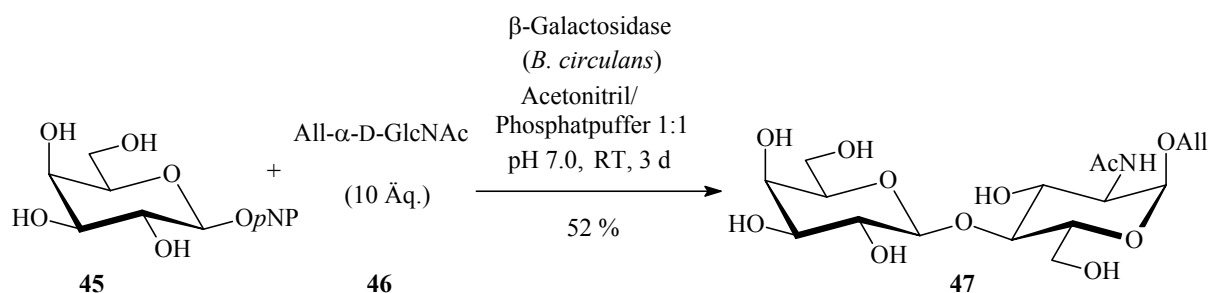


Abb. 20 Chemo-enzymatische Galactosylierung des *N*-Acetylglucosaminids

Für eine anschließende Derivatisierung an C-6 der Galactosyleinheit ist eine selektive Synthese wünschenswert, die es ermöglicht, umständliche Blockierungs- und Deblockierungsschritte am Disaccharid zu vermeiden. Klassisch-chemische Reaktionen erlauben

oftmals die Diskriminierung primärer und sekundärer Alkoholfunktionen, hier besteht darüber hinaus jedoch die Notwendigkeit, zwischen C-6 und C-6' zu unterscheiden.

Eine ausreichende Selektivität gewährleisten erneut Methoden, die sich der Enzym-Katalyse bedienen. Ein zweckdienlicher Biokatalysator, der ausschließlich eine Reaktion am Galactosylrest und bei diesem wiederum nur an C-6 vermittelt, ist die Galactose-Oxidase.

Da dieses Enzym auch für die Derivatisierung des Monosaccharids entsprechend Variante C (Abb. 18) von Interesse ist, wird es im Folgenden genauer vorgestellt.

5.1 Galactose-Oxidase

Galactose-Oxidase^{147,148} (D-Galactose:Sauerstoff-Oxidoreduktase, EC 1.1.3.9), ein extrazelluläres Enzym parasitärer Pilze (z. B. *Dactylium dendroides* oder *Polyporus circinatus*), katalysiert die Oxidation der primären Alkoholgruppe von D-Galactose und D-Galactosiden durch molekularen Sauerstoff, wobei *Galacto*-hexodialdose und Wasserstoffperoxid gebildet werden:

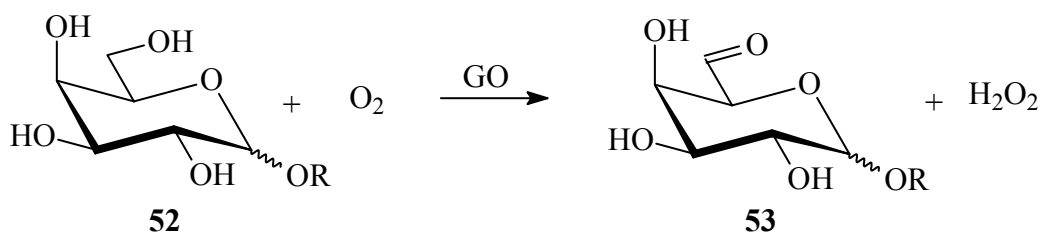
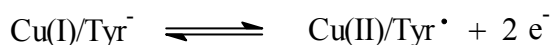


Abb. 21 Galactose-Oxidase-katalysierte Oxidation von Galactopyranosiden

Die Struktur der Galactose-Oxidase ist relativ gut erforscht.^{149,150,151} Es handelt sich um ein einkettiges Kupfer-Protein mit einem Molekulargewicht von 68 kDa.¹⁵² Das Enzym gehört zu den sogenannten „nicht-blauen“-Oxidasen, d. h. als prosthetische Gruppe ist ein Typ-2-Kupfer-Zentrum enthalten. Allgemein liegt das Metallzentrum bei diesem Typ in tetragonaler Koordination mit hauptsächlich Histidin-Liganden vor; die Sauerstoff-Aktivierung erfolgt zusammen mit einem organischen Coenzym aus dem Cu(I)-Zustand.

In der Galactose-Oxidase ist Cu(II) quadratisch-pyramidal konfiguriert. Die äquatorialen Positionen werden von zwei Histidin-Liganden, der Substratbindungsstelle und einem Tyrosinat/Tyrosylradikal-System besetzt, in axialer Stellung befindet sich ein Tyrosinatrest.^{153,154} Dem äquatorialen Liganden wird eine Tyrosyl-Radikal/Tyrosinat-Anion-Redoxfunktion zuerkannt, so dass sich insgesamt eine zwei-Elektronen-Reaktion ergibt:



Die Elektronen werden auf Sauerstoff übertragen und das Cu(II)/Tyr⁻-System durch das Kohlenhydrat regeneriert.¹⁵⁵

Das Enzym wird durch eine Wasserstoffperoxidkonzentration von 3 mmol/l merklich inhibiert.¹⁴⁷ Weiterhin hemmen Hydroxylamin, Hydrazin und Cyanid das Enzym vollständig, Natriumchlorid und Kaliumchlorid ab einer Konzentration von 160 mmol/l. Natriumsulfat und Phosphat stören bei pH 7 nicht, unter pH 5.7 bewirkt eine 0.1 M Phosphatkonzentration eine verminderte Oxidation.¹⁵⁶ Für die katalytische Aktivität des Enzyms ist außerdem ein Ion Ca²⁺ pro Molekül Kohlenhydrat notwendig, die Substratbindung erfolgt auch ohne Calcium.¹⁵⁷

Die Substratspezifität der Galactose-Oxidase wurde eingehend von *Avigad et al.*¹⁴⁷ sowie von *Schlegel et al.*¹⁵⁶ untersucht. Das Enzym setzt eine Reihe verschiedener Substrate um, deren für die Erkennung entscheidendes Kriterium offensichtlich die Konfiguration an C-4 ist, denn neben D-Galactose werden auch D-Talose und D-Gulose oxidiert, D-Glucose und D-Mannose jedoch nicht. Derivate der D-Galactose mit Substituenten an C-4 werden ebenfalls nicht erkannt. Da D-Talose, D-Galactosamin, *N*-Acetyl-D-galactosamin und 2-Desoxy-D-galactose – wenn auch mit geringerer Geschwindigkeit – umgesetzt werden, kann man schließen, dass Position 2 einen kleineren Einfluss ausübt.

Galactoside reagieren zum Teil wesentlich schneller als Galactose, besonders Oligo- und Polysaccharide des Guaran-Typs zeigen eine sehr viel höhere Reaktionsgeschwindigkeit. Die intraglycosidische Bindung zwischen terminaler Galactose und subterminaler Glycosyleinheit kann β 1→6, α 1→6 oder α 1→4 ausgebildet sein, auch β 1→4-Verknüpfungen werden erkannt, jedoch wesentlich schlechter. Ebenso ist die Bindungsaffinität zu Oligo- und Polysacchariden mit Galactose-Endgruppe, ausgenommen Lactose, sehr viel höher als zu Galactose (K_M Gal = 0.24, Stachyose 0.013, Guaran 0.00031, Lactose > 0.5).¹⁴⁷

Ausgewählte Beispiele für Substrate der Galactose-Oxidase sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5 Relative Umsatzgeschwindigkeit verschiedener Substrate in der Oxidation mit Galactose-Oxidase bezogen auf D-Galactose^{147,156}

Substrat	rel. Umsatzgeschwindigkeit
D-Galactose	100
D-Talose	52
D-Gulose	0.08
D-Galactosamin	75
<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin	92

2- <i>O</i> -Methyl-D-galactose	50
3- <i>O</i> -Methyl-D-galactose	172
4- <i>O</i> -Methyl-D-galactose	0
Methyl- α -D-galactopyranosid	125
Methyl- β -D-galactopyranosid	340
Lactose (Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)Glc)	2
Melibiose (Gal(α 1 $\rightarrow$ 6)Gal)	80
Galactobiose (Gal(β 1 $\rightarrow$ 6)Gal)	154
Stachyose	610
Guaran	180

Aufgrund der oben vorgestellten Daten ist anzunehmen, dass das synthetisierte Disaccharid **47** ein eher schlechtes Substrat für die Oxidoreduktase darstellt. Entgegen diesen Befunden gibt es jedoch Publikationen, in denen Lactose,¹⁵⁸ Lactitol¹⁵⁹ und Methyl- β -D-LacNAc¹⁴³ in immerhin mittelmäßigen Ausbeuten Galactose-Oxidase-katalysiert oxidiert werden konnten. Tatsächlich führte die Anwendung der chemo-enzymatischen Methode auf das vorliegende synthetische Problem nicht zum Erfolg (Abb. 22). Eine Oxidation fand höchstens mit marginalen Ausbeuten statt, die es nicht erlaubten, das gewünschte Produkt zu isolieren. Das Edukt konnte dagegen nahezu vollständig zurückgewonnen werden.

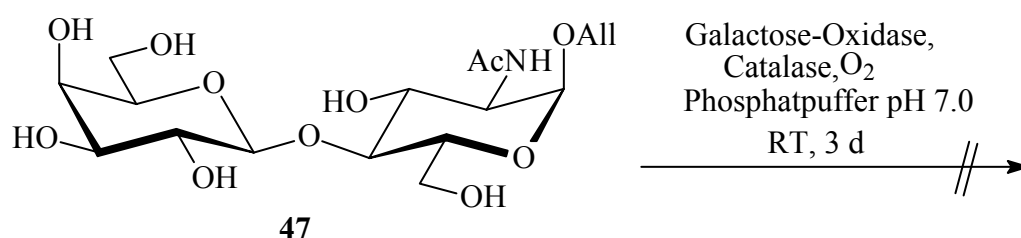


Abb. 22 Versuch der selektiven Oxidation von C-6'

Möglicherweise ist eine bessere Umsetzung durch Optimierung der Reaktionsbedingungen realisierbar, effektiver als die Ausweitung der Forschung in dieser Richtung erscheint es jedoch, erst die mit der Anwendung der anderen beiden Syntheserouten zu erzielenden Ergebnisse zu prüfen.

6 Reaktionsfolgen B und C: Derivatisierung des Monosaccharids

Synthese der neuen Donoren

6.1 Synthese von Donoren mit Aldehydprecursor-Funktionalität

Als nächstes sollte der Weg über die Synthese eines *p*NP-Gal-Derivats, das eine Aldehyd-Vorläuferfunktionalität trägt, mit nachfolgender enzymatischer Glycosylierung und anschließender Freisetzung des Aldehyds geprüft werden (Weg B, Abb. 18).

In der Literatur finden sich verschiedene Beispiele für Kohlenhydratstrukturen, aus denen ein Hexodialdopyranosid in einem Schritt zugänglich ist (Abb. 23).

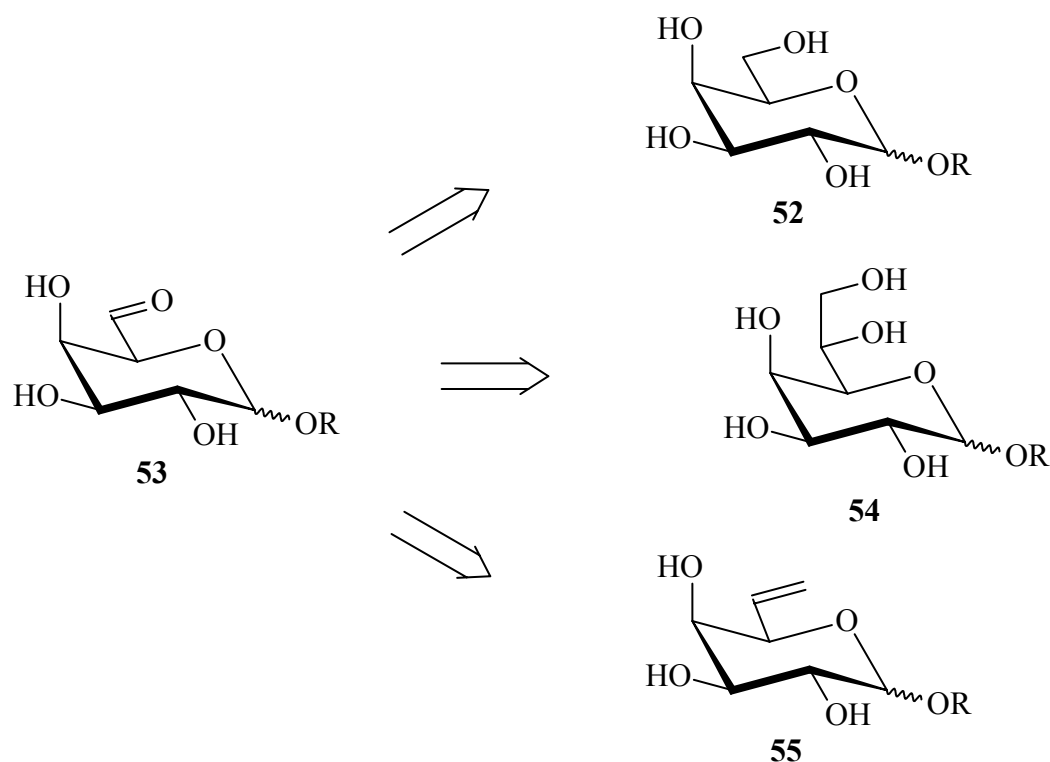


Abb. 23 Mögliche Edukte zur Synthese eines *galacto*-Hexodialdo-1,5-pyranosids

Die Erzeugung der Aldehydgruppe mittels selektiver Oxidation einer primären Alkoholfunktion erfordert als Vorläuferstruktur den üblichen Donor *p*NP-Gal, dessen Einsatz bereits in der Diskussion von Variante A beschrieben ist. Via Periodatspaltung kann die Darstellung des Hexodialdopyranosids ausgehend von einem Heptopyranosid (54) erfolgen. Alternativ ist die Aldehydgruppe mittels Ozonolyse eines Hept-6-enopyranosids (55) einföhrbar.

Eine Periodatspaltung zur Darstellung verschiedener oxidierter Hexoside ist von *Petterson et al.*¹⁶⁰ durchgeführt worden. Zur Synthese des *galacto*-konfigurierten Aldehyds beginnt die literaturbekannte Reaktionssequenz mit einer Kettenverlängerung von D-Mannose mit Nitromethan und folgender Nef-Reaktion.^{161,162,163} Die *D-glycero-D-galacto*-Heptose wurde dann in einer Fischer-Glycosylierung mit Methanol umgesetzt, abschließend erfolgte die Periodatspaltung zwischen C-6 und C-7.¹⁶⁰ Problematisch an dieser Reaktionsfolge ist der Glycosylierungsschritt. Sowohl die Stereoselektivität bezüglich der anomeren Konfiguration als auch das Auftreten von Furanosiden ist ungünstig. Überwiegend wird das für eine β -Galactosidase nicht umsetzbare α -Anomer gewonnen, und auch die in der angestrebten enzymatischen Glycosylierung nicht verwertbaren Furanoside sind stets zu großen Anteilen vertreten. Generell werden niedrige Ausbeuten an Pyranosid berichtet (bis zu 30 %), die Darstellung speziell des β -Galactopyranosids erfolgte sogar nur mit 2 %iger Ausbeute. Die Methode wird zur Synthese von Derivaten seltener Zucker wie D-Gulose,¹⁶⁴ ansonsten jedoch wenig angewandt.

In den literaturbeschriebenen Synthesen von Hept-6-enopyranosiden **55** wurde die Alkenfunktionalität durch Wittig-Reaktion oder in einem Fall¹⁶⁵ mit Lombardos Reagenz¹⁶⁶ selbst aus einem Aldehyd erzeugt. Dabei diente sie meist nicht als dessen Schutzgruppe, sondern wurde im weiteren Verlauf der Synthese für Reaktionen an der C-C-Doppelbindung benötigt. In der Arbeit von *Lehmann et al.*¹⁶⁷ jedoch, deren Ziel die Darstellung von L-Galactose aus D-Galactose mittels Oxidation von C-6 und Reduktion von C-1 war, wurde die Methylengruppe erstmals zu einer temporären Maskierung einer Aldehydfunktion genutzt. Weitere Arbeiten, in denen eine Carbonylgruppe aus einem zuvor erzeugten Olefin wieder freigesetzt wurde, folgten.^{165,168}

Die Anwendung dieser Methode – Oxidation und Maskierung der Aldehyd-Funktionalität als Alken – bietet sich hier an. Zum einen kann die Olefinstruktur sowohl vor der enzymatischen Glycosylierung in Gegenwart der *para*-Nitrophenolgruppe als auch nach der Verknüpfung der Zuckereinheiten selektiv mittels Ozonolyse in die gewünschte Carbonylverbindung überführt werden, zum anderen sind die ersten Syntheseschritte auf dem Weg zu 4-Nitrophenyl- β -D-*galacto*-hept-6-eno-1,5-pyranosid (**56**) mehrfach beschrieben und verbessert worden (s. u.), so dass die Reaktionsfolge ohne Schwierigkeiten durchzuführen sein sollte.

Als Variation der Olefinstruktur wurde außerdem die entsprechende Synthese eines *pNP*-Galactosids mit Allylsubstituent in 6-Position geplant, das quasi ein kettenverlängertes

Analogon repräsentiert und ebenfalls mittels Ozonolyse in einen Aldehyd umgewandelt werden kann.

6.1.1 Synthese von 4-Nitrophenyl- β -D-galacto-hept-6-eno-1,5-pyranosid (**56**) und 4-Nitrophenyl-6-O-allyl- β -D-galactopyranosid (**57**)

Der naheliegende Versuch, die Synthese der Zielverbindungen mit *p*NP-Gal als Edukt zu beginnen, stellte sich im Fall des Olefins als ungünstig heraus. Auf die diesbezüglichen Ergebnisse und Beobachtungen wird an späterer Stelle eingegangen. Als geeignet erwies sich die Darstellung des Olefins **56** bzw. des allylsubstituierten Galactosids **57** ausgehend von D-Galactose. Die Synthese setzt sich dann aus zwei Teilen, einen die Derivatisierung der Hydroxylgruppe an C-6 und einen die Einführung der *para*-Nitrophenylgruppe betreffend, zusammen (Abb. 24). Begonnen wird zweckmäßigerweise mit der Derivatisierung der Hydroxylgruppe an C-6, die Einführung der *para*-Nitrophenylgruppe findet im zweiten Abschnitt der Synthese statt.

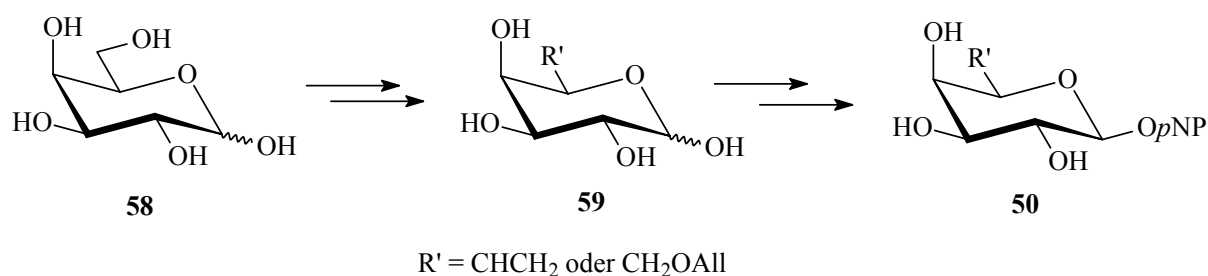


Abb. 24 Teilsynthesen

6.1.1.1 Derivatisierung an C-6

Der literaturbekannten Synthese folgend, wurde Diisopropylidengalactose¹⁶⁹ (**60**) mittels Pfitzner-Moffat-Oxidation in den Dialdehyd **61** überführt.^{170,171} Auf dessen beschriebene Reinigung durch Kugelrohrdestillation wurde verzichtet, da diese mit recht hohen Ausbeuteverlusten verbunden ist. Stattdessen wurde das Rohprodukt nach Waschen mit Wasser und wiederholtem Abfiltrieren von Dicyclohexylharnstoff direkt in der nächsten Reaktion eingesetzt. Diese 1972 erstmals von *Lehmann et al.*¹⁷² vorgestellte Umsetzung des Kohlenhydrats **61** in der Wittig-Reaktion wurde dort in wasserfreiem Diethylether mit *in-situ*-Generation des Phosphoniumylids aus Methyltriphenylphosphoniumbromid und *n*-Butyllithium durchgeführt und erbrachte die Hept-6-enopyranose **62** nach destillativer Aufreinigung in 56 %iger Ausbeute. *Lee et al.*¹⁷³ haben später das gleiche Produkt mit einer längeren

Reaktionszeit (16 h statt 2-3 h) und säulenchromatographischer Reinigung anstelle der Destillation mit einem ähnlichen Ergebnis (48 %) herstellen können. Eine Verbesserung der Ausbeute auf 83 % haben 1993 *Blake et al.*¹⁷⁴ durch Verwendung von trockenem THF als Lösemittel und Kalium-*tert*-butylat als Phosphoniumiodid deprotonierende Base erreicht. Die höhere Ausbeute ist dabei wohl weniger auf *tert*-Butylat und Iodid, als vielmehr auf THF zurückzuführen, denn hohe Ausbeuten um 90 % bei Verwendung von THF als Lösungsmittel wurden auch bei Wittig-Reaktionen an anderen Hexodialdosen beschrieben, bei denen das Ylid aus dem Methylphosphoniumbromid und ebenfalls Kalium-*tert*-butylat¹⁷⁵ oder auch Kaliumbis(trimethylsilyl)amid¹⁷⁶ gebildet wurde. Möglich ist auch der Einsatz eines „Instant-Ylids“, Methylidentriphenylphosphoran, das in Benzol zu sehr guten,¹⁷⁷ in Diethylether zu mittleren Ausbeuten¹⁶⁷ führte.

Diese Ergebnisse berücksichtigend wurde die Kettenverlängerung nach der Methode von *Blake et al.*,¹⁷⁴ allerdings unter Verwendung des kostengünstigeren Phosphoniumbromids anstelle des Iodids, durchgeführt. Das Produkt konnte in einer Ausbeute von 59 % über zwei Stufen isoliert werden. Die Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppen¹⁷⁸ erfolgte mit 0.1 M Salzsäure bei 90 °C quantitativ zu **63**.

Analog zu der Darstellung der methylen-substituierten Galactose **62** wurde 6-*O*-Allyl-D-galactose **64** synthetisiert. Anstelle von Pfitzner-Moffat-Oxidation und Wittig-Reaktion wurde die Allylgruppe in Anlehnung an eine von *Paulsen et al.*¹⁷⁹ beschriebene Allylierung eines GlcNAc-Derivats Phasentransfer-katalysiert eingeführt (Abb. 25).

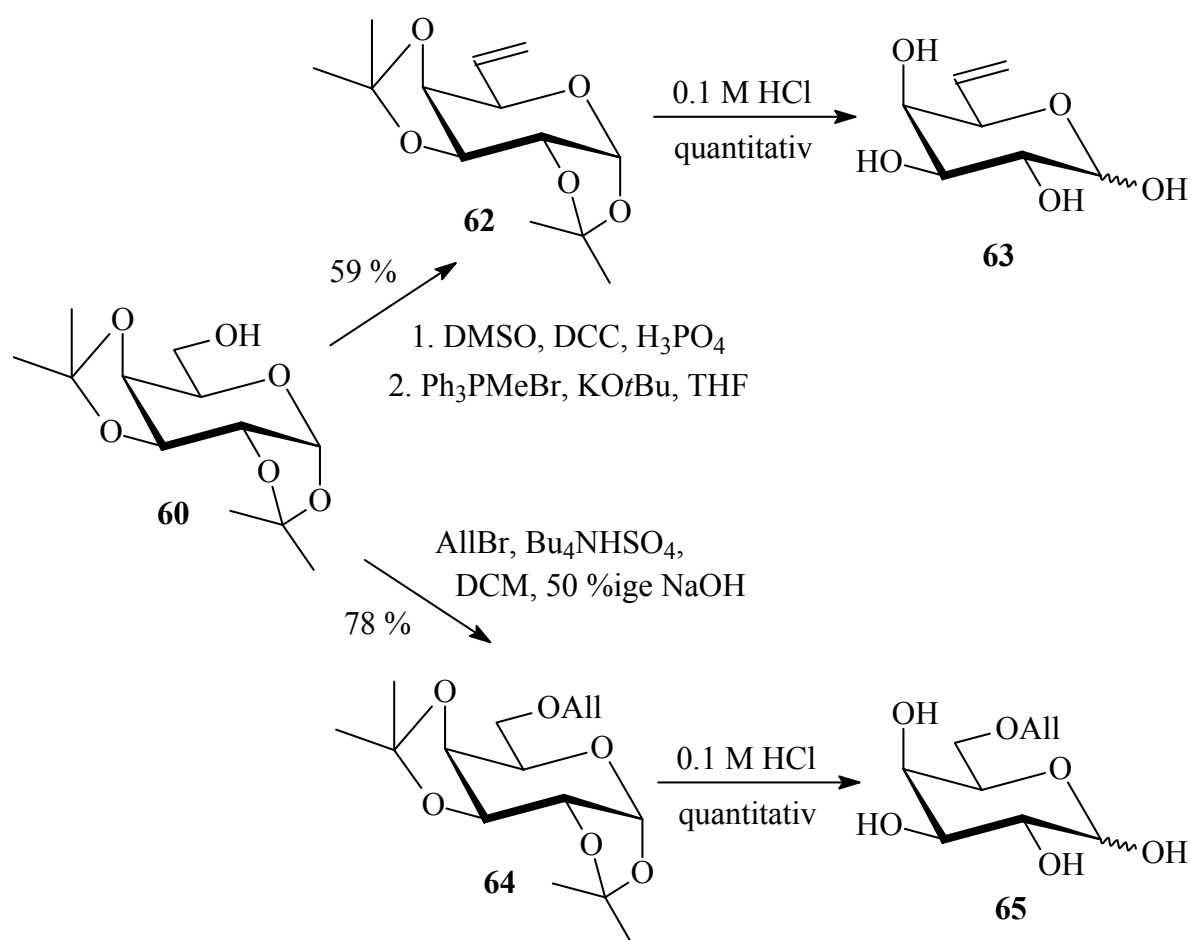


Abb. 25 Derivatisierung an C-6

6.1.1.2 Einführung der *para*-Nitrophenylgruppe

An dieser Stelle bieten sich zur Einführung der *para*-Nitrophenolgruppe drei alternative Methoden an: eine Glycosylierung nach Helferich, eine Koenigs-Knorr-Glycosylierung oder die Trichloracetimidat-Methode. Während der Weg über das Trichloracetimidat die zuverlässigste Version darstellt, ist die Reaktion nach Helferich diejenige mit den wenigsten Syntheseschritten. Die Koenigs-Knorr-Glycosylierung nimmt beide Kriterien betreffend den mittleren Platz ein. Im Folgenden werden die mit der Ausführung dieser Methoden erzielten Ergebnisse vorgestellt.

Helferich-Glycosylierung:

Die Einführung der *para*-Nitrophenylgruppe in β -Konfiguration am anomeren Zentrum schien am praktikabelsten nach Acetylierung des Zuckers mittels einer Helferich-Glycosylierung erreichbar zu sein. Diese Glycosylierungsmethode haben *Smits et al.*¹⁸⁰ für verschiedene Phenole und Benzylalkohole hinsichtlich geeigneter Katalysatoren und Reaktionsbedingungen am Beispiel von Glucose untersucht. Dabei konnten sie das jeweilige

Glucosid in 52 bis 85 %iger Ausbeute herstellen, wenn äquimolare Mengen von Glucose-pentaacetat, substituiertem Phenol-Derivat und Bortrifluorid-Etherat als Katalysator verwendet wurden. Die Reaktionszeit hing vom jeweiligen Substitutionsmuster des Aromaten ab und war im Falle von *para*-Nitrophenol mit 3 Tagen außergewöhnlich lang. Ähnliche Ergebnisse wurden zuvor bereits von *Ferrier et al.*¹⁸¹ bei der *para*-Nitrophenylierung von Idosepentaacetat erhalten.

Das für die Helferich-Glycosylierung benötigte β -Acetat wird üblicherweise durch kurzes Rühren des Zuckers in Essigsäureanhydrid mit Natriumacetat bei 120 °C hergestellt. Die Übertragung dieser Methode auf die in 6-Position derivatisierten Galactosen erbrachte jedoch ein Gemisch aus α - und β -Pyranose sowie α - und β -Furanose, das säulenchromatographisch nur teilweise getrennt werden konnte.

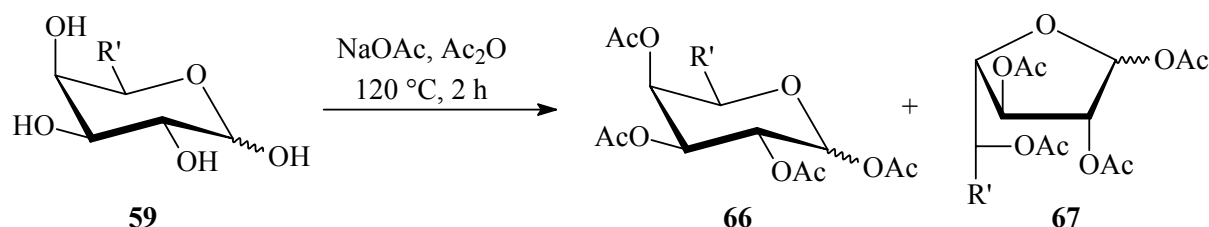


Abb. 26 Acetylierung der 6-derivatisierten Galactosen unter Erhalt eines Pyranose/Furanosegemisches

Während Glucoside und Mannoside im Allgemeinen wenig Neigung zeigen, furanoide Systeme auszubilden, ist ein recht hoher Anteil an diesen für Galactoside typisch. Die jeweilige Gleichgewichtszusammensetzung der Isomere in salzsaurer methanolischer Lösung weist einen Anteil von 22 % an Galactofuranosid, aber nur 1.5 % bzw. 0.7 % an Gluco- bzw. Mannofuranosid auf.¹⁸² Offenbar wird die Neigung zur Bildung von Furanosen durch einen Substituenten an C-6 noch verstärkt, wie auch die Acetylierung von 6-Desoxy-6-fluoro-D-galactose durch *Kováč et al.*,¹⁸³ bei der die acetylierten Isomere in einem Verhältnis von p:f 7:3 erhalten wurden, zeigt. Auch für eine mit Essigsäureanhydrid und Pyridin (1:1.5) durchgeführte Acetylierung der *galacto*-Hept-6-enopyranose **63** mussten *Lee et al.*¹⁷³ feststellen, dass die α -Pyranose in nur 45 %iger Ausbeute isoliert werden konnte, während der übrige Teil des gebildeten Produkts in Spuren als β -Pyranose, hauptsächlich jedoch als α - und β -Furanose vorlag.

Die Umsetzung der erhaltenen, mit β -Pyranose angereicherten Mischung der acetylierten Anomere in der Helferich-Glycosylierung nach *Smits et al.*¹⁸⁰ führte zwar zu einer vollständigen Reaktion zum *para*-Nitrophenylglycosid, erbrachte jedoch – auch bei kürzerer

Reaktionszeit – überwiegend α -Pyranosid **69** und nur wenig β -Anomer **71** (Abb. 27). Zur Synthese größerer Mengen des β -konfigurierten Produkts in reiner Form erschien diese Methode nicht geeignet.

Glycosylierung nach Koenigs-Knorr

Da *Kleine et al.*¹⁸⁴ bzw. *MacManus et al.*¹⁸⁵ für die *para*-Nitrophenylierung underivatisierter D-Galactose bzw. eines ähnlich derivatisierten Zuckers, 6,7-Didesoxy- β -D-galacto-hept-6-ynose, erfolgreich die Koenigs-Knorr-Glycosylierung angewandt haben, wurde diese über Acylierung, Bromierung und Glycosylierung in drei Schritten verlaufende Synthese auch auf das allylsubstituierte Galactosid **65** übertragen.

Die Ausbeute an acetyliertem pyranoiden Konstitutionsisomer konnte im Vergleich zu den vorherigen Ergebnissen verbessert werden, indem die Acetylierung der 6-*O*-Allyl-D-galactopyranose in Essigsäureanhydrid und Pyridin im Verhältnis 1:5 durchgeführt wurde, womit die Vermeidung der Bildung von Furanosen bereits beim entsprechenden L-Galactosederivat¹⁸⁶ und bei 6-*O*-*p*-Tolylsulfonylgalactopyranose gelungen ist.¹⁸⁷ Auch hier wurde nahezu ausschließlich acetylierte Pyranose isoliert.

Bei der folgenden Bromierungsreaktion mit Bromwasserstoff in Eisessig sind, wie auf dem DC durch Detektion mit Wasserstoffperoxid und dann Fluorescein erkennbar, bromhaltige Produkte entstanden. Diese wurden grob von den Salzen befreit und dann ohne weitere Identifizierung unter Phasentransferkatalyse durch Tetrabutylammoniumbromid¹⁸⁸ mit *para*-Nitrophenol zur Reaktion gebracht. Die säulenchromatographische Aufarbeitung erbrachte zwei Fraktionen, von denen die erste wahrscheinlich das erwünschte Produkt, *para*-Nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-allyl- β -D-galactopyranosid (**71**) enthielt, wenn auch mit starker Verunreinigung und in sehr geringer Ausbeute. Eine ungefähre Zuordnung der NMR-Signale zu der *para*-Nitrophenyl-Gruppe, der Allylgruppe, den Zucker-Protonen sowie den Acetylgruppen war möglich. In der zweiten Fraktion dagegen lag ein Produkt vor, das eine *para*-Nitrophenyl-Gruppe an der OH-1-Position aufweist, jedoch keine Allylgruppe mehr an der OH-6-Position (**70**).

Der versuchsweise angewandte Reaktionsweg über eine pyridinkatalysierte Benzoylierung von 6-*O*-Allyl-D-galactose mit anschließender Bromierung mit Bromwasserstoff, gelöst in Eisessig, worauf eine Umsetzung mit *para*-Nitrophenol folgen sollte, führte ebenfalls nicht zum Erfolg. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung des nach der Bromierung entstandenen Produkts zeigte, dass das Zwischenprodukt 2,3,4-Tri-*O*-benzoyl- α -D-galactopyranosylbromid nicht vorlag. Es hat zwar eine Bromierung an C-1 stattgefunden, was

die starke Tieffeldverschiebung von 6.94 ppm des H-1-Protons anzeigt, es liegen jedoch im Spektrum keine Signale vor, die sich der Allylgruppe zuordnen lassen.

Dies legt den Schluss nahe, dass diese Schutzgruppe unter den Bedingungen zur Einführung des Bromids abgespalten wird. Dem widersprechend finden sich allerdings Literaturbeispiele für erfolgreiche Bromierungen in Gegenwart eines Allylsubstituenten.^{189,190} Der Sachverhalt wurde nicht näher untersucht, da in den bisherigen Versuchen der Eindruck gewonnen wurde, dass die Derivatisierung an der OH-6-Position eine Verringerung der Reaktivität des Kohlenhydrats am anomeren Zentrum bewirkt, wie dies in anderen Arbeiten schon bei Uronsäuren beobachtet wurde,^{191,192} so dass die den Glycosyldonor relativ schwach aktivierende Koenigs-Knorr-Methode auch aus diesem Grund nicht für das hier vorliegende Glycosylierungsproblem geeignet schien.

Trichloracetimidat-Methode

Zur Gewährleistung einer ausreichenden Aktivierung des Glycosyldonors wurde schließlich die Trichloracetimidat-Methode¹⁹³ gewählt, die das gewünschte derivatisierte *para*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid **71** in zufriedenstellender Ausbeute und guter Reinheit erbrachte (Abb. 27 und Abb. 28).

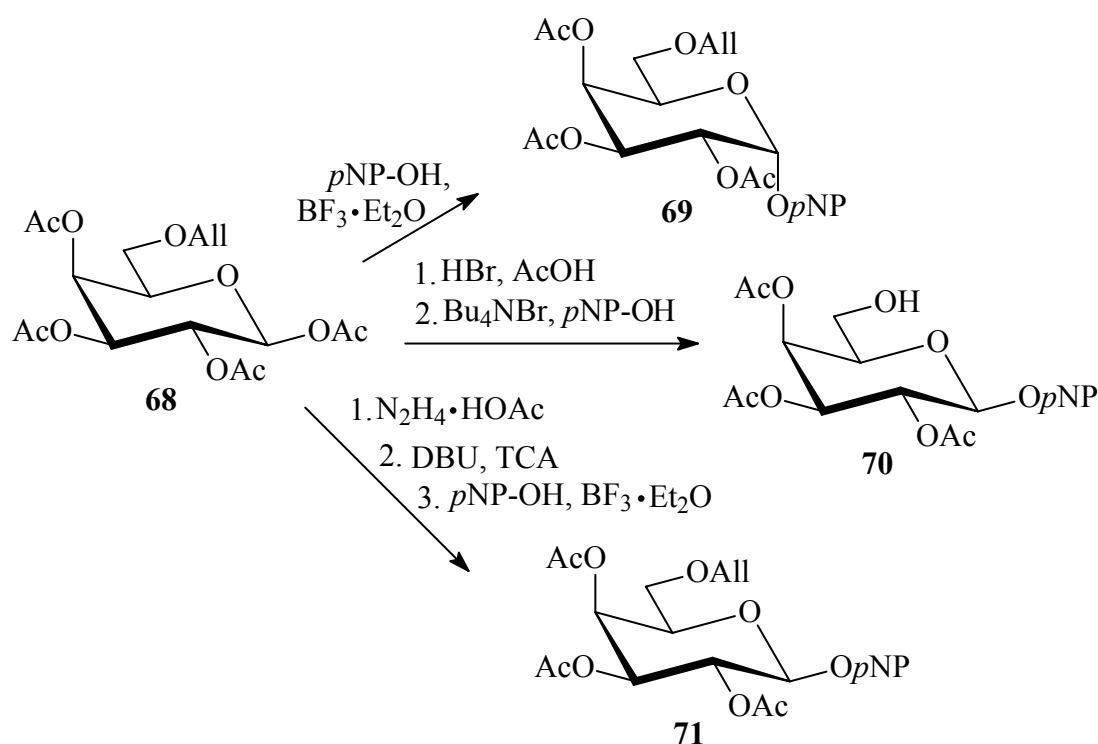
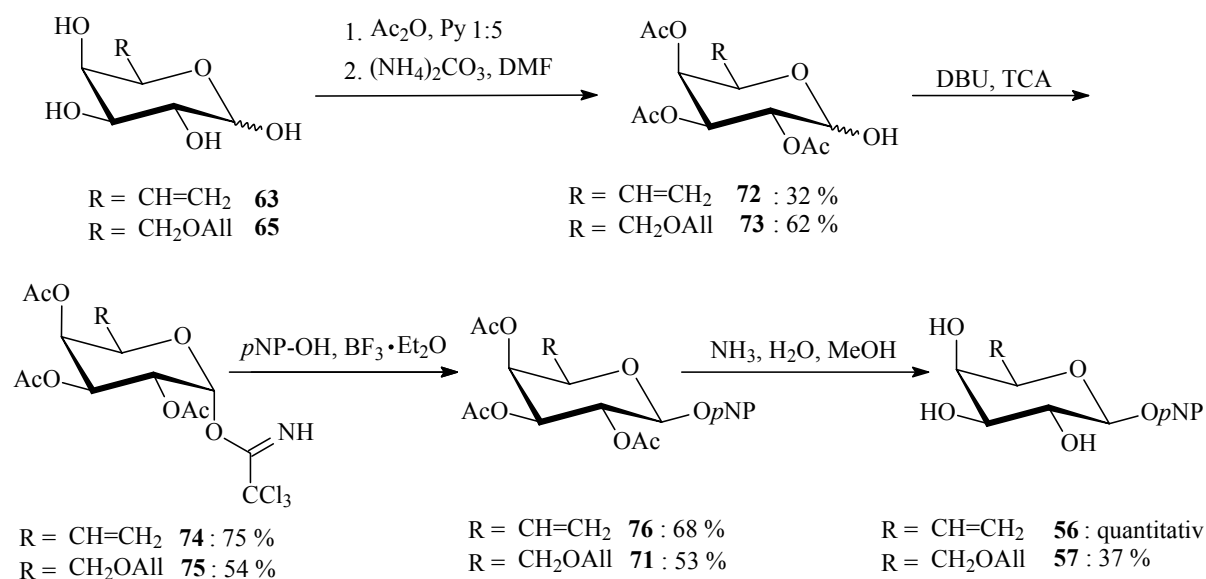


Abb. 27 Glycosylierung mit Allyl-substituierter Galactose nach verschiedenen Methoden und dabei isolierte Hauptprodukte

Abb. 28 Einführung der *p*NP-Gruppe in das Galactose-Derivat

Nach Acetylierung mit Essigsäureanhydrid/Pyridin 1:5 erfolgte eine selektive Deacetylierung an C-1 mit Ammoniumcarbonat¹⁹⁴ oder in einem parallelen Ansatz auch mit Hydraziniumacetat.^{195,196} Die DBU-katalysierte Addition von Trichloracetimid¹⁹⁷ führte in 75 %iger (**74**) bzw. 54 %iger (**75**) Ausbeute zum α -Trichloracetimidat, mit dem *para*-Nitrophenol in Dichlormethan unter Bortrifluorid-Katalyse problemlos glycosyliert werden konnte.^{198,199} Das allylsubstituierte Galactosid **71** konnte in 53 %iger Ausbeute isoliert werden, zusätzlich wurden 35 % einer Verbindung erhalten, die als eduktisomeres Trichloracetamid (**71b**) identifiziert wurde. Das methylenierte Galactosid **76** wurde in 68 %iger Ausbeute gewonnen. Wieder konnte auch die Bildung des Acetamids (**77**) festgestellt werden, in 13 %iger Ausbeute trat außerdem das α -konfigurierte Produkt **78** auf (Abb. 29).

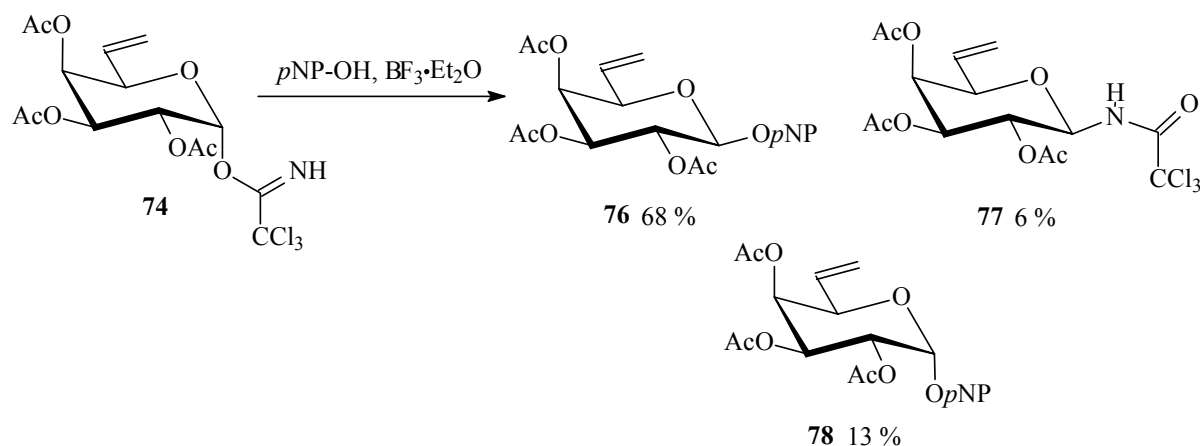


Abb. 29 Gewünschtes Produkt und Nebenprodukte bei der Glycosylierung

Die abschließende Deacetylierung gelang mit methanolischer Triethylaminlösung²⁰⁰ oder methanolischer Ammoniaklösung in 97 %iger Ausbeute bzw. quantitativ, im Falle des Allylderivats allerdings nur zu 37 %.

Um zu prüfen, ob die Aldehydfunktion aus diesen Verbindungen problemlos freigesetzt werden kann, wurde das Hept-6-eno-*galacto*-pyranosid **56** ozonolysiert. Tatsächlich konnte das Produkt **36** in 47 % Ausbeute gewonnen werden, die synthetisierten Galactoside **56** und **57** sind in dieser Hinsicht also als Vorläuferstrukturen geeignet. Die Untersuchungen zu ihrer Erkennung und Umsetzung durch die β -Galactosidase aus *B. circulans* werden im nächsten Kapitel beschrieben.

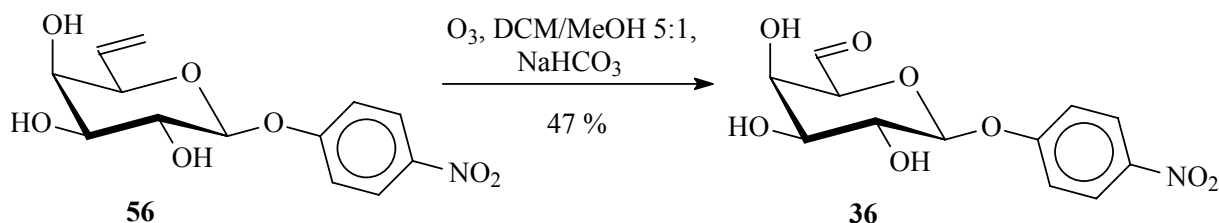


Abb. 30 Test-Ozonolyse zur Freisetzung der Aldehydfunktion aus dem Alken

Um den Aldehyd selbst (entsprechend Weg C in Abb. 18) zu erhalten, ist der Weg über den C-C-Doppelbindungs-Precursor zu umständlich. Stattdessen bieten sich schnellere Darstellungen ausgehend von *p*NP- β -D-Galactopyranosid an.

6.2 Synthese eines Donors mit Aldehyd-Funktionalität

Ausgehend vom kommerziell erhältlichen *p*NP- β -D-Galactopyranosid (**45**) ist es am naheliegendsten, die bereits vorhandene primäre Alkoholfunktion zu oxidieren. Wünschenswert ist dabei eine selektive Reaktion, die sich zum einen auf der Stufe des Aldehyds anhalten lässt, ohne dass die korrespondierende Carbonsäure gebildet wird, und die zum anderen in Gegenwart der sekundären Alkoholfunktionen durchführbar ist, so dass sie ausgehend vom ungeschützten Glycopyranosid in nur einem Schritt zum Produkt führt. Neben der Anwendung einer enzymkatalysierten Oxidation wurde auch geprüft, welche Möglichkeiten chemische Katalysatoren wie Periodinan oder TEMPO diesbezüglich bieten.

6.2.1 Selektive chemische Oxidation

Die Reaktion mit dem TEMPO-Radikal²⁰¹ als katalytischem Co-Oxidans verläuft regio-spezifisch an der primären Alkoholfunktion. In der Regel wird die Synthese für unpolare Alkohole, unter Bedingungen der Phasentransferkatalyse und mit einem zweiten Oxidationsmittel wie dem Natriumhypochlorit-Kaliumbromid-System sowohl zur Darstellung von Carbonsäuren,²⁰² als auch, bei kurzen Reaktionszeiten, zur Darstellung von Aldehyden genutzt.^{203,204} *Van Bekkum et al.*²⁰⁵ haben die Reaktion auf ein ungeschütztes Methylglucosid, das sie in Wasser bei pH 8.5 zum Aldehyd und zur Carbonsäure oxidierten, übertragen. Auch eine ähnlich durchgeführte Oxidation von Hyaluronsäure in Wasser bei pH 10 ist kürzlich beschrieben worden.²⁰⁶

Eine ebensolche Anwendung der TEMPO-Oxidation auf *para*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid führte zwar prinzipiell zum Erfolg, jedoch in sehr unbefriedigenden Ausbeuten (Abb. 31).

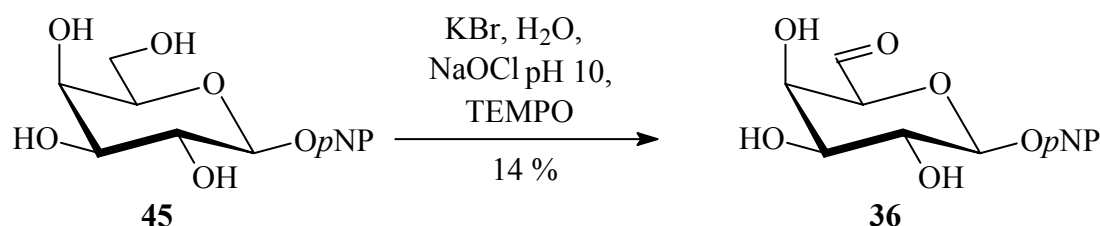


Abb. 31 Selektive Oxidation von *p*NP-Gal mittels TEMPO

Periodinan, das Dess-Martin-Reagenz,^{207,208} (79) oxidiert primäre Alkohole zum Aldehyd und sekundäre Alkohole zum Keton (Abb. 32). Von Vorteil sind neben der Ungiftigkeit des Reagenzes die milden Reaktionsbedingungen (Raumtemperatur und neutrale Lösungen), kurze Reaktionszeiten (20 min bis 2 h), eine sehr leichte Aufarbeitung und Ausbeuten von üblicherweise 80 - 100 %.^{207,209}

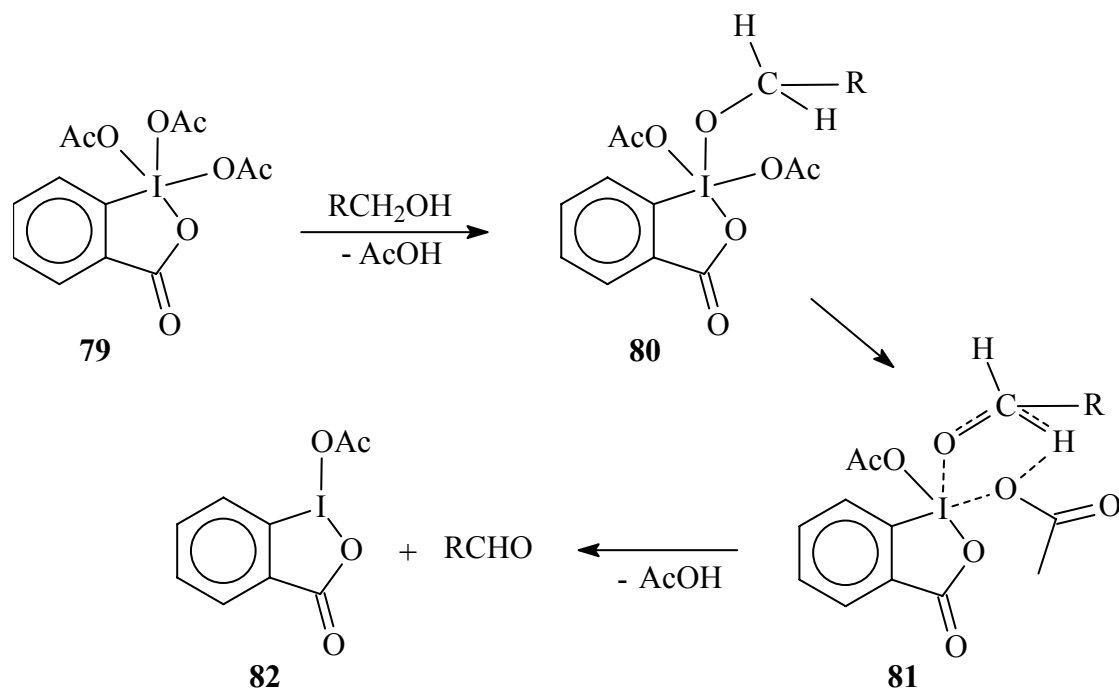


Abb. 32 Mechanismus der Oxidation mit Dess-Martin-Periodinan, DMP (1,1,1-Triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3-(1*H*)-on)^{210,211}

Obwohl hinsichtlich der Reaktion primärer und sekundärer Alkohole in bisherigen Veröffentlichungen kein Unterschied festgestellt wurde, wurde hier versucht, bei sehr kurzen Reaktionszeiten eine selektive Oxidation zu erreichen. Als größeres Problem als die Differenzierung stellte sich bei ausbleibender Schützung der Hydroxylgruppen an C-2 bis C-4 die schlechte Löslichkeit des Edukts in den üblicherweise für diese Reaktion verwendeten Lösungsmitteln Chloroform und Dichlormethan heraus. Alkohole sind als Lösungsmittel aus offensichtlichen Gründen nicht geeignet, in Wasser wird Periodinan hydrolysiert. Die Löslichkeit in Acetonitril wird dagegen als gut beschrieben. Für die Reaktion mit dem hydrophilen Galactosid wurde deshalb eine Lösung aus Dess-Martin-Periodinan in Dichlormethan hergestellt, zu der eine Lösung aus *p*NP-Gal in Acetonitril gegeben wurde. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion zeigte die Bildung eines einzigen neuen Produkts an. Nach 1 ½ h Reaktion konnte praktisch kein Umsatz mehr festgestellt werden, obwohl noch Reste des Edukts vorhanden waren.

Bedingt durch die recht große Hydrophilie von Edukt und Produkt gestaltet sich auch die Aufarbeitung weniger schnell als bisher beschrieben, jedoch nicht kompliziert. Gewöhnlich gelingt die besonders leichte Isolierung des Produkts durch Hydrolyse des Iodinans zu 2-Iodosobenzoat, welches durch Waschen mit Wasser vom unpolaren Produkt getrennt werden kann. Da sich *p*NP-Gal und das oxidierte Produkt ebenfalls in Wasser lösen, wird hier nach Zugabe von Wasser die wässrige Phase weiterbearbeitet, indem sie mit verdünnter

Natronlauge neutralisiert und dann gefriergetrocknet wird. Das Produkt kann anschließend säulenchromatographisch von Salzen, Edukt und Nebenprodukten gereinigt werden.

4-Nitrophenyl- β -D-*galacto*-hexodialo-1,5-pyranosid konnte mit dieser Methode in 32 %iger Ausbeute gewonnen werden (Abb. 33).

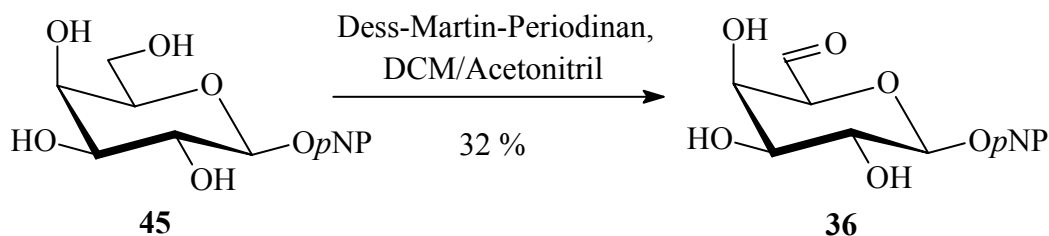


Abb. 33 Selektive Oxidation von *p*NP-Gal mittels Dess-Martin-Periodinan

6.2.2 Enzymatische Oxidation

Die besten Ausbeuten bei der Darstellung des Aldehyds **36** wurden bei Katalyse mit Galactose-Oxidase (GO) (Kap. 5.1) erreicht.

In der chemo-enzymatischen Synthese ist dieses Enzym fest etabliert, sowohl was die Umsetzung von Oligo-²¹² oder Polysacchariden²¹³ sowie Glycoproteinen²¹⁴ als auch was die Oxidation von *galacto*-konfigurierten Monosacchariden betrifft. Einig sind sich die Autoren darüber, dass die Reaktion in Phosphatpuffer bei pH 7.0 stattfinden und an Katalysator 120 bis 220 U GO pro mmol Substrat und die zehnfache Menge Catalase (auf GO bezogen) eingesetzt werden sollen. Catalase, die die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser katalysiert, wird zugesetzt, um das entstehende und sich bei den üblichen Substratkonzentrationen theoretisch auf eine Konzentration von etwa 100 mmol/l (bei vollständiger Umsetzung) anreichernde H₂O₂ abzubauen, da dieses Galactose-Oxidase schon in viel geringerer Konzentration (ab 3 mmol/l) deutlich inhibiert (Kap. 5.1).

Wichtig ist außerdem der Zusatz von Cu²⁺ in Form von Kupferchlorid oder Kupfersulfat. Geteilte Meinung herrscht darüber, welche Reaktionstemperatur zu wählen ist. Einige Autoren führen die Reaktion bei 4 °C durch,^{143,159,215} andere bevorzugen Raumtemperatur.^{158,216,217} Auch die angegebene Reaktionszeit differiert erheblich, von 30 Minuten²¹⁷ über mehrere Stunden bis 5 Tage.²¹⁶ Die Ausbeute für die Oxidation einfacher Galactoside liegt durchweg bei 75-100 %, wobei die Ansatzgröße in der Regel 1 bis 3 mmol beträgt. Nach Mazur *et al.*¹⁵⁹ kann die Umsetzung sogar im kg-Maßstab durchgeführt werden, wenn dies

auch eine Erhöhung der Katalysatormenge auf das vier- bis siebenfache des Standards erfordert.

Die Übertragung dieser Reaktionsbedingungen auf die Oxidation von 4-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (**45**), welches ein akzeptables Substrat darstellt, das etwa genauso schnell wie Galactose von Galactose-Oxidase umgesetzt wird,¹⁵⁷ führte zur praktisch quantitativen Bildung des gewünschten Produkts **36** (Abb. 34).

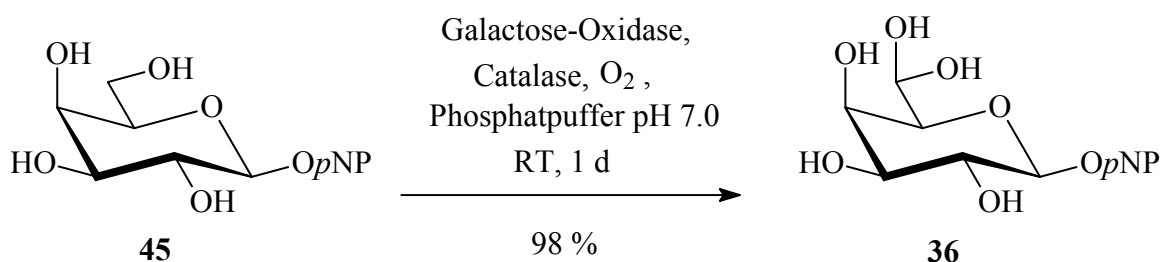


Abb. 34 Selektive Oxidation von *p*NP-Gal mittels Galactose-Oxidase

Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur, mit Spuren von Kupfersulfat und unter Sauerstoff-Atmosphäre durchgeführt. Eine Umsetzung an Luft ergab eine deutlich geringere Ausbeute (10 % d. Th.). Bedingt durch das wässrige Medium wurde anstelle des Aldehyds das Hydrat erhalten, was den weiteren Syntheseverlauf nicht beeinträchtigen sollte.

Die Reproduktion und Durchführung der Oxidation mit dermaßen gutem Ergebnis gelang anfänglich nicht. Die Ausbeuten lagen manchmal bei 50 %, was eine Trennung von unumgesetztem Edukt erheblich erschwerte, selten bei 70 %, oft ließ sich eine Umsetzung gar nicht feststellen. *Mazur et al.*²¹⁸ fanden bereits früher heraus, dass die Galactose-Oxidase eine ausgesprochen hohe Reinheit aufweisen muss, damit sehr gute Ausbeuten erlangt und die Bildung von Nebenprodukten, insbesondere Galacturonsäure, vermieden werden. Zudem konnte die Information²¹⁹ erlangt werden, dass Lösungen dieses Enzyms zum einen stets frisch angesetzt und sofort verbraucht werden sollten und zum anderen auch nur dann stabil sind, wenn ihre Konzentration größer als 10 mg/ml ist. Dies berücksichtigend konnten, kombiniert mit einem Wechsel des Anbieters, reproduzierbar sehr gute Ausbeuten über 90 % erreicht werden. Darüber hinaus gelang unter den verbesserten Katalysebedingungen nicht nur eine Verkürzung der Reaktionszeit von 3 d auf 1 d, sondern auch die Erhöhung der Substratmasse von 200 mg auf 300 mg bei gleichbleibender Enzymmenge (90 U) ohne Ausbeuteverluste.

Eine DC-Verfolgung der Reaktion ist möglich, der Aldehyd bildet jedoch keine distinkten Spots, sondern Schlieren, so dass eine Unterscheidung von dem ähnlich polaren Edukt nur

durch selektive Detektion, z. B. mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin gelingt. Das Produkt war stets mit winzigen Spuren eines hydrophoberen, vermutlich höher oxidierten Produkts verunreinigt. Bedingt durch die Lipophilie der *p*NP-Gruppe ist eine säulenchromatographische Reinigung des Produkts an Kieselgel in Dichlormethan/Methanol zwar möglich, aufgrund der schlechten Löslichkeit des oxidierten Galactosids in diversen Lösemitteln jedoch schwierig. Als bedeutend effektiver erwies es sich, das Produkt gar nicht aufzuarbeiten, sondern nach Entfernen des Wassers mittels Gefriertrocknung als Rohprodukt weiter einzusetzen. Das aus dem Puffer verbliebene Kaliumphosphat, dessen Masse fast die des Produkts erreichte, erwies sich in der weiteren Synthese als unschädlich; die Handhabung auch kleiner Mengen des Aldehyds wurde durch diese Verdünnung sogar erleichtert. Eine von *Maradufu et al.*²²⁰ verzeichnete Tendenz von Galactose-6-aldehyden, insbesondere bei Trocknung intermolekulare Acetalstrukturen auszubilden, wurde hier nicht beobachtet.

6.2.3 Nicht-selektive Oxidationsversuche an *p*NP-Gal

Zur Überprüfung, ob eine nicht-selektive Oxidation nach Schützung der sekundären Alkoholfunktionen die saubere Darstellung des Aldehyds in größeren Ansätzen ermöglicht, wurde auch die Anwendung derartiger Methoden zu dessen Darstellung untersucht.

Das benötigte geschützte, jedoch 6-OH-freie *p*NP-β-D-galactopyranosid ist nach einem von *Ekborg et al.*²²¹ beschriebenen Verfahren ausnehmend schnell zugänglich. In einer Eintopfreaktion wird *p*NP-Gal (**45**) mittels sequentieller Tritylierung, Benzoylierung und Detritylierung in das benötigte Derivat **83** überführt (Abb. 35).

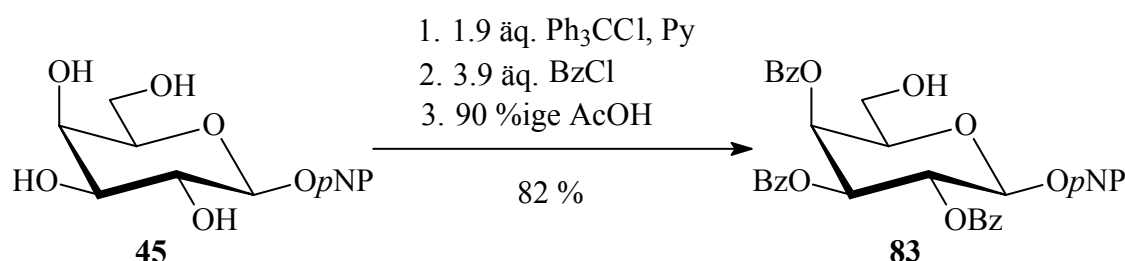


Abb. 35 Darstellung eines *p*NP-Galactosids mit geschützten sekundären Alkoholfunktionen nach *Ekborg et al.*²²¹

Die eigene Ausbeute für diese Reaktionsfolge lag bei 73 %, die Detritylierung wurde dabei nach einer Vorschrift von *Vasella et al.*²²² mit methanolischer Schwefelsäure statt Essigsäure

durchgeführt. Die etwas geringere Ausbeute lässt sich überwiegend auf die Bildung eines 3,6-ditritylierten Galactosids im ersten Reaktionsschritt zurückführen.

Die auf diese Weise erhaltene Verbindung wurde daraufhin einer Pfitzner-Moffat-Oxidation unterzogen, die jedoch als einziges Produkt 4-Nitrophenyl-2,3-di-*O*-benzoyl-4-desoxy- α -L-*threo*-hex-4-enodialdo-1,5-pyranosid (**84**) lieferte, dessen Bildung auf Oxidation und zusätzliche Eliminierung von Benzoessäure zurückzuführen ist (Abb. 36). Die Ausbeute an dieser Verbindung lag lediglich bei 17 %. 33 % des Edukts konnten zurückgewonnen werden, der restliche Zucker schien sich in weiteren Fragmentierungsreaktionen zersetzt zu haben, wie dies auch in anderen Fällen der Bildung α,β -ungesättigter Carbonylverbindungen beobachtet wurde.²²³

Ein ähnliches Ergebnis wurde überraschend auch in einer Dess-Martin-Oxidation erhalten, obwohl die Darstellung des entsprechend geschützten Methyl-*gluco*-Dialdehyds unter genau den gleichen Reaktionsbedingungen wie hier mit 63 %iger Ausbeute beschrieben ist.²²⁴ Mit dem benzoilylierten *p*NP-Galactosid **83** wurde als einziges Produkt die ungesättigte Verbindung **84** in 50 %iger Ausbeute erhalten, daneben konnten 50 % Edukt zurückgewonnen werden. Offenbar fördert die axiale Stellung der Benzoylgruppe den Austritt derselben so sehr, dass die gesättigte Carbonylverbindung nicht stabil ist.

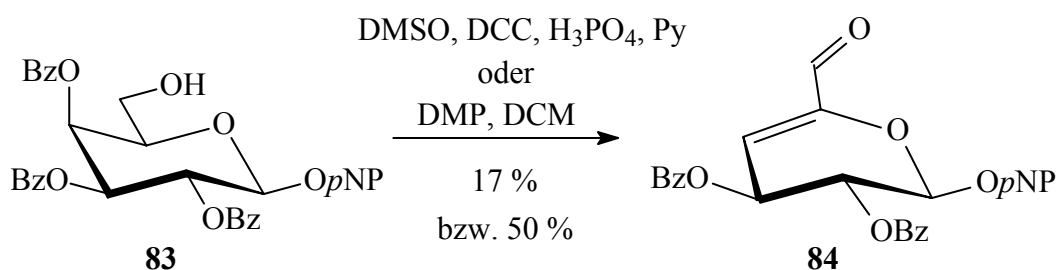


Abb. 36 Beobachteter Verlauf der Pfitzner-Moffat- und der Dess-Martin-Oxidation

Die aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Experimenten erhaltenen Daten belegen eindeutig die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung. Neben einem Singulett für das Aldehyd-Proton H-6 bei 9.28 ppm sind nur 4 weitere Protonen des Kohlenhydratgerüsts, stark tieffeldverschoben bei 5.7 bis 6.0 ppm, vorhanden. Das C-4-Signal liegt bei 115.73 ppm, in einem für C-C-Doppelbindungen charakteristischem Bereich, und weist damit eine auffällige Tieffeldverschiebung gegenüber gesättigten Kohlenhydraten auf, deren C-4-Peak sich in der Regel bei einer Verschiebung von 70 ppm befindet.

Bemerkenswert sind überdies die sehr kleine Kopplungskonstante $^3J_{1,2}$ von 1.8 Hz sowie das Erscheinen von Fernkopplungen, $^4J_{1,3} = 1.5$ Hz und $^4J_{2,4} = 1.5$ Hz, die sich mit der

postulierten Struktur in Einklang bringen lassen, wenn für diese eine $^1\text{H}_2$ -Konformation, bei der dann alle Substituenten pseudo-axial angeordnet sind, angenommen wird (Abb. 37).

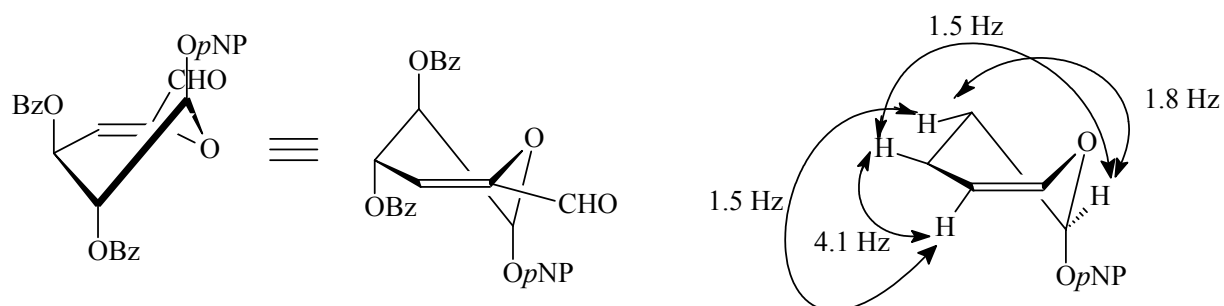


Abb. 37 $^1\text{H}_2$ -Konformation des α,β -ungesättigten Dialdo-*galacto*-pyranosids 84 mit $^3J_{\text{HH}}$ - und $^4J_{\text{HH}}$ -Kopplungen. Der Übersichtlichkeit halber sind die Benzoylsubstituenten und die CHO-Gruppe in der ganz rechts abgebildeten Struktur nicht mitgezeichnet.

Die Bildung einer α,β -ungesättigten Carbonylverbindung wird häufig, insbesondere unter Verwendung von Esterschutzgruppen²²⁵ bei Oxidationen beobachtet und ist nicht auf die Methode nach Pfitzner-Moffat beschränkt.^{226,227} Auch bei PCC-katalysierten Reaktionen und bei $-60\text{ }^\circ\text{C}$ bis $-75\text{ }^\circ\text{C}$ ablaufenden Swern-Oxidationen musste die Entstehung eines derartigen Nebenprodukts verzeichnet werden.^{228,229} Bei der sehr milden Dess-Martin-Oxidation ist die Retro-Michael-Reaktion dagegen bisher nicht festgestellt worden, zumindest gibt es keine diesbezüglichen Berichte.

Da die Dess-Martin-Reaktion zum einen unter neutralen Bedingungen stattfindet bzw. während der Reaktion sogar Essigsäure entsteht und zum anderen ionische Strukturen durch das unpolare, aprotische Lösungsmittel Dichlormethan nicht gefördert werden, ist mechanistisch zu vermuten, dass die sonst bei der Eliminierung eines Substituenten in β -Position zu einer Carbonylverbindung häufig auftretende E1cb-Reaktion hier deutlichen E2-Charakter annimmt. Aus dem Ablauf wird deutlich, warum Galactose im Vergleich zu Glucose eine Eliminierung viel leichter eingeht, denn nur der axiale Substituent in *galacto*-Konfiguration erlaubt eine *anti*-Eliminierung mit koplanarer Ausrichtung der beteiligten Orbitale.

Da die zuvor in der Precursor-Synthese durchgeführte Pfitzner-Moffat-Oxidation der diisopropylidenierten Galactose erfolgreich verlaufen war, schien ein entsprechender Schutzgruppenwechsel angebracht.

Alternativ zu Tritylierung, folgender Schützung und Detritylierung gibt es eine elegante von *Catelani et al.*^{230,231} entwickelte Methode, die einen einfachen Zugang zu 6-OH-freien

Galactopyranosiden darauf beruhend gewährt, dass offenkettige Acetale sich leichter hydrolysieren lassen als cyclische.

Bei Verwendung von 2,2-Dimethoxypropan statt Aceton führt die Isopropylidenierung eines Galactopyranosids unter saurer Katalyse nicht zu dem sonst beobachteten Gemisch aus 3,4-*O*- und 4,6-*O*-isopropylideniertem Acetal, sondern, wenn unter wasserfreien Bedingungen gearbeitet wird, nahezu ausschließlich zu einem 3,4-*O*-isopropylidenierten-6-*O*-(1-methoxy-1-methylethyl)-geschützten (2-methoxyisopropyl-, Mip-geschützten) Derivat **85** (Abb. 38). Eine folgende schonende Hydrolyse bei Raumtemperatur mit Spuren von Säure spaltet zwar das gemischte Acetal, lässt jedoch das cyclische intakt, so dass zum einen selektiv 3,4-geschützte Galactopyranoside²³² (**86**) und zum anderen, nach einer der Hydrolyse vorangehenden Blockierung der Hydroxylgruppe an C-2, z.B. als Acetylesther, Benzylether oder Methylether²³³, selektiv 6-OH-freie Galactopyranoside (**87**) zugänglich sind.

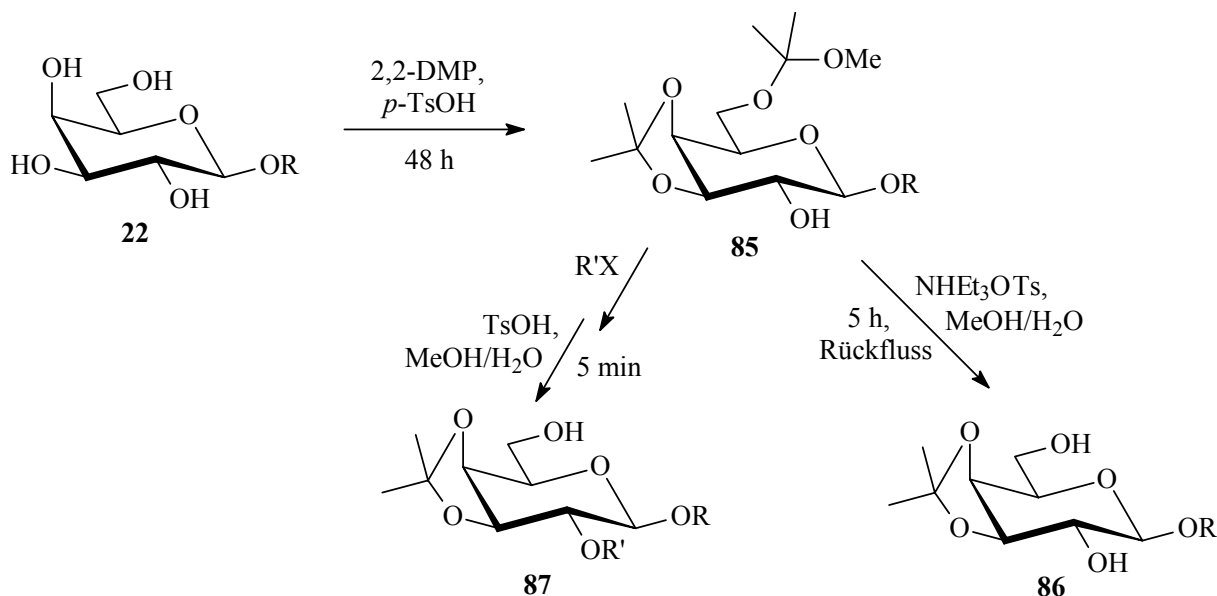


Abb. 38 Synthese 2,6-OH-freier bzw. 6-OH-freier Galactopyranoside nach *Catelani et al.*²³⁰

Die als Eintopfreaktion durchführbare Synthese wurde auf das vorliegende Problem übertragen. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Isopropylidenierung von *p*NP-Gal zeigte die Bildung von zwei neuen Produkten an, von denen angenommen und später bestätigt wurde, dass es sich um das 3,4-*O*-isopropylidenierte **88** und das zusätzlich 6-*O*-Mip-geschützte Derivat **89** handelte. Eine vollständige Umsetzung war auch bei längerer Reaktionszeit nicht zu erreichen.

Nach Zugabe von Pyridin und destillativer Entfernung des Dimethoxypropan wurde das Gemisch ohne Aufarbeitung acetyliert, anschließend von den Salzen befreit und dann 10 min mit einigen Tropfen Eisessig und wässrigem Methanol stehengelassen. Die DC-Detektion

zeugte von zwei Kohlenhydraten, die als 2,6-diacetyliertes Galactosid (**90**) und gewünschtes Produkt (**91**) interpretiert wurden. Die NMR-Auswertung nach säulenchromatographischer Trennung bestätigte das 6-OH-freie Produkt, ergab darüber hinaus jedoch, dass die erst-eluierte Fraktion zwei Verbindungen enthielt, denen die Strukturen **90** und **92** zugeordnet werden konnten (Abb. 39). Dieses Resultat lässt darauf schließen, dass die Mip-Gruppe so stabil ist, dass sie nicht nur zu großen Teilen das Stehen in essigsaurem Methanol, sondern auch die Reinigung über Kieselgel übersteht. Interessanterweise war das gemischte Acetal jedoch bei der NMR-spektroskopischen Aufnahme in nicht-entsäuertem Chloroform vollständig hydrolysiert, so dass neben je 1 Äquivalent Methanol und Aceton nur das ungeschützte Zuckerderivat vorlag. Eine Aufnahme in Methanol- d_4 ließ dagegen das Mip-geschützte Derivat erkennen.

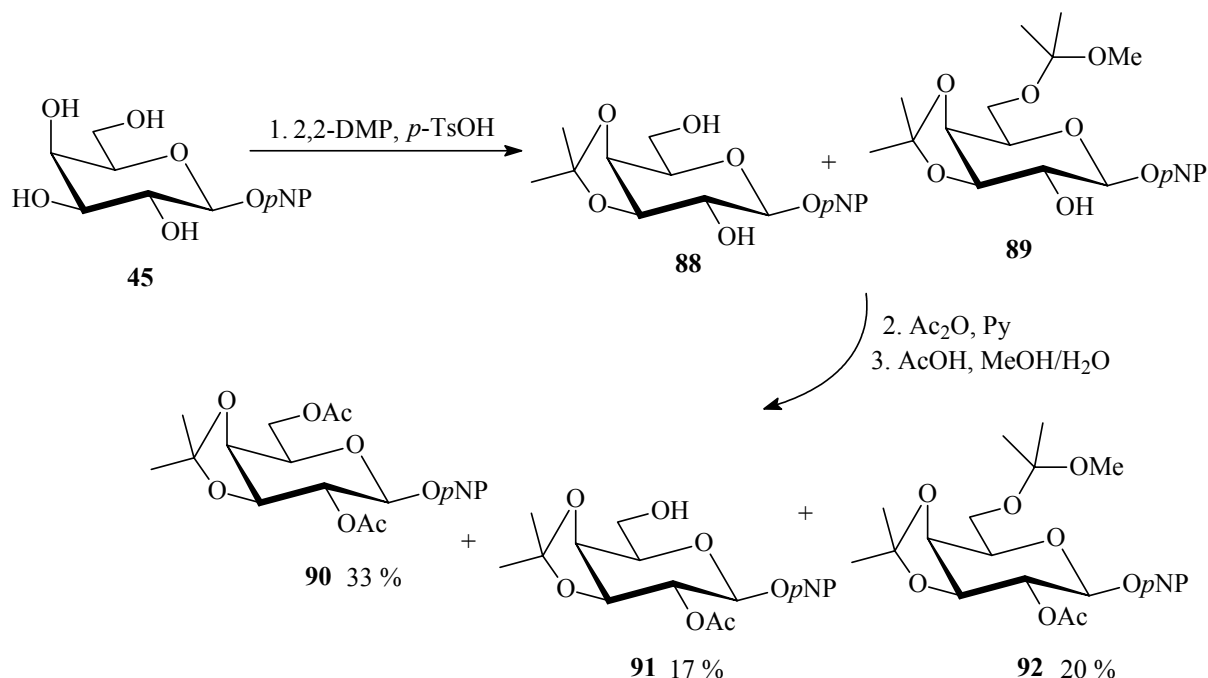


Abb. 39 Anwendung der Catelani-Synthese auf *p*NP-Gal

Eine Verbesserung der Ausbeute ist mit Sicherheit dadurch zu erreichen, dass die Reaktionszeit im letzten Syntheseschritt verlängert wird, kombiniert eventuell mit einer Zugabe von mehr Säure. Vor der Durchführung eines dementsprechenden Versuchs schien es jedoch angebracht zu prüfen, ob die Oxidation des Galactosids **91** ohne Schwierigkeiten vonstatten geht.

Dies traf nicht zu, wie die Charakterisierung der aus der Pfitzner-Moffat-Oxidation resultierenden Produkte ergab (Abb. 40). Die dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung zeigte zwar neben unumgesetztem Edukt (21 %) auch zwei neue Stoffe an, von denen sich einer nicht nur mittels UV-Aktivität und Verkohlen nach Besprühen mit ethanolischer

Schwefelsäure detektieren, sondern außerdem als korrespondierendes 2,4-Dinitrophenylhydrazon nachweisen ließ, die NMR-spektroskopische Analyse ergab jedoch, dass es sich bei dieser Verbindung erneut um ein Eliminierungsprodukt (**93**) handelte. Das zweite Reaktionsprodukt wurde als Methylthiomethyl-substituiertes Galactosid **94** identifiziert, dessen Bildung auf eine mechanistisch der Pummerer-Umlagerung analoge Reaktion zurückzuführen ist (Abb. 41).

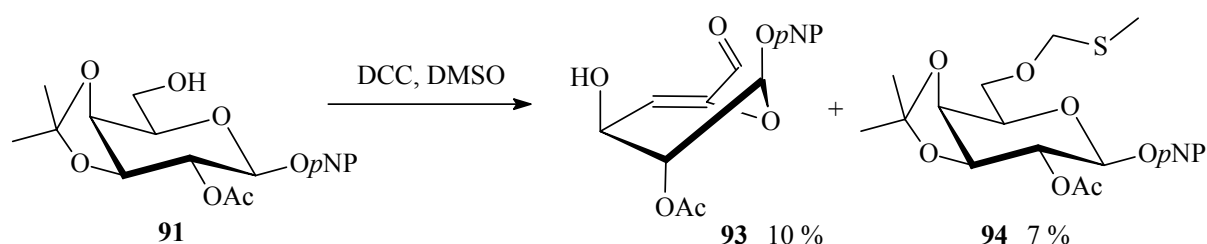


Abb. 40 Produkte der Pfitzner-Moffat-Oxidation des Isopropyliden-substituierten *p*NP-Galactosids **91**

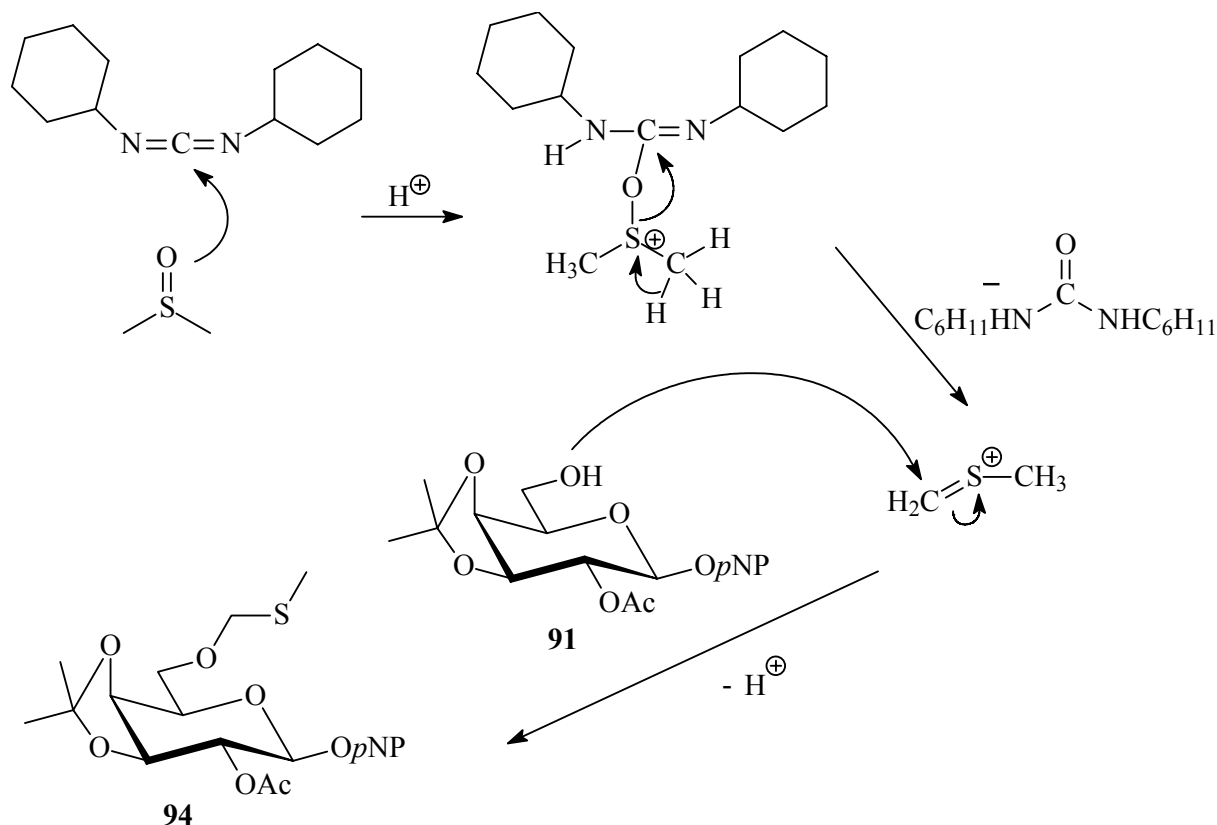


Abb. 41 Mechanismus der Bildung des Thioacetals. Im Vergleich zur Pummerer-Umlagerung wird das Sulfoxid hier anstelle eines Säureanhydrids durch ein Harnstoff-Anhydrid aktiviert. Der folgende nukleophile Angriff auf das Methylsulfencarbeniumion geschieht durch die Alkoholfunktion des Kohlenhydrats in Vertretung des Säureanions der eigentlichen Pummerer-Umlagerung.

Da durch den Austritt von Aceton auch die OH-3-Gruppe freigesetzt wird, ist mit höher oxidierten Produkten zu rechnen, die wiederum Eliminierungsreaktionen eingehen können,

was im weiteren Verlauf zur vollständigen Fragmentierung des Moleküls führen kann. Dies kann die niedrige Gesamtausbeute begründen.

Eine Strategie zur Vermeidung der Eliminierung könnte in der Anwendung von Oxidationsmethoden bestehen, die in einem saureren Milieu stattfinden. Zu sauer darf die Reaktionslösung jedoch nicht werden, damit der Schutz durch die Isopropylidengruppe gewährleistet bleibt. Eine in der Literatur beschriebene Jones-Oxidation eines isopropylidenierten Galactose-Derivats zur Uronsäure führte zu recht niedrigen Ausbeuten, vermutlich aufgrund einer Freisetzung der Hydroxylgruppen an C-3 und C-4, so dass auch höher oxidierte Verbindungen entstanden.²³⁴ Andere Verfahren zur Oxidation vergleichbarer Verbindungen, wie zum Beispiel die Reaktion mit DMSO und Essigsäureanhydrid, führten ebenfalls nicht zu dem gesättigten Aldehyd, sondern neben dem Thioacetal (13 %) zu einem 2,6-Diacetat (40 %) und einem Enolacetat (25 %).²³⁵

Ein sinnvoll erscheinender Austausch der Schutzgruppen durch weniger nukleofuge Substituenten ist nicht praktikabel. Die gern angewandte Blockierung der sekundären Alkoholfunktionen als Benzylether ist hier prinzipiell ungeeignet, da die Entschützung durch Hydrierung auch die *para*-Nitrophenylgruppe und die Aldehydfunktion beeinträchtigen würde. Überdies wurde bei Versuchen zur Synthese des entsprechend derivatisierten *p*NP-Mannopyranosids, welches ebenfalls mit der Absicht hergestellt werden sollte, die mit Benzoyl-Substituenten auftretende Eliminierung in der Swern-Oxidation zu vermeiden, die Zersetzung des Kohlenhydrats festgestellt.²³⁶ Eliminierung bei Oxidation wurde sogar mit Methylether-Funktionalitäten unter Austritt von Methanol beobachtet.²²⁴

Da mit der enzymkatalysierten Oxidation bereits eine geeignete Methode zur Darstellung des Aldehyds **36** in hoher Ausbeute und Reinheit vorliegt, wurde auf Verbesserungsversuche der chemisch-katalysierten Oxidationen verzichtet.

6.3 Synthese von Donoren mit Aminvorläufer- und Amin-Funktionalität

Zur Einführung einer Amino-Funktionalität in die Kohlenhydratstruktur wurde der gängigste Weg, bestehend aus Veresterung der OH-6-Gruppe mittels eines Sulfonsäurechlorids, Substitution des nukleofugen Sulfonats durch Azid und dessen Reduktion gewählt, welcher von *Lindhorst et al.*²³⁷ bereits erfolgreich für *p*NP-Man angewandt wurde.

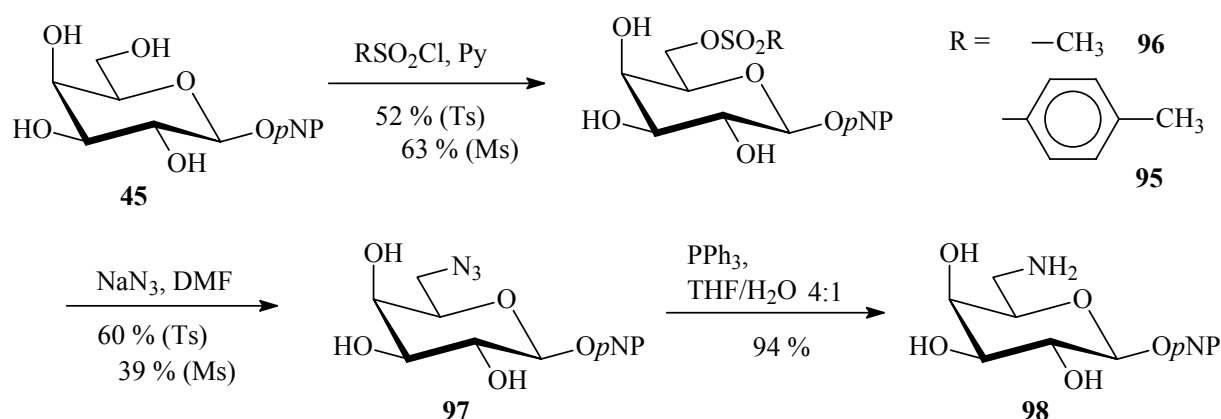


Abb. 42 Synthese von *p*NP-Galactopyranosiden mit Amino- bzw. Aminoprecursor-Substituenten

Als Sulfonsäureester wurden sowohl das Tosylat **95** als auch das Mesylat **96** synthetisiert. Tosylchlorid sollte aufgrund seines sterischen Anspruchs deutlich bevorzugt mit der primären Alkoholfunktion des Monosaccharids reagieren, wohingegen die kleinere Mesylgruppe kaum selektives Verhalten erwarten lässt, das mesylsubstituierte Galactosid jedoch mit größerer Wahrscheinlichkeit in der späteren enzymatischen Glycosylierung umgesetzt wird.

Die Mesylierung verlief bemerkenswert positiv, mit zufriedenstellenden Ausbeuten und vorherrschender Bildung des 6-*O*-substituierten Produkts in einer Selektivität, die der der Tosylierung entsprach. In beiden Synthesen ließ sich das Edukt (**45**) auch nach längeren Reaktionszeiten nicht vollständig umsetzen, diese führten lediglich zur Bildung mehrfach substituierten Nebenprodukts, so dass es sich als vorteilhafter erwies, die Reaktion nach wenigen Stunden zu beenden.

Die folgende nukleophile Substitution mit Natriumazid führte mit beiden Edukten sowohl zum gewünschten Produkt (**97**) als auch zu einem bicyclischen Nebenprodukt (**99**), welches durch konkurrierenden intramolekularen Angriff der OH-3-Gruppe an C-6 entsteht (Abb. 43). Dieser findet hier in erheblichem Ausmaß statt, bedingt durch die axiale OH-Gruppe an C-4, die sich in der Vorzugsausrichtung des C-6-Substituenten auf der Achse Nukleophil-C-6-Nukleofug befindet, somit den Angriff insbesondere eines anionischen Nukleophils behindert²³⁸ und die intermolekulare Substitution benachteiligt.

Die abschließende Reduktion des Azids **97** zum Amin **98** erfolgte, um die *para*-Nitrophenyl-Gruppe nicht zu beeinträchtigen, nicht mit Wasserstoff, sondern mit Triphenylphosphin in Form einer Staudinger-Reaktion,^{239,240} welche die oxidative Übertragung eines Nitrens auf ein Phosphan bezeichnet (Abb. 44).

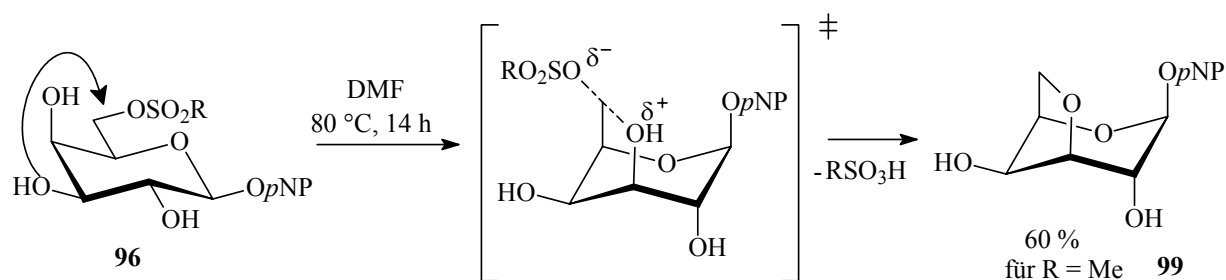


Abb. 43 Substitution des Sulfonats durch die OH-3-Gruppe unter Ausbildung eines intramolekularen Ethers. Die im $^1\text{H-NMR}$ -Experiment auftretenden kleinen Kopplungskonstanten $J_{1,2} = 0$ Hz, $J_{2,3} = 4.6$ Hz und $J_{3,4} = 0$ Hz zeigen, dass das 3,6-Anhydrogalactosid trotz 1,3- und 1,5-diaxialer Wechselwirkungen in $^1\text{C}_4$ -Konformation und nicht, wie für eine ähnliche Verbindung beschrieben,²⁴¹ in Boot-Konformation vorliegt. Das HMBC-Experiment lässt eine Kopplung zwischen H-6 und C-3 erkennen und bestätigt damit die Konstitution.

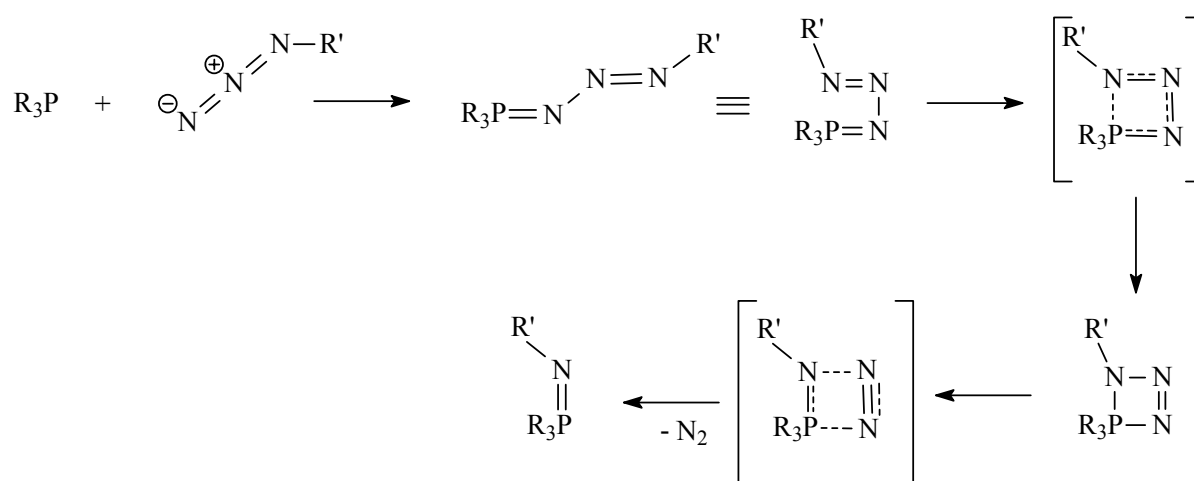


Abb. 44 Postulierter Mechanismus der Staudinger-Reaktion. Das als Zwischenprodukt gebildete Phosphoranylid-Triazen^{242,243,244} konnte in einigen Fällen isoliert werden,^{245,246,247} in denen eine Stabilisierung durch sterisch anspruchsvolle Substituenten R und R' sowie durch elektronenschiebende Reste R oder elektronenziehende Reste R' vorlag. Vermutlich bildet sich das Iminophosphoran dann analog einer Aza-Wittig-Reaktion über einen cyclischen Übergangszustand.

Das Amin **98** wird nach Hydrolyse und Reinigung an Kieselgel mit sehr guter Ausbeute erhalten und steht nun, wie auch Mesylat **96** und Azid **97**, für die Nutzung in einer enzymatischen Glycosylierung zur Verfügung.

Der Austausch der Substituenten an C-6 im Laufe dieser Reaktionssequenz ließ sich sehr gut im $^{13}\text{C-NMR}$ -Experiment verfolgen. Während die Sulfonsäureester einen tieffeldverschobenen Peak für C-6 bei etwa 70 ppm aufweisen, bewirken die Azido- und die Aminogruppe eine deutliche Hochfeldverschiebung des Signals zu 53 bzw. 43 ppm.

7 Reaktionsfolgen B und C:

β -Galactosidase-katalysierte Glycosylierungen mit neuen Glycosyldonoren

Die chemo-enzymatische Umsetzung der neuen Donoren sollte, um deren prinzipielle Erkennung als Substrat durch die β -Galactosidase eingehender, das heißt unter verschiedenen Bedingungen, zu prüfen, nicht nur mit Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (**46**), sondern auch mit 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose (**23**) als Akzeptor untersucht werden. Diese beiden Akzeptoren erfordern, wie die literaturbeschriebenen Galactosylierungen gezeigt haben (Kap. 3.3.1), für eine optimale Umsetzung unterschiedliche Reaktionsbedingungen, so dass eine Erkennung der unnatürlichen Donorsubstrate durch das Enzym sowohl in Puffer/Acetonitril 1:1, bei pH 7.0 und 25 °C als auch in Puffer, bei pH 5.0 und 55 °C ermittelt wird (Abb. 45).

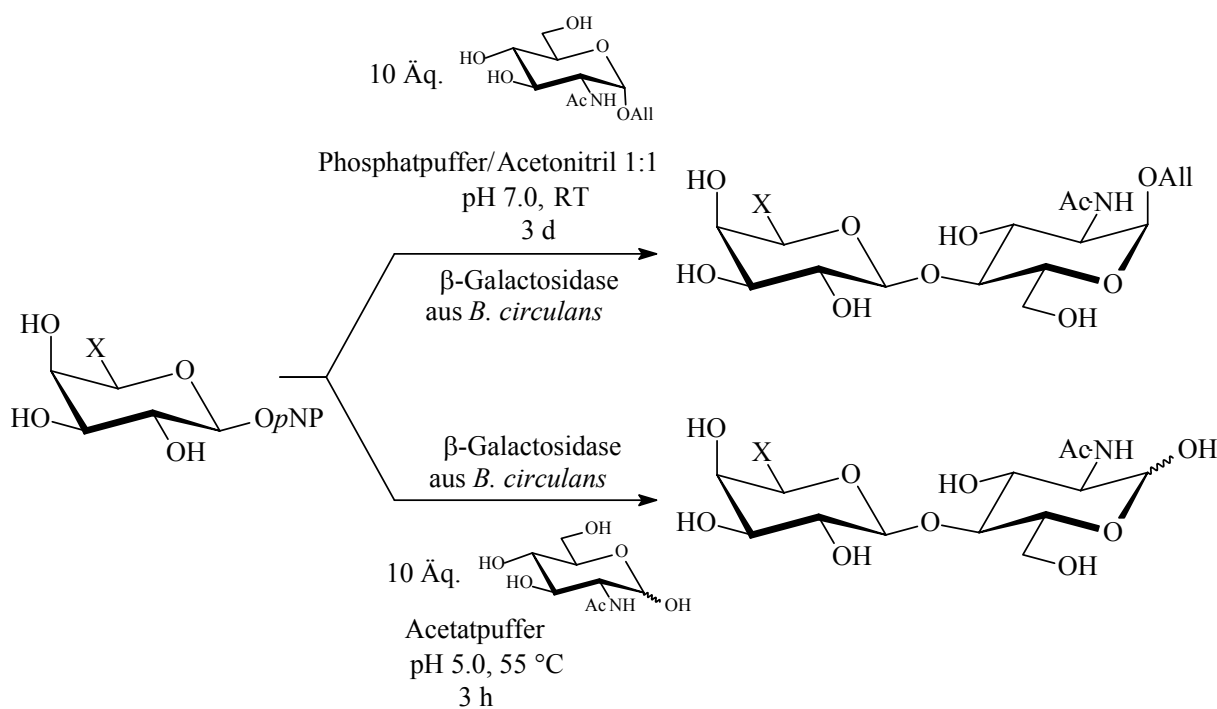


Abb. 45 Schema der enzymatischen Umsetzungen

Vor dem Einsatz der synthetisierten Galactosid-Derivate wurde die Aussicht auf Erfolg der chemo-enzymatischen Reaktion anhand zweier kommerziell erhältlicher, 6-modifizierter „pNP- β -D-galactopyranosid“-Donoren, pNP- β -D-fucopyranosid (**100**) und pNP- α -L-arabinopyranosid (**101**), getestet. Bereits die von Wong *et al.*¹⁴³ publizierte Glycosylierung mit dem 6-oxidierten Donor 4-Nitrophenyl- β -D-galacto-hexodialo-1,5-pyranosid (**36**) sowie die erst kürzlich von Usui *et al.*¹⁴⁴ beschriebene Umsetzung von 4-Methylumbelliferyl-6-sulfo- β -D-

galactopyranosid (**39**) (Kap. 3.3.1) lassen vermuten, dass die primäre Alkoholfunktion des Galactosids für dessen Akzeptanz als Substrat durch die β -Galactosidase aus *B. circulans* nicht zwingend notwendig ist.

Durch erfolgreiche Glycosylierungen mit dem Fuco- und dem Arabinopyranosid konnte dies hier untermauert werden. Das 6-Desoxygalactosid (**100**) erbrachte die erwarteten β 1 $\rightarrow$ 4-verknüpften Disaccharide **102** und **103** in sehr hohen Ausbeuten von 76 % und 66 % (Tab. 6), vergleichbar underivatisiertem Galactopyranosid. Zudem ließ sich in 9 %iger Ausbeute ein Produkt isolieren, das nach NMR-spektroskopischer Untersuchung als zweifach fucosyliertes Allyl-*N*-acetylglucosaminid identifiziert, dessen Detailstruktur jedoch nicht genauer untersucht wurde. Die Nutzung des Pentopyranosids (**101**) als Glycosyldonor führte ebenfalls zur Bildung der LacNAc-Derivate, jedoch in einem sehr viel geringeren Ausmaß: Der größte Teil des Arabinopyranosids blieb unumgesetzt; das nicht-reduzierende Produkt (**104**) konnte immerhin in 13 %iger Ausbeute, das reduzierende (**105**) in 6 %iger Ausbeute isoliert werden.

7.1 Precursor-funktionalisierte Donoren

Von den synthetisierten Glycosyldonoren mit Aldehydprecursor-Funktionalität konnte jener mit Olefingruppe, 4-Nitrophenyl- β -D-galacto-hept-6-eno-1,5-pyranosid (**56**), erfreulich leicht in der chemo-enzymatischen Disaccharidsynthese zur Reaktion gebracht werden. Die LacNAc-Mimetika Allyl-6,7-didesoxy- β -D-galacto-hept-6-enopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (**106**) und 6,7-Didesoxy- β -D-galacto-hept-6-enopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose (**107**) wurden in 31 %iger bzw. 20 %iger Ausbeute gewonnen (Tab. 6). Der unnatürliche Donor **56** lässt sich, wie kürzlich *MacManus et al.*²⁴⁸ zeigten, auch durch SNAP (Schnecken-Aceton-Puder) und durch β -Amylase umsetzen und auf die 4- bzw. 6-Position eines Galactopyranosid-Akzeptors übertragen.

Das etwas größere allylsubstituierte Galactosid **57** wurde dagegen von der β -Galactosidase aus *B. circulans* nicht als Substrat akzeptiert. Um einen Aktivitätsverlust des Enzyms als Ursache für das Ausbleiben der Umsetzung ausschließen zu können, wurde nach 3 Tagen ergebnisloser Reaktion zwischen 6-*O*-Allylgalactopyranosid **57** und Allyl- α -D-GlcNAc **46** zusätzlich der Standard-Donor *p*NP-Gal (**45**) zu dem Ansatz gegeben. Daraus bildete sich das Standard-Disaccharid (**47**) wie gewöhnlich, was belegt, dass eine Desaktivierung des Enzyms nicht stattgefunden hatte.

Die Precursor-funktionalisierten Donoren auf Seiten des Amins präsentierten sich dem Enzym als zu fremde Strukturen. Das dem von *Usui et al.*¹⁴⁴ getesteten 6-Sulfogalactosid **39**

immerhin recht ähnliche Mesylat **96** wurde ebenso wenig umgesetzt wie das Azid **97**. Auch in diesen Fällen bewirkte eine zusätzliche Zugabe des Standard-Donors (**45**) die erwartete Kondensation zum Standard-Disaccharid (**47**) – eine Desaktivierung des Enzyms war also auszuschließen.

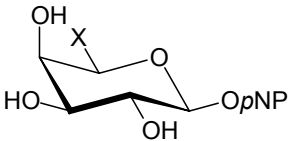
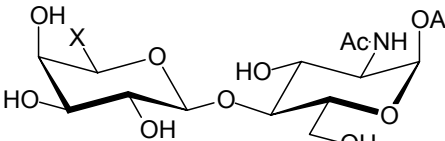
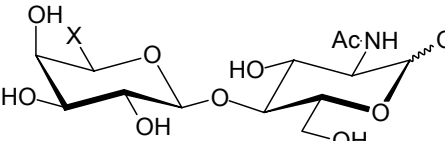
7.2 Aldehyd- und Amin-funktionalisierte Donoren

Die DC-Verfolgung der Glycosylierung von All- α -D-GlcNAc (**46**) mit *para*-Nitrophenyl-6-amino-6-desoxy- β -D-galactopyranosid (**98**) zeigte die Bildung einer neuen Verbindung an, die sich sowohl durch Rosa-Färbung nach Reaktion mit Ninhydrin als auch durch Verkohlen mit ethanolischer Schwefelsäure detektieren ließ, deren Isolierung jedoch Schwierigkeiten bereitete. Weder Gelpermeationschromatographie an Biogel noch an Sephadex erwies sich als geeignet. Chromatographie an Aktivkohle/Celite mit Ethanol/Wasser als Eluent blieb ebenso erfolglos wie eine präparative DC an Kieselgel mit *i*PrOH/NH₃/H₂O 5:1:2 als Laufmittel. Eine Trennung im analytischen Maßstab und der Nachweis des Produkts, zumindest des Natrium-Addukts einer Verbindung mit der entsprechenden Molmasse von 445 g/mol, gelang mittels LCMS. Nach Acetylierung ließ sich das Produkt schließlich in etwa 10 %iger Ausbeute rein gewinnen und NMR-spektroskopisch als das gewünschte β 1 $\rightarrow$ 4-verknüpfte LacNAc-Mimetikum **108** nachweisen. Die Glycosylierungsstelle kann durch eine Kopplung von H-1' und C-4 im HMBC eindeutig belegt werden.

Der Aldehyd (**36**) selbst wurde wie ausgeführt (Kap. 3.3.1) bereits von Wong *et al.*¹⁴³ zur Disaccharidsynthese eingesetzt, deren erfolgreicher Verlauf in eigenen Versuchen bestätigt werden konnte. Unter den üblichen Reaktionsbedingungen war die Ausbeute an oxidiertem Allyl-LacNAc-Derivat **109** jedoch, insbesondere nach Vergleich mit den Literaturergebnissen, enttäuschend gering (ca. 3 %). Ein Verzicht auf Acetonitril als Lösungsmittelkomponente, entsprechend der Literaturdurchführung, führte zu einer beeindruckenden Steigerung der Ausbeute auf 66 %. Weitere Optimierungsversuche durch Änderung des Donor/Akzeptor-Verhältnisses auf 1:1, 1:3.5 oder 3.5:1, des pH-Werts auf pH 6.0 und der Temperatur auf 40 °C in Testansätzen führten eher zu geringerer Produktbildung. Mit Verringerung des Akzeptorüberschusses auf 5 Äquivalente fiel die Ausbeute (~ 67 %) dagegen genauso hervorragend aus, und überdies gelang die Trennung des Produkts von überschüssigem Akzeptor, für welche sich eine Reinigung an Biogel P2, gefolgt von einer Chromatographie an Sephadex LH20 als am zweckdienlichsten erwies, wesentlich schneller, in nur einem Durchlauf. Mit Verwendung des unbehandelten, lediglich gefriergetrockneten

Rohprodukts aus der Galactose-Oxidase-katalysierten Reaktion, welches Aldehyd **36** und Kaliumphosphat als Hauptbestandteile zu je etwa 50 % enthält, konnte die Darstellung von Allyl- β -D-galacto-hexodialdopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (**109**) überaus effektiv gestaltet werden. Die nach dieser Methode erzielten Ausbeuten lagen konstant reproduzierbar bei ungefähr 70 % über zwei Stufen.

Tab. 6 Enzymatische Glycosylierung mit unnatürlichen Galactosid-Donor-Derivaten und gewonnene LacNAc-Mimetika

					
X	Nr	Ausbeute	Nr	Ausbeute	Nr
CH ₃	100	76 %	102	66 %	103
H	101	13 %	104	~ 6 %	105
CH=CH ₂	56	31 %	106	20 %	107
CH ₂ OCH ₂ CH=CH ₂	57	0 %	-	/	-
CH ₂ OSO ₂ CH ₃	96	0 %	-	0 %	-
CH ₂ N ₃	97	0 %	-	0 %	-
CH ₂ NH ₂	98	~ 10% ^a	108	/	-
CHO	36	71 % ^b	109	19 % ^c	110

a nach Acetylierung

b Dieses Ergebnis wurde über 2 Stufen erhalten, bei Durchführung der Glycosylierung in reinem Phosphatpuffer pH 7.0 und mit nur 5 Äq. Akzeptor.

c Diese Reaktion wurde von Dr. E. May durchgeführt. Die Reaktionszeit wurde von 3 h auf 8 h verlängert.

In allen Fällen der erfolgreichen Disaccharidbildung konnte der Transfer auf die 4-Position des Akzeptors NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Die Signale in den ¹H-NMR-Spektren sind trotz Aufnahme in D₂O sehr gut aufgelöst, lediglich im Fall des arabinosylierten Allyl-*N*-acetylglucosaminids (**104**) musste dieses zur eindeutigen Identifizierung peracetyliert werden. In den ¹³C-NMR-Spektren der einzelnen Produkte zeigen die jeweiligen Signale für C-4 eine chemische Verschiebung von etwa 80 ppm und unterliegen damit einer charakteristischen Tieffeldverschiebung von 8 – 10 ppm. Die Konstitution wurde durch HMBC-Experimente bestätigt, in denen Kopplungen zwischen H-1' und C-4 sowie H-4 und C-1' gefunden werden können.

7.3 Weitere chemo-enzymatische Glycosylierungen

Zur kurzen Prüfung der eingangs erwähnten, weniger erfolgversprechenden vierten Variante des Syntheseschemas (Kap. 4), welche die reduktive Aminierung vorwegnimmt, indem anstelle des LacNAc-Disaccharids das *p*NP-Gal-Monosaccharid reduktiv alkyliert wird, und eine enzymatische Glycosylierung im Anschluss vorgesehen ist, wurde der oxidierte Glycosyldonor **36** mit Taurin reduktiv aminierte.²⁴⁹ Das synthetisierte Kohlenhydrat-Aminosäure-Konjugat **111** wurde in der β -Galactosidase-vermittelten Glycosylierung getestet, zeigte die Erwartungen bestätigend jedoch keine Reaktion (Abb. 46). Im Hinblick auf das herzustellende Taurin-substituierte Disaccharid untermauert dieses Ergebnis die Vermutung, dass die Hydrolase den substituierten Galactosylrest nicht mehr als solchen erkennt, so dass das LacNAc-Disaccharid Galactosidase-stabil zu sein verspricht.

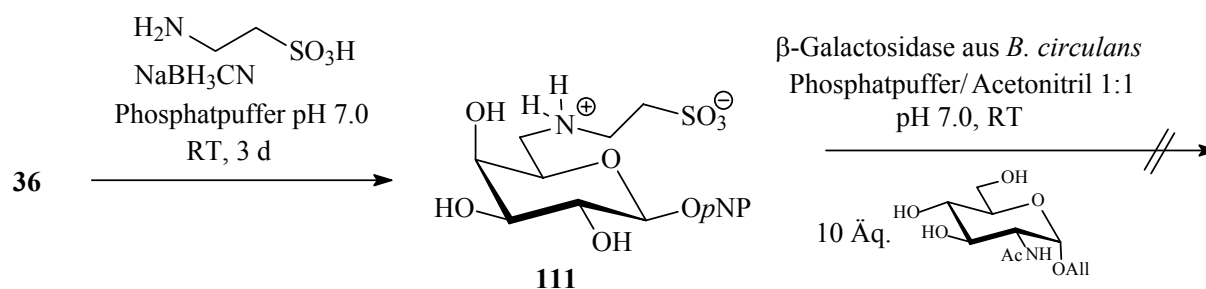


Abb. 46 Darstellung eines Kohlenhydrat-Aminosäure-Konjugats und Test der Verbindung als Donor in der enzymatischen Glycosylierung

In Ergänzung der an 6-Position derivatisierten Donoren wurden ein 2,6-di-*O*-acetyliertes und ein 2-*O*-acetyliertes *p*NP-Galactosid (**112** und **113**) synthetisiert und auf ihre Eignung als Glycosyldonoren hin untersucht. Die Darstellung der Verbindungen erfolgte in einem Schritt aus dem an früherer Stelle (Kap. 6.2.3) beschriebenen Gemisch aus Isopropyliden- und Acetyl- bzw. Isopropyliden-, Acetyl- und Mip-geschützten *p*NP-Galactosiden, welches im Zuge der Catelani-Reaktionsfolge hergestellt worden war. Die Deisopropylidenierungen der Edukte **90** und **92** mit Essigsäure/TFA 4:1 ergab die – nun leicht trennbaren – Verbindungen **112** und **113** in quantitativer bzw. 85 %iger Ausbeute (Abb. 47). Eine im sauren Milieu zu befürchtende Wanderung der Acetylgruppe an C-2 hat nicht stattgefunden; ein HMBC-Experiment bestätigte jeweils die gewünschte Konstitution.

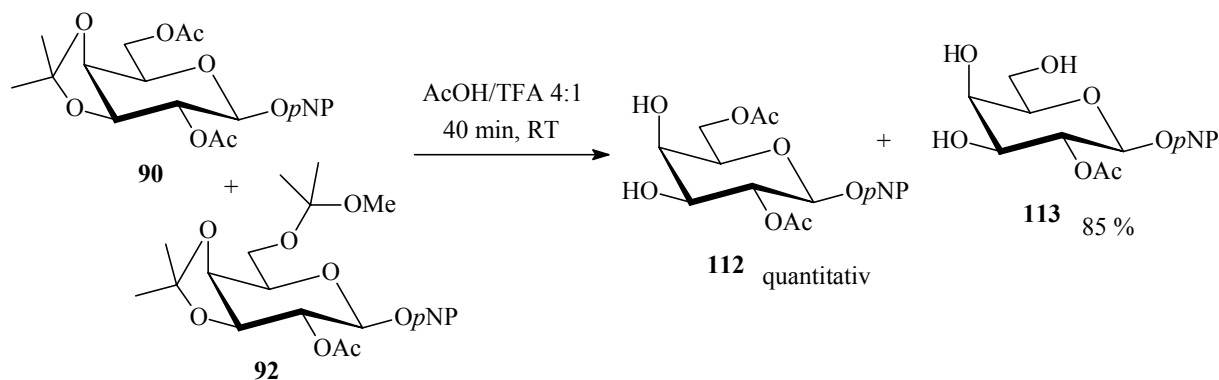


Abb. 47 Darstellung eines 2,6-di-O-acetylierten und eines 2-O-acetylierten Galactosids

Ein durch β -Galactosidase aus *B. circulans* katalysierter Galactosyltransfer mit dem GalNAc-ähnlichen Glycosyldonor **113** ließ sich nicht beobachten, folgerichtig zeigte auch das 2,6-derivatisierte Monosaccharid **112** keine Reaktion.

Kurz wurde außerdem ein neuartiger Glycosylakzeptor untersucht, bei dem es sich um ein Aminosulfonsäure-substituiertes Glucosid (**114**) handelte. Die Synthese dieser Verbindung erfolgte durch reduktive Aminierung des entsprechenden allylierten und ozonolysierten Kohlenhydrats mit Taurin.²⁴⁹ Eingesetzt unter den für nicht-reduzierende Akzeptoren optimierten Reaktionsbedingungen führte das Akzeptorderivat mit *pNP*-Gal zu einem Disaccharid (**115**). Der Galactosyltransfer auf das Glucosid-Edukt fand dabei an Position 6 statt, so dass in 50 %iger Ausbeute das *allo*Lactosid **115** erhalten wurde (Abb. 48).

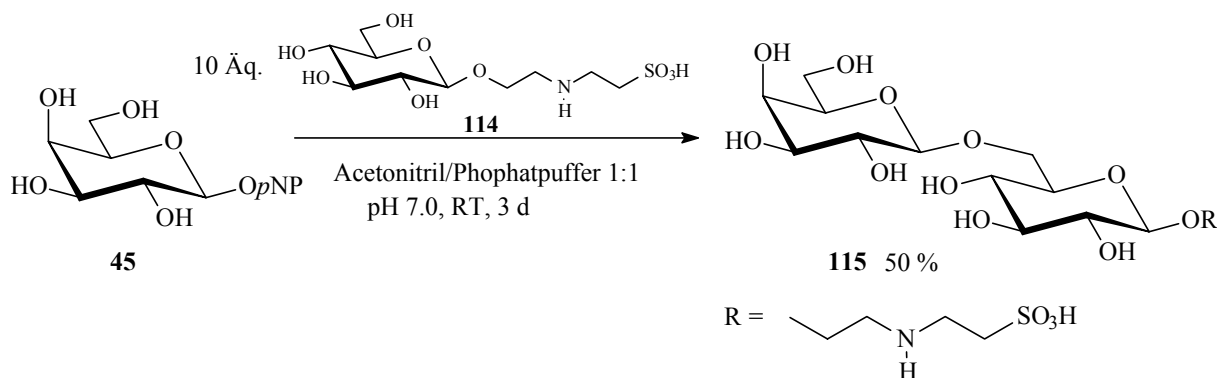


Abb. 48 Enzymatische Galactosylierung von *N*-[2-(β -D-Glucopyranosyloxy)ethyl]-2-aminoethansulfonsäure (**114**)

Das NMR-NOESY-Experiment in D₂O gab einen ersten Hinweis auf die 1 $\rightarrow$ 6-Bindung, erlaubte aber keine eindeutige Zuordnung der Glycosylierungsstelle, da H-1' zwar mit H-6a und H-6b, jedoch auch mit einem Multipllett, das die Signale für H-3' und H-4 und H-5 enthält, sowie einem Multipllett, das aus den Peaks für H-3 und H-5' besteht, koppelt. Unzweideutig konnte die glycosidische Bindung zur primären Alkoholfunktion jedoch durch

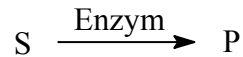
Kopplungen zwischen H-1' und C-6 sowie H-6a und H-6b und C-1' im HMBC festgestellt werden.

Schlussfolgern lässt sich aus den getätigten chemo-enzymatischen Glycosylierungen bzw. Glycosylierungsversuchen, dass die β-Galactosidase eine recht große Toleranz gegenüber Veränderungen der 6-Position des Glycosyldonors besitzt. Diese kann vollständig fehlen, wie im Falle des Arabinopyranosids, jedoch wird die Ausbeute dann deutlich vermindert. Andererseits darf ein Substituent an C-6 nicht zu groß sein, damit eine Umsetzung stattfindet. Gut erkannt werden Donoren mit kleinen und hydrophoben Gruppen an C-6, wie in Fucopyranosid und dem Olefin **56** oder mit kleinen und polaren Funktionalitäten wie in Galactopyranosid, dem Hydrat **36** und dem Amin **98**. Überraschend stört eine ionische Funktion nicht, wie der Transfer des bei pH 7 protoniert vorliegendenamins zeigt. Auch das in der Literatur¹⁴⁴ beschriebene anionische Sulfat **39** (Kap. 3.3.1.2), mit einer O⁻ statt einer Methylgruppe im Vergleich zum Mesylat **96**, reagiert, wird allerdings überwiegend auf die 6-Position übertragen, wohingegen die ungeladene Verbindung **96** gar nicht erkannt wird. Das Auftreten von geladenen Funktionalitäten am Akzeptormolekül hat ebenfalls keine negativen Auswirkungen auf die Glycosylierung, was durch die erfolgreiche Umsetzung des neuen Akzeptors mit Aminosulfonsäure-Aglycon (**114**) belegt wird. Der in der Literatur beschriebene Einfluss der 2-Acetamidogruppe auf die Regioselektivität der Glycosylierung (s. Kap. 3.3.1.1) wird bestätigt.

Um die Fähigkeit der Donoren, als Substrat für die β-Galactosidase aus *B. circulans* zu wirken, nicht nur über die Ausbeuten präparativer Umsetzungen, sondern auch über die Umsatzgeschwindigkeit zu erfassen, wurden die *p*NP-Galactosid-Derivate, die sich in den Transglycosylierungen als Substrat bewährt haben, enzymkinetisch untersucht.

8 Enzymkinetik

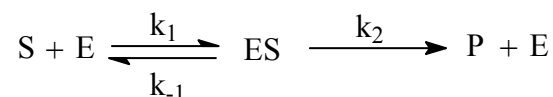
Die Geschwindigkeit der enzymkatalysierten Umsetzung eines Substrats S zum Produkt P



wird üblicherweise beschrieben durch die Michaelis-Menten-Kinetik.

Auf ersten Überlegungen *Browns*²⁵⁰ zum Mechanismus von Enzymreaktionen, welche die Beobachtung, dass Enzyme Substratsättigung zeigen, auf eine einleitende Bindung zwischen Enzym und Substrat zurückführten, sowie kinetischen Untersuchungen *Henris*^{251,252}, der das Postulat eines Enzym-Substrat-Komplexes bestätigte, aufbauend, führten *Michaelis* und *Menten*²⁵³ verbesserte kinetische Untersuchungen der Saccharosehydrolyse durch – bei konstantem pH-Wert, ausschließlicher Berücksichtigung der Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion und Abwarten der Mutarotations-Gleichgewichtseinstellung vor Messung des Drehwerts als Maß für die Konzentration an Produkt. Mit der Interpretation der Ergebnisse gelang es ihnen, eine grundlegende Theorie zur mathematischen Beschreibung enzymkatalysierter Umsetzungen zu entwerfen.

Die Reaktion von S zu P läuft demnach über Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ES in Form einer vorgelagerten Gleichgewichtsreaktion und Zerfall von ES in E und P als Folgereaktion ab:



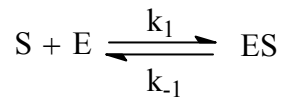
k_1 , k_{-1} und k_2 sind dabei die Geschwindigkeitskonstanten des jeweiligen Reaktionsschrittes.

Unter Berücksichtigung erweiternder Annahmen von *Haldane* und *Briggs*²⁵⁴ lautet die heute gängige Form der Michaelis-Menten-Gleichung, die die Reaktionsgeschwindigkeit v in Abhängigkeit von der Substratkonzentration $[S]$ beschreibt:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

$v_{\max}$ ist dabei die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, die theoretisch bei Substratsättigung vorliegt, in der Praxis jedoch nie erreicht wird, und K_M ist die sogenannte Michaelis-

Konstante. In der ursprünglichen Darstellung von Michaelis und Menten entspricht diese der Gleichgewichts- oder auch Substratkonstanten K_S der Halbreaktion



d.h.

$$K_S = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}, \quad (2)$$

in der Erweiterung von Briggs und Haldane jedoch wird die Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes in Enzym und Produkt nicht vernachlässigt – was tatsächlich für den speziellen Fall der von Michaelis und Menten untersuchten Saccharase zufällig möglich war, da hier $k_2 \ll k_{-1}$ gilt; in den meisten Fällen jedoch, bei denen der Wert für k_2 etwa in der gleichen Größenordnung wie der von k_1 liegt, muss k_2 berücksichtigt werden – so dass

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3)$$

gilt. K_M stellt damit die Kombination einer Gleichgewichts- und einer Geschwindigkeitskonstante einer Folgereaktion dar.

Die Michaelis-Menten-Gleichung gilt nur für Anfangsgeschwindigkeiten v_0 , wobei „Anfang“ bedeutet, dass weniger als 10 % des Substrats zu Produkt umgesetzt sind. Dies bringt verschiedene Vorteile mit sich, zum Beispiel kann der Einfluss der Rückreaktion ebenso außer Acht gelassen werden wie eine eventuelle Produkthemmung oder sonstige Desaktivierung des Enzyms.

Um die Anfangsgeschwindigkeiten v_0 bei verschiedenen Substratkonzentrationen zu ermitteln und daraus entsprechend der Michaelis-Menten-Gleichung $v_{\max}$ und K_M als charakteristische Größen des Enzyms unter den gegebenen Reaktionsbedingungen für das jeweilige Substrat zu berechnen, gibt es verschiedene Möglichkeiten der praktischen Durchführung der Messung, alle darauf beruhend, dass die Reaktionsgeschwindigkeit allgemein als Änderung der Konzentration mit der Zeit ausgedrückt werden kann. Die Abnahme der Konzentration des Edukts oder die Zunahme der des Produkts kann direkt gemessen werden, wobei die Quantifizierung beispielsweise mittels HPLC geschehen kann. Dies erfordert nach dem Starten der Reaktion jeweils nach einer bestimmten Zeit die Entnahme einer kleinen Probe, in der die Reaktion dann mit geeigneten Mitteln, beispielsweise durch starkes Verdünnen, Denaturieren des Enzyms durch Erhitzen oder Ändern des pH-Werts, abgebrochen wird, und deren Konzentration an Edukt bzw. Produkt aus dem Integral des jeweiligen Peaks im HPLC-

Elugramm bestimmt wird. Fast sämtliche in der Literatur beschriebenen zeitabhängigen Untersuchungen von β -Galactosidase-(*B. circulans*)-katalysierten Glycosylierungen sind nach dieser Methode durchgeführt worden.^{121,123,127,130,138,140,142}

Alternativ zu dieser direkten Aufnahme der Konzentrationsänderung mit der Zeit kann eine zur Konzentration proportionale Größe gemessen werden. Dieses Prinzip nutzend sind photometrische Reaktionsverfolgungen, bei denen die Extinktionsänderung mit der Zeit, über das Lambert-Beer'sche Gesetz verbunden mit der Konzentrationsänderung mit der Zeit, ermittelt werden, gängig. Dieses sehr bequeme und einfache Verfahren hat den Vorteil, dass die Reaktion direkt in einer Küvette im Photometer durchgeführt werden kann, was sowohl eine Messung in kleineren Zeitabständen ermöglicht, als auch Fehler, die durch Abbruchbedingungen und -zeiten bewirkt sind, vermeidet. Natürlich müssen Edukt oder Produkt für eine solche Anwendung UV-aktiv oder zumindest mit einer Indikatorreaktion, z. B. entsprechend einem optischen Test nach Warburg, koppelbar sein.

Bei den fraglichen Transgalactosylierungen absorbieren sowohl das jeweilige Edukt-Galactosid **116** als auch das Produkt *para*-Nitrophenol Licht im UV/Vis-Bereich, so dass die Reaktion eine photometrische Verfolgung prinzipiell erlaubt. Allerdings ist eine Überlagerung der zu untersuchenden Glycosylierung mit Nebenreaktionen, insbesondere einer Hydrolyse der Donoren, nicht zu verhindern (Abb. 49). Dies hat nicht nur eine Wirkung auf die Galactosidkonzentration, sondern auch auf die *p*NP-Konzentration zur Folge, so dass eine gemessene Reaktionsgeschwindigkeit sich tatsächlich aus zweien, der der Transgalactosylierung und der der Hydrolyse zusammensetzt. Der Erhalt solcher gemischten Werte kann vermieden werden, indem auf die Zugabe von Akzeptor verzichtet und als Maß für die jeweilige Substrataffinität der β -Galactosidase direkt die Hydrolyse der *p*NP-Gal-Derivate verfolgt wird. Bei dieser einfachen Reaktion ist anzunehmen, dass praktisch keine die Messung der Konzentration beeinträchtigenden Nebenreaktionen auftreten. Zwar sind die in der Hydrolyse-Reaktion ermittelten Umsatzgeschwindigkeiten nicht vorbehaltlos auf die Transglycosylierung übertragbar, was sich auch aus Untersuchungen von *Wong et al.*¹⁴³ erkennen lässt: Eine Transgalactosylierung mit *p*NP-Gal verlief dort langsamer als die konkurrierende Hydrolyse, während im Fall des oxidierten Donors **36** die Transgalactosylierung schneller als die Hydrolyse stattfand, dennoch vermitteln die gewonnenen kinetischen Daten einen Eindruck von der Akzeptanz der Donoren und den Substratbindungseigenschaften der β -Galactosidase.

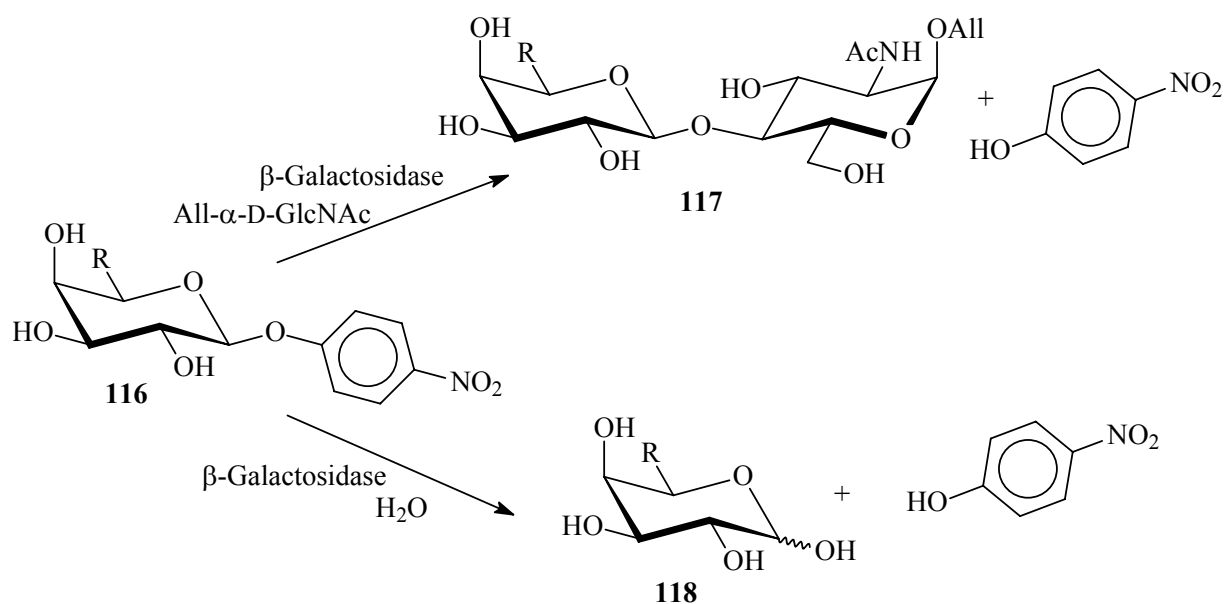


Abb. 49 Transglycosylierung und Hydrolyse der *p*NP-Galactosid-Derivate als Konkurrenzreaktionen im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. R = H, CH₃, CH=CH₂, CHO, CH₂NH₂ oder CH₂OH

Auf die Affinität des Enzyms zum Substrat können pH-Wert, Lösungsmittel und Temperatur Einfluss haben. Bei einem Vergleich der Donoren untereinander ist es deshalb entscheidend, dass diese Reaktionsbedingungen konstant gehalten werden. Für die photometrischen Messungen schien es günstig, die Bedingungen zu wählen, die sich im Falle der Transglycosylierung als optimal erwiesen haben, das sind ein pH-Wert von 7.0, eine Temperatur von 22 °C und als Lösungsmittel ein 1:1 Gemisch aus Acetonitril und 50 mM Kaliumphosphatpuffer. Zur photometrischen Reaktionsverfolgung war es notwendig, eine geeignete Wellenlänge zu finden, bei der selektiv entweder das Verschwinden des Edukts oder die Bildung des Produkts beobachtet werden kann. Um diese zu ermitteln, wurden die UV/Vis-Spektren der verschiedenen Edukt-Galactoside und des Produkts *para*-Nitrophenol unter Bedingungen, identisch, insbesondere den pH-Wert, der die Größe des Extinktionskoeffizienten ϵ beeinflusst, betreffend, mit den bei der Hydrolysereaktion herrschenden, aufgenommen. Die UV/Vis-Spektren aller untersuchten *p*NP-Galactoside zeigen zwei Absorptionsmaxima bei etwa 220 und 300 nm, jenes von *p*NP-OH weist drei Maxima, bei 230, 315 und 401 nm auf (Abb. 50). Um Überlappungen in der Absorption von Edukt und Produkt zu vermeiden, bietet sich die Messung der Extinktionsänderung mit der Zeit bei einer Wellenlänge von 401 nm, bei der die Galactoside gar nicht absorbieren, *p*NP-OH jedoch ein Maximum besitzt, an.

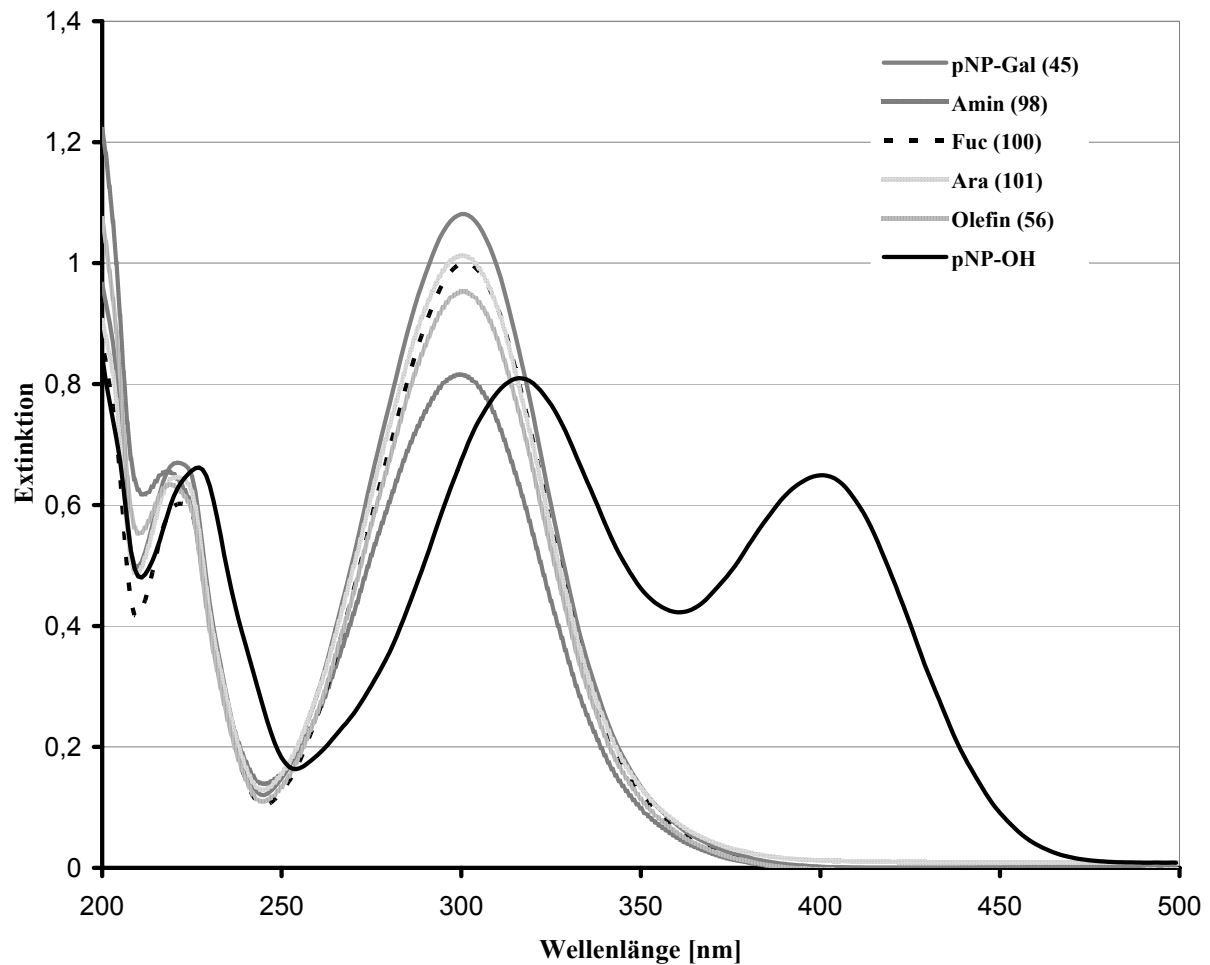


Abb. 50 UV/Vis-Spektren der *p*NP-Galactosid-Donoren und von *p*NP-OH, aufgenommen bei einer Substratkonzentration von 10^{-4} M in Acetonitril/50 mM Kaliumphosphatpuffer 1:1 bei pH 7.0 und 22 °C

Zur Messung der Extinktionsänderung bei 401 nm mit der Zeit wurden in 1 ml Kunststoffküvetten 900 µl der jeweiligen Substratlösung in Acetonitril/Puffer 1:1 und 50 µl Acetonitril vorgelegt. Sofort nach Zugabe von 50 µl einer Lösung aus 20 mg Enzym/ml Puffer wurde die Messung gestartet und über einen Zeitraum von 15 min mit einem Aufnahmeintervall von 5 sek verfolgt. Dabei zeigte sich sehr schnell, dass die Zugabe des Enzyms einen deutlichen, jedoch von der Umsetzung unabhängigen zusätzlichen Einfluss auf die Extinktion ausübte, der besonders in den ersten 5 min groß ist, jedoch auch danach nicht vernachlässigt werden kann. Dies wurde auf das veränderte Lösungsverhalten des Enzyms im Acetonitril/Puffer-Gemisch zurückgeführt. Die β -Galactosidase löst sich in Acetonitril kaum, und flockt bei Zugabe zum 1:1 Lösemittelgemisch sofort aus. Die dadurch bewirkte Extinktionsänderung ist bereits in einer Blindprobe ohne Substrat deutlich sichtbar (Abb. 51, Reihe 1). Tatsächlich lässt sich der beobachtete Effekt durch die umgekehrte Reihenfolge der Zugabe, das bedeutet Vorlage von 900 µl einer Lösung aus Enzym in Acetonitril/Puffer 1:1 und sofortiger Start der

Messung nach Zugabe von 100 µl Substratlösung in dem Lösungsmittelgemisch, weitgehend ausschalten (Abb. 51, Reihe 2). Nach wie vor bewirkt das Enzym in Kombination mit Acetonitril jedoch eine Trübung der Probe.

In der Transglycosylierung wurde Acetonitril zugesetzt, um die Hydrolyse als unerwünschte Nebenreaktion zurückzudrängen, die 1→4-Regioselektivität der Disaccharidsynthese zu verbessern und um eine schnellere Lösung der Substrate, insbesondere des Donors, zu vermitteln. Nur der letztgenannte Grund spielt auch bei der kinetischen Untersuchung der Hydrolysereaktion eine Rolle, verbunden mit den Nachteilen bei der Extinktionsmessung rechtfertigt er allein den Zusatz von Acetonitril jedoch nicht. Um eine verlässlichere Absorption zu erhalten, wurden die Hydrolysereaktionen deshalb in reinem Kaliumphosphatpuffer durchgeführt. Die UV/Vis-Spektren der Galactoside und von *para*-Nitrophenol in reinem Puffer sind identisch mit den in Abb. 50 dargestellten, in Acetonitril/Puffer aufgenommenen, so dass die Messwellenlänge von 401 nm nach wie vor geeignet ist. Der Enzymblindtest zeigt sowohl bei Vorlage der Enzymlösung als auch bei Vorlage der Substratlösung eine konstante, niedrige Absorption (Abb. 51, Reihen 3 und 4). Bei einigen verhältnismäßig unpolaren Donorderivaten musste die Substratkonzentration aufgrund des fehlenden Acetonitrils für die Messung relativ niedrig gewählt werden, um dennoch eine Lösung zu erreichen.

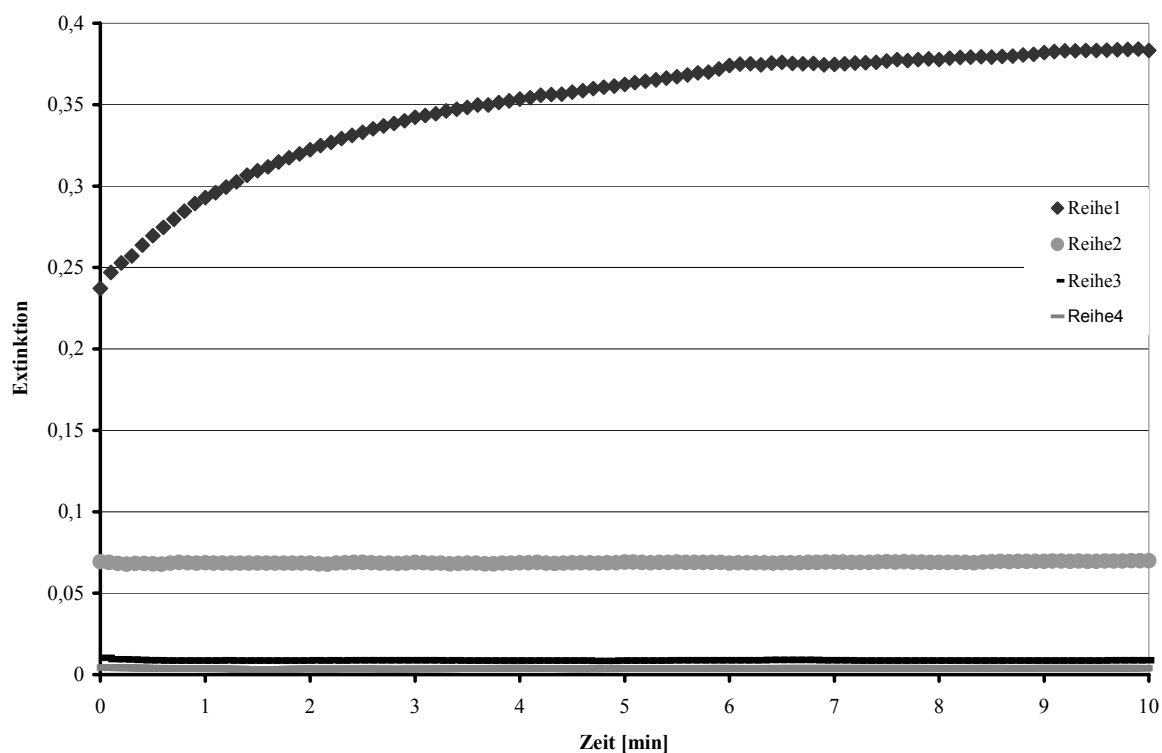


Abb. 51 Blindversuche ohne Substrat in Puffer/Acetonitril 1:1 (Reihe 1 und 2) und Puffer (Reihe 3 und 4) bei Zugabe (Reihe 1 und 3) und Vorlage (Reihe 2 und 4) des Enzyms

Bei der Wahl der Substratkonzentrationen war zu beachten, dass das Lambert-Beer'sche Gesetz nur bei Konzentrationen bis zu 10^{-2} M gilt. Bei einem Umsatz von 10 % darf die Konzentration des *p*NP-Gal-Derivats also nicht höher als 10^{-1} M liegen, muss dabei jedoch deutlich größer sein als die Enzymkonzentration, damit die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von letzterer wird und die Voraussetzung des Fließgleichgewichts erfüllt ist. Weiterhin hat die Praxis gezeigt, dass die Absorption einen Wert von 2 nicht überschreiten darf, da das Photometer hier seinen Grenzwert hat. Enzym- und/oder Substratkonzentration müssen also entsprechend niedrig gewählt werden, wobei beides auch nicht zu klein werden darf, da sonst zum einen die Reaktionsgeschwindigkeit diffusionskontrolliert wird und man sich zum anderen im Bereich des Geräteleerwerts bewegt. Als optimal erwies es sich, die Substratkonzentrationen im mM-Bereich anzusetzen und dabei mit einer möglichst kleinen Enzymkonzentration (100 µg/ml) zu arbeiten, so dass während der Reaktion eine Absorption von ungefähr 0.5 bis 1 erreicht wird. Um mechanistische Effekte der Reaktion in der Michaelis-Menten-Auswertung eindeutig feststellen zu können, sollte die Substratkonzentration idealerweise über einen Bereich von zwei bis drei Zehnerpotenzen variieren. Die Gerätegrenzwerte und die eingeschränkte Löslichkeit einiger Galactosidderivate in Puffer erlauben dies jedoch nicht immer. Nur im Falle des underivatisierten *p*NP-β-D-galactopyranosids sowie des oxidierten Derivats ließen sich E(t)-Messungen über einen solchermaßen großen Substratkonzentrationsbereich, von $7.5 \cdot 10^{-3}$ M bis $1 \cdot 10^{-5}$ M bzw. von $2 \cdot 10^{-3}$ M bis $5 \cdot 10^{-5}$ M reichend, aufnehmen.

Die Anfangsgeschwindigkeit bei der jeweiligen Substratkonzentration wird aus der an den dazugehörigen Graphen angelegten Tangenten ermittelt, deren Steigung dE/dt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes umgerechnet wird, entsprechend

$$v_0 = \frac{dn_{\text{pNP-OH}}}{dt} = \frac{V}{\epsilon \cdot d} \frac{dE}{dt} \quad (4)$$

mit

$n_{\text{pNP-OH}}$ als Stoffmenge des freigesetzten *para*-Nitrophenols,

ϵ als molarem dekadischen Extinktionskoeffizienten von *para*-Nitrophenol unter den gegebenen Bedingungen, also bei 401 nm, 22 °C und pH 7.0 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer,

d als Schichtdicke der verwendeten Küvette, in diesem Falle 1 cm, und

V als dem Gesamtvolumen der Reaktionslösung in der Küvette, hier 1 ml.

Da keine Literaturwerte für den Extinktionskoeffizienten bei den gewählten Reaktionsbedingungen vorliegen, wurde dieser aus einer E($c_{\text{pNP-OH}}$)-Aufnahme zu $\epsilon = 9.08 \cdot 10^3$ l/(mol*cm) ermittelt (Abb. 52).

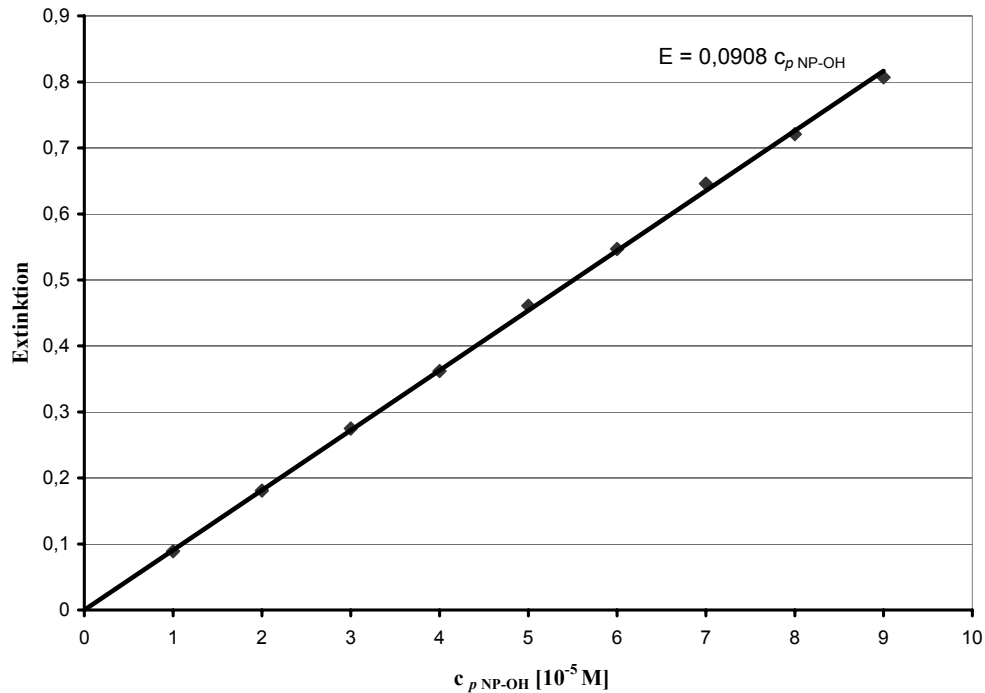


Abb. 52 Aufnahme der Extinktion in Abhängigkeit von der *para*-Nitrophenol-Konzentration in 50 mM Kaliumphosphatpuffer bei pH 7,0, 22 °C und 401 nm

Die Auftragung der so aus den einzelnen E(t)-Läufen erhaltenen Wertepaare v_0 gegen $[S]$ ($= c_{p\text{NPGal}}$) im Michaelis-Menten-Diagramm (Abb. 53) zeigt scheinbar die erwartete hyperbolische Funktion mit einem nahezu linearen Anstieg bei sehr kleinen Substratkonzentrationen – bei denen die Umsetzung entsprechend der Michaelis-Menten-Gleichung (1) einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung gehorcht:

$$\frac{dc_{p\text{NP-OH}}}{dt} = \frac{v_{\max}}{K_M} \cdot c_{p\text{NPGal}} \quad (5)$$

dann einer abnehmenden Steigung des Graphen mit zunehmender Substratkonzentration und schließlich einer asymptotischen Annäherung an $v_{\max}$ – hier noch nicht erkennbar – wenn die Substratkonzentration gegen unendlich geht und die Reaktion somit einem Geschwindigkeitsgesetz nullter Ordnung folgt:

$$\frac{dc_{p\text{NP-OH}}}{dt} = v_{\max} \quad (6)$$

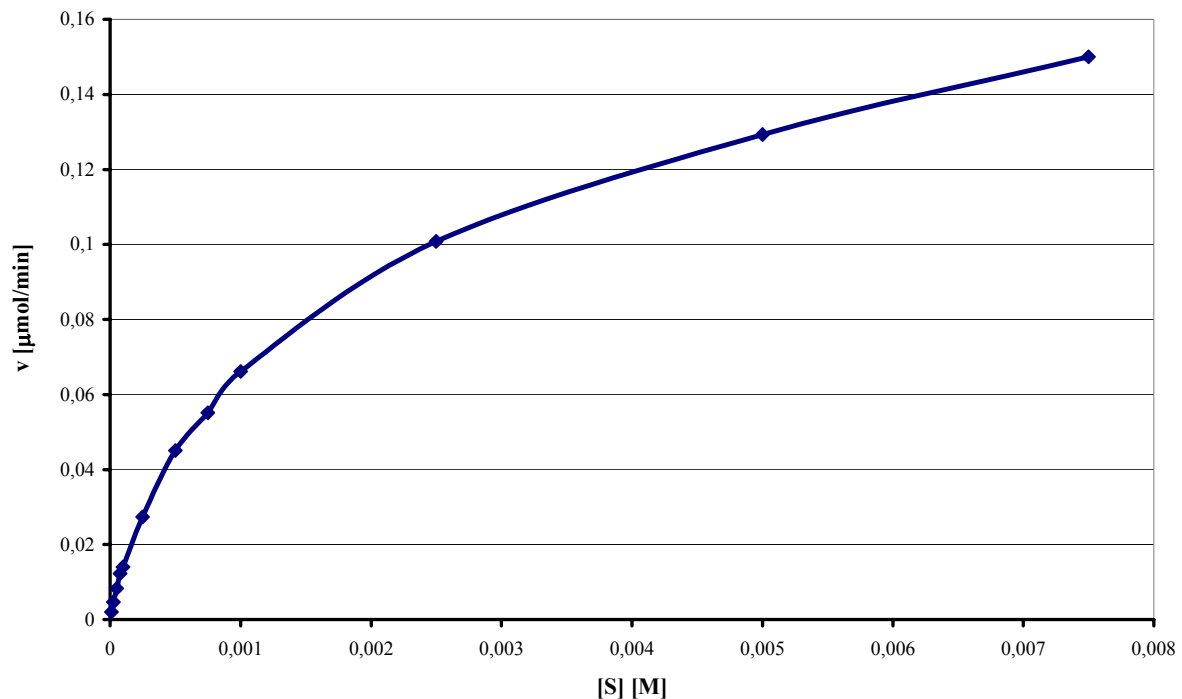


Abb. 53 Michaelis-Menten-Diagramm von pNP-Gal, erstellt mit $[E]_{\text{ges}} = 100 \mu\text{g/ml}$, in Puffer bei pH 7,0, 22 °C und 401 nm

Zur graphischen Ermittlung von K_M und v_{max} ist diese Art der Darstellung nach herrschender Meinung wenig geeignet, weswegen verschiedene Methoden der Linearisierung entwickelt wurden. Am bekanntesten ist in der Enzymkinetik wohl die doppelt-reziproke Auftragung der Wertepaare nach Lineweaver und Burk (Abb. 54). Die Linearisierung erfolgt hier durch einfache Kehrwertbildung der Michaelis-Menten-Gleichung (1) zu

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\text{max}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\text{max}}} \quad (7)$$

v_{max} und K_M sind somit aus y-Achsenabschnitt und Steigung der Geraden berechenbar.

Diese Art der Linearisierung ist jedoch nicht nur die gängigste, sondern auch die ungenaueste. Ganz besonders nachteilig wirken sich bei dieser Methode Messfehler bei kleinen Substratkonzentrationen aus. Schon kleinste Ungenauigkeiten führen zu erheblichen Veränderungen in der Steigung. Da die Substratkonzentrationen für die Messung zudem meist arithmetisch und nicht geometrisch äquidistant gewählt werden, kommt es zu einer Häufung der Datenpunkte bei kleinen und einer Verarmung der Datenpunkte bei großen x-Werten, so dass die bei kleinen Substratkonzentrationen ermittelten Geschwindigkeiten, die naturgemäß eher mit Fehlern behaftet sind als Werte im mittleren Messbereich, zusätzlich an Einfluss

gewinnen. Auch lassen sich in der Lineweaver-Burk-Linearisierung mechanistische Einflüsse, z. B. ob das Enzym überhaupt einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt, nur schwer erkennen. So kann durch die für *p*NP-Gal ermittelten $1/v$ ($1/[S]$)-Wertepaare ohne Weiteres eine Gerade gelegt werden, ebenso wie eine ganz leicht konkav gekrümmte Hyperbel (Abb. 54).

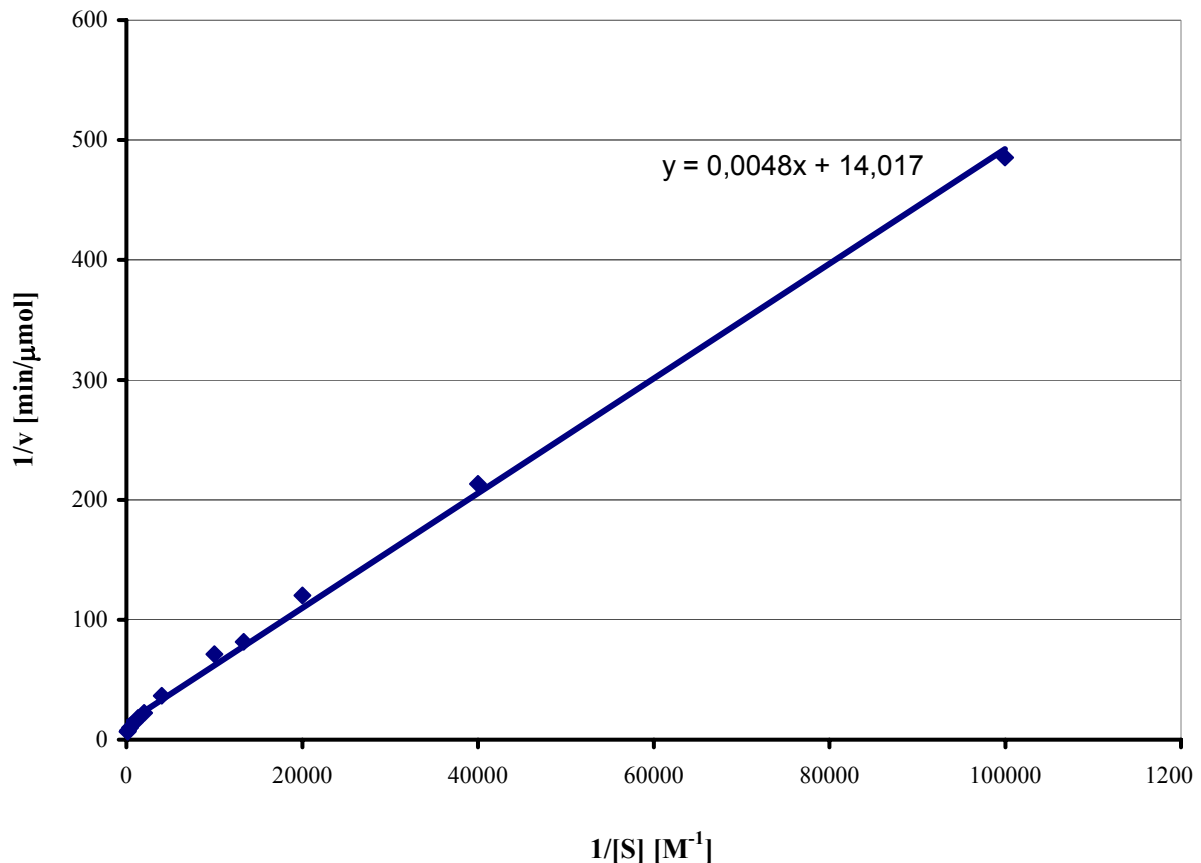


Abb. 54 Lineweaver-Burk-Diagramm der *p*NP-Gal-Hydrolyse

Mehr Aufschluss in diesem Zusammenhang sowie verlässlichere Berechnungen der Maximalgeschwindigkeit und der Michaeliskonstante ermöglichen andere Darstellungsweisen der Messwerte. Sehr populär sind die Linearisierungen nach Eadie-Hofstee wie auch die nach Hanes-Woolf. Für der Michaelis-Menten-Kinetik folgende Enzyme ist der „direct linear plot“ nach Cornish-Bowden ebenfalls gut geeignet.

Nach Hanes-Woolf wird die Lineweaver-Burk-Gleichung (7) mit $[S]$ multipliziert, so dass sich

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}} \cdot [S] \quad (8)$$

ergibt. Aufgetragen wird $[S]/v$ gegen $[S]$.

Multiplikation der Lineweaver-Burk-Gleichung (7) mit v und $v_{\max}$ und Auflösen nach v ergibt die Eadie-Hofstee-Darstellung

$$v = -K_M \cdot \frac{v}{[S]} + v_{\max} \quad (9)$$

bei der v gegen $v/[S]$ aufgetragen wird.

Üblicherweise finden sich statistische und systematische Fehler häufiger als in $[S]$ in v , das in der Eadie-Hofstee-Linearisierung sowohl in die x- als auch in die y-Achse eingeht und somit einen recht großen Einfluss zeigt. Daher ergibt die Hanes-Woolf-Darstellung (8) die Gerade mit den geringsten und konsistentesten Fehlern.

Die entsprechend vorgenommene Auswertung der Messergebnisse der β -Galactosidase-katalysierten Hydrolyse von p NP-Gal zeigt, dass sich durch die Auftragung des berechneten Quotienten $c_{p\text{NP-OH}}/v$ gegen $c_{p\text{NP-OH}}$ nur schlecht eine Gerade legen lässt, vielmehr scheint die Verbindung der Punkte eine Hyperbel zu ergeben (Abb. 55).

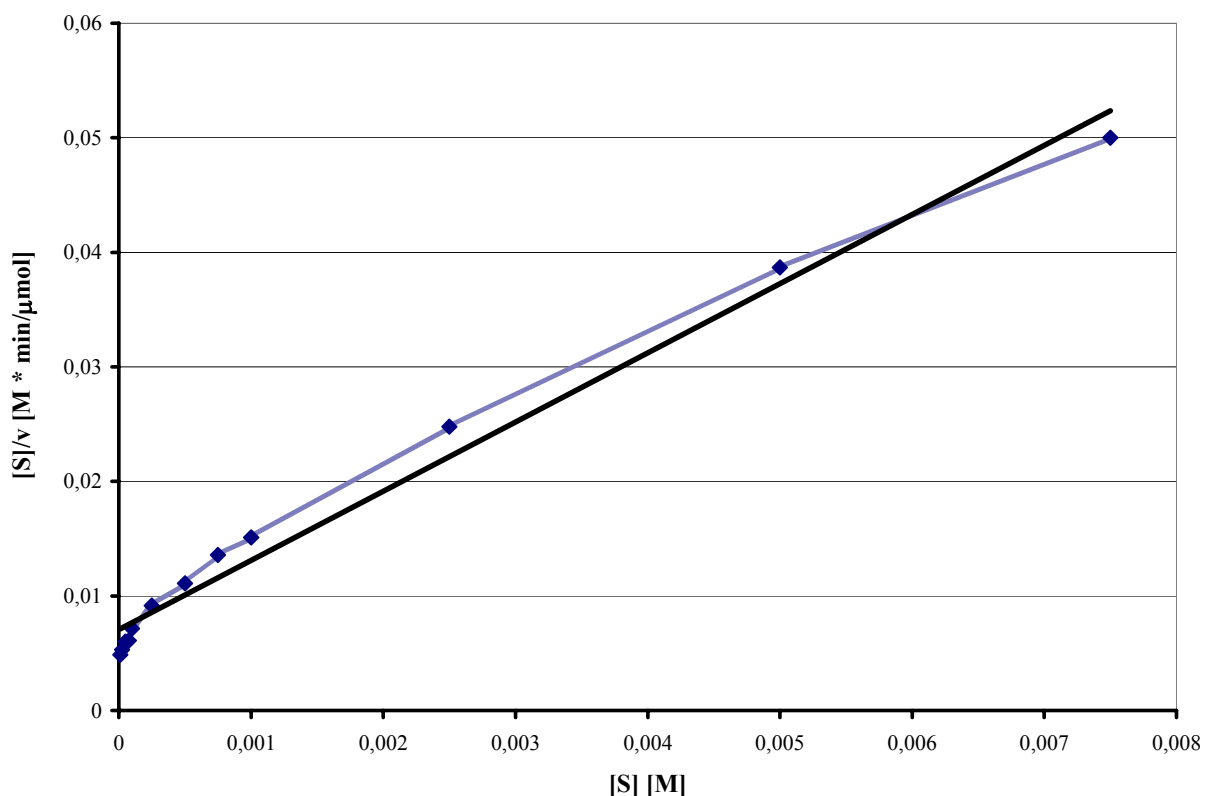


Abb. 55 Hanes-Woolf-Diagramm der p NP-Gal-Hydrolyse

Auch die Auftragung nach Eadie-Hofstee zeigt ganz deutlich keine Gerade (Abb. 56)

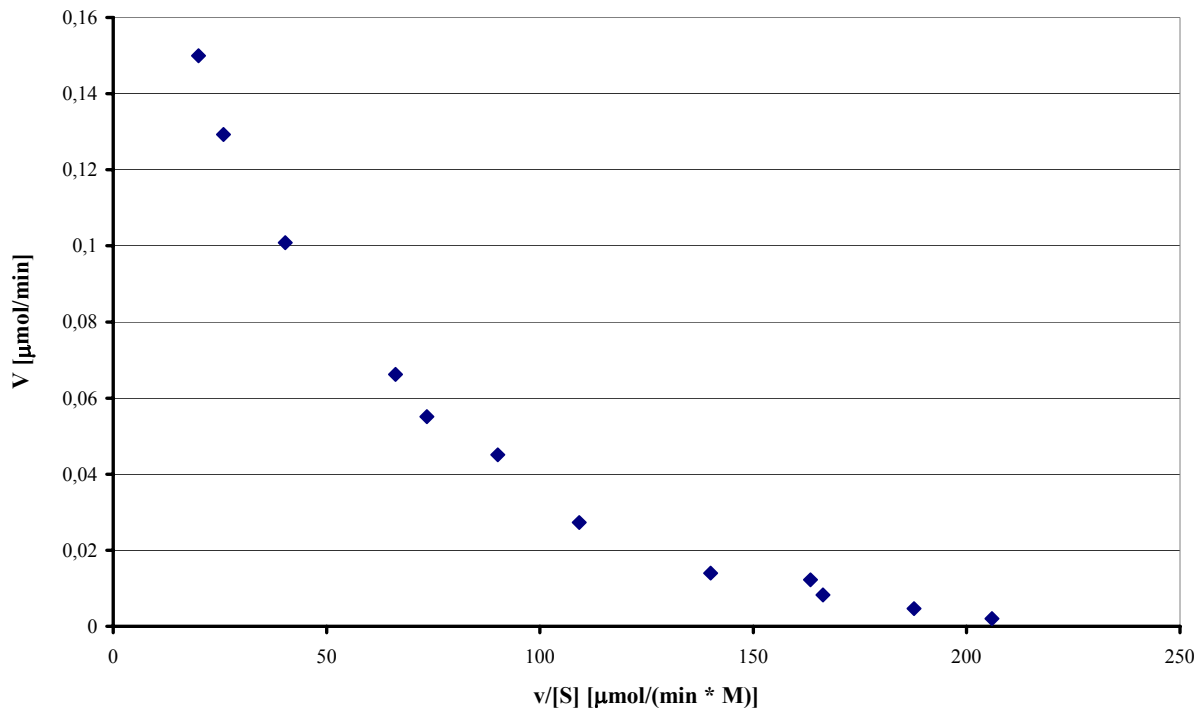


Abb. 56 Eadie-Hofstee-Diagramm der *p*NP-Gal-Hydrolyse

Für diesen Befund gibt es verschiedene Möglichkeiten der Erklärung. Zum einen muss überprüft werden, ob die beobachtete Abweichung von dem theoretischen linearen Graphen durch Messfehler verursacht wurde. Dabei deutet die gleichmäßige Form der erhaltenen Kurve eher auf systematische als auf statistische Fehler, wie Wiege- und Pipettierfehler, hin. Denkbar ist zum Beispiel, dass sich der Extinktionskoeffizient ε mit der *p*NP-OH-Konzentration ändert, da ε pH-Wert abhängig und das bei der Reaktion freigesetzte *para*-Nitrophenol sauer ist. Eine Überprüfung des pH-Werts während der Reaktion zeigt, dass dieser tatsächlich trotz gepufferter Lösung bei hohen Substratkonzentrationen leicht sinkt. So beträgt er bei einer *p*NP-Gal-Konzentration von $7.5 \cdot 10^{-3}$ M nach 2 min Reaktion nur noch 6.98 statt 7.00 und sinkt im weiteren Verlauf langsam auf 6.96. Fraglich ist allerdings, ob diese Änderung einen derartigen Einfluss auf ε und damit v hat, dass sie für die beobachtete Krümmung des Graphen verantwortlich ist.

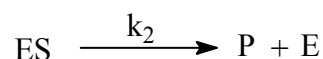
Die pH-Abhängigkeit des molaren Extinktionskoeffizienten von *para*-Nitrophenol ist für eine Wellenlänge von 405 nm in der Literatur beschrieben²⁵⁵. Demnach wird ε mit steigender H^+ -Konzentration erst langsam, dann schnell kleiner. So bewirkt eine Senkung des pH-Werts von 7.1 auf 6.7 ein starkes und nahezu lineares Abfallen von ε von $11150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ auf $7360 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, also um etwa $95 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pro 0.01 pH. Wenn ε , also der Divisor der gemessenen Extinktionsänderung, während der zehnminütigen Reaktion tatsächlich kleiner wird, muss v

größer sein als für einen konstanten Extinktionskoeffizienten berechnet. Ein Vergleich mit der Eadie-Hofstee-Graphik zeigt, dass die Krümmung der Kurve dann noch größer wird – allerdings vernachlässigbar wenig – die Nicht-Linearität sich damit also nicht erklären lässt.

Um andere systematische Fehler ausschließen zu können, wurden die E(t)-Messungen wiederholt, wobei die Reaktionen nicht aufsteigend oder absteigend mit der Substratkonzentration, sondern durcheinander vermessen wurden. Die Auswertung ergab in den einzelnen linearisierten Auftragungen jeweils einen Kurvenverlauf, der dem aus der ersten Messreihe erhaltenen ganz ähnlich war, was gegen irgendwelche systematischen Fehler spricht.

Da Messfehler somit ausgeschlossen werden können, könnte sich der gefundene Kurvenverlauf daraus erklären, dass das Enzym die zur Aufstellung der Michaelis-Menten-Gleichung getätigten Annahmen nicht erfüllt:

Zum einen soll die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes aus den Edukten reversibel und schneller verlaufen als die Dissoziation in Katalysator und Produkt, d.h. dass der zweite Schritt



geschwindigkeitsbestimmend ist.

Die Messung der Anfangsgeschwindigkeiten stellt dabei sicher, dass keine Rückreaktion stattfindet, die allerdings im Falle der hier untersuchten Hydrolyse der *p*NP-Gal-Derivate sowieso unwahrscheinlich ist, da Wasser als Lösungsmittel und damit im großen Überschuss eingesetzt wird.

Weiterhin wird ein Fließgleichgewicht (steady state) für [ES] angenommen, was bedeutet, dass die Bildung von ES aus E und S und die Dissoziation von ES in E und S bzw. E und P mit der gleichen Geschwindigkeit stattfinden, so dass gilt

$$\frac{d[\text{ES}]}{dt} = 0 \quad (10)$$

Diese Annahme sollte erfüllt sein, wenn die Substratkonzentration im Vergleich zur Enzymkonzentration groß ist, also $[\text{S}] \gg [\text{E}]$, was gegeben ist, denn die zugesetzten 100 µg Enzym/ml Reaktionslösung entsprechen bei einer Molmasse von 247 kD $4 \cdot 10^{-7}$ M, wohingegen die kleinste Substratkonzentration 10^{-5} M beträgt.

Es wird für die Berechnung der Michaelis-Menten-Gleichung außerdem vorausgesetzt, dass das Enzym in seiner Gesamtkonzentration erhalten bleibt, also $[\text{E}]_{\text{ges}} = [\text{E}] + [\text{ES}]$ gilt, mit $[\text{E}]_{\text{ges}}$ als zugegebener Enzymmenge und $[\text{E}]$ als Konzentration des freien Enzyms. Die

Blindversuche haben bestätigt, dass das Enzym sich nicht zersetzt und in seiner Gesamtkonzentration erhalten bleibt.

Die getätigten Annahmen sind also alle erfüllt.

Eine Hemmung der Galactosidase durch *p*NP-OH oder durch Bindung von Galactose an das aktive Zentrum ist bei den kurzen Reaktionszeiten auszuschließen. Ebenso sollte eine Verarmung des Substrats bei kleinen Konzentrationen noch nicht stattfinden.

Eine denkbare Erklärung für die gefundene Nicht-Linearität besteht in Überlagerungseffekten durch Nebenreaktionen. Ein Blindtest mit *p*NP-Gal in Puffer ohne Enzym zeigt, dass die nicht-Enzym-katalysierte Hydrolyse keinen Einfluss hat, die *p*NP-OH-Konzentration bleibt praktisch konstant.

In früheren Arbeiten (Kap. 3.3.1) wurde das Auftreten einer Selbst-Galactosylierung, d.h. einer Di- bzw. Oligosaccharidbildung durch Verknüpfung von *p*NP-Gal mit *p*NP-Gal bzw. Galactose als Nebenreaktion bei der Transglycosylierung beschrieben (Abb. 57). Dies könnte insbesondere bei großen Substratkonzentrationen einen Überlagerungseffekt verursachen, indem die Reaktion zum Beispiel gemäß Abb. 58 mit der einfachen Hydrolyse konkurriert.

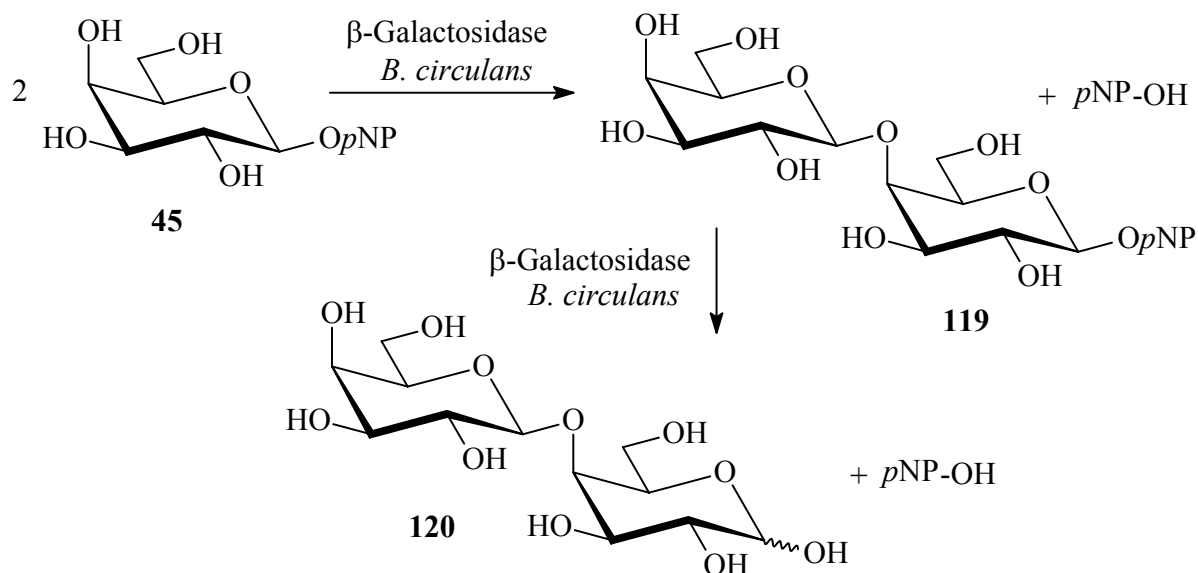


Abb. 57 Transgalactosylierung als Nebenreaktion

es bisher keine Angaben in der Literatur. Die Tatsache, dass sehr viele Enzyme mehrere Substratbindungsstellen aufweisen, stützt die Annahme, dass dies auch auf die β -Galactosidase von *B. circulans* zutrifft. Ein Vergleich des hier nach Eadie-Hofstee berechneten Graphen mit in der Literatur abgebildeten²⁵⁶ bestätigt den typischen Kurvenverlauf bei negativer Kooperativität.

Die Auswirkung der Bindung des ersten Substratmoleküls auf die Bindung der nächsten wird mathematisch beschrieben durch eine modifizierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]^n}{K_M^n + [S]^n} \quad (11)$$

Im Falle der negativen Kooperativität hemmt die Bindung des ersten Substratmoleküls die eines zweiten, so dass der Hill-Koeffizient n einen Wert kleiner 1 annimmt.

Eine Kurvenanpassung der Wertepaare mittels dieser Gleichung führt zu einem Hillkoeffizienten von $n = 0.85$ (Abb. 59).

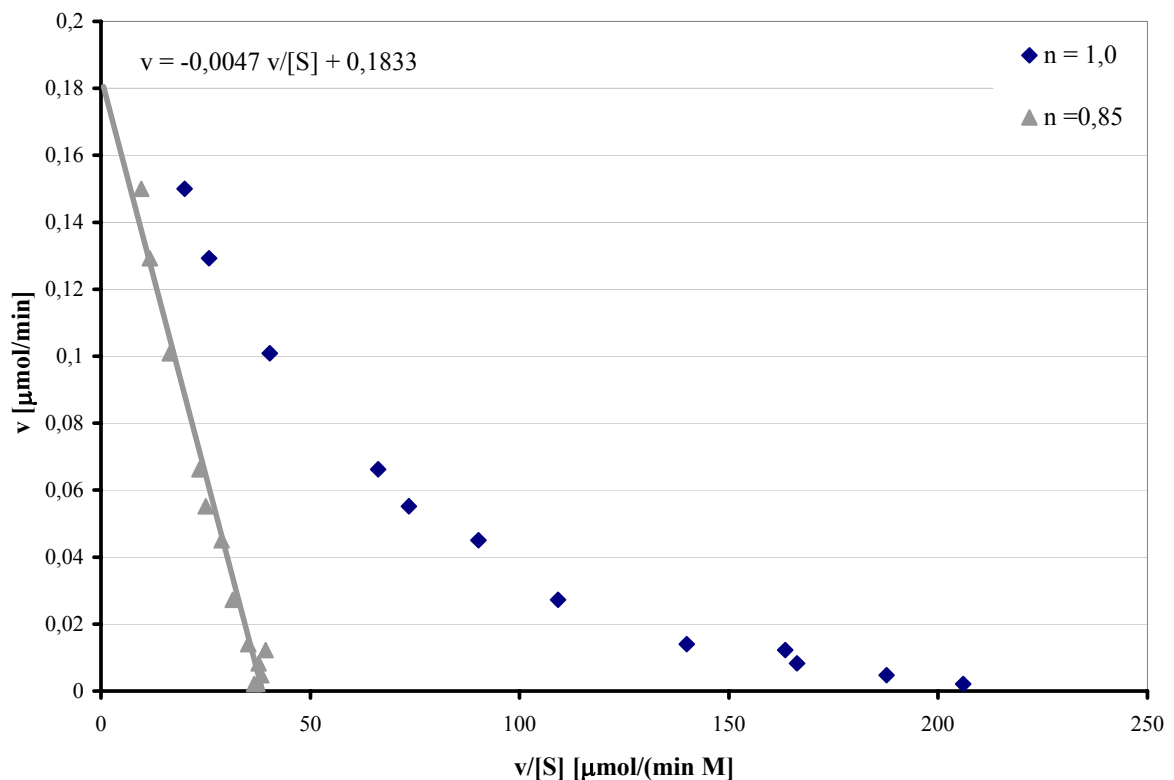


Abb. 59 Eadie-Hofstee-Graphik der p NP-Gal Hydrolyse mit angepasstem Hill-Koeffizienten n

Aus der angepassten Linearisierung ergibt sich für p NP-Gal ein $v_{\max}$ von etwa $0.18 \mu\text{mol/min}$ und eine damit spezifische Aktivität von etwa $1833 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$.

Die neuen Donorsubstrate **56** (Olefin), **100** (Fuc), **101** (Ara), **36** (Aldehyd) und **98** (Amin) wurden entsprechend vermessen. Bei den derivatisierten Galactosiden ist allerdings eine Geradenanpassung wie im Fall von *p*NPGal (**45**) oftmals nicht möglich, da die unzureichende Löslichkeit der Donoren bei hohen und der Geräteleerwert bei kleinen Substratkonzentrationen die für die verlässliche Zuordnung einer negativen oder positiven Kooperativität mit entsprechender Berechnung des Hill-Koeffizienten notwendige Bandbreite der Messung nicht erlauben; eine scheinbare Krümmung könnte in diesen Fällen ebenso gut auf Messfehlern beruhen. Die für die derivatisierten Donoren direkt aus den Linearisierungen ermittelten $v_{\max}$ - und K_M -Werte spiegeln demnach nur deren Größenordnung, nicht aber exakte Werte der Konstanten wider. Dennoch ist ein Trend erkennbar, wie die folgenden Graphiken zeigen, in denen eine Auftragung der für den jeweiligen Donor ermittelten Wertepaare nach Lineweaver-Burk (Abb. 60), Eadie-Hofstee (Abb. 61 und Abb. 63) Hanes-Woolf (Abb. 63 und Abb. 64) dargestellt ist.

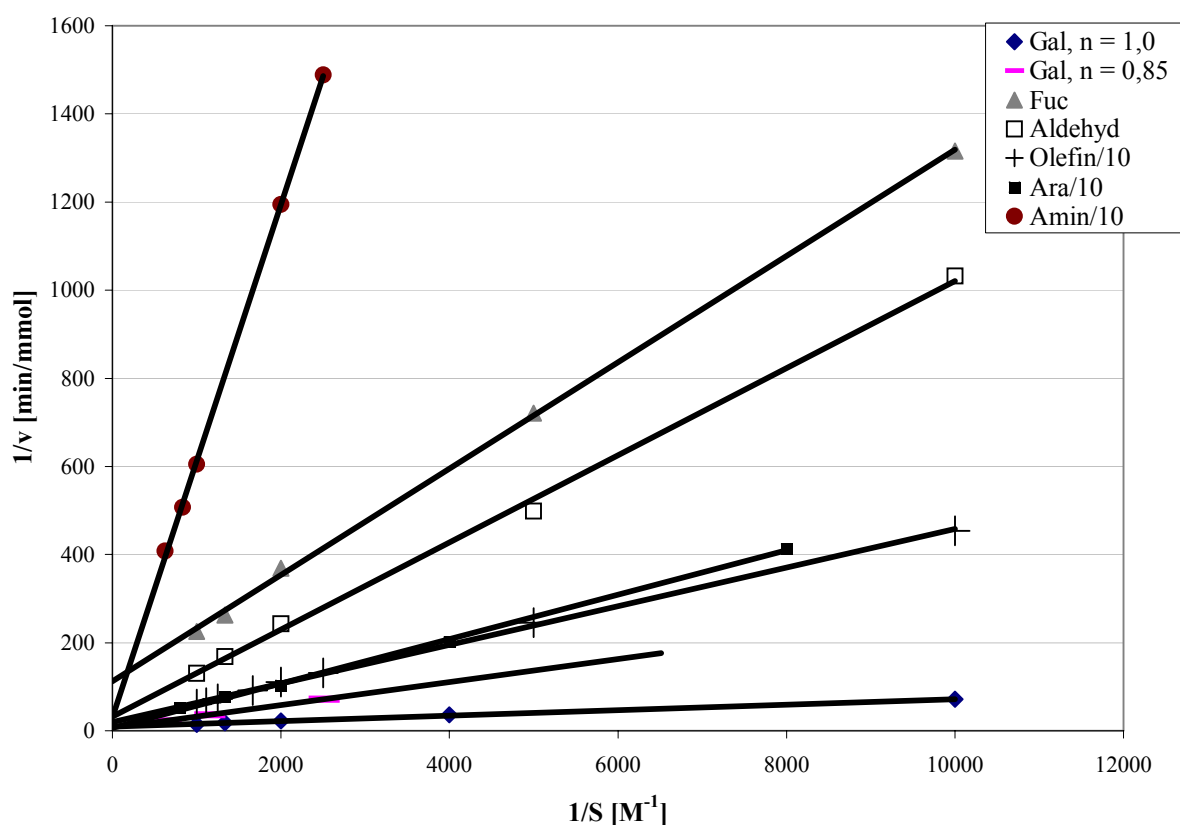


Abb. 60 Lineweaver-Burk Diagramme der Donoren. Für die Darstellung wurden die $1/v$ -Werte von Amin, Arabinopyranosid und Olefin durch 10 geteilt. Die Reaktionen mit Arabinopyranosid und Olefin mussten außerdem mit der zehnfachen Konzentration an Enzym durchgeführt werden.

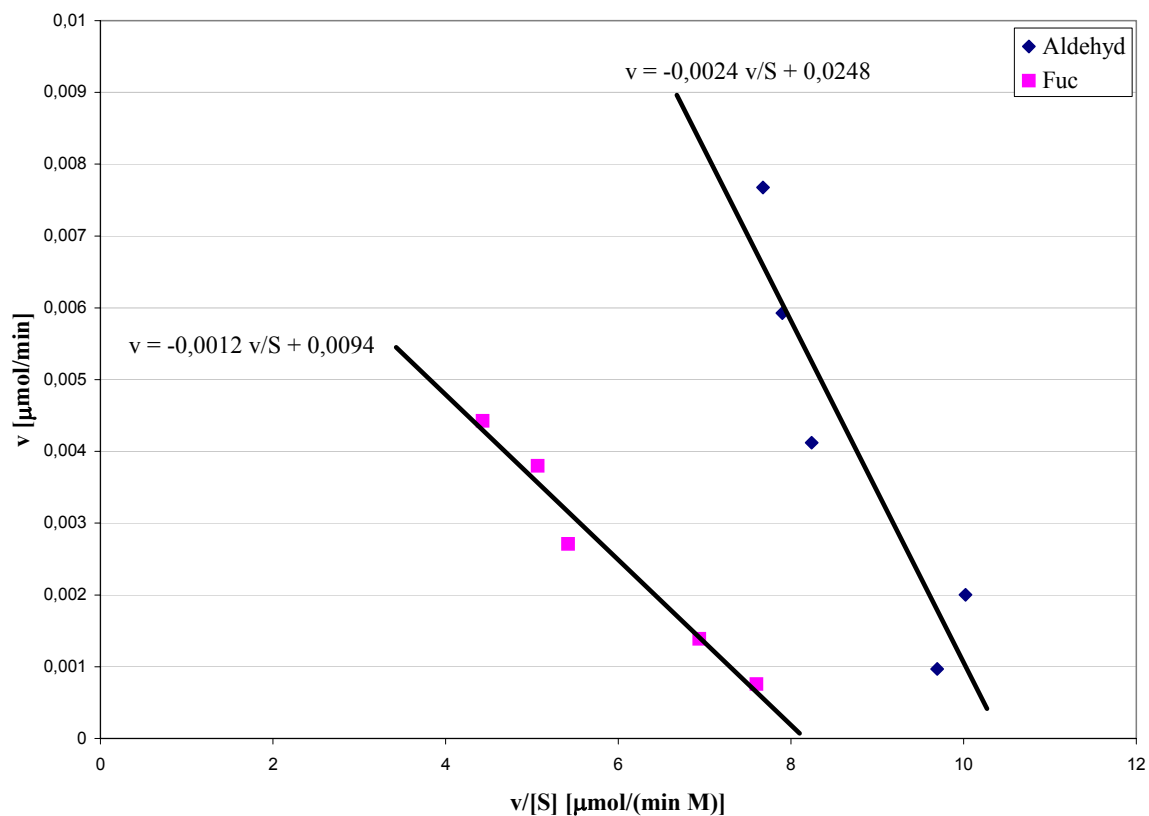


Abb. 61 Eadie-Hofstee-Diagramm der Hydrolyse von Fuc (100) und Aldehyd (36)

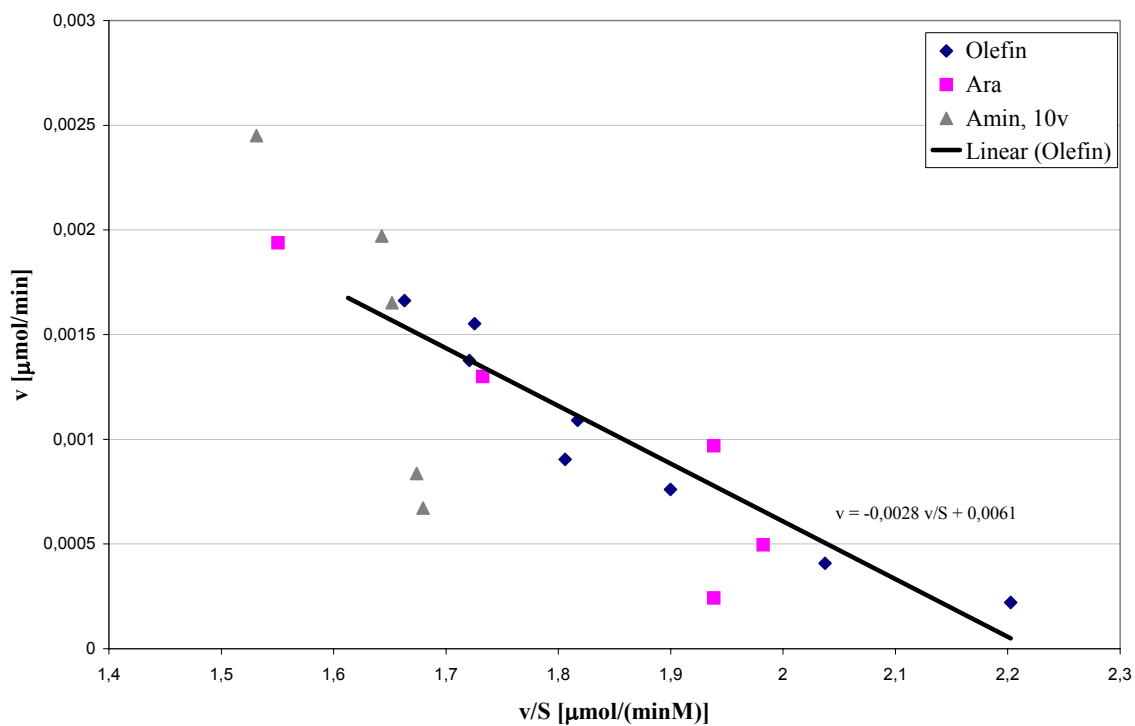


Abb. 62 Eadie-Hofstee-Diagramm der Hydrolyse von Ara (101), Olefin (56) und Amin (98); die Werte für v mussten im Fall es Amins mit 10 multipliziert werden, um in dieser Abbildung darstellbar zu sein.

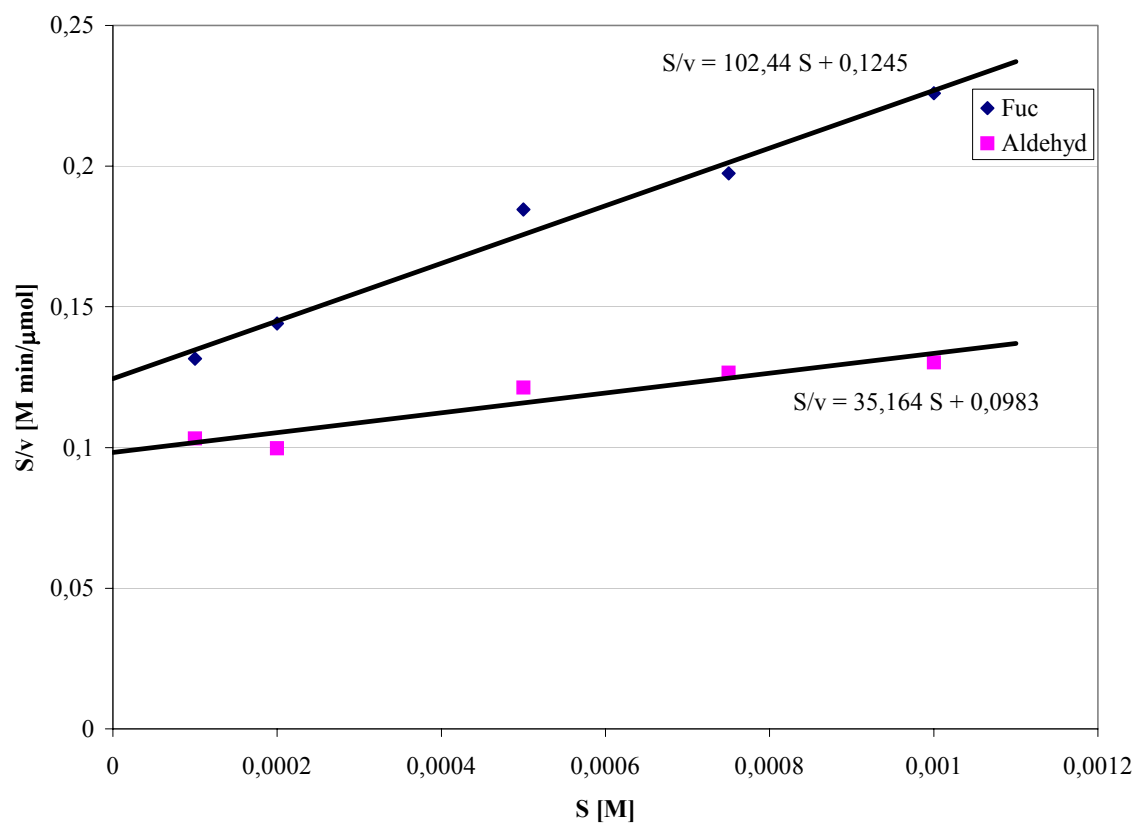


Abb. 63 Hanes-Woolf-Diagramm der Hydrolyse von Fuc (100) und Aldehyd (36)

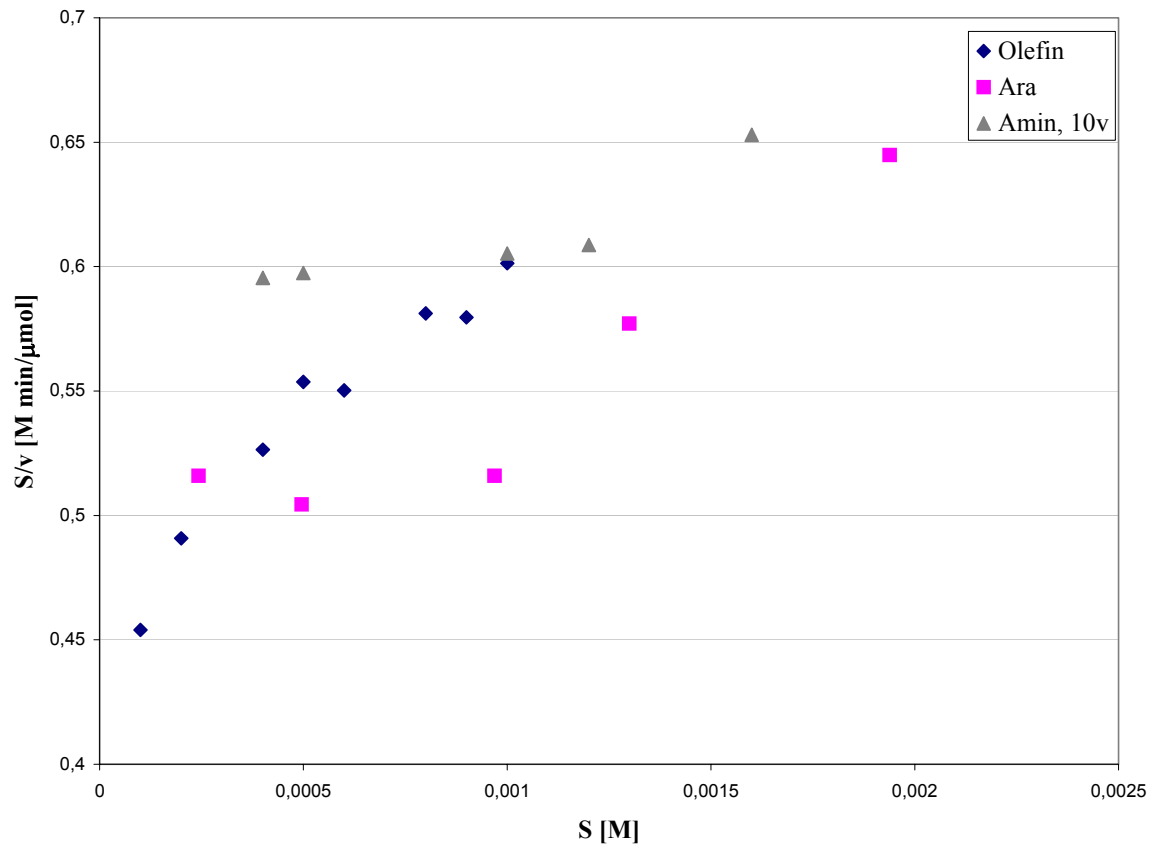


Abb. 64 Hanes-Woolf-Diagramm der Hydrolyse von Ara (101), Olefin (56) und Amin (98); die Werte für v mussten im Fall es Amins mit 10 multipliziert werden, um in dieser Abbildung darstellbar zu sein.

Die nach den verschiedenen Methoden ermittelten Werte für K_M und $v_{\max}$, bezogen auf 1 mg Enzym, sind in Tab. 7 aufgeführt. Vergleichbare Literaturwerte sind nicht verfügbar; eine von *Usui et al.*¹⁴⁴ gemessene Michaelis-Menten-Kinetik der β -Galactosidase aus *B. circulans* bei 40 °C, pH 6.0 und mit *o*NP- β -D-galactopyranosid als Substrat ergaben für dieses: $v_{\max} = 6.7$ $\mu\text{mol}/(\text{mg min})$ und $K_M = 0.47$ mM.

Tab. 7 Aus den Linearisierungen nach Lineweaver-Burk (LB), Eadie-Hofstee (EH) und Hanes-Woolf (HW) berechnete Werte für K_M [mM] und $v_{\max}$ [$\mu\text{mol}/\text{min}$] (auf 1 mg Enzym bezogen)

	$v_{\max}$ LB	$v_{\max}$ EH	$v_{\max}$ HW		K_M LB	K_M EH	K_M HW
Gal 45	2.9	1.8	2.0		7.7	4.7	5.2
Aldehyd 36	0.3	0.3	0.3		3.1	2.4	2.8
Fuc 100	0.1	0.1	0.1		1.1	1.2	1.2
Amin 98	0.03	-	-		17	-	-
Ara 101	0.01	-	-		7.0	-	-
Olefin 56	0.01	0.01	-		2.0	2.8	-
<i>o</i> NP-Gal ¹⁴⁴	6.7				0.47		

Diese kinetischen Daten ergänzen die in der präparativen Darstellung der Disaccharide erhaltenen Ergebnisse. Im einen wie im anderen Fall zeigt sich, dass Arabinopyranosid **101**, Amin- und Olefindonor (**98** und **56**) weniger gute Substrate für die β -Galactosidase sind, während das Fucopyranosid **100** und der Aldehyd-funktionalisierte Donor **36** zwar recht langsam, aber mit hervorragenden Ausbeuten umgesetzt werden.

9 Reduktive Aminierung

Sowohl die Synthese eines C-6'-Aldehyd- als auch eines C-6'-Amino-funktionalisierten *N*-Acetyllactosaminids ist mit Reaktionsfolge C (Abb. 18) gelungen. Die Variante der Aldehyd-Funktionalisierung des Disaccharids ist der anderen dabei eindeutig überlegen. Bezüglich der Reaktionsführung – die Synthese ist zügig, mit minimalem Zeit- und Arbeitsaufwand durchführbar – doch vor allem bezüglich des Ergebnisses – in den chemo-enzymatischen Umsetzungen konnten vorzügliche Ausbeuten erzielt werden. Im Hinblick auf die auszuführende reduktive Aminierung sind somit ausgehend vom Carbonyl-derivatisierten LacNAc-Derivat **109** Aminosäuren bzw. Aminosucker für die gewünschte Einführung der Substituenten erforderlich.

9.1 Synthese der Aminosucker

Natürlich vorkommende Aminosucker, wie z.B. D-Glucosamin, sind für einen direkten Einsatz in der reduktiven Aminierung nicht gut geeignet, da ihre in der offenkettigen Konstitution existente Carbonylfunktion in Konkurrenz zu dem zugesetzten Aldehyd mit der Aminogruppe reagieren kann.^{86,257} Zur Vermeidung solch einer homomolekularen Reaktion ist es notwendig, die Ring-Ketten-Tautomerie zu unterbinden, indem beispielsweise die Lactolgruppe des Aminosuckers entfernt oder blockiert wird. Dies berücksichtigend wurden D-Glucosamin-Derivate in drei Variationen hergestellt:

Einem literaturbekannten^{258,259} Weg folgend wurde in drei Schritten, die einen temporären Schutz der Aminofunktion des D-Glucosamins (**121**) mit Anisaldehyd, folgende Acetylierung und schließlich saure Spaltung der Schiff'schen Base **123** beinhalten, 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucosamin-hydrochlorid (**124**) synthetisiert (Abb. 65). Das Produkt wurde als weißer Feststoff in sehr guter Ausbeute über alle drei Stufen erhalten.

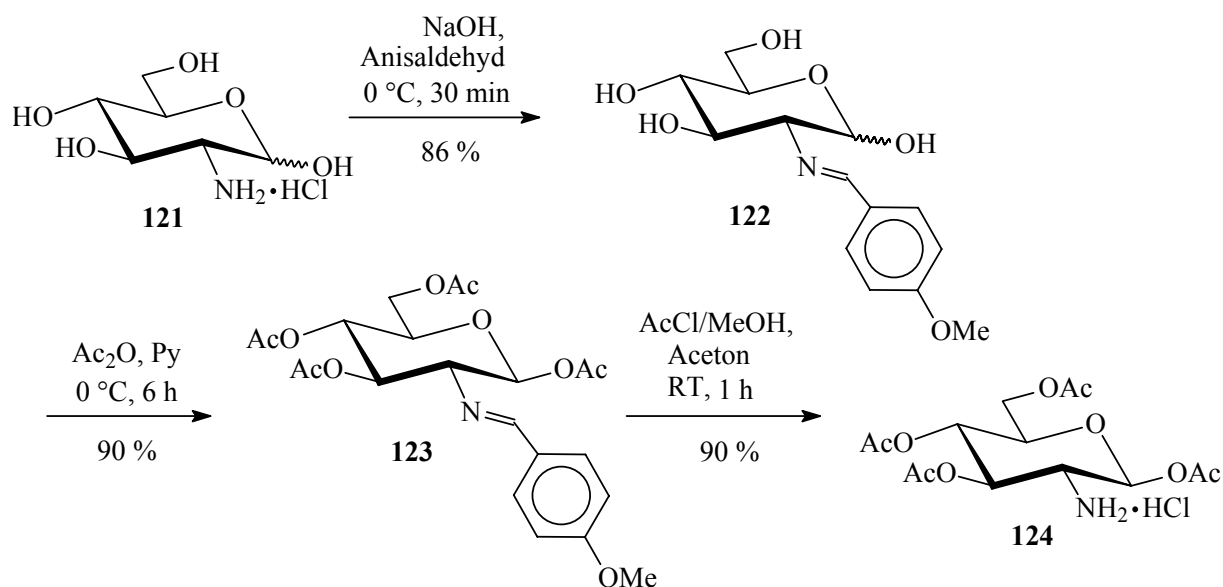


Abb. 65 Synthese eines geschützten 2-Aminozuckers aus D-Glucosamin nach *Bergmann et al.*²⁵⁸

Gleichfalls bietet die *N*-Deacetylierung eines *N*-Acetylglucosamins, dessen Lactolgruppe zuvor leicht in einer Fischer-Glycosylierung geschützt werden kann, Zugang zu einer zweckdienlichen Aminoverbindung. Ein geeignetes Edukt stand mit Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucosamin (46) bereits durch dessen Bedarf als Akzeptor in der chemo-enzymatischen Glycosylierung (Kap. 7) zur Verfügung. Die Ausführung der Reaktion an dem Allyl-substituierten Glycosid erfolgte analog einer von *Wong et al.*⁸⁵ beschriebenen Methode als basische Amidspaltung mit Bariumhydroxid (Abb. 66). Während dort die Trennung des Produkts von Salzen mittels kontinuierlicher Extraktion mit Dichlormethan erreicht wurde, wurde die Aufarbeitung hier, nach der mittels DC festgestellten vollständigen Reaktion des Edukts, schneller gestaltet, indem durch Zugabe kleiner Portionen Trockeneis überschüssiges Bariumhydroxid-Octahydrat und gebildetes Bariumacetat, die bei Raumtemperatur eine gute Löslichkeit in Wasser von 56 g/l bzw. 760 g/l aufweisen, in Bariumcarbonat überführt, dessen Löslichkeit in Wasser nur 0.02 g/l beträgt, und damit ausgefällt wurden.

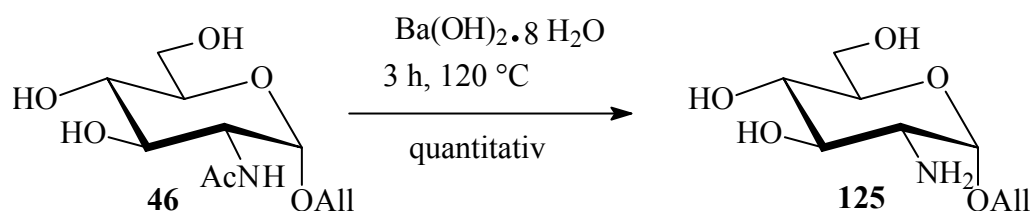


Abb. 66 Darstellung von Allyl-2-amino-2-desoxy- α -D-glucosamin durch basische Amidspaltung

Als drittes wurde, eine Synthesefolge von Schäfer²⁶⁰ nacharbeitend, eine saure Spaltung der Acetamidgruppe nach radikalischer Dehalogenierung von 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosylchlorid²⁶¹ (**126**) genutzt, um ein Glucosamin ohne Lactolgruppe zu bilden (Abb. 67). Nach Kristallisation wurde das Produkt **128** in sehr guter Ausbeute erhalten.

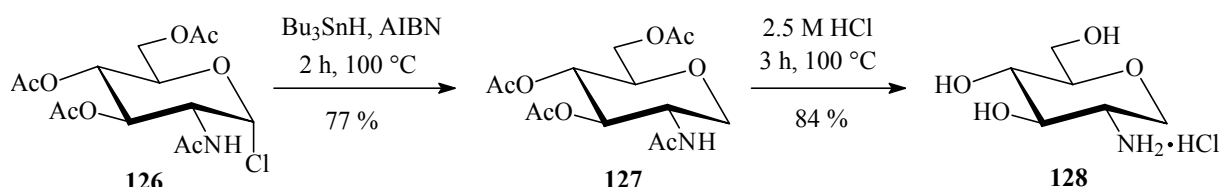


Abb. 67 Darstellung von 2-Amino-1,5-anhydro-2-desoxyglucitol-hydrochlorid durch saure Amidspaltung

Damit standen drei Monosaccharide (**124**, **125** und **128**) zur Verfügung, in denen eine Öffnung des Zuckerringes blockiert ist und die die Aminogruppe den natürlichen Aminoglycosiden entsprechend an C-2 tragen.

In Ergänzung dieser 2-Aminozucker-Derivate wurden zwei weitere Monosaccharide, die zusätzlich zu der natürlichen 2-Acetamidogruppe eine Aminofunktion an C-6 tragen, sowie Kohlenhydrate mit einer Aminofunktion an C-1 (verknüpft über eine Alkylkette) hergestellt.

Die Darstellung eines β -Glucosids mit Amino-funktionalisiertem Linker erfolgte nach einer Methode von Kieburg.²⁶² Anstelle von D-Mannose wie dort wurde hier D-Glucose nach der Trichloracetimidat-Methode mit Bromethanol zur Reaktion gebracht. Substitution des Bromids durch Azid, Entschützung²⁶³ und katalytische Hydrierung²⁶⁴ lieferten 2-Aminoethyl- β -D-glucopyranosid (**132**) (Abb. 68).

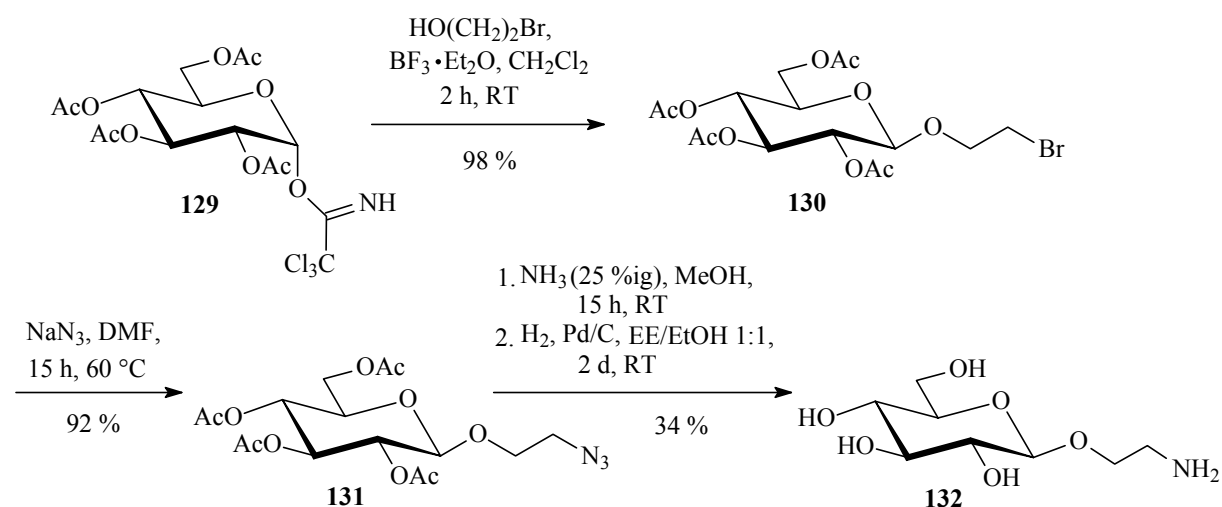


Abb. 68 Synthese eines Glucopyranosids mit Amino-substituiertem Linker an C-1

Zur Synthese eines α -*N*-Acetylglucosaminids mit Amino-funktionalisiertem Linker wurde ein bedeutend kürzerer, neuer Weg entworfen. Die bewährten Bedingungen der Fischer-Glycosylierung zwischen Allylalkohol und *N*-Acetylglucosamin (Kap. 5) wurden auf 3-Hydroxypropionitril als alkoholische Komponente übertragen. Nach beendeter Reaktion konnte der größte Teil überschüssigen 3-Hydroxypropionitrils, das einen Siedepunkt von 228 °C besitzt, bei 90 °C im Ölpumpenvakuum entfernt werden. Die Reinigung des Rohprodukts gelang durch säulenchromatographische Trennung (DCM/MeOH 7:1 $\rightarrow$ 5:1), gefolgt von Umkristallisation aus Dichlormethan/Methanol. Das saubere Glycopyranosyloxypropionitril **133** wurde im zweiten und damit letzten Schritt der Synthese katalytisch hydriert zum 3-Aminopropylglycosid **134**.

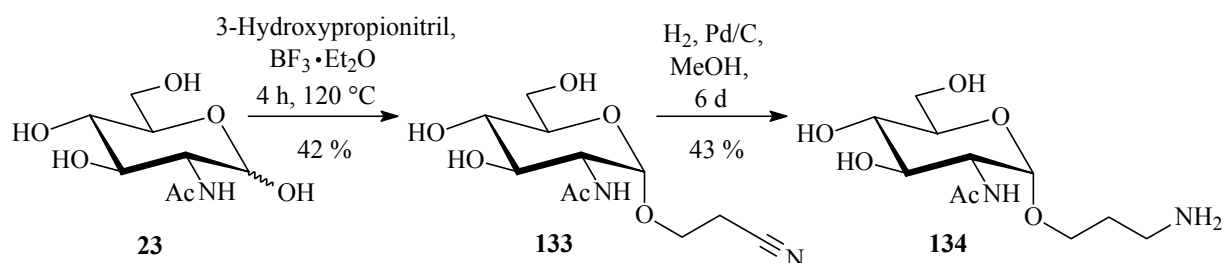


Abb. 69 Synthese eines *N*-Acetyl-glucosaminopyranosids mit Amino-substituiertem Linker an C-1

Der bereits für die Synthese des 6-Amino-*p*NP-galactosids **98** erfolgreich genutzte Weg über Tosylierung, Substitution des Sulfonatrests mit Azid und Reduktion mit Triphenylphosphin nach *Staudinger* (Kap. 6.3) kam hier erneut zur Anwendung. Wiederum wurde Allyl-GlcNAc (**46**) als Edukt eingesetzt, außerdem wurde das entsprechende Benzyl-Derivat²⁶⁵ hergestellt. Die Benzylgruppe bietet in der folgenden reduktiven Aminierung mit dem AllylLacNAc-Derivat nicht nur den Vorteil einer leichten Verfolgbarkeit der Reaktion mittels DC und UV-Detektion, sondern verspricht auch eine bessere Auswertung des NMR-Spektrums, da sich die beiden GlcNAc-Bausteine des Trisaccharids dann stärker unterscheiden.

Die ersten Reaktionsschritte sind für beide Edukte literaturbeschrieben.^{85,266} Abgesehen von der Tosylierung, in der sich, wie auch zuvor beobachtet, nicht alles Edukt umsetzte, verlief die Reaktionssequenz in beiden Fällen sehr zufriedenstellend. Die Amino-funktionalisierten Produkte **140** und **141** standen nach säulenchromatographischer Reinigung in EE/MeOH 1:9 + 3 % Py für einen weiteren Einsatz zur Verfügung.

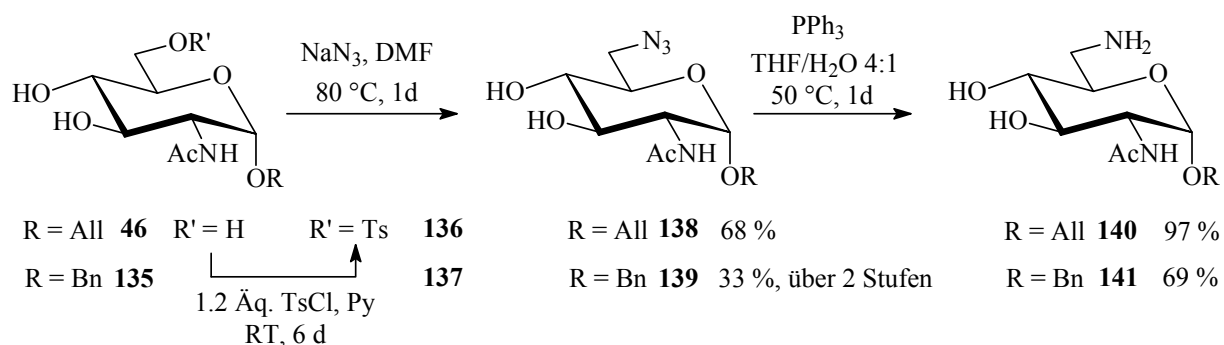


Abb. 70 Darstellung 6-Amino-substituierter Monosaccharide

9.2 Testums\u00e4tze mit einem Modell-Aldehyd

Die in der Literatur (s. Kap. 3.2) beschriebenen Reaktionsbedingungen f\u00fcr eine reduktive Aminierung am Kohlenhydrat sind ausgesprochen vielf\u00e4ltig. Zumeist wird Methanol als L\u00f6sungsmittel verwendet, doch gerade mit ungesch\u00fctzten Zucker-Strukturen wird die Reaktion auch h\u00e4ufig in Wasser bzw. Puffer und manchmal in Acetonitril ausgef\u00fchrt. Da das Gleichgewicht der Iminiumion-Bildung (Abb. 11) an sich schon auf Seiten der Edukte liegt, ist es prinzipiell g\u00fcnstiger, in wasserfreien Systemen zu arbeiten. Oftmals werden dem Ansatz sogar wasserbindende Zus\u00e4tze wie Molsieb oder Alox beigelegt, um die Ausbeute der Reaktion zu erh\u00f6hen.⁷³ Diese Vorgehensweise ist hier jedoch nicht m\u00f6glich, da sich das Aldehyd-substituierte Disaccharid **109** nur in w\u00e4ssrigen Systemen l\u00f6st.

In der eigenen Diplomarbeit und aufbauenden Arbeiten wurde das oxidierte *p*NP-Gal-Monosaccharid **36** mit verschiedenen Aminos\u00e4uren erfolgreich im w\u00e4ssrigen Puffersystem zur Reaktion gebracht. Die Ausbeuten der so gewonnenen Kohlenhydrat-Aminos\u00e4ure-Konjugate lagen bei 20 bis 40 %. Um nun zu pr\u00fcfen, ob eine Steigerung des Umsatzes durch Zugabe von Acetonitril zum L\u00f6sungsmittel erreicht werden kann, wurde das 2-Aminoethylglucosid **132** mit *p*NP- β -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranosid (**36**) in Puffer/Acetonitril 1:1 bei pH 7.0 und Raumtemperatur mit 2 \u00c4quivalenten Natriumcyanoborhydrid umgesetzt. Nach zwei Tagen Reaktion konnte ein neuer verkohlbarer und mit Ninhydrin detektierbarer Spot auf dem DC beobachtet werden. Nach Isolierung der Verbindung mittels Gelpermeationschromatographie an Biogel P2, anschlie\u00dfender NMR- und massenspektroskopischer Untersuchung wurde festgestellt, dass es sich bei dem Produkt nicht um das Disaccharid, sondern um das Amidin (**142**) aus Aminoverbindung **132** und Acetonitril handelte (Abb. 71). Somit erwies sich Acetonitril als L\u00f6sungsmittel ungeeignet.

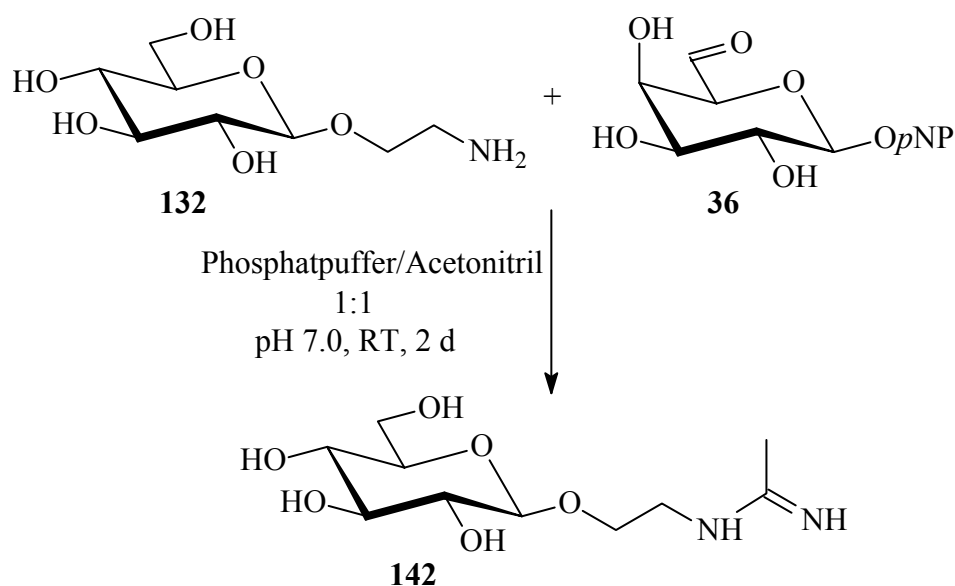


Abb. 71 Synthese eines Amidins unter den Bedingungen der reduktiven Aminierung in Acetonitril

In Versuchen mit 2-Amino-2-desoxy-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosid (**124**) konnte zwar eine Umsetzung mittels DC festgestellt werden, eine Isolierung der entstandenen Verbindungen gelang jedoch nicht. Geeignete Reaktionsbedingungen und die generelle Tauglichkeit der dargestellten Aminozucker für die Reaktion in einer reduktiven Aminierung wurden dann anhand eines einfachen Modell-Aldehyds, der aus der Synthese des Precursor-funktionalisierten Glycosyldonors zur Verfügung stehenden 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden-α-D-*galacto*-hexodialdo-1,5-pyranose (**61**), überprüft.

Erfolgreiche Synthesen erfolgten ähnlich einer Vorschrift von *Wong et al.*⁸⁵ in Methanol, in dem der Aldehyd gelöst und mit 3 Äquivalenten Amin, gelöst in Methanol, versetzt wurde. Mit einer methanolischen Essigsäure- bzw. Triethylamin-Lösung wurde die Lösung auf pH 6 eingestellt, bevor 1 Äquivalent Natriumcyanoborhydrid als 0.3 M methanolische Lösung zugegeben wurde. Die drei 2-Amino-substituierten Zucker blieben unter diesen Bedingungen ungelöst, so dass in diesen Fällen wenig Wasser bis zur Lösung zugefügt wurde. Der Ansatz wurde zumeist über Nacht rühren gelassen und je nach Fortschritt der Reaktion dann nochmals mit Natriumcyanoborhydrid versetzt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Einengen und säulenchromatographische Reinigung. In allen Fällen gelang die Isolation des gewünschten Zucker-Zucker-Konjugats (Abb. 72). Zusätzlich konnte meistens das Auftreten eines zweiten, ebenfalls verkohlbaren und Ninhydrin-aktiven Spots, der zu einer unpolaren Verbindung gehörte, beobachtet werden. Mittels ¹H-, ¹³C-NMR, HMQC, HMBC und FAB oder MALDI-Tof gelang die Identifikation der Spezies als Cyano-Addukt.

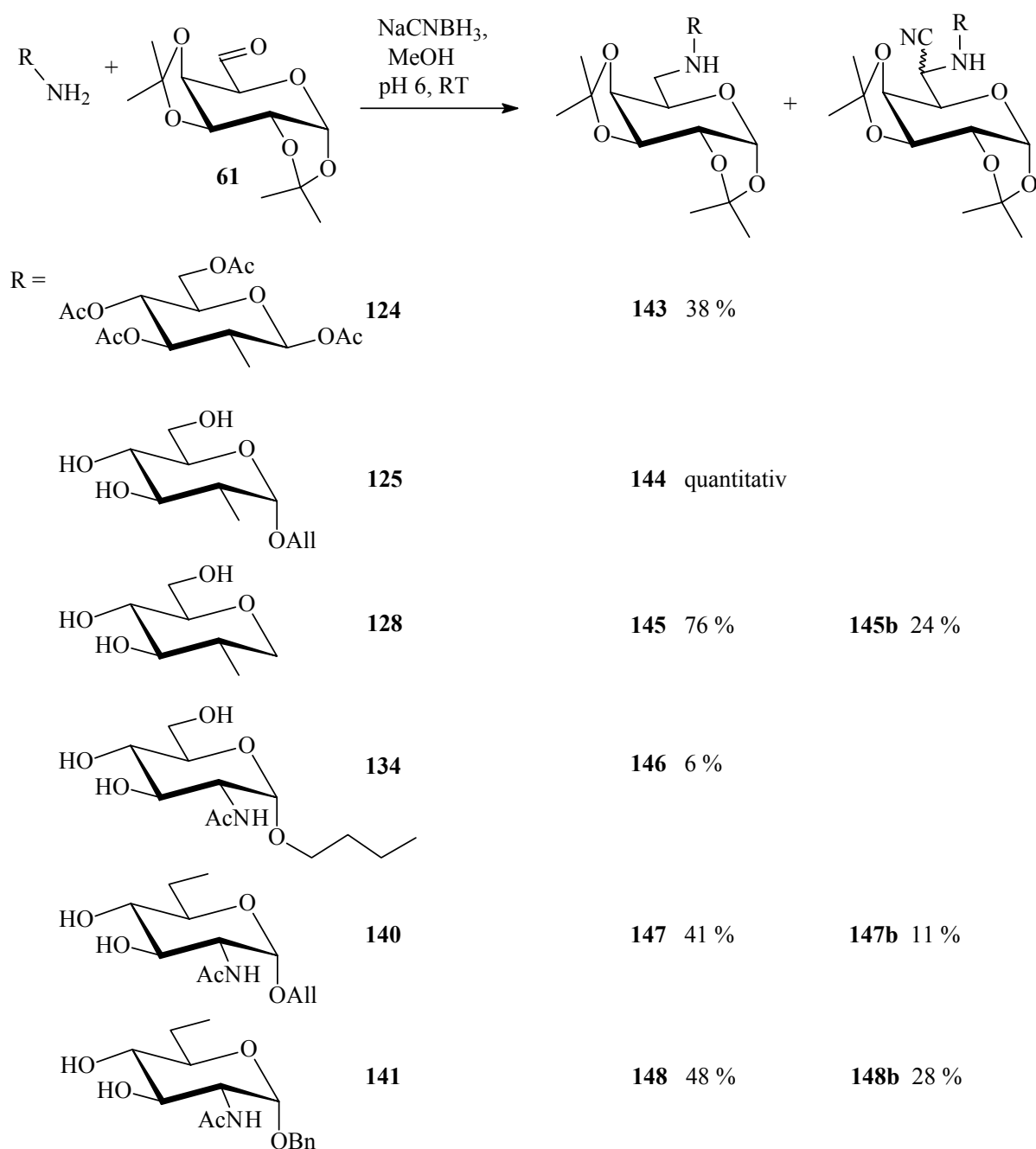


Abb. 72 Reduktive Aminierung mit den synthetisierten Aminosuktern und Aldehyd 61

9.3 Reduktive Aminierungen mit dem Aldehyd-funktionalisierten Disaccharid

Die Umsetzungen mit dem C-6'-oxidierten Disaccharid **109** wurden analog mit zweien der Aminosucker, **128** und **141**, sowie zwei Aminosäuren, β -Alanin und Taurin, erfolgreich durchgeführt. Da sich das LacNAc-Derivat selbst nicht in Methanol löste, war in allen Fällen

eine Zugabe von Wasser nötig. Die Reaktionen mit den Aminosäuren wurden in reinem Wasser durchgeführt.

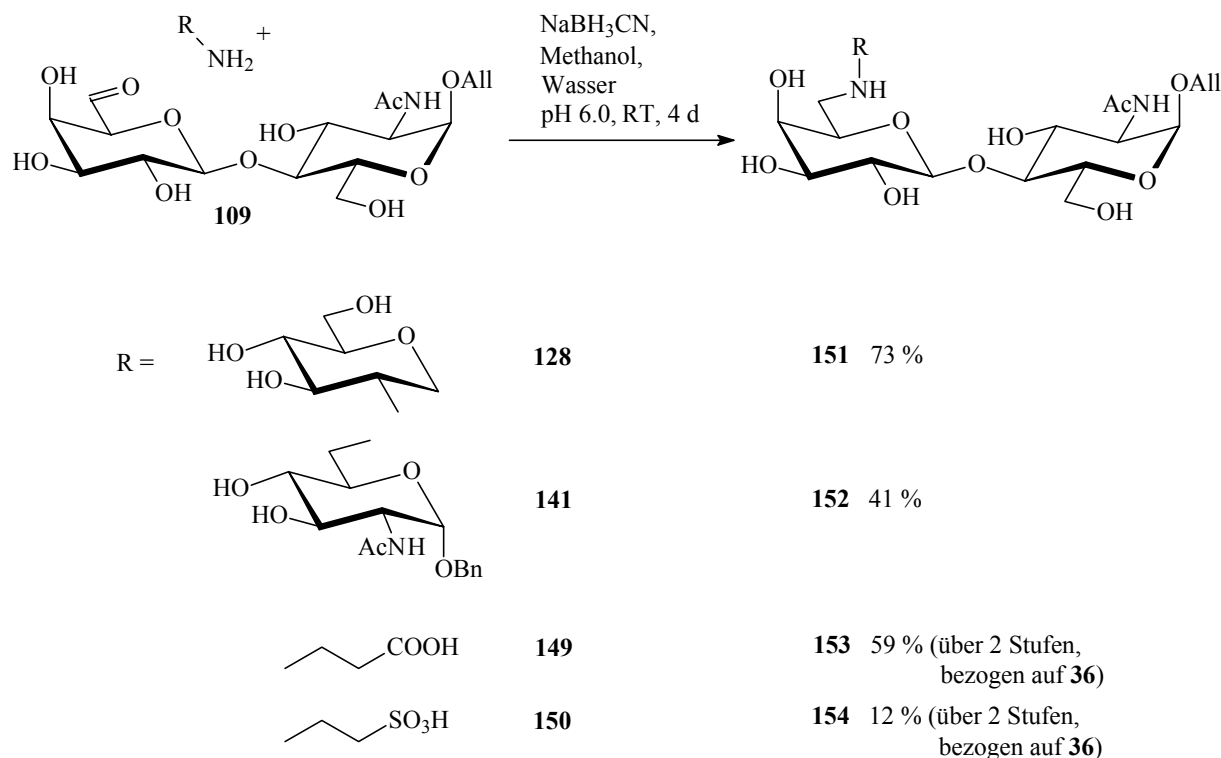


Abb. 73 Reduktive Aminierung des Disaccharids **109** zu den Zielverbindungen **151-154**

Interessanterweise war hier das Auftreten von Nebenprodukten nur in Spuren festzustellen, wobei deren geringe Menge eine saubere Isolation und somit Identifikation nicht zuließ.

Die Reaktionszeit verlängerte sich bei diesen Umsetzungen auf 4 Tage. Die Zugabe einer größeren Menge Natriumcyanoborhydrid zeigte bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit keine Auswirkungen, eine beachtliche Beschleunigung der Produkt-Bildung konnte jedoch am Beispiel des Aminoglycosids **141** durch Erhitzen auf 100 °C und gleichzeitiges Bestrahlen mit Mikrowellen erzielt werden. Bereits nach 5 Minuten war der Edukt-Aldehyd nicht mehr detektierbar, zudem schienen sich auch weniger Nebenprodukte gebildet zu haben.

Somit ist die Darstellung der Zielverbindungen **151**, **152**, **153** und **154** in nur drei Schritten, über Galactose-Oxidase-katalysierte Oxidation, β -Galactosidase-katalysierte Glycosylierung und reduktive Aminierung, in 10 bis 52 %iger Gesamtausbeute gelungen. Die vorgestellte Methode präsentiert demnach einen schnellen und effizienten Zugang zu den gewünschten Glycomimetika.

10 Zusammenfassung

Natürliche Killerzellen stellen eine spezielle Klasse von Lymphocyten zur Verteidigung des Körpers gegen virusinfizierte oder auch maligne körpereigene Zellen dar. Nach enger Bindung an die Zielzelle, welche mittels eines C-Lectin-artigen Rezeptorproteins auf Seiten der Killerzelle und bestimmter Kohlenhydratstrukturen auf Seiten der schadhafte Zelle erfolgt, verursachen sie die Lyse letzterer. Doch können nicht alle entarteten Zellen so beseitigt werden – einige Tumorzellen erweisen sich als resistent gegenüber NK-Zellen, was darauf zurückgeführt werden kann, dass sie auf ihrer Oberfläche keine Strukturen präsentieren, die als Liganden für das die Anbindung vermittelnde Rezeptorprotein, NKR-P1, fungieren. Eingehendere Erforschungen der Bindung zwischen Tumor- und NK-Zelle mit dem Ziel, die molekularen Mechanismen der NK-Zellen-Aktivität genügend genau zu verstehen, um das gewonnene Wissen für gezielte Anti-Tumor und antivirale Immuntherapien einsetzen zu können, wurden möglich, nachdem es Bezouška und Mitarbeitern gelungen ist, eine lösliche Form von NKR-P1 zu klonieren und in *E. coli* zu exprimieren. Mittels dieses Proteins konnten verschiedene Kohlenhydratstrukturen auf ihr Vermögen, an NKR-P1 zu binden und NK-Zellen zu aktivieren, *in vitro* untersucht werden. Di- bis Tetrasaccharide mit anionischen Funktionalitäten in Form von Sulfat- oder Carboxylatgruppen oder auch Neuraminsäureresten und auch neutrale kleine Oligosaccharide, die aus 2-Acetamidozuckern aufgebaut sind, haben sich als gute Liganden erwiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode ausgearbeitet werden, die eine einfache Synthese mit schnellem Zugang zu solchen Strukturen bietet, die die genannten Merkmale in sich vereinen und darüber hinaus stabiler gegenüber einem Glycosidase-vermittelten Verdau sind. Hierzu sollten Glycomimetika mit *N*-Acetyllactosamin-Grundstruktur synthetisiert werden, die an C-6' eine anionische Funktionalität oder ein unnatürlich verknüpftes drittes Monosaccharid tragen. Die Darstellung des Disaccharids sollte enzymatisch-katalysiert und die Einführung des Substituenten an C-6' mittels reduktiver Aminierung erfolgen, wobei der Untersuchung des die Glycosylierung katalysierenden Enzyms besondere Aufmerksamkeit gelten sollte.

Zum Aufbau des LacNAc-Grundgerüsts wurde β -Galactosidase aus *B. circulans* eingesetzt, eine Hydrolase, die außergewöhnlich gute Transgalactosylierungseigenschaften aufweist. So

findet der Galactosyltransfer mit hohen Ausbeuten und nahezu ausschließlich an Position 4 des Glycosylakzeptors statt.

Neben der Galactosylierung zum Disaccharid setzt sich die hier ausgeführte Synthese der Glycomimetika aus Einführung einer Amino- oder Aldehyd-Funktionalität an C-6 des Galactosylrests und reduktiver Aminierung zusammen. Eine Kombination der Syntheseschritte in verschiedener Reihenfolge wurde untersucht. In diesem Zusammenhang wurden mehrere neue Donoren für die β -Galactosidase aus *B. circulans* synthetisiert und auf ihre Eignung als Substrat geprüft. *p*NP- β -D-Galactopyranoside mit Aldehyd-Precursorfunktionalität in Form eines C-Methylen- (**56**) und eines O-Allyl-Substituenten (**57**), mit Amin-Precursorfunktionalität in Form eines O-Mesyl- (**96**) und eines C-Azid-Substituenten (**97**), mit Aldehyd- (**36**) und mit Amin-Funktionalität (**98**) wurden dargestellt. Die Synthese erfolgte ausgehend von D-Galactose über Derivatisierung an C-6 und Glycosylierung von *para*-Nitrophenol, für die sich die Trichloracetimidat-Methode als erfolgreich erwies, oder ausgehend von *p*NP- β -D-Galactopyranosid (**45**) durch selektive Substitution bzw. Oxidation der primären Alkoholfunktion, für deren Ausführungen verschiedene Varianten erprobt wurden. Am erfolgreichsten hinsichtlich Schnelligkeit und Ausbeute erwies sich der Weg über eine vollständige Derivatisierung des Monosaccharids, vollzogen als Galactose-Oxidase-katalysierte Oxidation von **45** zu **36**, die nahezu quantitativ das Produkt erbrachte, mit folgender β -Galactosidase-katalysierter Glycosylierung zum Aldehyd-funktionalisierten *N*-Acetyllactosaminid **109**, das so in etwa 70 %iger Ausbeute erhalten wurde.

Dabei zeigte sich die Fähigkeit der β -Galactosidase zur Umsetzung derivatisierter Monosaccharide nicht auf das oxidierte Monosaccharid **36** beschränkt, vielmehr konnte eine außergewöhnlich große Toleranz des Enzyms gegenüber einer Veränderung an C-6 des Glycosyldonors festgestellt werden – die Strukturen **56**, **36** und **98** wurden erfolgreich in Transglycosylierungen mit den Glycosylakzeptoren Allyl- α -D-*N*-acetylglucosaminid (**46**) und *N*-Acetylglucose (**23**) zur Reaktion gebracht. Desgleichen konnten mit *p*NP- β -D-Fucopyranosid (**100**) und *p*NP- α -L-Arabinopyranosid (**101**) die entsprechenden Disaccharide **102** bis **105** durch Anwendung der chemo-enzymatischen Glycosylierungstechnik gebildet werden.

Über die präparative Nutzung hinaus wurden die neuen Donoren enzymkinetisch untersucht. Bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit zeigte sich das underivatisierte Galactosid **45** den anderen deutlich überlegen. Während der Aldehyd **36** etwa siebenmal weniger schnell hydrolysiert wurde als *p*NP-Gal **45**, reagierten die übrigen Monosaccharide noch langsamer. Die Michaelis-Konstanten lagen dagegen in der gleichen Größenordnung.

Zur reduktiven Aminierung des Aldehyd-funktionalisierten LacNAc-Derivats **109** wurden verschiedene Amino-substituierte Glycoside synthetisiert. Ausgehend von Glucosamin bzw. *N*-Acetylglucosamin wurde nach Blockierung oder auch Entfernung der Lactolgruppe entweder die natürliche Aminofunktion an C-2 freigesetzt (**124**, **125** und **128**) oder eine Aminogruppe durch Substitution an C-6 (**140** und **141**) oder Derivatisierung der Schutzgruppe an C-1 (**132** und **134**) neu eingeführt. Geeignete Reaktionsbedingungen für eine reduktive Aminierung mit den dargestellten Aminosukzern konnten in Umsetzungen mit einem einfachen Modell-Aldehyd (**61**) ermittelt werden. Gute Ausbeuten wurden in wässrig/methanolischer Lösung mit 3 Äquivalenten Amin und 0.5 Äquivalenten Natriumcyano-borhydrid (bezogen auf den Aldehyd) sowie einem pH-Wert von 6 erhalten. Durch reduktive Aminierung von **109** mit den Aminosukzern **128** und **141** gelang die Darstellung der neuen Trisaccharid-Mimetika **151** (73 %) und **152** (41 %), durch Reaktion von **109** mit β -Alanin und Taurin konnten die neuen säurefunktionalisierten Disaccharide **153** und **154** erhalten werden.

Die Darstellung der Zielverbindungen **151**, **152**, **153** und **154** ist somit in nur drei Schritten, über Galactose-Oxidase-katalysierte Oxidation, β -Galactosidase-katalysierte Glycosylierung und reduktive Aminierung, in bis zu 52 %iger Gesamtausbeute gelungen, sodass der angestrebte schnelle und effiziente Zugang zu den gewünschten Glycomimetika mittels dieser Reaktionsfolge erreicht wurde.

Summary

Natural killer cells represent a distinct class of lymphocytes which are involved in viral immunity and in defense against tumors. Tight binding of the NK-cell to the target cell which is achieved by a C-lectin-like receptor protein on the surface of the killer cell and certain carbohydrate structures on the surface of the infected cell, follows lysis of the latter. However, some tumor cells proved to be resistant to NK-cytotoxicity due to the lack of cell surface structures representing ligands for NKR-P1. More detailed investigations of the binding between tumor and NK-cell were possible after Bezouška and co-workers succeeded in cloning a soluble form of NKR-P1 and expressing it in *E. coli*. The aim of these investigations is to understand molecular mechanisms regulating the biological activities of NK-cells in sufficient detail to use the knowledge in a targeted manner in anti-tumor and anti-viral immunotherapies. Using the soluble NKR-P1 the binding affinities and activation effects of various carbohydrate structures could be tested. Di- to tetrasaccharides carrying anionic functionalities such as sulfate, carboxylate or neuramic acid residues proved to be good ligands as well as small neutral oligosaccharides consisting of 2-acetamidoglycosyl moieties.

The aim of this work was to develop a method, which allows a simple synthesis and rapid access to such structures combining the mentioned features and possessing a higher stability against glycosidase-mediated metabolism. Therefore glycomimetics based on *N*-acetylglucosamine and carrying an anionic substituent or an unnaturally linked monosaccharide residue at C-6' were synthesized and the disaccharide could be constructed applying chemo-enzymatic methods. Introduction of the C-6'-substituent could be accomplished by reductive amination. A closer investigation of the enzyme employed to catalyse the glycosylation was of special interest.

Synthesis of the basic LacNAc-like disaccharide structures was achieved using β -galactosidase from *Bacillus circulans*, which shows extraordinary transgalactosylation activity and catalyses the formation of β 1 $\rightarrow$ 4 linkages to the glycosyl acceptor nearly exclusively and in high yields.

Synthesis of the glycomimetics was carried out by introduction of an amino- or an aldehyde-functionality at C-6 of the galactoside residues including reductive amination, in addition to the galactosylation step. These reaction steps were studied in altered sequence. In this context

several novel donor structures for the β -galactosidase from *B. circulans* were prepared and tested as substrates. *p*NP β -D-galactopyranosides bearing an aldehyde-precursor functionality as *C*-methylen- (**56**) and as *O*-allyl-substituent (**57**), an amine-precursor functionality as *O*-mesyl- (**96**) and as *C*-azide-substituent (**97**), an aldehyde- (**36**) and an amine-functionality (**98**) were synthesized. This was achieved starting from either D-galactose, which was derivatized at C-6 and used for glycosylation of *para*-nitrophenol applying the trichloroacetimidate method or starting from *p*NP β -D-galactosidase by selective substitution or oxidation of its primary alcohol functionality. For oxidation various methods were attended and utilized. The most successful synthetic pathway proved to be the galactose-oxidase catalysed oxidation of the monosaccharide **45** to give **36**, in nearly quantitative yield. This was followed by β -galactosidase catalysed glycosylation to give the aldehyde-substituted *N*-acetylglucosaminide **109** in 70 % yield.

The galactosidase proved to transfer derivatized monosaccharides others than the oxidized galactoside **36**. It revealed an extraordinary tolerance with respect to a C-6 modification of the galactosyl donor and thus modified structures such as **56**, **36** and **98** could be reacted successfully with allyl α -D-*N*-acetylglucosaminide (**46**) as well as *N*-acetylglucose (**23**). Transglycosylation with *p*NP β -D-fucopyranoside (**100**) and *p*NP α -L-arabinopyranoside (**101**) led to the corresponding disaccharides **102** to **105**.

In addition to a synthetic use the novel donor structures were analysed applying enzyme-kinetics. The non-derivatized galactoside **45** showed the highest hydrolysis rate, whereas the aldehyde **36** was transformed seven times slower and the other monosaccharide derivatives even much slower. The Michaelis-constants were determined to be of the same magnitude.

For reductive amination of the aldehyde functionalized LacNAc derivative **109** various amino-substituted glycosides were synthesized. After protection or removal of the lactol group in glucosamine or *N*-acetylglucosamine the natural aminogroup at C-2 was regenerated (**124**, **125** and **128**). Alternatively, an aminogroup was introduced by substitution at C-6 to lead to compounds **140** and **141** or by derivatization of the protecting group at C-1 to give structures **132** and **134**. Appropriate reaction conditions for a reductive amination with the synthesized aminosugars could be established after tests with a simple aldehyde (**61**). High yields were achieved in an aqueous/methanolic solution with 3 equivalents of amine and 0.5 equivalents of sodium cyanoborohydride at pH 6. Reductive amination of **109** with aminosugars **128** and **141** furnished the novel trisaccharide mimetics **151** (73 %) and **152** (41 %). Reaction of **109** with β -alanine or taurine led to the novel acid-functionalized disaccharides **153** and **154**.

Thus, successful synthesis of the target compounds **151-154** could be managed in only three reaction steps, via galactose-oxidase catalysed oxidation, β -galactosidase catalysed glycosylation and reductive amination. The products were obtained in an overall yield up to 52 %. Thus, this reaction sequence provides rapid and efficient access to the desired glycomimetics.

11 Experimenteller Teil

11.1 Allgemeine Arbeitsmethoden

Dünnschichtchromatographie

Alle Reaktionen wurden dünnenschichtchromatographisch auf Kieselgelfolie (Merck DC-Alufolien 60 F₂₅₄) verfolgt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Absorption sowie durch Besprühen mit 10 %iger ethanolischer Schwefelsäure und anschließender Wärmebehandlung. Aldehyde wurden außerdem durch Besprühen mit einer 0.2 %igen Lösung aus 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 0.2 M Salzsäure, aminofunktionalisierte Verbindungen durch Eintauchen in eine 0.2 M ethanolische Ninhydrinlösung und bromhaltige Verbindungen mit Hilfe zweier Tauchbäder aus Wasserstoffperoxid/Essigsäure (1:1) und Fluorescein/Ethanol/Wasser (2:1:1) sichtbar gemacht.

Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Trennungen wurden nach dem Flash-Verfahren mit leichtem Stickstoffüberdruck an Kieselgel (230-400 mesh, Korngröße 0.040-0.063 mm, Merck) durchgeführt.

Gelpermeationschromatographie wurde an Biogel P2, Biogel P4 oder Sephadex G15 mit bidestilliertem Wasser als Laufmittel durchgeführt.

NMR-Spektroskopie

Alle dargestellten Verbindungen wurden mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie an den Bruker Spektrometern AMX-400 (100 MHz bei ¹³C) und DRX-500 (125 MHz bei ¹³C) charakterisiert. Die genaue Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von ¹H¹³C-COSY oder HMQC und gegebenenfalls ¹H¹H-COSY-, HMBC-, NOESY- und TOCSY-Experimenten.

Den Proben in Chloroform wurde Tetramethylsilan als interner Standard zugesetzt. Die Spektren wurden nach 1. Ordnung ausgewertet.

Massenspektren

MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem Bruker Biflex III aufgenommen. Gemessen wurde im Positive Reflektor Mode. Als Matrix wurde DHB verwendet.

FAB-Massenspektren wurden an einem VG Analytical 70-250S Massenspektrometer gemessen.

Schmelzpunktbestimmungen erfolgten an einem apotec-Schmelzpunktbestimmer.

Der optische Drehwert wurde mit einem Perkin-Elmer-Polarimeter 341 in 100 mm-Küvetten bei 20 °C ermittelt.

Elementaranalysen wurden in der Abteilung Zentrale Elementanalytik des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

LCMS

Die Trennung des Probengemisches wurde an einer eclipse XDB-C8 Säule, Durchmesser 5 µm, 4.6 x 150 mm, Hewlett Packard, mit einer consta Metrix 4100MS HPLC der Firma Thermo Separation Products mit einer Flussrate von 1ml/min durchgeführt. Die Detektion erfolgte über ein MS MAT 95 XL Massenspektrometer der Firma Thermo Quest Finnigan.

Die photometrischen Reaktionsverfolgungen zur Ermittlung enzymkinetischer Daten wurden an einem Lambda 20 Perkin Elmer UV/Vis Spektrometer durchgeführt.

Zur Einstellung des pH-Wertes von Puffer-Lösungen wurden die pH-Meter Metrohm 632 sowie Mettler Toledo MP 220 verwendet.

Wässrige Lösungen wurden an einer Lyovac GT 2 Lyophile der Firma Leybold, einer Christ Alpha 1-4 LD oder einer Christ Alpha 1-2 LD gefriergetrocknet.

11.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: β -Galactosidase-katalysierte Glycosylierung mit Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (**46**) als Akzeptor

100 μ mol des Glycosyldonors werden mit 261 mg (1 mmol, 10 Äq.) Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (**46**) in 1.4 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 und 1.4 ml Acetonitril gelöst. Dann werden 142 μ l (7 U) einer Lösung aus 10 mg β -Galactosidase aus *B. circulans* in 1 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 hinzugegeben. Der Ansatz wird 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Durch 5-minütiges Erhitzen auf 100 °C wird die Reaktion beendet. Das Lösungsmittel wird durch Gefriertrocknung entfernt und der Rückstand gelpermeationschromatographisch an Biogel P2 mit Wasser als Eluent gereinigt.

AAV 2: β -Galactosidase-katalysierte Glycosylierung mit 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose (**23**) als Akzeptor

150 μ mol des Glycosyldonors werden mit 300 mg (1.36 mmol, 9 Äq.) 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose (**23**) in 4 ml 50 mM Natriumacetatpuffer pH 5.0 bei 55 °C gelöst. Dann werden 80 μ l (4 U) einer Lösung aus 10 mg β -Galactosidase aus *B. circulans* in 1 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 hinzugegeben. Der Ansatz wird 3 Stunden bei 55 °C geschüttelt, die Lösung färbt sich während dieser Zeit leuchtend gelb. Durch 5-minütiges Erhitzen auf 100 °C wird die Reaktion beendet. Das Lösungsmittel wird durch Gefriertrocknung entfernt und der Rückstand gelpermeationschromatographisch an Biogel P2 mit Wasser als Eluent gereinigt.

AAV 3: Staudinger-Reduktion

1 mmol des Edukt-Azids werden in 45 ml THF/H₂O 4:1 gelöst und mit 0.36 g (1.36 mmol, 1.4 Äq.) Triphenylphosphin sowie etwa 1g Kieselgel versetzt. Der Ansatz wird bei 50 °C über Nacht gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch im jeweils angegebenen Laufmittel gereinigt.

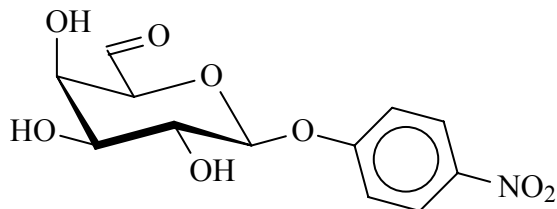
AAV 4: Reduktive Aminierung

0.15 mmol Aldehyd und 0.45 mmol (3 Äq.) Amin werden in 1 ml abs. Methanol verrührt. Falls in Methanol keine Lösung erreicht wird, wird tropfenweise Wasser zugefügt, bis sich die Edukte lösen. Der pH-Wert des Ansatzes wird dann mittels einer 1 M Lösung aus Eisessig

in Methanol bzw. einer 10 %igen Lösung aus Triethylamin in Methanol auf pH 6 eingestellt. Anschließend werden 0.2 bis 0.25 ml einer 0.3 M methanolischen Natriumcyanoborhydrid-Lösung zugegeben. Der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach der vollständigen Umsetzung des Aldehyds werden Methanol unter vermindertem Druck und Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. Das Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt.

11.3 Spezielle Arbeitsvorschriften

4-Nitrophenyl- β -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranosid (36)



$C_{12}H_{13}NO_8$
299.2 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 154 °C (Zersetzung)

$[\alpha]_D^{20} = -87^\circ$ (c = 0.15 g/100 ml, H₂O)

$R_F = 0.29$ (DCM/MeOH 7:1)

Ausbeute:

1) 47 % , 2) 98 % , 3) 32 % , 4) 14 %

Lit. (2)¹⁴³: 77 % (keine Charakterisierung)

1. Darstellung mittels Ozonolyse

Unter Argonatmosphäre werden 300 mg (1.01 mmol) 4-Nitrophenyl-6,7-didesoxy- β -D-galacto-hept-6-enopyranosid (**56**) und 128 mg Natriumhydrogencarbonat in 6 ml abs. Dichlormethan/abs. Methanol 5:1 verrührt und auf -50 °C gekühlt. Anschließend wird so lange Ozon eingeleitet, bis die Reaktionslösung eine blaue Farbe annimmt (2 ½ h). Überschüssiges Ozon wird durch Einleiten eines Argonstroms vertrieben, dann werden 291 mg Triphenylphosphin zugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur gerührt, bis keine Peroxide mehr nachgewiesen werden können (36 h). Das Reaktionsgemisch wird eingeeengt und das Produkt säulenchromatographisch (DCM/MeOH 9:1) von Nebenprodukten befreit. 143 mg (0.48 mmol, 47 %) 4-Nitrophenyl- β -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranosid können isoliert werden.

2. Darstellung mittels Galactose-Oxidase katalysierter Oxidation

303 mg (1.01 mmol) *p*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid werden mit 10 μ l einer 500 mM Kupfersulfatlösung in 14 ml Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 gelöst. Nach Zugabe von 90 μ l (3120 U) Catalase und 90 μ l (90 U) Galactose-Oxidase wird der Ansatz in einer Sauerstoffatmosphäre 1 Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird dann durch Zugabe von 4 ml Methanol abgebrochen. Methanol wird am Rotationsverdampfer abdestilliert, die restliche wässrige Lösung wird gefriergetrocknet. Es werden 580 mg eines hellgelben Pulvers erhalten, das das Produkt und Salze etwa im Verhältnis 1:1 enthält und ohne Reinigung direkt weiter eingesetzt werden kann. Zur Bestimmung der Ausbeute werden 102 mg des Rohprodukts durch Filtration über Kieselgel (LM DCM/MeOH 10:1) von Salzen

befreit. Es werden 55 mg (0.17 mmol, 98 %) leicht gelblicher Feststoff erhalten, der 4-Nitrophenyl- β -D-*galacto*-hexodialdo-1,5-pyranosid-hydrat sowie sehr geringe Mengen an Nebenprodukt enthält.

3. Darstellung mittels Dess-Martin-Oxidation

60 mg (0.14 mmol) Dess-Martin-Periodinan werden in 0.6 ml Dichlormethan gelöst und mit einer Lösung aus 38 mg (0.13 mmol) *p*NP-Gal in 0.5 ml Acetonitril versetzt. Nach 2 ½ h Rühren bei Raumtemperatur werden 4 ml Dichlormethan und Wasser zugegeben. Die Phasen werden getrennt, die wässrige Phase wird filtriert und mit 1.3 M Natronlauge neutralisiert. Nach destillativer Entfernung des Wassers wird der Rückstand in Dichlormethan/Methanol 10:1 säulenchromatographisch an Kieselgel getrennt. Es werden 12 mg (0.04 mmol, 32 %) **36** erhalten.

4. Darstellung mittels TEMPO-Oxidation

58 mg (0.19 mmol) *p*NP-Gal und 12 mg Kaliumbromid werden in 3 ml Wasser verrührt, im Eisbad gekühlt, mit 25.4 μ l einer mittels konzentrierter Salzsäure auf pH 10 eingestellten 13 %igen Natriumhypochlorit-Lösung sowie einer Spatelspitze TEMPO versetzt und im Eisbad gerührt. Der pH-Wert wird während der Reaktion kontrolliert und mittels verdünnter Natriumhydroxidlösung bei pH 10 gehalten. Nach 3 ½ h wird die Reaktionslösung mittels verdünnter Salzsäure neutralisiert und dann gefriergetrocknet. Das Produkt wird säulenchromatographisch (LM DCM/MeOH 20:1, dann 10:1) von unumgesetzten Edukt getrennt. Es werden 8 mg (0.03 mmol, 14 %) **36** erhalten.

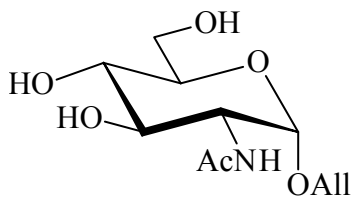
¹H-NMR (400 MHz, D₂O)

δ = 8.24 (m, 2H, *p*NP), 7.22 (m, 2H, *p*NP), 5.16 (d, 1H, H-1), 5.11 (d, 1H, H-6), 4.14 (d, 1H, H-4), 3.85 (dd, 1H, H-2), 3.75 (dd, 1H, H-3), 3.61 (d, 1H, H-5) ppm.

$J_{1,2} = 7.9$, $J_{2,3} = 9.2$, $J_{3,4} = 3.3$, $J_{5,6} = 7.4$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O)

δ = 142.96 (C-*p*NP), 126.49 (CH-*p*NP), 116.87 (CH-*p*NP), 100.52 (C-1), 88.46 (C-6), 77.66 (C-5), 72.77 (C-3), 70.58 (C-2), 68.43 (C-4) ppm.

Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (46)

261.27 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 167 °C, Lit.¹⁴⁵: 172-174 °C $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 118^\circ$ (c = 0.56 g/100ml, MeOH),Lit.¹⁴⁵: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 148.8^\circ$ (c = 1.62 g/100ml, H₂O) R_{F} = (DCM/MeOH 5:1)

Ausbeute: 93 %

12.38 g (55.97 mmol) 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose (**23**) werden in 230 ml Allylalkohol (3.37 mol) suspendiert und mit 3.3 ml Bortrifluoridethyletherat versetzt. Anschließend wird auf 110 °C erhitzt und 2.5 h unter Rückfluss gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle) wird die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt und mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Nach dem Einengen wird das Produkt säulenchromatographisch mit dem Laufmittelgemisch Dichlormethan/Methanol (12:1) von den Nebenprodukten getrennt. 13.61 g (52.15 mmol, 93 %) Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid können isoliert werden.

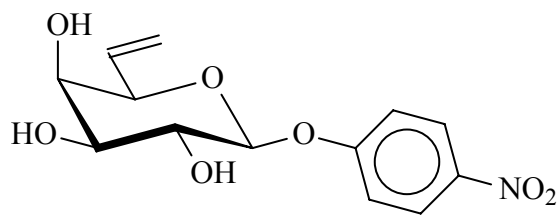
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)

δ = 5.90 (dddd, 1H, CH-All), 5.30 (d, 1H, =CH₂-All), 5.16 (d, 1H, =CH₂-All), 4.83 (d, 1H, H-1), 4.20 (dd, 1H, -CH₂-All), 4.00 (dd, 1H, -CH₂-All), 3.90 (dd, 1H, H-2), 3.82 (dd, 1H, H-6a), 3.70 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.59 (ddd, 1H, H-5), 3.32 (m, 1H, H-4), 1.98 (s, 3H, Ac) ppm.

$J_{1,2} = 3.3$, $J_{2,3} = 10.7$, $J_{4,5} = 9.8$, $J_{5,6a} = 2.0$, $J_{5,6a} = 5.6$, $J_{6a,6b} = 11.7$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{c}} = 10.4$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{t}} = 17.3$, $J_{\text{CH-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 5.1$, $J_{\text{CH-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 6.1$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 13.3$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD)

δ = 174.10 (CO-Ac), 135.95 (CH-All), 117.90 (=CH₂-All), 98.12 (C-1), 74.34 (C-5), 73.19 (C-4), 72.82 (C-3), 69.56 (-CH₂-All), 63.14 (C-6), 55.82 (C-2), 21.71 (CH₃-Ac) ppm.

4-Nitrophenyl-6,7-didesoxy- β -D-galacto-hept-6-enopyranosid (56)

297.2 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 174-178 °C (Zersetzung), Lit.²⁴⁸: 173 °C $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -95^\circ$ (c = 0.20 g/100 ml, CH₃OH),Lit.²⁴⁸: keine Angabe $R_F = 0.41$ (DCM/MeOH 7:1), 0.10 (PE/EE 1:2)

Ausbeute: quantitativ

Zu einer Suspension aus 535 mg (1.26 mmol) 4-Nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6,7-dideoxy- β -D-galacto-hept-6-enopyranosid (**76**) in 3.3 ml Methanol wird eine Lösung aus 0.38 ml 25 %iger Ammoniaklösung in 1.1 ml Methanol gegeben. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur werden die gebildete Lösung bis zur Trockne eingeeengt und der erhaltene weiße Feststoff im Vakuum getrocknet. Es werden 375 mg (1.26 mmol) 4-Nitrophenyl-6,7-dideoxy- β -D-galacto-hept-6-enopyranosid gewonnen.

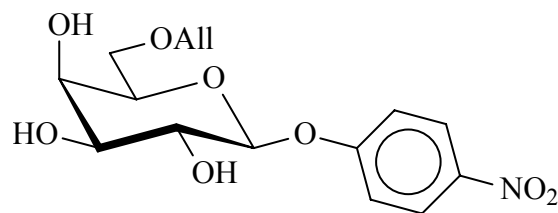
FAB (*m*-Nitrobenzylalkohol): 298.2 ($\text{M} + \text{H}^+$)¹H-NMR (500 MHz, MeOD)

$\delta = 8.24$ (m, 2H, *p*NP), 7.25 (m, 2H, *p*NP), 6.00 (ddd, 1H, H-6), 5.39 (ddd, 1H, H-7_t), 5.26 (ddd, 1H, H-7_c), 5.11 (d, 1H, H-1), 4.32 (dd, 1H, H-5), 3.90-3.87 (m, 2H, H-2, H-4), 3.68 (dd, 1H, H-3) ppm.

$J_{1,2} = 7.6$, $J_{2,3} = 9.8$, $J_{3,4} = 3.5$, $J_{4,5} = 1.0$, $J_{5,6} = 5.4$, $J_{6,7c} = 10.7$, $J_{6,7t} = 17.0$, $J_{7c,7t} = 1.3$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD)

$\delta = 162.83$ (C-*p*NP), 142.76 (C-*p*NP), 134.46 (C-6), 125.49 (CH-*p*NP), 116.55 (CH-*p*NP), 116.47 (C-7), 100.94 (C-1), 76.17 (C-5), 73.59 (C-3), 71.55, 70.66 (C-2, C-4) ppm.

4-Nitrophenyl-6-*O*-allyl- β -D-galactopyranosid (57)

341.30 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 149 °C

 $[\alpha]_D^{20} = -94^\circ$ (c = 0.175 g/100 ml, MeOH) $R_F = 0.44$ (DCM/MeOH 6:1)

Ausbeute: 37 %

ber.: C 52.78 H 5.61 N 4.10

gef.: C 52.62 H 5.64 N 3.89

222 mg (0.47 mmol) 4-Nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-allyl- β -D-galactopyranosid (**71**) werden in 1.2 ml Methanol verrührt und mit einer Lösung aus 140 μ l 25 %iger Ammoniak-Lösung in 400 μ l Methanol versetzt. Der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, dann eingengt und der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel (LM DCM/MeOH 10:1) gereinigt. Es werden 60 mg (0.18 mmol, 37 %) 4-Nitrophenyl-6-*O*-allyl- β -D-galactopyranosid sauber erhalten.

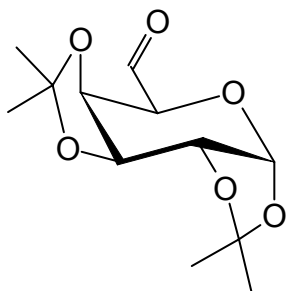
FAB (*m*-Nitrobenzylalkohol): 342.2 ($M + H^+$) ^1H -NMR (400 MHz, MeOD)

$\delta = 8.43$ (d, 2H, *p*NP), 7.47 (d, 2H, *p*NP), 6.14 (dddd, 1H, CH-All), 5.51 (dd, 1H, =CH₂-All), 5.39 (dd, 1H, =CH₂-All), 5.25 (d, 1H, H-1), 4.29-4.25 (m, 2H, -CH₂-All), 4.17-4.11 (m, 2H, H-4, H-5), 4.06 (dd, 1H, H-2), 3.94 (dd, 1H, H-6a), 3.91 (dd, 1H, H-6b), 3.84 (dd, 1H, H-3) ppm.

$J_{1,2} = 7.6$, $J_{2,3} = 9.7$, $J_{3,4} = 3.3$, $J_{5,6a} = 4.8$, $J_{5,6b} = 3.3$, $J_{6a,6b} = 10.2$, $J_{\text{CH-All,=CH}_2\text{c}} = 10.4$, $J_{\text{CH-All,=CH}_2\text{t}} = 17.3$, $J_{\text{=CH}_2\text{c,=CH}_2\text{t}} = 1.8$, $J_{\text{CH}_2\text{-All,CH-All}} = 5.3$, $J_{\text{CH}_2\text{-All,CH-All}} = 6.6$ Hz.

 ^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD)

$\delta = 164.34$ (C-*p*NP), 142.76 (C-*p*NP), 136.48 (CH-All), 126.95 (CH-*p*NP), 118.18 (CH-*p*NP), 117.43 (=CH₂-All), 102.55 (C-1), 76.13 (C-4 oder C-5), 75.09 (C-3), 73.68 (-CH₂-All), 72.39 (C-2), 70.88 (C-6), 70.72 (C-4 oder C-5) ppm.

1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranose (61)

258.27 g/mol

gelbbrauner Sirup

 $R_F = 0.79$ (PE/EE 1:2)

Ausbeute: quantitativ, Rohprodukt

13.8 g (53.1 mmol) 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose¹⁶⁹ (**60**) werden unter Eiskühlung mit 40 ml (526.5 mmol, 10.7 äq.) DMSO und 15 ml Benzol versetzt und gerührt, bis eine homogene Lösung vorliegt. Dann werden 3 ml Pyridin, 1.3 ml konzentrierte Phosphorsäure und 31.0 g (150 mmol, 2.9 äq.) Dicyclohexylcarbodiimid hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 4.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 26.6 g (210 mmol) Oxalsäure, gelöst in 70 ml Methanol, abgebrochen. Nach Filtrieren wird das Reaktionsgemisch mit 50 ml gesättigter Natriumchloridlösung versetzt und einmal mit 50 ml, dann noch dreimal mit je 25 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden sechsmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen noch zweimal mit 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Während des Einengens fällt *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff aus, der abfiltriert werden muss. Es werden 13.7 g (53.0 mmol, 100 %) **61** erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

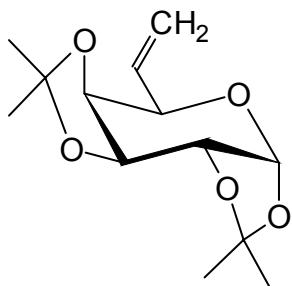
$\delta = 9.62$ (s, 1H, H-6), 5.67 (d, 1H, H-1), 4.66 (dd, 1H, H-3), 4.60 (dd, 1H, H-4), 4.39 (dd, 1H, H-2), 4.19 (d, 1H, H-5), 1.50 (s, 3H, -CH₃), 1.44 (s, 3H, -CH₃), 1.35 (s, 3H, -CH₃), 1.31 (s, 3H, -CH₃) ppm.

 $J_{1,2} = 5.1$, $J_{2,3} = 2.3$, $J_{3,4} = 7.9$, $J_{4,5} = 2.0$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3)

$\delta = 200.65$ (C-6), 110.44 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 109.45 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 96.66 (C-1), 73.62 (C-5), 72.14 (C-4), 71.08 (C-2), 70.92 (C-3), 26.41 , 26.20 , 25.33 , 24.86 (4 x $-\text{CH}_3$) ppm.

6,7-Didesoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galacto-hept-6-enopyranose (**62**)



$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_5$

256.30 g/mol

brauner Sirup

Lit.¹⁷²: Sdp._{0.4} 85-87 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -49^\circ$ ($c = 1.03$ g/100 ml, CHCl_3),

Lit.¹⁷²: $[\alpha]_{578}^{21} = -200.2^\circ$ ($c = 3.17$ in CHCl_3)

$R_F = 0.42$ (PE/EE 4:1)

Ausbeute: 59 %

Die Reaktion wird in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt: Zu einer in einem Eis-Kochsalz-Bad gekühlten Suspension von 21.3 g (190.2 mmol) Kalium-*tert*-butylat in 130 ml abs. THF werden innerhalb von 10 Minuten 71.1 g (199.1 mmol) Methyltriphenylphosphoniumbromid in 120 ml abs. THF getropft. Die Reaktionslösung färbt sich dabei zitronengelb. Nach fünfzehnminütigem Rühren bei Raumtemperatur wird eine Lösung aus 25.0 g (96.8 mmol) 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranose (**61**) in 75 ml abs. THF tropfenweise zum Reaktionsansatz zugefügt. Die nun orangefarbene Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird das Gemisch mit 250 ml Wasser versetzt, kurz gerührt und anschließend mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (*n*-Hexan/EE 6:1) gereinigt. Es werden 14.7 g (57.3 mmol, 59 %) 6,7-Dideoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galacto-hept-6-enopyranose gewonnen.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3)

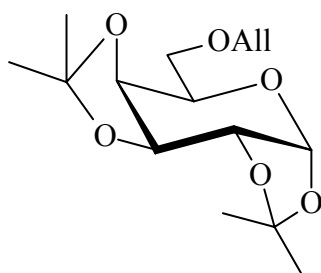
$\delta = 5.87$ (ddd, 1H, H-6), 5.51 (d, 1H, H-1), 5.30 (ddd, 1H, H-7_t), 5.21 (ddd, 1H, H-7_c), 4.55 (dd, 1H, H-3), 4.25 (dd, 1H, H-2), 4.22 (dddd~dd, 1H, H-5), 4.15 (dd, 1H, H-4), 1.46 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.38 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.26 (s, 2 x 3H, 2 x $-\text{CH}_3$) ppm.

$J_{1,2} = 5.0$, $J_{2,3} = 2.4$, $J_{3,4} = 7.8$, $J_{4,5} = 2.1$, $J_{5,6} = 6.0$, $J_{6,7c} = 10.7$, $J_{6,7t} = 17.0$, $J_{7c,7t} = 1.5$, $J_{5,7c} = 1.3$, $J_{5,7t} = 1.3$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3)

$\delta = 134.32$ (C-6), 117.52 (C-7), 109.68 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 108.87 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 96.85 (C-1), 73.86 (C-4), 71.29 (C-3), 70.88 (C-2), 69.41 (C-5), 26.52 , 26.35 , 25.33 , 24.75 (4 x $-\text{CH}_3$) ppm.

6-*O*-Allyl-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**64**)



$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_6$
300.4 g/mol

weißer Sirup

Lit.²⁶⁷: Sdp._{0.03} 86 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -60^\circ$ ($c = 0.5$ g/100 ml, CHCl_3),

Lit.: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -71.8^\circ$,

$R_{\text{F}} = 0.39$ (PE/EE 4:1)

Ausbeute: 78 %

5.07 g (19.5 mmol) 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose¹⁶⁹ **60** werden in 400 ml Dichlormethan und 400 ml 50 %iger Natronlauge zusammen mit 31 ml Allylbromid und 6.53 g Tetrabutylammoniumhydrogensulfat kräftig gerührt. Nach 5 h Reaktion bei Raumtemperatur werden die Phasen getrennt, die wässrige Phase wird mit DCM extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 6:1) werden 4.57 g (15.2 mmol, 78 %) **64** erhalten.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3)

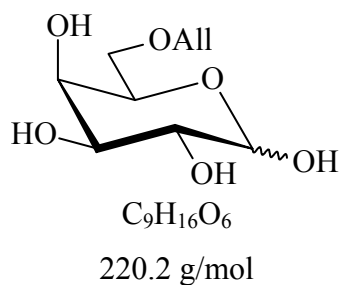
$\delta = 5.79$ (ddd, 1H, CH-All), 5.41 (d, 1H, H-1), 5.15 (dd, 1H, $=\text{CH}_{2t}$ -All), 5.05 (d, 1H, $=\text{CH}_{2c}$ -All), 4.47 (dd, 1H, H-3), 4.19 (dd, 1H, H-2), 4.13 (dd, 1H, H-4), 3.94 - 3.90 (m, 2H, $-\text{CH}_2$ -All), 3.85 (dd, 1H, H-5), 3.53 (dd, 1H, H-6a), 3.46 (dd, 1H, H-6b), 1.42 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.32 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.21 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.19 (s, 3H, $-\text{CH}_3$) ppm.

$J_{1,2} = 5.1$, $J_{2,3} = 2.5$, $J_{3,4} = 8.1$, $J_{4,5} = 2.0$, $J_{5,6a} = 5.6$, $J_{5,6b} = 6.6$, $J_{6a,6b} = 10.2$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_{2t}} = 17.3$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_{2c}} = 10.7$, $J_{=\text{CH}_{2c},=\text{CH}_{2t}} = 1.5$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3)

$\delta = 134.22$ (CH-All), 117.50 ($=\text{CH}_2$ -All), 109.61 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 108.81 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 96.80 (C-1), 74.00 ($-\text{CH}_2$ -All), 72.86 (C-4), 71.20 (C-3), 71.10 (C-2), 69.02 (C-6), 67.15 (C-5), 26.22 , 26.05 , 25.00 , 24.45 ($4 \times -\text{CH}_3$) ppm.

6-*O*-Allyl-D-galactopyranose (**65**)



weißer Feststoff

Smp.: 85°C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -10^\circ$ ($c = 0.38$ g/100 ml, H_2O),

$R_{\text{F}} = 0.70$ (EE/MeOH/ H_2O 7:3:1)

Ausbeute: 26.02 g, Rohprodukt

Zu einer Lösung von 1060 ml (106 mmol, 1.02 äq.) 0.10 M Salzsäure und 105 ml Methanol werden 31.36 g (104.4 mmol) 6-*O*-Allyl-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**64**) zugefügt. Nach $2\frac{1}{2}$ stündigem Rühren unter Rückfluss bei 90°C wird die Reaktion abgebrochen, nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert. Anschließend wird Methanol am Rotationsverdampfer abdestilliert. Zur Reinigung von Natriumchlorid wird das Produkt über Kieselgel filtriert (Laufmittel: Chloroform/Methanol 6:1). 26.02 g 6-*O*-Allyl-D-galactopyranose werden als brauner Sirup erhalten und ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt. Eine kleine Menge wird auskristallisiert, mit Chloroform gewaschen und ergibt **65** als weißen Feststoff.

^1H -NMR (400 MHz, MeOD)

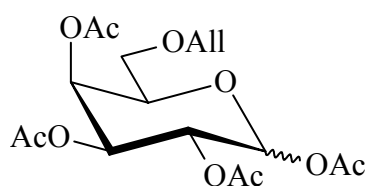
$\delta = 6.11$ (m, 1H, CH-All), 5.47 (dd, 1H, $=\text{CH}_2\text{c}$ -All), 5.33 (m, 2H, $=\text{CH}_2\text{t}$ -All, H-1), 4.34 (dd ~ t, 1H, H-5), 4.22 (m, 3H, H-2, $-\text{CH}_2$ -All), 4.06 (dd, 1H, H-4), 3.96 (dd, 1H, H-3), 3.92 (dd, 1H, H-2), 3.84 (m, 2H, H-6a, H-6b) ppm.

$J_{1,2} = 3.6$, $J_{2,3} = 10.4$, $J_{3,4} = 3.1$, $J_{4,5} = 1.3$, $J_{5,6a} = 6.6$, $J_{5,6b} = 5.6$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{t}} = 17.3$, $J_{=\text{CH}_2\text{c},=\text{CH}_2\text{t}} = 0.8$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD)

$\delta = 136.50, 136.47$ (CH-All), 117.79 ($=\text{CH}_2$ -All), 99.11 (C-1 β), 94.63 (C-1 α), $75.40, 74.15$ (C-5), $73.73, 73.67$ ($-\text{CH}_2$ -All), $71.68, 71.61$ (C-4), $71.28, 71.11$ (C-6), $71.02, 70.81, 70.44, 71.20$ (C-3, C-2) ppm.

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-allyl-D-galactopyranose (**68**)



brauner Sirup

$R_F = 0.72, 0.66$ (PE/EE 1:1)

$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$

388.37 g/mol

1.46 g (6.76 mmol) **65** werden unter Eiskühlung in 90 ml Pyridin gelöst und mit 18 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 19-stündigem Rühren wird das Reaktionsgemisch durch Zugabe von 30 ml Toluol verdünnt. Die Lösungsmittel werden am Rotationsverdampfer abdestilliert, und es wird noch dreimal mit 30 ml Toluol codestilliert. Anschließend wird das Rohprodukt 30 min lang im Ölpumpenvakuum getrocknet, um dann ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet zu werden. Es werden 2.85 g Rohprodukt erhalten.

^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3)

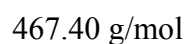
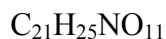
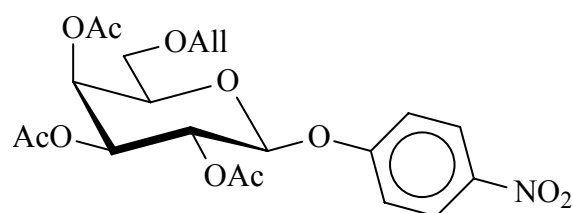
$\delta = 6.30$ (m, 2H, H-1, H-4), 5.55 (dddd, 1H, CH-All), 5.43 (m, 2H, H-2, H-3), 4.57 (dd, 1H, $=\text{CH}_{2t}$ -All), 4.39 (dd, 1H, $=\text{CH}_{2c}$ -All), 4.27 (m, 2H, H-5, $-\text{CH}_2$ -All), 3.80 (m, 1H, $-\text{CH}_2$ -All), 3.55 (dd, 1H, H-6a), 3.47 (dd, 1H, H-6b), 1.96 (s, 3H, Ac), 1.94 (s, 3H, Ac), 1.92 (s, 3H, Ac), 1.91 (s, 3H, Ac) ppm.

$J_{5,6a} = 7.4$, $J_{5,6b} = 2.0$, $J_{6a,6b} = 14.4$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_{2c}} = 10.4$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_{2t}} = 17.8$, $J_{=\text{CH}_{2c},=\text{CH}_{2t}} = 1.8$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},=\text{CH}_2} = 1.8$ Hz.

^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3)

$\delta = \approx 169$ (4 x CO-Ac), 134.45 (CH-All), 118.16 ($=\text{CH}_2$ -All), 92.72 (C-1), 90.28 (C-4), 72.81 ($-\text{CH}_2$ -All), 71.45 (C-5), 70.59 (C-3), 68.03 (C-2), 67.99 (C-6), ≈ 21 (4 x CH_3 -Ac) ppm.

4-Nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-allyl- β -D-galactopyranosid (71) und *N*-(2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-allyl- β -D-galactopyranosyl)trichloracetamid (71b)



weißer Schaum

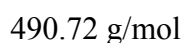
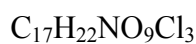
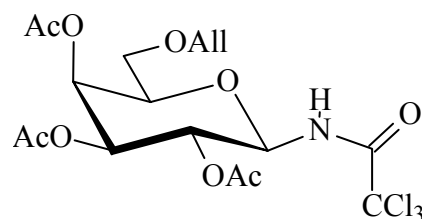
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2^\circ$ ($c = 0.6 \text{ g/100 ml}$, CHCl_3)

$R_F = 0.55$ (Tol/EE 2:1)

Ausbeute: 53 %

ber.: C 53.96 H 5.39 N 3.00

gef.: C 52.91 H 5.46 N 2.61



Unter Argonatmosphäre werden 1.86 g (3.79 mmol) *O*-(2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-allyl- α -D-galactopyranosyl)trichloracetimidat (**75**) in 10 ml abs. Dichlormethan gelöst und im Eiskochsalzbad gekühlt. Sodann werden 525 mg (3.79 mmol) *p*-Nitrophenol und ca. 0.5 ml (3.79 mmol) Bortrifluorid-Etherat zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 ½ h im Eiskochsalzbad gerührt, dann mit 7 ml Dichlormethan versetzt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 3:1) gereinigt. Es werden 935 mg (2.00 mmol, 53 %) 4-Nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-allyl- β -D-galactopyranosid (**71**), 658 mg (1.34 mmol, 35 %) *N*-(2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-allyl- α -D-galactopyranosyl)trichloracetamid (**71b**) und 14 mg (0.03 mmol, 11 %) 4-Nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-allyl- α -D-galactopyranosid erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

$\delta = 8.14$ (m, 2H, *p*NP), 7.03 (m, 2H, *p*NP), 5.76 (dddd, 1H, CH-All), 5.45 (dd, 1H, H-2), 5.44 (dd, 1H, H-4), 5.17 (dddd~dq, 1H, =CH_{2t}-All), 5.13 (dddd~dq, 1H, =CH_{2c}-All), 5.09 (d, 1H, H-1), 5.07 (dd, 1H, H-3), 3.97 (ddd~dt, 1H, H-5), 3.93-3.88 (m, 2H, -CH₂-All), 3.51-3.47 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.11 (s, 3H, Ac), 2.00 (s, 3H, Ac), 1.95 (s, 3H, Ac) ppm.

$J_{1,2} = 7.9$, $J_{2,3} = 10.2$, $J_{3,4} = 3.6$, $J_{4,5} = 0.8$, $J_{5,6a} = 5.8$, $J_{5,6b} = 5.4$, $J_{\text{CH-All,=CH}_2\text{c}} = 10.4$, $J_{\text{CH-All,=CH}_2\text{t}} = 17.8$, $J_{\text{=CH}_2\text{c,=CH}_2\text{t}} = 1.8$, $J_{\text{CH}_2\text{-All,=CH}_2} = 1.8$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3)

$\delta = 170.68$, 170.48 , 169.71 (3 x CO-Ac), 161.82 (C-*p*NP), 143.56 (C-*p*NP), 134.37 (CH-All), 126.21 (CH-*p*NP), 118.04 (=CH₂-All), 117.03 (CH-*p*NP), 99.17 (C-1), 73.70 (C-5), 72.91 (-CH₂-All), 71.22 (C-3), 69.00 (C-4), 68.18 (C-6), 67.79 (C-2), 21.11 , 21.06 , 20.97 (3 x CH₃-Ac) ppm.

N-(2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-allyl- β -D-galactopyranosyl)trichloracetamid (**71b**):

MALDI-TOF (DHB, positive mode): 490.30 , 492.30 ($\text{M} + \text{H}^+$), 512.16 , 514.16 , 516.16 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 528.12 , 530.11 , 532.10 ($\text{M} + \text{K}^+$)

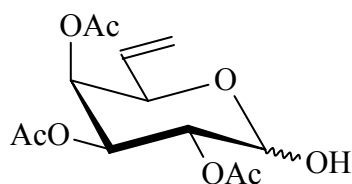
^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3)

$\delta = 7.38$ (dd, 1H, NH), 5.76 (dddd, 1H, CH-All), 5.47 (dd, 1H, H-4), 5.17 (dddd~dq, 1H, =CH_{2t}-All), 5.14 (dd, 1H, H-3), 5.13 - 5.09 (m, 2H, H-2, =CH_{2c}-All), 5.06 (dd, 1H, H-1), 3.95 - 3.90 (m, 2H, H-5, -CH₂-All), 3.84 (dddd~ddt, 1H, -CH₂-All), 3.50 (dd, 1H, H-6a), 3.39 (dd, 1H, H-6b), 2.09 (s, 3H, Ac), 1.99 (s, 3H, Ac), 1.94 (s, 3H, Ac) ppm.

$J_{1,\text{NH}} = 8.7$, $J_{1,2} = 8.9$, $J_{2,3} = 8.7$, $J_{3,4} = 3.4$, $J_{4,5} = 1.0$, $J_{5,6a} = 5.6$, $J_{5,6b} = 8.9$, $J_{6a,6b} = 9.9$, $J_{\text{CH-All,=CH}_2\text{c}} = 10.1$, $J_{\text{CH-All,=CH}_2\text{t}} = 17.3$, $J_{\text{=CH}_2\text{c,=CH}_2\text{t}} = 2.5$, $J_{\text{CH}_2\text{-All,=CH}_2} = 1.8$, $J_{\text{CH}_2\text{-All,-CH=}} = 5.9$, $J_{\text{CH}_2\text{-All,-CH}_2\text{-All}} = 12.7$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3)

$\delta = 171.83$ (3 x CO-Ac), 162.37 (-NH-CO-), 134.42 (CH-All), 118.24 (=CH₂-All), 80.90 (C-1), 74.48 (C-5), 72.84 (-CH₂-All), 71.04 , 68.73 (C-2, C-3), 67.97 (C-4), 67.50 (C-6), 21.06 , 20.96 (3 x CH₃-Ac) ppm.

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6,7-didesoxy-D-*galacto*-hept-6-enopyranose (72)

302.26 g/mol

farbloser Sirup

 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 1.4^\circ$ ($c = 1.518$ g/100 ml, CHCl_3) $R_F = 0.1$ (PE/EE 3:1)

Ausbeute: 25 %

2.90 g (12.9 mmol) 6,7-Dideoxy-D-*galacto*-hept-6-enopyranose (**63**) werden in 40 ml trockenem Pyridin gelöst, unter Rühren mit 7.4 ml (78.3 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wird das Pyridin mit 50 ml Toluol codestilliert. Das Produkt wird säulenchromatographisch (PE/EE 4:1; $R_F = 0.3$ (PE/EE 1:1)) gereinigt. Es werden 3.30 g (9.6 mmol, 74 %) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6,7-dideoxy-D-*galacto*-hept-6-enopyranose erhalten, die sofort weiter umgesetzt werden. Das Zwischenprodukt wird in 19 ml trockenem DMF gelöst, mit 0.93 g (15.7 mmol) Hydrazinacetat versetzt und zwei Stunden bei 60 °C gerührt. Anschließend werden 60 ml Ethylacetat beigelegt, mit Natriumchloridlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird säulenchromatographisch (PE/EE 3:1) gereinigt. Es werden 934 mg (3.1 mmol) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6,7-dideoxy-D-*galacto*-hept-6-enopyranose erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 25 %.

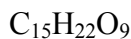
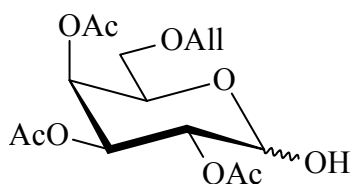
 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

$\delta = 5.66$ (dddd, 1H, H-6), 5.46 (d, 1H, H-1 α), 5.40-5.02 (m, 5H, H-2 α + β , H-3 α + β , H-4 α + β , H-7 α + β , H-7 β + β), 4.74-4.66 (m, 2H, H-5 α , H-1 β), 4.20-4.17 (m, 1H, H-5 β), 2.05 (s, 3H, Ac), 2.02 (s, 3H, Ac), 1.92 (s, 3H, Ac) ppm.

$J_{1\alpha,2\alpha} = 3.3$, $J_{5,6} = 5.1$, $J_{6,7c} = 10.7$, $J_{6,7t} = 16.3$ Hz.

 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)

$\delta = 171.70$ (CO-Ac), 171.00 (CO-Ac), 170.98 (CO-Ac), 133.07 (C-6), 118.18 (C-7), 95.90 (C-1 β), 90.77 (C-1 α), 74.12 (C-5 β), 71.55, 69.19, 68.35 (C-2, C-3, C-4), 20.99, 20.96, 20.90 (3 x CH_3 -Ac) ppm.

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-allyl-D-galactopyranose (73)

346.33 g/mol

farbloser Feststoff

 $R_F = 0.62$ (PE/EE 1:1) $[\alpha]_D^{20} = 91^\circ$ ($c = 0.35$ g/100 ml, CHCl_3)Smp. = 108°C

Ausbeute: 62 %

Anomerenverhältnis (CDCl_3 , RT): $\alpha:\beta \approx 2.6 : 1$

2.85 g (7.34 mmol) **68** werden in 5.9 ml DMF gelöst, mit 1.06 g (13.58 mmol, 1.85 äq.) Ammoniumcarbonat versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 70 ml Dichlormethan zugegeben und viermal mit 70 ml gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die wässrigen Phasen werden nochmals mit 30 ml Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Filtrieren wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Toluol/EE 1:1) gereinigt und es können 1.59 g (4.36 mmol, 62 %) **73** isoliert werden.

MALDI-TOF (DHB, positive mode): 385.01 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 369.08 ($\text{M} + \text{K}^+$) ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3)

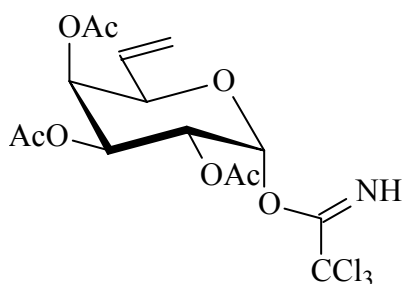
$\delta = 5.99$ (dddd, 1H, CH-All), 5.65 (d, 0.72H, H-1 α), 5.61 (d, 0.72H, H-4 α), 5.55 (dd, 0.72H, H-3 α), 5.40 (dd, 1H, =CH_{2t}-All), 5.34 (dd, 1H, =CH_{2c}-All), 5.30 (dd, 0.72H, H-2 α), 5.26 (dd, 0.28H, H-3 β), 5.21 (dd, 0.28H, H-2 β), 4.87 (d, 0.28H, H-1 β), 4.59 (dd, 0.72H, H-5 α), 4.16 (dd, 0.28H, -CH₂-All β), 4.13 (dd, 0.72H, -CH₂-All α), 4.10 (dd, 0.72H, -CH₂-All α), 4.09 (d, 0.28H, H-4 β), 4.07 (dd, 0.28H, -CH₂-All β), 4.03 (dd, 0.28H, H-5 β), 3.71 (dd, 0.28H, H-6 $\alpha\beta$), 3.64 (dd, 0.72H, H-6 $\alpha\alpha$), 3.58 (dd, 0.28H, H-6 $\beta\beta$), 3.57 (dd, 0.72H, H-6 $\beta\alpha$), 2.26 (s, 3H, Ac), 2.22 (s, 3H, Ac), 2.13 (s, 3H, Ac) ppm.

$J_{1\alpha,2\alpha} = 3.8$, $J_{1\beta,2\beta} = 7.7$, $J_{2\alpha,3\alpha} = 10.9$, $J_{2\beta,3\beta} = 10.9$, $J_{3\alpha,4\alpha} = 3.4$, $J_{3\beta,4\beta} = 2.8$, $J_{4,5} = 0.8$, $J_{5\alpha,6\alpha\alpha} = 7.4$, $J_{5\beta,6\alpha\beta} = 6.7$, $J_{5\alpha,6\beta\alpha} = 4.7$, $J_{5\beta,6\beta\beta} = 4.9$, $J_{6\alpha\alpha,6\beta\alpha} = 10.8$, $J_{6\alpha\beta,6\beta\beta} = 10.1$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{c}} = 8.9$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{t}} = 17.3$, $J_{=\text{CH}_2\text{c},=\text{CH}_2\text{t}} = 1.5$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},\text{CH-All}} = 5.9$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},\text{CH-All}} = 6.1$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 13.1$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},=\text{CH}_2} = 1.8$ Hz.

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3)

$\delta = \approx 170.5$ (3 x CO-Ac), 134.33 (CH-All), 118.42 (-CH₂-All α), 118.22 (-CH₂-All β), 96.19 (C-1 β), 90.96 (C-1 α), 72.78 (-CH₂-All); 69.40 (C-2), 68.26 (C-6), 68.22 (C-4), 67.94 (C-3), 67.71 (C-5), ≈ 21.0 (3 x CH₃-Ac) ppm.

***O*-(2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6,7-didesoxy- α -D-*galacto*-hept-6-enopyranosyl)trichloracetimidat (74)**



weißer Feststoff

Smp. 92 °C

$[\alpha]_D^{20} = 128^\circ$ ($c = 0.75$ g/100 ml, CHCl_3)

$R_F = 0.19$ (PE/EE 5:1), 0.23 (PE/EE 4:1)

Ausbeute: 75 %

$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{NO}_8\text{Cl}_3$

446.7 g/mol

2.38 g (7.87 mmol) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6,7-dideoxy-D-*galacto*-hept-6-enopyranose (72) werden unter Argonatmosphäre in 30 ml abs. Dichlormethan gelöst und mit 9.8 ml Trichloracetonitril und 1.6 ml einer Lösung aus 0.73 ml DBU in 5.5 ml abs. Dichlormethan versetzt. Die nun rot-braune Lösung wird 2 ½ h bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel dann abdestilliert und der Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 6:1) gereinigt. Es werden 2.63 g (5.88 mmol, 75 %) *O*-(2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6,7-dideoxy- α -D-*galacto*-hept-6-enopyranosyl)trichloracetimidat (74) erhalten.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3)

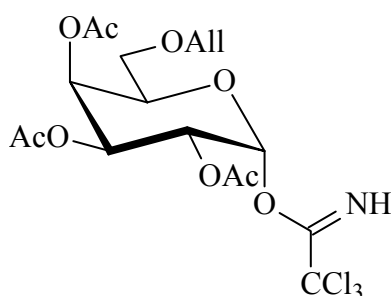
$\delta = 8.57$ (s, 1H, NH), 6.58 (d, 1H, H-1), 5.64 (ddd, 1H, H-6), 5.47 (dd, 1H, H-4), 5.41 (dd, 1H, H-3), 5.32 (dd, 1H, H-2), 5.30 (ddd, 1H, H-7_t), 5.19 (ddd, 1H, H-7_c), 4.66 (dd, 1H, H-5), 2.07 (s, 3H, Ac), 1.96 (s, 3H, Ac), 1.94 (s, 3H, Ac) ppm.

$J_{1,2} = 3.6$, $J_{2,3} = 10.7$, $J_{3,4} = 3.1$, $J_{4,5} = 1.0$, $J_{5,6} = 5.3$, $J_{6,7c} = 10.7$, $J_{6,7t} = 17.3$, $J_{7c,7t} = 1.3$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3)

$\delta = 170.65, 170.53, 170.43$ (3 x CO-Ac), 161.40 ($-\text{C}=\text{NH}$), 131.93 (C-6), 119.20 (C-7), 94.19 (C-1), 72.37 (C-5), 70.21 (C-4), 68.17 (C-3), 67.41 (C-2), $21.10, 21.00, 20.97$ (3 x $\text{CH}_3\text{-Ac}$) ppm.

***O*-(2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-allyl- α -D-galactopyranosyl)trichloracetimidat (75)**



$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{NO}_9\text{Cl}_3$

490.72 g/mol

farbloser Feststoff

Smp. = 112°C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 100^\circ$ ($c = 0.5$ g/100 ml, CHCl_3)

$R_{\text{F}} = 0.75$ (PE/EE 1:1)

Ausbeute: 54 %

2.42 g (6.99 mmol) **73** werden unter Ar-Atmosphäre in 27 ml abs. Dichlormethan gelöst und mit 8.72 ml (86.96 mmol, 12.44 äq.) Trichloracetonitril versetzt. Anschließend werden 1.0 ml einer Lösung von 0.73 ml (4.89 mmol, 0.70 äq.) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en in 5.5 ml abs. Dichlormethan langsam zugetropft, bis sich die Reaktionslösung tiefbraun verfärbt. Das Reaktionsgemisch wird 2.5 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird es am Rotationsverdampfer etwas eingeeengt und säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: PE/EE 3:1). Es werden 1.86 g (3.79 mmol, 54 %) **75** gewonnen.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3)

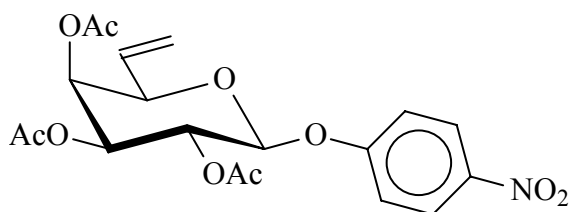
$\delta = 8.56$ (s, 1H, $=\text{NH}$), 6.47 (d, 1H, H-1), 5.74 (dddd, 1H, CH-All), 5.54 (d, 1H, H-4), 5.37 (dd, 1H, H-3), 5.30 (dd, 1H, H-2), 5.15 (dd, 1H, $=\text{CH}_2\text{-All}$), 5.09 (dd, 1H, $=\text{CH}_2\text{-All}$), 4.32 (dd ~ t, 1H, H-5), 3.91 (dd, 1H, $-\text{CH}_2\text{-All}$), 3.82 (dd, 1H, $-\text{CH}_2\text{-All}$), 3.47 (dd, 1H, H-6a), 3.38 (dd, 1H, H-6b), 2.09 (s, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.96 (s, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.94 (s, 3 H, $-\text{CH}_3$) ppm.

$J_{1,2} = 3.5$, $J_{2,3} = 11.1$, $J_{3,4} = 2.7$, $J_{4,5} = 0.8$, $J_{5,6a} = 6.0$, $J_{5,6b} = 6.6$, $J_{6a,6b} = 9.9$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{c}} = 10.4$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{t}} = 17.3$, $J_{=\text{CH}_2\text{c},=\text{CH}_2\text{t}} = 1.3$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},\text{CH-All}} = 4.4$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},\text{CH-All}} = 5.7$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 12.9$ Hz.

^{13}C (125 MHz, CDCl_3)

$\delta = \approx 170.4$ (3 x CO-Ac), 134.44 (CH-All), 118.07 ($=\text{CH}_2$ -All), 94.15 (C-1), 72.84 (CH_2 -All), 71.06 (C-2), 70.52 (C-3), 68.38 (C-4), 67.83 (C-6), 66.71 (C-5), ≈ 21.1 (3 x CH_3 -Ac) ppm.

4-Nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6,7-didesoxy- β -D-galacto-hept-6-enopyranosid (76), *N*-(2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6,7-didesoxy- β -D-galacto-hept-6-enopyranosyl)trichloracetamid (77) und 4-Nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6,7-didesoxy- α -D-galacto-hept-6-enopyranosid (78)



$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_{10}$

423.4 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 162 °C, Lit.¹⁸⁵: 164 °C

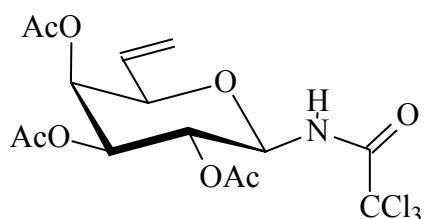
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 6^\circ$ ($c = 0.27$ g/100 ml CHCl_3)

$R_{\text{F}} = 0.07$ (PE/EE 4:1)

Ausbeute: 68 % (+ 13 % α -Anomer)

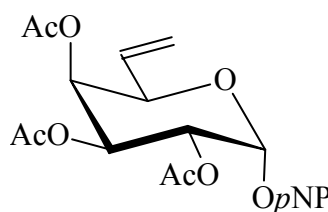
ber.: C 53.89 H 5.00 N 3.31

gef.: C 53.28 H 5.06 N 3.31



$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{NO}_9\text{Cl}_3$

490.7 g/mol



$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_{10}$

423.4 g/mol

223 mg (0.50 mmol) *O*-(2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6,7-dideoxy- α -D-galacto-hept-6-enopyranosyl)-trichloracetimidat (74) und 70 mg (0.50 mmol) *p*-Nitrophenol werden unter Argonatmosphäre in ca. 1 ml Dichlormethan gelöst, in einem Eis-Kochsalzbad gekühlt und mit ca. 12 μl Bortrifluorid-Etherat versetzt. Nach 2 h Rühren im Eis-Kochsalzbad wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die säulenchromatographische Trennung der gebildeten Produkte ergibt 42 mg eines Gemisches aus 4-Nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6,7-dideoxy- α -D-galacto-hept-6-enopyranosid (0.07 mmol, 13 %) und *N*-(2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6,7-dideoxy- α -D-galacto-hept-6-enopyranosyl)trichloracetamid (0.03 mmol, 6 %) sowie 145 mg (0.34 mmol, 68 %) 4-Nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6,7-dideoxy- β -D-galacto-hept-6-enopyranosid.

MALDI-TOF (DHB, positive mode): 446.1 ($M + Na^+$), 462.0 ($M + K^+$)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$)

δ = 8.14 (m, 2H, *p*NP), 7.03 (m, 2H, *p*NP), 5.69 (ddd, 1H, H-6), 5.47 (dd, 1H, H-2), 5.41 (dd, 1H, H-4), 5.34 (ddd, 1H, H-7_t), 5.23 (ddd, 1H, H-7_c), 5.16 (d, 1H, H-1), 5.13 (dd, 1H, H-3), 4.35 (m, 1H, H-5), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.00 (s, 3H, Ac), 1.95 (s, 3H, Ac) ppm.

$J_{1,2} = 7.9$, $J_{2,3} = 10.4$, $J_{3,4} = 3.3$, $J_{4,5} = 1.1$, $J_{5,6} = 4.8$, $J_{6,7c} = 10.9$, $J_{6,7t} = 17.3$, $J_{7c,7t} = 1.3$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$)

δ = 170.68, 170.48, 169.71 (3 x CO-Ac), 161.82 (C-*p*NP), 143.56 (C-*p*NP), 131.49 (C-6), 126.22 (CH-*p*NP), 119.24 (C-7), 117.00 (CH-*p*NP), 99.07 (C-1), 74.57 (C-5), 71.20 (C-3), 69.48 (C-4), 68.82 (C-2), 21.09, 21.00, 20.97 (3 x CH_3 -Ac) ppm.

N(-2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6,7-didesoxy- β -D-*galacto*-hept-6-enopyranosyl)trichloracetamid (**77**)*
und 4-Nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6,7-didesoxy- α -D-*galacto*-hept-6-enopyranosid (**78**):

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$)

δ = 8.15 (m, 2H, *p*NP), 7.41 (d, 0.5H, NH*), 7.41 (m, 2H, *p*NP), 5.87 (d, 1H, H-1), 5.68-5.56 (m, 1.5H, H-6, H-6*), 5.54 (dd, 1H, H-3), 5.44 (dd, 1H, H-4), 5.40 (dd, 0.5H, H-4*), 5.32 (ddd, 1H, H-7_t), 5.28 (dd, 1H, H-2), 5.24 (ddd, 0.5H, H-7_t*), 5.21 (ddd, 1H, H-7_c), 5.18-5.14 (m, 1.5H, H-2*, H-3*, H-7_c*), 5.12 (dd, 0.5H, H-1*), 4.48 (dd, 1H, H-5), 4.30 (dd, 1H, H-5*), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 1.5H, Ac*), 2.02 (s, 3H, Ac), 2.01 (s, 1.5H, Ac*), 1.98 (s, 3H, Ac), 1.94 (s, 1.5H, Ac*) ppm.

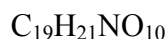
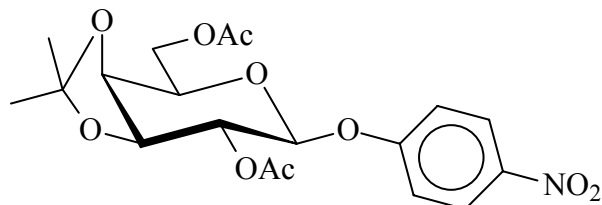
$J_{1,2} = 3.6$, $J_{2,3} = 10.9$, $J_{3,4} = 3.3$, $J_{4,5} = 1.0$, $J_{5,6} = 5.1$, $J_{6,7c} = 10.7$, $J_{6,7t} = 17.3$, $J_{7c,7t} = 1.3$ Hz.

$J_{1*,NH*} = 8.7$, $J_{1*,2*} = 8.9$, $J_{3*,4*} = 3.1$, $J_{4*,5*} = 1.3$, $J_{5*,6*} = 4.8$, $J_{6*,7c*} = 10.4$, $J_{6*,7t*} = 17.6$, $J_{7c*,7t*} = 1.3$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$)

δ = 171.77, 170.79, 170.61, 170.55, 170.46, 170.18 (3 x CO-Ac, 3 x CO-Ac*), 162.41 (C-*p*NP), 161.54 (C-NH*), 131.82 (C-6), 131.69 (C-6*), 126.33 (CH-*p*NP), 119.37 (C-7*), 119.03 (C-7), 116.88 (CH-*p*NP), 95.33 (C-1), 80.70 (C-1*), 76.17 (C-5*), 71.10 (C-2*), 70.96 (C-5), 70.27 (C-4), 69.85 (C-4*), 68.52 (C-3*), 67.89 (C-2), 67.84 (C-3), 21.43, 21.10, 21.07, 20.98, 20.96 (3 x CH_3 -Ac, 3 x CH_3 -Ac*) ppm.

4-Nitrophenyl-2,6-di-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden- β -D-galactopyranosid (90), 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden- β -D-galactopyranosid (91) und 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden-6-*O*-2-methoxypropyl- β -D-galactopyranosid (92)

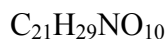
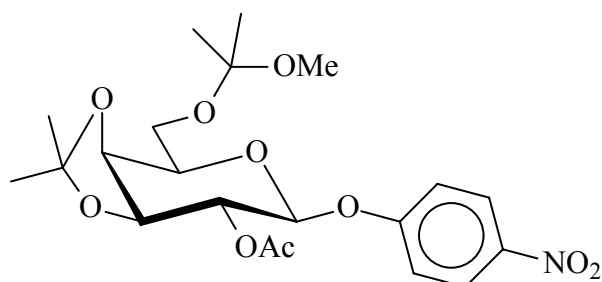


423.35 g/mol

weißer Feststoff

$R_F = 0.53$ (Tol/EE 1:2)

Ausbeute: ca. 33 %

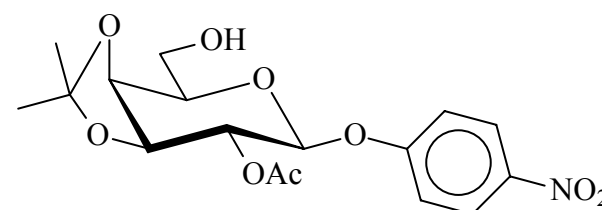


455.44 g/mol

weißer Feststoff

$R_F = 0.53$ (Tol/EE 1:2)

Ausbeute: ca. 20 %



383.36 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 151 °C

$[\alpha]_D^{20} = -13^\circ$ ($c = 4$ mg/2 ml, MeOH)

$R_F = 0.30$ (Tol/EE 1:2)

Ausbeute: 17 %

ber.: C 53.26 H 5.52 N 3.65

gef.: C 53.88 H 5.73 N 3.85

Zu einer Lösung von 75 mg (0.39 mmol) trockener *p*-Toluolsulfonsäure in 25 ml 2,2-Dimethoxypropan (DMP) werden 3.00 g (10.0 mmol) 4-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (**45**) hinzugefügt und die Lösung für 48 Stunden unter Argon bei Raumtemperatur gerührt.

Danach werden 0.31 ml (3.9 mmol) Pyridin hinzugefügt und das Reaktionsgemisch evaporiert. Der Rückstand wird in einer eisgekühlten Lösung von 6.2 ml trockenem Pyridin und 3.5 ml Essigsäureanhydrid aufgenommen und noch 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es werden tropfenweise bei 0 °C 1.8 ml Ethanol hinzugefügt, und nach 30 Minuten wird das Reaktionsgemisch in 20 ml Dichlormethan aufgenommen und in Eiswasser

geschüttet. Das Gemisch wird mit Dichlormethan extrahiert und jeweils einmal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen. Die organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und evaporiert. Der Rückstand wird noch zweimal mit Toluol ko-evaporiert um noch vorhandenes Pyridin zu entfernen und wird dann in einem 10:1 Methanol/Wasser-Gemisch, mit 28 Tropfen Eisessig versetzt, aufgenommen. Nach 10 Minuten werden 28 Tropfen Triethylamin hinzugegeben und evaporiert. Der Rückstand wird noch zweimal mit Toluol ko-evaporiert und das Produktgemisch (3.46 g) mittels Säulenchromatographie getrennt. Als Laufmittel wird ein Gemisch aus Toluol/Ethylacetat (2:1) verwendet.

Fraktion 1 enthält ein Gemisch aus 4-Nitrophenyl-2,6-di-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden- β -D-galactopyranosid (**90**) und 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden-6-*O*-2-methoxypropyl- β -D-galactopyranosid (**92**) in einem Verhältnis von 1:0.6 mit einer Ausbeute von 2.30 g (ca. 3.3 mmol, 33 % **90**, 2.0 mmol, 20 % **92**). Aus Fraktion 2 erhält man 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden- β -D-galactopyranosid (**91**) mit einer Menge von 570 mg (1.5 mmol). Dies entspricht einer Ausbeute von 17 % bezogen auf 4-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid.

Fraktion 1: Gemisch aus 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden-6-*O*-(2-methoxypropyl)- β -D-galactopyranosid (**92**) und 4-Nitrophenyl-2,6-di-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden- β -D-galactopyranosid (**90**). **92** ist in der NMR-Auswertung mit einem * gekennzeichnet.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3)

δ = 8.13 (m, 3.2H, *p*NP, *p*NP*), 6.96 (m, 3.2H, *p*NP, *p*NP*), 5.23 – 5.18 (m, 1.6H, H-2, H-2*), 5.06 (d, 0.6H, H-1*), 5.02 (d, 1H, H-1), 4.33 – 4.30 (m, 2H, H-6a,b), 4.28 – 4.20 (m, 3.2H, H-3, H-4, H-3*, H-4*), 4.12 (ddd, 1H, H-5), 4.01 (ddd, 0.6H, H-5*), 3.95 (dd, 0.6H, H-6a*), 3.82 (dd, 0.6H, H-6b*), 2.05 (s, 3H, O-Ac-2), 2.04 (s, 1.8H, -OAc-2*), 2.03 (s, 3H, -OAc-6), 1.53 (s, 1.8H, -CCH₃*), 1.52 (s, 3H, -CCH₃), 1.30 (s, 4.8H, -CCH₃, -CCH₃*) ppm.

$J_{1,2} = 7.1$, $J_{4,5} = 2.0$, $J_{5,6a} = 4.8$, $J_{5,6b} = 7.1$, $J_{1*,2*} = 7.6$, $J_{4*,5*} = 1.7$, $J_{5*6a*} = 7.4$, $J_{5*,6b*} = 4.1$, $J_{6a*,6b*} = 11.7$ Hz.

In CDCl_3 wurde die Mip-Gruppe von **92** abgespalten und es entstand 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden- β -D-galactopyranosid (**91**) neben Methanol und Aceton. Es wurde zusätzlich noch ein ^1H -NMR in Methanol d_4 aufgenommen, welches zeigt, dass bei dem Zucker mit einem Anteil von 0.6 die Mip-Gruppe an C-6 noch vorhanden ist.

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

δ = 8.04 (m_c, 3.2H, *p*NP, *p*NP*), 7.00 (m_c, 1.2H, *p*NP*), 6.97 (m, 2H, *p*NP), 5.12 (d, 1H, H-1), 5.09 (d, 0.6H, H-1*), 5.03 (dd, 1.6H, H-2, H-2*), 4.22 – 4.16 (m, 6.8H, H-3, H-3*, H-4, H-4*, H-5, H-5*, H-6a,b), 3.53 – 3.50 (m, 1.2H, H-6a*,b*), 2.96 (s, 1.8H, -OCH₃*), 1.93 (s, 4.8H, O-Ac-2, O-Ac-2*), 1.89 (s, 3H, O-Ac-6), 1.38 (s, 4.8H, CCH₃, CCH₃*), 1.19 (s, 3H, -CCH₃), 1.18 (s, 1.8H, -CCH₃*), 1.17 (s, 1.8H, -CCH₃*), 1.15 (s, 1.8H, -CCH₃*) ppm.

$J_{1,2} = 7.6$, $J_{1^*,2^*} = 7.9$, $J_{6a^*,b^*} = 7.2$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃)

δ = 126.25 (CH-*p*NP), 126.11 (CH-*p*NP*), 116.99 (CH-*p*NP), 116.80 (CH-*p*NP), 98.19 (C-1), 98.12 (C-1*), 76.93 (C-4*), 76.63 (C-4), 74.20 (C-5*), 73.80 (C-3), 73.29 (C-3*), 72.24 (C-2*), 72.04 (C-2), 71.68 (C-5), 63.68 (C-6), 62.64 (C-6*), 27.81 (CCH₃*), 27.68 (CCH₃), 26.58 (CCH₃*), 26.47 (CCH₃), 21.86 (O-Ac-2*), 21.30 (O-Ac-2), 21.23 (O-Ac-6) ppm.

Fraktion 2: 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden- β -D-galactopyranosid (**91**)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃)

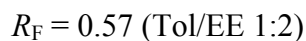
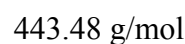
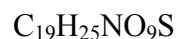
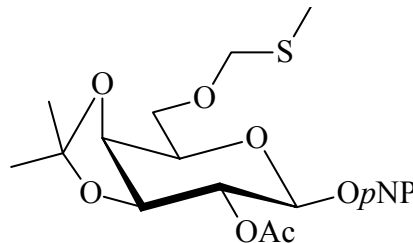
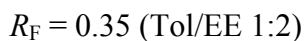
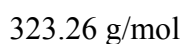
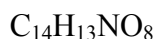
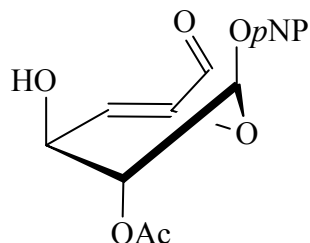
δ = 8.13 (m_c, 2H, *p*NP), 6.98 (m_c, 2H, *p*NP), 5.21 (dd, 1H, H-2), 5.06 (d, 1H, H-1), 4.26 (dd, 1H, H-3), 4.23 (dd, 1H, H-4), 4.02 (ddd, 1H, H-5), 3.95 (dd, 1H, H-6a), 3.82 (dd, 1H, H-6b), 2.05 (s, 3H, O-Ac), 1.53 (s, 3H, CCH₃), 1.30 (s, 3H, CCH₃) ppm.

$J_{1,2} = 7.4$, $J_{2,3} = 6.4$, $J_{3,4} = 5.9$, $J_{4,5} = 1.7$, $J_{5,6a} = 4.1$, $J_{5,6b} = 7.4$, $J_{6a,6b} = 11.7$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃)

δ = 170.00 (-O(CO)-CH₃), 161.87 (C-*p*NP), 140.00 ((C-*p*NP), 126.25 (CH-*p*NP), 116.80 (CH-*p*NP), 111.63 (C-(CH₃)₂), 98.12 (C-1), 76.92 (C-3), 74.20 (C-5), 73.80 (C-4), 72.24 (C-2), 62.63 (C-6), 27.81 (CH₃-C), 26.58 (CH₃-C), 21.30 (CH₃-CO) ppm.

4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-4-desoxy- α -L-*threo*-hex-4-enodialdo-1,5-pyranosid (93) und 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden-6-*O*-methylthiomethyl- β -D-galactopyranosid (94)



400 mg (0.94 mmol) 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden- β -D-galactopyranosid (**91**) werden mit 0.88 ml DMSO (11.6 mmol) und 0.33 ml Benzol versetzt. Das Gemisch wird gerührt, bis eine homogene Lösung vorliegt. Danach werden 0.07 ml Pyridin, 0.03 ml Phosphorsäure und 680 mg Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 3.31 mmol) hinzugegeben. Die Lösung wird über Nacht gerührt und die Reaktion durch Zugabe von 590 mg Oxalsäure (4.63 mmol) in 2 ml Methanol abgebrochen. Die Suspension wird filtriert und das Filtrat mit gesättigter NaCl-Lösung versetzt und mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen und die wässrige Phase noch zweimal mit Essigester extrahiert. Die organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und schließlich das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt. Als Laufmittel dient ein Gemisch von Toluol/Essigester (1:1).

Es wurden 2 Fraktionen erhalten. Fraktion 1 enthielt 31 mg (0.07 mmol, 7 %) 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden-6-*O*-methylthiomethyl- β -D-galactopyranosid (**94**). Fraktion 2 enthielt 108 mg eines Gemisches aus Edukt (**91**) und 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-4-desoxy- α -L-*threo*-hex-4-enodialdo-1,5-pyranosid (**93**) im Verhältnis 2:1.

Das gewünschte Produkt 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden- β -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranosid konnte nicht isoliert werden.

4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden-6-*O*-methylthiomethyl- β -D-galactopyranosid:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ = 8.13 (m_c, 2H, *p*NP), 7.01 (m_c, 2H, *p*NP), 5.20 (dd, 1H, H-2), 5.03 (d, 1H, H-1), 4.66 – 4.57 (m, 2H, -S-CH₂), 4.26 – 4.21 (m, 2H, H-3, H-4), 4.08 (ddd, 1H, H-5), 3.84 – 3.74 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.06 (s, 2H, -SCH₃), 2.05 (s, 3H, -(CO)CH₃), 1.53 (s, 3H, -CCH₃), 1.30 (s, 3H, -CCH₃) ppm.

$J_{1,2} = 7.1$, $J_{2,3} = 5.6$, $J_{6a,6b} = 11.5$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ = 126.15 (CH-*p*NP), 117.02 (CH-*p*NP), 111.48 ($\underline{\text{C}}\text{-(CH}_3)_2$), 98.28 (C-1), 76.69 (C-3), 76.22 (-SCH₂), 73.65 (C-4), 72.96 (C-5), 72.23 (C-2), 67.47 (C-6), 31.32 (-SCH₃), 27.77 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{CH}}_3$), 26.51 ($\text{C}\underline{\text{CH}}_3$), 21.31 (-(CO) $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$) ppm.

4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden- β -D-galactopyranosid* und 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl-4-desoxy- α -L-*threo*-hex-4-enodialdo-1,5-pyranosid:

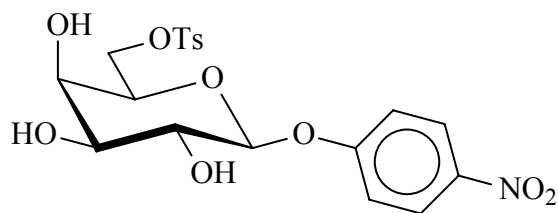
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ = 9.24 (s, 0.5H, H-6), 8.18 (m_c, 1H, *p*NP), 8.13 (m_c, 2H, *p*NP*), 7.15 (m_c, 1H, *p*NP), 6.99 (m_c, 2H, *p*NP*), 6.18 (dd, 0.5H, H-4), 5.99 (dd, 0.5H, H-1), 5.30 (dd, 0.5H, H-2), 5.21 (dd, 1H, H-2*), 5.06 (d, 1H, H-1*), 4.28 – 4.20 (m, 2.5H, H-3, H-3*, H-4*), 4.01 (ddd, 1H, H-5*), 3.95 (dd, 1H, H-6a*), 3.82 (dd, 1H, H-6b*), 2.06 (s, 1.5H, -COCH₃), 2.05 (s, 3H, -COCH₃*), 1.53 (s, 3H, -CCH₃*), 1.31 (s, 3H, -CCH₃*) ppm.

$J_{1,2} = 1.3$, $J_{2,4} = 1.3$, $J_{3,4} = 4.8$, $J_{1*,2*} = 7.4$, $J_{2*,3*} = 6.3$, $J_{5*,6a*} = 7.4$, $J_{5*,6b*} = 4.1$, $J_{6a*,6b*} = 11.9$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ = 186.00 (C-6), 126.44 (CH-*p*NP), 126.26 (CH-*p*NP*), 120.00 (C-4), 117.38 (CH-*p*NP), 116.80 (CH-*p*NP*), 98.12 (C-1*), 94.94 (C-1), 76.93 (C-3*), 74.20 (C-5*), 73.79 (C-4*), 72.24 (C-2*), 70.00 (C-2), 63.00 (C-3), 62.64 (C-6*), 27.81 ($\text{C}\underline{\text{CH}}_3^*$), 26.58 ($\text{C}\underline{\text{CH}}_3^*$), 21.86 (-CO $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 21.45 (-CO $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3^*$) ppm.

4-Nitrophenyl-6-*O*-tosyl- β -D-galactopyranosid (95)C₁₉H₂₁NO₁₀S

455.44 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 81 °C

[α]_D²⁰ = -100 ° (c = 0.50 g/100 ml, CH₃OH)*R*_F = 0.49 (DCM/MeOH 6:1)

Ausbeute: 51 %

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus 1.80 g (5.97 mmol) *p*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (**45**) in 25 ml Pyridin werden 1.40 g (7.34 mmol) Tosylchlorid, gelöst in Pyridin, getropft. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Zugabe von 100 ml Wasser abgebrochen. Das Produkt wird mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase erst mit 5 %iger Salzsäure, dann mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (LM DCM/MeOH 7:1) gereinigt. Es werden 1.40 g (3.07 mmol, 51 %) 4-Nitrophenyl-6-*O*-tosyl- β -D-galactopyranosid erhalten.

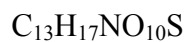
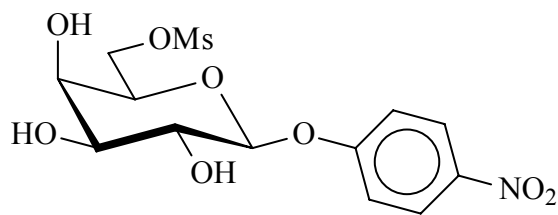
¹H-NMR (500 MHz, MeOD)

δ = 8.19 (m, 2H, *p*NP), 7.74 (m, 2H, CH-Ts), 7.31 (m, 2H, CH-Ts), 7.17 (m, 2H, *p*NP), 5.00 (d, 1H, H-1), 4.31 (dd, 1H, H-6a), 4.27 (dd, 1H, H-6b), 4.05 (dd, 1H, H-5), 3.89 (d, 1H, H-4), 3.81 (dd, 1H, H-2), 3.61 (dd, 1H, H-3), 2.40 (s, 3H, CH₃-Ts) ppm.

$J_{1,2} = 7.9$, $J_{2,3} = 9.8$, $J_{3,4} = 3.5$, $J_{5,6a} = 4.1$, $J_{5,6b} = 7.9$, $J_{6a,6b} = 10.7$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD)

δ = 164.11, 146.95, 144.29, 134.71 (2 x C-*p*NP, 2 x C-Ts), 131.37 (CH-Ts), 129.62 (CH-Ts), 127.10 (CH-*p*NP), 118.19 (CH-*p*NP), 102.15 (C-1), 74.76, 74.73 (C-3, C-5), 72.08 (C-2), 71.16 (C-6), 70.35 (C-4), 21.93 (CH₃-Ts) ppm.

4-Nitrophenyl-6-*O*-mesyl- β -D-galactopyranosid (96)

379.3 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 155 °C

 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -93^\circ$ (c = 0.25 g/100 ml, CH₃OH) $R_{\text{F}} = 0.50$ (DCM/MeOH 4:1)

Ausbeute: 63 %

ber.: C 41.16 H 4.52 N 3.69

gef.: C 41.10 H 4.65 N 3.68

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus 180 mg (0.598 mmol) *p*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (**45**) in 7.5 ml Pyridin werden 57.5 μ l (0.745 mmol) Mesylchlorid getropft. Nach 5 ½ h Rühren bei 0 °C wird die Reaktion durch Zugabe von Wasser abgebrochen. Die Lösungsmittel werden am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (LM DCM/MeOH 7:1) gereinigt. Es werden 143 mg (0.376 mmol, 63 %) 4-Nitrophenyl-6-*O*-mesyl- β -D-galactopyranosid erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O)

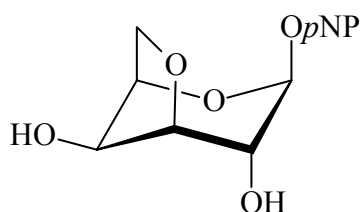
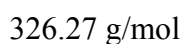
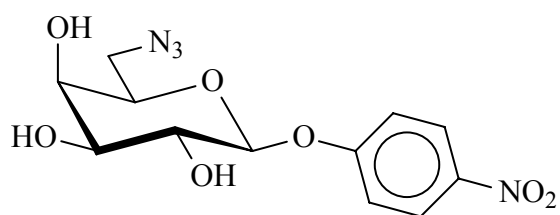
δ = 8.12 (m, 2H, *p*NP), 7.10 (m, 2H, *p*NP), 5.10 (d, 1H, H-1), 4.41 (dd, 1H, H-6a), 4.35 (dd, 1H, H-6b), 4.11 (dd, 1H, H-5), 3.93 (d, 1H, H-4), 3.75 (dd, 1H, H-2), 3.67 (dd, 1H, H-3), 3.00 (s, 3H, CH₃-Ms) ppm.

$J_{1,2} = 7.6$, $J_{2,3} = 10.2$, $J_{3,4} = 3.3$, $J_{5,6a} = 3.8$, $J_{5,6b} = 8.2$, $J_{6a,6b} = 11.2$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O)

δ = 162.05 (C-*p*NP), 146.95 (C-*p*NP), 126.44 (CH-*p*NP), 116.85 (CH-*p*NP), 100.06 (C-1), 73.42 (C-5), 72.61 (C-3), 70.50 (C-2), 70.03 (C-6), 68.50 (C-4), 36.95 (CH₃-Ms) ppm.

4-Nitrophenyl-6-azido-6-desoxy- β -D-galactopyranosid (**97**) und 4-Nitrophenyl-3,6-anhydro- β -D-galactopyranosid (**99**)



weißer Feststoff

Smp. 205 °C (Zersetzung)

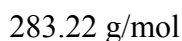
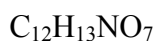
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -224^\circ$ ($c = 0.15 \text{ g/100 ml}$, CH_3OH)

$R_F = 0.35$ (DCM/MeOH 5:1)

Ausbeute: 60 %

ber.: C 44.17 H 4.32 N 17.17

gef.: C 44.19 H 4.52 N 16.54



$R_F = 0.40$ (DCM/MeOH 5:1)

1. Synthese ausgehend von Tosylat **95**

1.46 g (3.21 mmol) 4-Nitrophenyl-6-*O*-tosyl- β -D-galactopyranosid (**95**) werden mit 1.05 g (16.2 mmol) Natriumazid in 40 ml abs. DMF gelöst und 14 h bei 80 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird dann auf Raumtemperatur gekühlt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, nach Filtration im Vakuum konzentriert und anschließend flashchromatographisch an Kieselgel (LM DCM/MeOH 12:1) gereinigt. Es werden 0.63 g (1.93 mmol, 60 %) 4-Nitrophenyl-6-azido-6-desoxy- β -D-galactopyranosid erhalten.

2. Synthese ausgehend von Mesylat **96**

117 mg (0.31 mmol) 4-Nitrophenyl-6-*O*-mesyl- β -D-galactopyranosid (**96**) werden mit 100 mg (1.54 mmol) Natriumazid in 4 ml abs. DMF gelöst und 5 h bei 80 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird dann auf Raumtemperatur gekühlt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird flashchromatographisch an Kieselgel (LM DCM/MeOH 12:1) gereinigt. Es werden 53 mg (0.19 mmol, 60 %) 4-Nitrophenyl-3,6-anhydro- β -D-galactopyranosid (**99**) und 39 mg (0.12 mmol, 39 %) 4-Nitrophenyl-6-azido-6-desoxy- β -D-galactopyranosid (**97**) erhalten.

4-Nitrophenyl-6-azido-6-desoxy- β -D-galactopyranosid (**97**): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD)

δ = 8.22 (m, 2H, *p*NP), 7.25 (m, 2H, *p*NP), 5.08 (d, 1H, H-1), 3.93 (ddd, 1H, H-5), 3.84 (m, 2H, H-2, H-4), 3.65 (dd, 1H, H-6a), 3.63 (dd, 1H, H-3), 3.35 (dd, 1H, H-6b) ppm.

$J_{1,2} = 7.6$, $J_{2,3} = 9.9$, $J_{3,4} = 3.3$, $J_{4,5} = 1.0$, $J_{5,6a} = 8.4$, $J_{5,6b} = 4.1$, $J_{6a,6b} = 12.7$ Hz.

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

δ = 127.01 (CH-*p*NP), 118.08 (CH-*p*NP), 102.31 (C-1), 76.38 (C-5), 74.85 (C-3), 72.15, 70.90 (C-2, C-4), 52.94 (C-6) ppm.

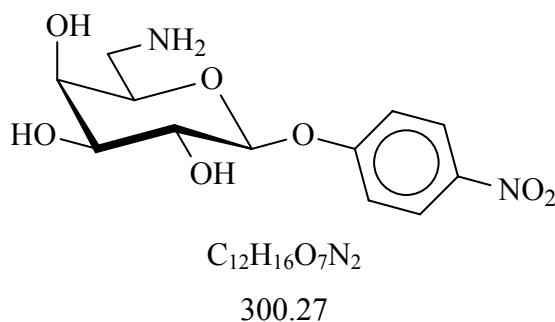
4-Nitrophenyl-3,6-anhydro- β -D-galactopyranosid (**99**): $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)

δ = 8.21 (m, 2H, *p*NP), 7.19 (m, 2H, *p*NP), 5.82 (d, 1H, OH-2), 5.44 (s, 1H, H-1), 5.38 (d, 1H, OH-4), 4.27 (dd, 1H, H-4), 4.22 (dd, 1H, H-5), 4.09 (d, 1H, H-3), 4.05 (dd, 1H, H-2), 3.85 (d, 1H, 6a), 3.80 (dd, 1H, H-6b) ppm.

$J_{\text{OH-2,2}} = 4.6$, $J_{2,3} = 4.6$, $J_{\text{OH-4,4}} = 3.8$, $J_{4,5} = 1.8$, $J_{5,6b} = 2.8$, $J_{6a,b} = 9.7$ Hz.

 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6)

δ = 162.00 (C-*p*NP), 141.80 (C-*p*NP), 126.17 (CH-*p*NP), 116.89 (CH-*p*NP), 99.67 (C-1), 80.91 (C-3), 78.57 (C-5), 72.54 (C-2), 69.94 (C-6), 69.38 (C-4) ppm.

4-Nitrophenyl-6-amino-6-desoxy- β -D-galactopyranosid (**98**)

gelber Feststoff

Smp. 188 °C (Zersetzung)

 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -66^\circ$ ($c = 0.28$ g/100 ml, CH_3OH) $R_{\text{F}} = 0.36$ (PrOH/ H_2O /25 %ige NH_3 -Lsg. 7:3:0.1)

Ausbeute: 94 %

ber.: C 48.00 H 5.37 N 9.33

gef.: C 44.55 H 5.69 N 7.74

Zu einer Lösung aus 90 mg (0.27 mmol) *p*-Nitrophenyl-6-azido-6-desoxy- β -D-galactopyranosid (**97**) in 13.5 ml THF/Wasser 4:1 werden 93 mg (0.35 mmol) Triphenylphosphin gegeben. Die Reaktionslösung wird mit 290 mg Kieselgel versetzt und 14 h bei 50 °C gerührt. Nach Abdestillieren der Lösungsmittel wird der erhaltene Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel (1. LM EE/MeOH 2:1 + 3 % Pyridin, 2. LM EE/MeOH 1:4 + 3 % Pyridin) gereinigt. 76 mg (0.25 mmol, 94 %) 4-Nitrophenyl-6-amino-6-desoxy- β -D-galactopyranosid können isoliert werden. Eine leichte Verunreinigung des Amins **98**, vermutlich mit Kieselgel, bedingt durch dessen säulenchromatographische Reinigung mit dem sehr polaren Laufmittel EE/MeOH 1:4 + 3 % Pyridin, konnte mittels Verbrennungsanalyse festgestellt werden.

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

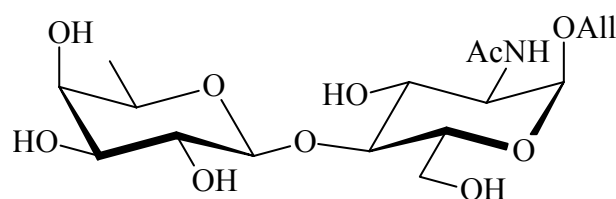
δ = 8.30 (m, 2H, *p*NP), 7.33 (m, 2H, *p*NP), 5.16 (d, 1H, H-1), 3.99 (d, 1H, H-4), 3.93 (m, 2H, H-2, H-5), 3.72 (dd, 1H, H-3), 3.22 (dd, 1H, H-6a), 3.10 (dd, 1H, H-6b) ppm.

$J_{1,2} = 7.6$, $J_{2,3} = 9.7$, $J_{3,4} = 3.3$, $J_{5,6a} = 7.6$, $J_{5,6b} = 4.3$, $J_{6a,6b} = 13.5$ Hz.

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

δ = 164.22 (C-*p*NP), 143.00 (C-*p*NP), 127.08 (CH-*p*NP), 118.06 (CH-*p*NP), 102.44 (C-1), 75.71 (C-5), 74.89 (C-3), 72.09 (C-2), 71.43 (C-4), 42.90 (C-6) ppm.

Allyl- β -D-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (**102**)



$\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{NO}_{10}$

407.40 g/mol

farbloser Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 52^\circ$ ($c = 0.25$ g/100 ml, H_2O)

$R_{\text{F}} = 0.56$ (iPrOH/ NH_3 / H_2O 5:1:2)

Ausbeute: 76 %

33 mg (116 μmol) 4-Nitrophenyl- β -D-fucopyranosid (**100**) und 302 mg (1.16 mmol, 10 äq.) Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (**46**) werden nach AAV1 umgesetzt. Es werden 36 mg (88 μmol , 76 %) **102** erhalten.

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

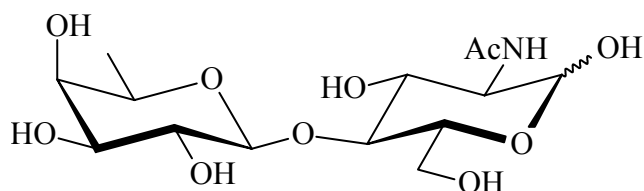
$\delta = 5.80 - 5.65$ (m, 1 H, CH-All), 5.14 (d, 1H, $=\text{CH}_2\text{-All}$), 5.02 (d, 1H, $=\text{CH}_2\text{-All}$), 4.71 (d, 1H, H-1), 4.20 (d, 1H, H-1'), 4.00 (dd, 1H, $-\text{CH}_2\text{-All}$), 3.92 (dd, 1H, $-\text{CH}_2\text{-All}$), 3.91 (dd, 1H, H-2), 3.88 – 3.78 (m, 5H, H-3, H-5, H-6a, H-6b, H-5'), 3.72 (d, 1H, H-4'), 3.66-3.60 (m, 2H, H-4, H-3'), 3.46 (dd, 1H, H-2'), 1.82 (s, 3H, NHAc), 1.01 (d, 3H, H-6') ppm.

$J_{1,2} = 3.1$, $J_{2,3} = 10.7$, $J_{1',2'} = 7.6$, $J_{2',3'} = 9.7$, $J_{3',4'} = 3.3$, $J_{5',6'} = 6.4$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{c}} = 10.4$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{t}} = 17.3$, $J_{\text{CH-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 5.6$, $J_{\text{CH-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 5.4$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 12.5$ Hz.

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

$\delta = 174.78$ (CO-NHAc), 133.97 (CH-All), 118.36 ($=\text{CH}_2\text{-All}$), 103.37 (C-1'), 96.19 (C-1), 79.83 (C-4), 73.11 (C-3'), 71.56 (C-4'), 71.46 (C-3 oder C-5'), 71.06 (C-2'), 70.92 (C-3 oder C-5'), 71.01 (C-5), 69.00 ($-\text{CH}_2\text{-All}$), 60.31 (C-6), 53.67 (C-2), 22.24 ($\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 15.71 (C-6') ppm.

$\beta\text{-D-Fucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-2-acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose (103)$



gelber Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -10^\circ$ ($c = 0.1$ g/100 ml, H_2O)

$R_{\text{F}} = 0.36$ (EE/MeOH/ H_2O 7:3:1)

Ausbeute: 66 %

$\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_{10}$

367.33 g/mol

40 mg (140 μmol) 4-Nitrophenyl- $\beta\text{-D-fucopyranosid (100)}$ und 300 mg (1.36 mmol, 10 äq.) *N*-Acetyl-D-glucosamin (**23**) werden nach AAV2 umgesetzt. Es werden 34 mg (93 μmol , 66 %) **103** erhalten.

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

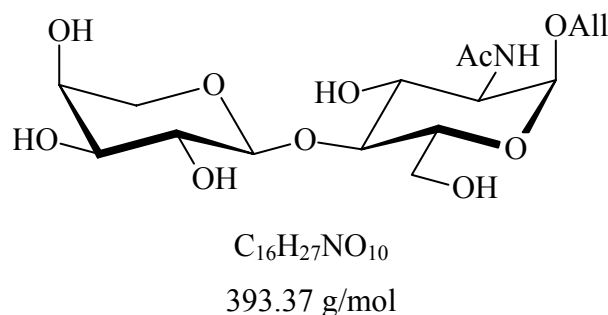
$\delta = 5.33$ (d, 0.6H, H-1 α), 4.63 (m, 0.4H, H-1 β), 4.56 (d, 1H, H-1'), 4.12 – 4.06 (m, 1.1H, H-5 α , H-6a α), 4.04 - 3.95 (m, 4H, H-2 α , H-3 α , H-6b α , H-5 β , H-6a β , H-6b β , H-5'), 3.89 (d, 1H, H-4'), 3.82 – 3.77 (m, 2.8H, H-4 α , H-2 β , H-3 β , H-4 β , H-3'), 3.63 (m, 1H, H-2'), 2.18 (s, 3H, NHAc), 1.38 (d, 3H, H-6') ppm.

$J_{1\alpha,2\alpha} = 2.3$, $J_{1',2'} = 7.9$, $J_{2',3'} = 9.9$, $J_{3',4'} = 3.3$, $J_{5',6'} = 6.4$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O)

$\delta = 173.78$ (CO-NHAc), 103.39 (C-1'), 95.21 (C-1 β), 90.91 (C-1 α), 79.88 (C-4 α), 75.11 (C-4 β), 73.09 (C-3'), 72.92 (C-3 β), 71.56 (C-4'), 71.46 (C-5'), 71.05 (C-2'), 70.54 (C-3 α), 69.68 (C-5), 60.52, 60.37 (C-6 α und β), 56 (C-2 β), 54.09 (C-2 α), 22.56, 22.27 (CH_3 -NHAc α und β), 15.70 (C-6')

Allyl- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (104**)**



farbloser Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 40^\circ$ ($c = 0.20$ g/100 ml, H_2O)

$R_F = 0.60$ (iPrOH/ NH_3 / H_2O 5:1:2)

Ausbeute: 13 %

32 mg (116 μmol) 4-Nitrophenyl- α -L-arabinopyranosid (**101**) und 302 mg (1.16 mmol, 10 äq.) Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (**46**) werden nach AAV1 umgesetzt. Es werden 6 mg (15 μmol , 13 %) **104** erhalten.

^1H -NMR (400 MHz, D_2O)

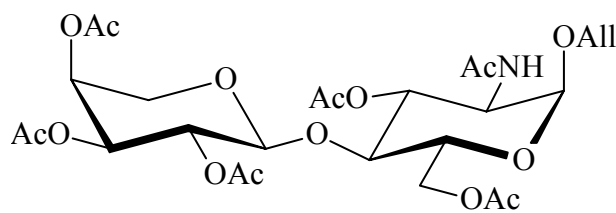
$\delta = 5.97 - 5.86$ (m, 1 H, CH-All), 5.31 (dd, 1H, =CH₂-All), 5.22 (dd, 1H, =CH₂-All), 4.89 (d, 1H, H-1), 4.33 (d, 1H, H-1'), 4.17 (dd, 1H, -CH₂-All), 4.00 (dd, 1H, -CH₂-All), 3.93 – 3.78, 3.67-3.61 (2 x m, 1 x 7H, 1 x 3H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b, H-3', H-4', H-5a', H-5b'), 3.51 (dd, 1H, H-2'), 2.00 (s, 3H, NHAc) ppm.

$J_{1,2} = 3.3$, $J_{1',2'} = 7.6$, $J_{2',3'} = 9.7$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{c}} = 10.4$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{t}} = 17.3$, $J_{=\text{CH}_2\text{c},=\text{CH}_2\text{t}} = 1.5$, $J_{\text{CH-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 5.3$, $J_{\text{CH-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 6.4$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 13.2$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O)

$\delta = 173.00$ (CO-NHAc), 133.98 (CH-All), 118.35 ($=\text{CH}_2$ -All), 103.75 (C-1'), 96.24 (C-1), 79.15 (C-4), 72.64 (C-3'), 71.38 (C-2'), 71.07 (C-5), 69.84 (C-3), 68.98 ($-\text{CH}_2$ -All), 68.69 (C-4'), 66.80 (C-5'), 60.25 (C-6), 53.79 (C-2), 22.25 (CH_3 -NHAc) ppm.

Allyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (104b)



$\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{NO}_{15}$

603.54 g/mol

6 mg (15 μmol) **104** werden über Nacht in 0.2 ml Pyridin und 0.1 ml Essigsäureanhydrid gerührt. Das Produkt wird säulenchromatographisch an Kieselgel (LM PE/EE 2:1) gereinigt. Es werden 2 mg Allyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosid erhalten.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3)

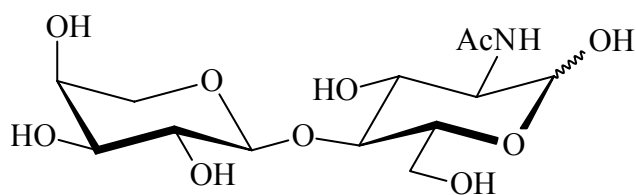
$\delta = 5.86 - 5.76$ (m, 1 H, CH-All), 5.63 (d, 1H, NH), 5.25 – 5.12 (m, 4H, H-3, H-4', 2 x $=\text{CH}_2$ -All), 5.01 (dd, 1H, H-2'), 4.94 (dd, 1H, H-3'), 4.75 (d, 1H, H-1), 4.40 (d, 1H, H-1'), 4.33 (dd, 1H, H-6a), 4.18 (ddd~dt, 1H, H-2), 4.09 (dddd~ddt, 1H, $-\text{CH}_2$ -All), 4.05 (dd, 1H, H-6b), 3.91 (dddd~ddt, 1H, $-\text{CH}_2$ -All), 3.88 (dd, 1H H-5a'), 3.81 (ddd, 1H, H-5), 3.71 (dd~t, 1H, H-4), 3.50 (dd, 1H, H-5b'), 2.05, 2.04, 2.00, 1.96, 1.94, 1.88 (6 x s, 6 x 3H, 6 x Ac) ppm.

$J_{1,2} = 3.8$, $J_{2,3} = 10.2$, $J_{2,\text{NH}} = 9.7$, $J_{3,4} = 8.9$, $J_{4,5} = 9.9$, $J_{5,6a} = 2.3$, $J_{5,6b} = 4.3$, $J_{6a,6b} = 11.5$, $J_{1',2'} = 6.4$, $J_{2',3'} = 8.9$, $J_{3',4'} = 3.3$, $J_{4',5a'} = 3.8$, $J_{4',5b'} = 1.8$, $J_{5a',5b'} = 12.5$, $J_{\text{CH-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 5.3$, $J_{\text{CH-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 6.4$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 13.2$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3)

δ = 172.2, 171.44, 170.6 (6 x CO-Ac), 133.51 (CH-All), 118.82 ($=\text{CH}_2$ -All), 101.66 (C-1'), 96.68 (C-1), 77.38 (C-4), 72.34 (C-3), 70.45 (C-3'), 70.00 (C-2'), 69.11 ($-\text{CH}_2$ -All), 68.92 (C-5), 67.61 (C-4'), 63.19 (C-6), 62.60 (C-5'), 52.33 (C-2), 23.63, 21.32, 21.28, 21.22, 21.11, 21.01 (6 x CH_3 -Ac) ppm.

α -L-Arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose (105**)**



$\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_{10}$

367.33 g/mol

40 mg (150 μmol) 4-Nitrophenyl- α -L-arabinopyranosid (**101**) und 300 mg (1.36 mmol, 9 äq.) *N*-Acetyl-D-glucosamin (**23**) werden nach AAV2 umgesetzt. Es werden 3 mg (10 μmol , 6 %) **105** erhalten.

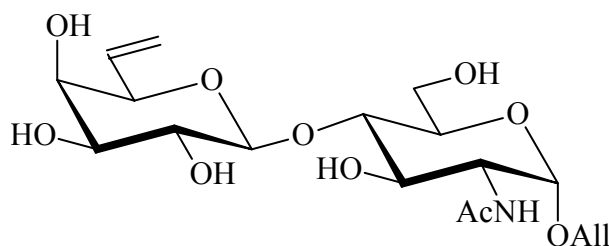
^1H -NMR (400 MHz, D_2O)

δ = 5.15 (bs, 0.6 H, H-1 α), 4.67 (d, 0.4H, H-1 β), 4.33 (d, 1H, H-1'), 3.93 – 3.76 (m, 6H, H-2 α , H-3, H-5, H-6a, H-6b, H-4', H-5a'), 3.64-3.59 (m, 4H, H-2 β , H-4, H-3', H-5b'), 3.55-3.46 (m, 1.6 H, H-4 α oder β , H-2'), 1.99 (s, 3H, NHAc) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O)

δ = 103.76 (C-1'), 95.26 (C-1 β), 90.96 (C-1 α), 79.20 (C-4), 72.63 (C-3'), 71.38 (C-2'), 70.70, 69.51, 68.70 (C-3, C-5, C-4'), 66.81 (C-5'), 60.32 (C-6), 54.22 (C-2), 22.29 (CH_3 -NHAc) ppm.

Allyl-6,7-didesoxy- β -D-*galacto*-hept-6-enopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (106**)**



farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = -136^\circ$ ($c = 0.25$ g/100 ml, H_2O)

$R_F = 0.59$ (EE/MeOH/ H_2O 7:3:1)

Ausbeute: 31 %

$C_{18}H_{29}NO_{10}$

419.4 g/mol

32 mg (108 μ mol) 4-Nitrophenyl-6,7-dideoxy- β -D-*galacto*-hept-6-enopyranosid (**56**) und 224 mg (861 μ mol, 8 äq.) Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (**46**) werden nach AAV1 umgesetzt. Es werden 14 mg (33 μ mol, 31 %) **106** erhalten.

1H -NMR (400 MHz, D_2O)

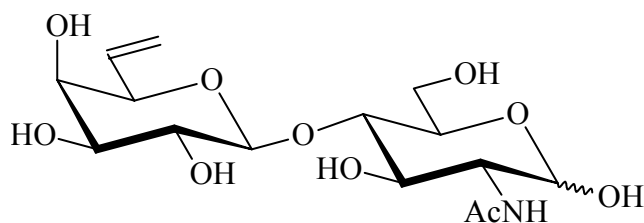
$\delta = 5.83$ (dddd, 1 H, CH-All), 5.78 (ddd, 1H, H-6'), 5.24 (m, 1H, H-7'c), 5.20 (m, 2H, =CH₂-All, H-7't), 5.12 (dd, 1H, =CH₂-All), 4.80 (d, 1H, H-1), 4.38 (d, 1H, H-1'), 4.12 (dd, 1H, H-5'), 4.09 (dddd~ddt, 1H, -CH₂-All), 3.91 (dddd~ddt, 1H, -CH₂-All), 3.82-3.71 (m, 6H, H-2, H-3, H-5, H-6a, H-6b, H-4'), 3.59 (m, 2H, H-3', H-4), 3.42 (dd, 1H, H-2'), 1.92 (s, 3H, NHAc) ppm.

$J_{1,2} = 3.1$, $J_{1',2'} = 7.9$, $J_{2',3'} = 9.9$, $J_{3',4'} = 3.6$, $J_{4',5'} = 1.3$, $J_{5',6'} = 5.3$, $J_{6',7'c} = 10.9$, $J_{6',7't} = 17.6$, $J_{7'c,7't} = 1.8$, $J_{CH-All,=CH_2c} = 10.4$, $J_{CH-All,=CH_2t} = 23.4$, $J_{=CH_2c,=CH_2t} = 1.5$, $J_{CH-All,CH_2-All} = 5.3$, $J_{CH-All,CH_2-All} = 5.1$, $J_{CH_2-All,CH_2-All} = 13.0$, $J_{CH_2-All,=CH_2} = 1.5$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O)

$\delta = 175.00$ (CO-NHAc), 133.93, 133.44 (C-6', CH-All), 118.34, 118.11 (C-7', =CH₂-All), 103.43 (C-1'), 96.17 (C-1), 79.65 (C-4), 75.60 (C-5'), 72.90 (C-3'), 71.03 (C-2'), 70.96, 70.89, 69.92 (C-3, C-5, C-4'), 68.97 (-CH₂-All), 60.23 (C-6), 53.65 (C-2), 22.22 (CH₃-NHAc) ppm.

6,7-didesoxy- β -D-galacto-hept-6-enopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose (107)



weißer Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = 224^\circ$ ($c = 0.13$ g/100 ml, H_2O)

$R_F = 0.36$ (iPrOH/ NH_3 / H_2O 5:1:2)

Ausbeute: 20 %

$C_{15}H_{25}NO_{10}$

379.3 g/mol

10 mg (34 μ mol) 4-Nitrophenyl-6,7-dideoxy- β -D-galacto-hept-6-enopyranosid (**56**) und 75 mg (340 μ mol, 10 äq.) *N*-Acetyl-D-glucosamin (**23**) werden nach AAV2 umgesetzt. Es werden 3 mg (7 μ mol, 20 %) **107** erhalten.

1H -NMR (400 MHz, D_2O)

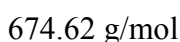
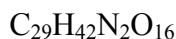
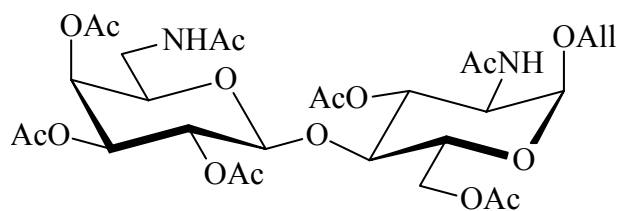
$\delta = 5.73$ (ddd, 1 H, H-6'), 5.18 (dd, 1H, H-7't), 5.14 (dd, 1H, H-7'c), 5.02 (d, 0.7H, H-1 α), 4.52 (d, 0.3H, H-1 β), 4.28 (d, 1H, H-1'), 4.07 (m, 1H, H-5'), 3.80-3.32 (m, 9H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b, H-2', H-3', H-4'), 1.85 (s, 3H, NHAc) ppm.

$J_{1\alpha,2} = 2.3$, $J_{1\beta,2} = 7.6$, $J_{1',2'} = 7.9$, $J_{5',6'} = 5.1$, $J_{6',7'c} = 10.9$, $J_{6',7't} = 17.6$, $J_{7'c,7't} = 1.3$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O)

$\delta = 133.47$ (C-6'), 118.14 (C-7'), 103.50, 103.34 (C-1'), 95.27 (C-1 β), 90.94 (C-1 α), 79.24, 78.82 (C-4 β), 75.76 (C-4 α), 75.64 (C-5'), 75.25, 72.92, 71.83, 71.06, 70.92, 70.67, 70.61, 69.68, 68.96 (C-3, C-5, C-2', C-3', C-4'), 60.50, 60.38 (C-6), 56.63 (C-2 β), 54.12 (C-2 α), 22.57, 22.28 (CH_3 -NHAc) ppm.

Allyl-6-acetamido-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (108)



36 mg (116 μmol) 4-Nitrophenyl-6-amino-6-desoxy- β -D-galactopyranosid (**98**) und 300 mg (1.16 mmol, 10 äq.) Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (**46**) werden nach AAV1 umgesetzt.

Von den erhaltenen 356 mg gelben Feststoffes werden 114 mg in 2 ml abs. Pyridin gelöst, im Wasserbad gekühlt und tropfenweise mit 1 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wird dreimal mit Toluol codestilliert. Der erhaltene Rückstand wird zweimal säulenchromatographisch (LM PE/EE 1:4 und DCM/MeOH 6:1) gereinigt. Es werden 2 mg sauberes Produkt, Allyl-6-acetamido-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosid, isoliert.

^1H -NMR (500 MHz, MeOD)

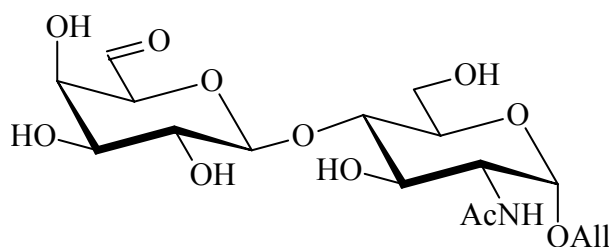
δ = 5.87 (dddd, 1 H, CH-All), 5.23 (d, 1H, =CH₂-All), 5.17 (d, 1H, H-4'), 5.14-5.09 (m, 2H, =CH₂-All, H-3), 4.95 (dd, 1H, H-3'), 4.89 (dd, 1H, H-2'), 4.69 (d, 1H, H-1), 4.55 (d, 1H, H-1'), 4.37 (dd, 1H, H-6a), 4.13-4.08 (m, 2H, -CH₂-All, H-2), 4.04 (dd, 1H, H-6b), 3.95 (dd, 1H, -CH₂-All), 3.84-3.79 (m, 2H, H-5, H-5'), 3.75 (dd, 1H, H-4), 3.36 (dd, 1H, H-6a'), 3.12 (dd, 1H, H-6b'), 2.04 (s, 3H, Ac), 2.00 (s, 3H, Ac), 1.96 (s, 3H, Ac), 1.94 (s, 3H, Ac), 1.83 (s, 6H, 2 x Ac), 1.81 (s, 3H, Ac) ppm.

$J_{1,2} = 3.8$, $J_{3,4} = 8.8$, $J_{4,5} = 10.1$, $J_{5,6a} = 1.9$, $J_{5,6b} = 6.0$, $J_{6a,6b} = 12.0$, $J_{1',2'} = 7.9$, $J_{2',3'} = 10.4$, $J_{3',4'} = 3.5$, $J_{5',6a'} = 8.2$, $J_{5',6b'} = 6.3$, $J_{6a',6b'} = 13.6$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{c}} = 10.7$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{t}} = 17.0$, $J_{\text{CH-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 6.3$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 12.9$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD)

δ = 131.68 (CH-All), 117.49 ($=\text{CH}_2$ -All), 100.85 (C-1'), 96.35 (C-1), 76.48 (C-4), 71.58 (C-3, C-3'), 69.75 (C-2' und C-5 oder C-5'), 69.06 (C-5 oder C-5'), 68.62 ($-\text{CH}_2$ -All), 67.43 (C-4'), 62.68 (C-6), 52.59 (C-2), 38.02 (C-6'), 21.30 – 19.60 (7 x CH_3 -Ac) ppm.

Allyl- β -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (109)



$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{NO}_{11}$

421.4 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 219 °C (Zers.)

$[\alpha]_D^{20} = 7^\circ$ (c = 0.15 in H_2O)

$R_F = 0.31$ (iPrOH/ NH_3 / H_2O 5:1:2)

Ausbeute: 68 %

70 mg (0.22 mmol) 4-Nitrophenyl- β -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranosid (**36**) und 300 mg (1.15 mmol, 5.2 äq.) Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid werden (**46**) in 4 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 nach Zugabe von 600 μl einer Lösung aus 10 mg β -Galactosidase aus *B. circulans* in 1 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 (30 U) umgesetzt. Nach drei Tagen Rühren bei Raumtemperatur wird Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. Der Rückstand wird gelpermeationschromatographisch an Sephadex LH 20 mit Methanol/Wasser 1:1 als Eluent gereinigt. Es werden 65 mg (0.15 mmol, 68 %) **109** erhalten.

MALDI-TOF (DHB, positive mode): 444.2 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 460.1 ($\text{M} + \text{K}^+$)

^1H -NMR (400 MHz, D_2O)

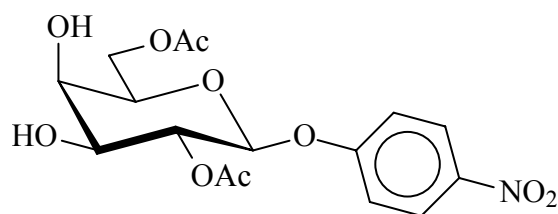
δ = 6.05 (ddd, 1 H, CH-All), 5.44 (dd, 1H, $=\text{CH}_2$ -All), 5.35 (dd, 1H, $=\text{CH}_2$ -All), 5.21 (d, 1H, H-6'), 5.01 (d, 1H, H-1), 4.57 (d, 1H, H-1'), 4.30 (dd, 1H, $-\text{CH}_2$ -All), 4.17 (d, 1H, H-4'), 4.12 (dd, 1H, $-\text{CH}_2$ -All), 4.03-3.91 (m, 5H, H-2, H-3, H-5, H-6a, H-6b), 3.81 (dd, 1H, H-4), 3.75 (dd, 1H, H-3'), 3.64 (dd, 1H, H-2'), 3.54 (dd, 1H, H-5'), 2.11 (s, 3H, NHAc) ppm.

$J_{1,2} = 3.1$, $J_{1',2'} = 8.1$, $J_{2',3'} = 10.7$, $J_{3',4'} = 3.6$, $J_{5',6'} = 7.1$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{c}} = 10.7$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{t}} = 17.3$, $J_{=\text{CH}_2\text{c},=\text{CH}_2\text{t}} = 1.5$, $J_{\text{CH-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 5.6$, $J_{\text{CH-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 6.6$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 13.2$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O)

$\delta = 175.00$ (CO-NHAc), 133.93 (CH-All), 118.34 ($=\text{CH}_2$ -All), 103.60 (C-1'), 96.12 (C-1), 88.39 (C-6'), 80.04 (C-4), 77.29 (C-5'), 72.83 (C-3'), 71.08 (C-2'), 70.82 (C-5), 70.06 (C-3), 68.97 ($-\text{CH}_2$ -All), 68.38 (C-4'), 60.35 (C-6), 53.59 (C-2), 22.23 (CH_3 -NHAc) ppm.

4-Nitrophenyl-2,6-di-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosid (112) und 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosid (113)



$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_{10}$
385.33 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 177 °C

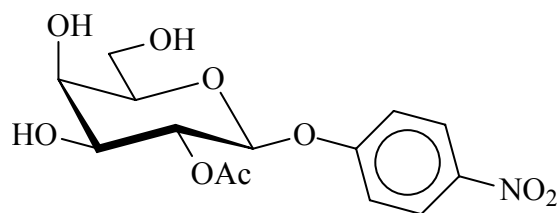
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -40^\circ$ ($c = 6$ mg/2 ml, MeOH)

$R_F = 0.35$ (DCM/MeOH 10:1)

Ausbeute: quantitativ

ber.: C 49.85 H 4.97 N 3.64

gef.: C 49.67 H 5.00 N 3.96



$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_9$
343.29 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 204 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -12^\circ$ ($c = 5$ mg/2 ml, MeOH)

$R_F = 0.15$ (DCM/MeOH 10:1)

Ausbeute: ca. 85 %

ber.: C 48.96 H 5.00 N 4.08

gef.: C 48.51 H 5.14 N 4.19

400 mg 4-Nitrophenyl-(2,6-di-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden)- β -D-galactopyranosid (**90**) (ca. 0.58 mmol) und 4-Nitrophenyl-(2-*O*-acetyl-3,4-*O*-isopropyliden-6-*O*-2-methoxyisopropyl)- β -D-galactopyranosid (**92**) (ca. 0.34 mmol) werden in 17 ml (0.03 mmol) 90 %ige Essigsäure und 4 ml 90 %ige Trifluoressigsäure gegeben und etwa 40 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Gemisch in Toluol aufgenommen und bei 50 °C evaporiert. Der Rückstand wird noch zweimal mit Toluol ko-evaporiert. Das Produktgemisch wird mittels

Säulenchromatographie getrennt. Als Laufmittel dient ein Dichlormethan/Methanol-Gemisch (10:1). Als Fraktion 1 wird 4-Nitrophenyl-2,6-di-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosid (Produkt 1) in einer Menge von 228 mg (0.59 mmol, quantitativ) isoliert. Aus Fraktion 2 erhält man 4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosid (Produkt 2) in einer Menge von 101 mg (0.29 mmol, 85 %).

4-Nitrophenyl-2,6-di-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosid (**112**)

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

δ = 8.04 (m_c , 2H, *p*NP), 7.00 (m_c , 2H, *p*NP), 5.17 (dd, 1H, H-2), 5.08 (d, 1H, H-1), 4.17 (dd, 1H, H-6a), 4.10 (dd, 1H, H-6b), 3.87 (ddd, 1H, H-5), 3.78 (dd, 1H, H-4), 3.65 (dd, 1H, H-3), 1.91 (s, 3H, -O-Ac), 1.89 (s, 3H, -O-Ac) ppm.

$J_{1,2} = 7.9$, $J_{2,3} = 9.9$, $J_{3,4} = 3.6$, $J_{4,5} = 1.0$, $J_{5,6a} = 7.9$, $J_{5,6b} = 4.8$, $J_{6a,6b} = 11.5$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, MeOD)

δ = 170.00 ($-\underline{\text{C}}\text{O-CH}_3$), 163.69 (C- *p*NP), 127.03 (CH-*p*NP), 118.10 (CH-*p*NP), 100.09 (C-1), 75.08 (C-5), 73.42 (C-2), 73.15 (C-3), 70.58 (C-4), 64.91 (C-6), 21.29 (O-Ac-6), 21.11 (O-Ac-2) ppm.

4-Nitrophenyl-2-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosid (**113**)

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

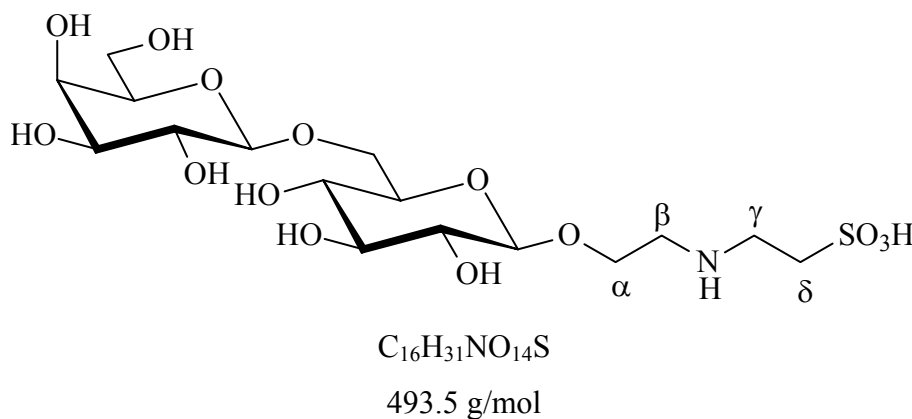
δ = 8.21 (m_c , 2H, *p*NP), 7.19 (m_c , 2H, *p*NP), 5.35 (dd, 1H, H-2), 5.23 (d, 1H, H-1), 3.97 (d, 1H, H-4), 3.81 (m, 4H, H-3, H-5, H-6a, H-6b), 2.09 (s, 3H, O-Ac-2) ppm.

$J_{1,2} = 8.1$, $J_{2,3} = 9.7$, $J_{3,4} = 3.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, MeOD)

δ = 170.00 ($-\underline{\text{C}}\text{O-CH}_3$), 163.87 (C- *p*NP), 127.06 (CH-*p*NP), 118.17 (CH-*p*NP), 100.48 (C-1), 77.92 (C-5), 73.66 (C-2), 73.37 (C-3), 70.69 (C-4), 62.69 (C-6), 21.31 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-C}$) ppm.

***N*-[2-(β-D-galactopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyloxy)ethyl]-2-aminoethansulfonsäure (115)**



weißer Sirup
 $[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$
 (c = 0.25 g/100 ml,
 H₂O)
 $R_F = 0.25$
 (PrOH/H₂O 2:1)
 Ausbeute: 50 %

70 mg (0.21 mmol) *N*-[2-(β-D-glucopyranosyloxy)ethyl]-2-aminoethansulfonsäure (**114**) und 11 mg (0.04 mmol) *para*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (**45**) werden nach AAV 1 umgesetzt. 12 mg (0.02 mmol, 50 %) **115** können isoliert werden.

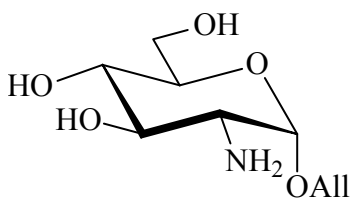
¹H-NMR (400 MHz, D₂O)

δ = 4.48 (d, 1H, H-1), 4.41 (d, 1H, H-1'), 4.19 (dd, 1H, H-6a), 4.16-4.09 (m, 1H, -CH₂-αa), 3.98-3.93 (m, 1H, -CH₂-αb), 3.90-3.87 (m, 2H, H-4', H-6a'), 3.83 (dd, 1H, H-6b), 3.76-3.60 (m, 4H, H-4, H-5, H-3', H-6b'), 3.54-3.41 (m, 5H, H-3, H-2', H-5', -CH₂-γa, -CH₂-γb), 3.34-3.30 (m, 3H, H-2, -CH₂-βa, -CH₂-βb), 3.27-3.23 (m, 2H, -CH₂-δa, -CH₂-δb) ppm.

$J_{1,2} = 7.91$, $J_{5,6a} = 2.0$, $J_{5,6b} = 5.6$, $J_{6a,6b} = 11.7$, $J_{1',2'} = 7.6$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O)

δ = 103.93 (C-1'), 102.66 (C-1), 75.77 (C-3 oder C-5'), 75.57 (C-4, C-5, C-3'), 75.28 (C-4, C-5 oder C-3'), 73.37 (C-2), 73.12 (C-4, C-5, C-3'), 71.17 (C-2'), 69.72 (C-3 oder C-5'), 69.08 (C-4'), 69.05 (C-6), 65.63 (CH₂-α), 61.43 (C-6'), 47.79 (CH₂-β), 47.24 (CH₂-δ), 43.54 (CH₂-γ) ppm.

Allyl-2-amino-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (125)

$C_9H_{17}NO_5$
219.2 g/mol

weißer, amorpher Feststoff

Lit.²⁶⁸: Smp. 117-118 °C

$[\alpha]^{20}_D = 59^\circ$ ($c = 0.65$ g/100 ml, MeOH),

Lit.²⁶⁸: $[\alpha]^{25}_D = 142.5^\circ$ ($c = 0.8$ g/100 ml, H₂O)

$R_F = 0.07$ (DCM/MeOH 4:1)

Ausbeute: quantitativ %

915 mg (3.5 mmol) α -AllGlcNAc (**46**) und 14.18 g (44.9 mmol) Bariumhydroxidooctahydrat werden in 74 ml Wasser über einen Zeitraum von 3 h bei 120 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der gebildete Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wird zur Reinigung von Bariumsalzen portionsweise mit Trockeneis versetzt, so dass Bariumcarbonat ausfällt und erneut abfiltriert werden kann. Das Filtrat wird sodann gefriergetrocknet, wonach 920 mg eines amorphen Feststoffes erhalten werden. Die theoretische maximale Ausbeute liegt bei 767 mg.

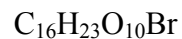
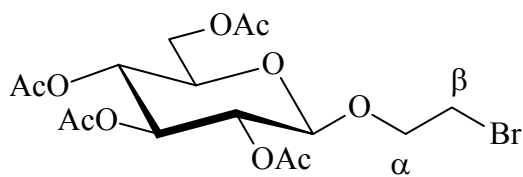
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)

$\delta = 5.96$ (dddd, 1 H, CH-All), 4.81 (dddd~dq, 1H, =CH₂-All), 5.18 (dddd~dq, 1H, =CH₂-All), 4.89 (d, 1H, H-1), 4.24 (dddd~ddt, 1H, -CH₂-All), 4.01 (dddd~ddt, 1H, -CH₂-All), 3.80 (dd, 1H, H-6a), 3.69 (dd, 1H, H-6b), 3.58 (ddd, 1H, H-5), 3.53 (dd~t, 1H, H-3 oder H-4), 3.31 (dd, 1H, H-3 oder H-4), 2.71 (dd, 1H, H-2) ppm.

$J_{1,2} = 3.6$, $J_{2,3} = 9.9$, $J_{3,4} = 9.7$, $J_{4,5} = 9.9$, $J_{5,6a} = 2.3$, $J_{5,6b} = 5.6$, $J_{6a,6b} = 12.0$, $J_{CH-All,=CH_2c} = 10.4$, $J_{CH-All,=CH_2t} = 17.3$, $J_{CH-All,CH_2-All} = 5.3$, $J_{CH-All,CH_2-All} = 6.1$, $J_{CH_2-All,CH_2-All} = 13.0$, $J_{CH_2-All,=CH_2} = 1.4$, $J_{CH_2-All,=CH_2} = 1.4$, $J_{CH-All,=CH_2} = 1.5$, $J_{CH-All,=CH_2} = 1.5$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD)

$\delta = 135.81$ (CH-All), 118.08 (=CH₂-All), 99.20 (C-1), 75.72 (C-3 oder C-4), 74.65 (C-5), 72.35 (C-3 oder C-4), 69.77 (-CH₂-All), 63.01 (C-6), 57.25 (C-2) ppm.

2-Bromethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (130)

455.25 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 106 °C

Lit.²⁶⁹: Smp. 117.3 °C $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -3^\circ$ (c = 0.99 g/100 ml, CHCl_3)Lit.²⁶⁹: $[\alpha]_{\text{D}}^{28} = -20.5^\circ$ (c = 4 g/100 ml, Aceton) $R_{\text{F}} = 0.64$ (EE/Tol 2:1)

Ausbeute: 98 %

3.59 g (7.3 mmol) *O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)trichloracetimidat (**129**) werden in 110 ml abs. Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung werden im Argon-Gegenstrom 450 μL (792 mg, 6.3 mmol) 2-Bromethanol und 9 Tropfen Bortrifluorid-Etherat hinzugegeben. Dieses Gemisch wird 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird dann unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Tol/EE 3:1) gereinigt. Es können 2.84 g (6.2 mmol, 98 %) 2-Bromethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid gewonnen werden.

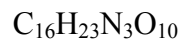
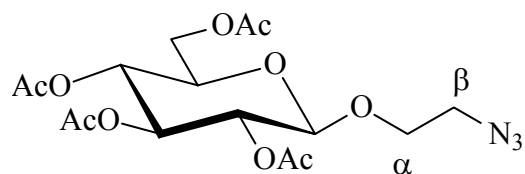
¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3):

$\delta = 5.15$ (dd, 1H, H-3), 5.02 (dd, 1H, H-4), 4.94 (dd, 1H, H-2), 4.51 (d, 1H, H-1), 4.21 (dd, 1H, H-6a), 4.05-4.11 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\alpha\text{a} + \text{H-6b}$), 3.76 (dt, 1H, $-\text{CH}_2-\alpha\text{b}$), 3.64 (ddd, 1H, H-5), 3.37-3.41 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\beta$), 2.02 (s, 3H, Ac), 2.00 (s, 3H, Ac), 1.96 (s, 3H, Ac), 1.94 (s, 3H, Ac) ppm.

$J_{1,2} = 7.9$, $J_{2,3} = 9.6$, $J_{3,4} = 9.6$, $J_{4,5} = 9.6$, $J_{5,6\text{a}} = 4.8$, $J_{5,6\text{b}} = 2.3$, $J_{6\text{a},6\text{b}} = 12.2$, $J_{-\text{CH}_2-\alpha\text{a}, -\text{CH}_2-\alpha\text{b}} = 11.2$, $J_{-\text{CH}_2-\alpha\text{b}, -\text{CH}_2-\beta} = 6.4$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 101.4$ (C-1), 73.0 (C-3), 72.4 (C-5), 71.5 (C-2), 70.2 ($-\text{CH}_2-\alpha$), 68.8 (C-4), 62.3 (C-6), 30.2 ($-\text{CH}_2-\beta$), 21.1-20.1 ($\text{CH}_3\text{-Ac}$) ppm.

2-Azidoethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (131)

417.37 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 104 °C

Lit.²⁷⁰: 114-115 °C $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -13^\circ$ (c = 2.45 g/100 ml, CHCl₃)Lit.²⁷⁰: $[\alpha]_{\text{D}} = -40^\circ$ (c = 1.5 g/100 ml, CHCl₃) $R_{\text{F}} = 0.71$ (EE/Tol 2:1)

Ausbeute: 92 %

Zunächst werden 2.84 g (6.2 mmol) 2-Bromethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (**130**) in 120 ml abs. DMF gelöst. Zu dieser Lösung werden unter Argon-Gegenstrom 3.25 g (50 mmol) Natriumazid hinzugegeben. Die gelbe Lösung wird über Nacht bei 60 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird nach beendeter Reaktion am Rotationsverdampfer entfernt. Die konzentrierte Lösung wird säulenchromatographisch gereinigt. Als Laufmittel wird ein Petrolether/Ethylacetat-Gemisch (1:1) verwendet. Nach Entfernung der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer, Waschen des kristallinen Rückstands mit Ethanol und Trocknung des Produkts im Ölpumpenvakuum werden 2.36 g (5.7 mmol, 92 %) **131** als weißer Feststoff erhalten.

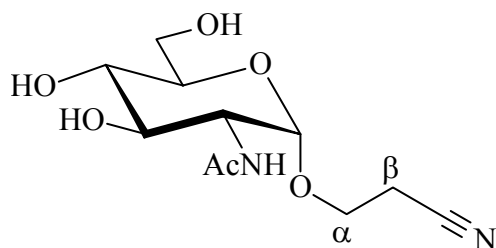
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

$\delta = 5.15$ (dd, 1H, H-3), 5.03 (dd, 1H, H-4), 4.95 (dd, 1H, H-2), 4.54 (d, 1H, H-1), 4.19 (dd, 1H, H-6a), 4.10 (dd, 1H, H-6b), 3.96 (ddd, 1H, -CH₂- α a), 3.59-3.68 (m, 2H, H-5, -CH₂- α b), 3.42 (ddd, 1H, -CH₂- β a), 3.22 (ddd, 1H, -CH₂- β b), 2.02 (s, 3H, Ac), 1.99 (s, 3H, Ac), 1.96 (s, 3H, Ac), 1.94 (s, 3H, Ac) ppm.

$J_{1,2} = 7.9$, $J_{2,3} = 9.6$, $J_{3,4} = 9.6$, $J_{4,5} = 9.6$, $J_{5,6a} = 4.7$, $J_{5,6b} = 2.4$, $J_{6a,6b} = 12.3$, $J_{\text{CH2-}\alpha\text{a}, -\text{CH2-}\alpha\text{b}} = 10.7$, $J_{-\text{CH2-}\alpha\text{a}, -\text{CH2-}\beta\text{b}} = 4.9$, $J_{-\text{CH2-}\alpha\text{a}, -\text{CH2-}\beta\text{a}} = 3.6$, $J_{-\text{CH2-}\alpha\text{b}, -\text{CH2-}\beta\text{a}} = 8.4$, $J_{-\text{CH2-}\alpha\text{b}, -\text{CH2-}\beta\text{b}} = 3.3$, $J_{\text{CH2-}\beta\text{a}, -\text{CH2}\beta\text{b}} = 13.3$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

$\delta = 170.0$ (CO-Ac), 101.1 (C-1), 73.2 (C-3), 72.3 (C-5), 71.5 (C-2), 68.9 (-CH₂- α), 68.8 (C-4), 62.3 (C-6), 50.9 (-CH₂- β), 21.1-21.0 (CH₃-Ac) ppm.

3-(2-Acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosyloxy)propionitril (133)C₁₁H₁₈N₂O₆

274.3 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 208 °C

[α]_D²⁰ = 131 ° (c = 0.23 g/100 ml, H₂O)*R*_F = 0.34 (DCM/MeOH 4:1)

Ausbeute: 42 %

ber.: C 48.16 H 6.61 N 10.21

gef.: C 47.85 H 6.63 N 10.08

4.00 g (18.1 mmol) GlcNAc (**23**) werden in 50 ml 3-Hydroxypropionitril suspendiert und mit 0.8 ml Bortrifluorid-Etherat versetzt. Der Zucker wird bei 120 °C in Lösung gebracht und 4 h bei dieser Temperatur gerührt. Der Ansatz wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert und anschließend bei 90 °C im Ölpumpenvakuum eingeeengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (DCM/MeOH 7:1 → 5:1) gereinigt. Die noch nicht vollständig von Nebenprodukten getrennten Fraktionen werden anschließend aus Dichlormethan/Methanol umkristallisiert, wobei die Verunreinigungen in der Hitze in Lösung gehen und das Produkt sauber abfiltriert werden kann. Es werden insgesamt 2.10 g (7.66 mmol, 42 %) 3-(2-Acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosyloxy)propionitril erhalten.

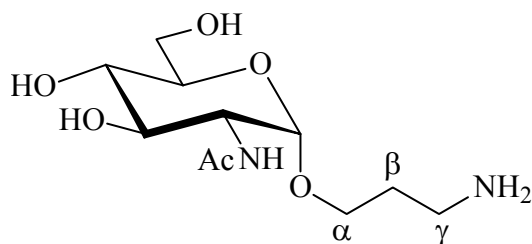
FAB (*m*-Nitrobenzylalkohol): 275.3 (M + H⁺)¹H-NMR (400 MHz, D₂O)

δ = 4.90 (d, 1H, H-1), 3.91-3.85 (m, 2H, H-2, -CH₂ α -), 3.82 (dd, 1H, H-6a), 3.76-3.66 (m, 4H, H-6b, H-3, H-5, -CH₂ α b), 3.38 (dd, 1H, H-4), 2.70 (t, 2H, -CH₂ β), 1.93 (s, 3H, NHAc) ppm.

$J_{1,2} = 3.5$, $J_{2,3} = 10.4$, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.2$, $J_{5,6a} = 1.3$, $J_{5,6b} = 4.7$, $J_{6a,6b} = 11.7$, $J_{CH2\alpha a/CH2\beta} = J_{CH2\alpha b/CH2\beta} = 5.9$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O)

δ = 174.91 (CO-NHAc), 120.37 (-CN), 97.48 (C-1), 72.61, 71.23 (C-5, C-3), 70.33 (C-4), 63.15 (-CH₂- α), 60.91 (C-6), 53.97 (C-2), 22.32 (CH₃-NHAc), 18.65 (-CH₂- β) ppm.

3-Aminopropyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (134)C₁₁H₂₂N₂O₆

278.3 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 90 °C

[α]_D²⁰ = 137 ° (c = 0.3 g/100 ml, MeOH)*R*_F = 0.26 (EE/MeOH 1:4 + 3 % Py)

Ausbeute: >43 %

575 mg (2.09 mmol) 3-(2-Acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosyloxy)propionitril (**133**) werden in 4 ml abs. Methanol suspendiert, mit einer Spatelspitze Pd/C versetzt und bei Normaldruck in einer Wasserstoffatmosphäre 6 d gerührt. Der Ansatz wird dann über Celite filtriert und eingengt. Nach säulenchromatographischer Trennung (EE/MeOH 1:4 + 3 % Py) von Edukt und Nebenprodukten können 247 mg (0.88 mmol, 43 %) 3-Aminopropyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid rein isoliert werden. Außerdem werden 375 mg einer Mischfraktion erhalten, die nicht weiter gereinigt wird.

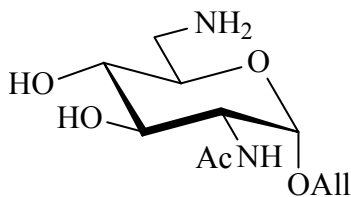
FAB (*m*-Nitrobenzylalkohol): 279.2 (M + H⁺)¹H-NMR (400 MHz, MeOD)

δ = 4.79 (d, 1H, H-1), 3.89 (dd, 1H, H-2), 3.83 (dd, 1H, H-6a), 3.77 (ddd, 1H, -CH₂ α), 3.68 (dd, 1H, H-6b), 3.64 (dd, 1H, H-3), 3.57 (ddd, 1H, H-5), 3.47 (ddd~dt, 1H, -CH₂ α b), 3.33 (dd, 1H, H-4), 2.70 (t, 2H, -CH₂ γ), 2.05 (s, 3H, NHAc), 1.89-1.75 (m, 2H, -CH₂ β) ppm.

$J_{1,2} = 3.6$, $J_{2,3} = 10.7$, $J_{3,4} = 8.9$, $J_{4,5} = 9.9$, $J_{5,6a} = 2.3$, $J_{5,6b} = 5.9$, $J_{6a,6b} = 11.7$, $J_{CH2\alpha a/CH2\alpha b} = 9.9$, $J_{CH2\alpha a/CH2\beta a} = 5.9$, $J_{CH2\alpha a/CH2\beta b} = 6.9$, $J_{CH2\alpha b/CH2\beta a} = 5.9$, $J_{CH2\alpha b/CH2\beta b} = 5.9$, $J_{CH2\beta/CH2\gamma} = 7.1$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD)

δ = 172.56 (CO-NHAc), 97.53 (C-1), 72.88 (C-5), 71.75 (C-3), 71.39 (C-4), 66.14 (-CH₂- α), 61.76 (C-6), 54.39 (C-2), 46.79 (CH₂- γ), 29.29 (-CH₂- β), 21.52 (CH₃-NHAc) ppm.

Allyl-2-acetamido-6-amino-2,6-didesoxy- α -D-glucopyranosid (140)C₁₁H₂₀N₂O₅

260.3 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 168 °C (Zersetzung)

[α]_D²⁰ = 40 ° (c = 0.22 g/100 ml, H₂O)*R*_F = 0.08 (EE/MeOH 1:9 + 3 % Py)

Ausbeute: 97 %

ber.: C 50.75 H 7.74 N 10.76

gef.: C 50.09 H 7.54 N 9.37

128 mg (0.45 mmol) Allyl-2-acetamido-6-azido-2,6-dideoxy- α -D-glucopyranosid (**138**) werden nach AAV3 umgesetzt und säulenchromatographisch (LM EE/MeOH 1:9 + 3 % Py) gereinigt. Es werden 113 mg (0.43 mmol, 97 %) Allyl-2-acetamido-6-amino-2,6-dideoxy- α -D-glucopyranosid erhalten.

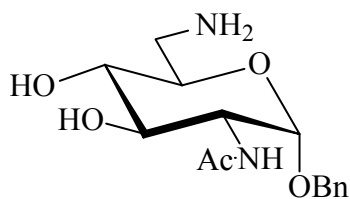
¹H-NMR (400 MHz, D₂O)

δ = 5.93 (dddd, 1H, CH-All), 5.43 (d, 1H, =CH₂-All), 5.34 (dd, 1H, =CH₂-All), 4.89 (d, 1H, H-1), 4.19 (dddd~ddt, 1H, -CH₂-All), 4.01 (dddd~ddt, 1H, -CH₂-All), 3.89 (dd, 1H, H-2), 3.71 (dd, 1H, H-3), 3.63 (ddd, 1H, H-5), 3.35 (dd, 1H, H-4), 2.98 (dd, 1H, H-6a), 2.76 (dd, 1H, H-6b), 2.00 (s, 3H, NHAc) ppm.

$J_{1,2} = 3.6$, $J_{2,3} = 10.7$, $J_{3,4} = 8.9$, $J_{4,5} = 9.9$, $J_{5,6a} = 2.5$, $J_{5,6b} = 7.4$, $J_{6a,6b} = 13.7$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{c}} = 10.4$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{t}} = 17.3$, $J_{\text{CH-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 5.3$, $J_{\text{CH-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 6.1$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 13.0$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O)

δ = 174.86 (CO-NHAc), 134.07 (CH-All), 118.31 (=CH₂-All), 96.40 (C-1), 72.55 (C-5), 72.04 (C-4), 71.37 (C-3), 68.86 (-CH₂-All), 54.11 (C-2), 41.79 (C-6), 22.27 (CH₃-NHAc) ppm.

Benzyl-2-acetamido-6-amino-2,6-dideoxy- α -D-glucopyranosid (141)C₁₅H₂₂N₂O₅

310.3 g/mol

weißer Feststoff

Smp.: 165 °C (Braunfärbung), 175 °C (Smp.)

Lit.²⁷¹: Smp. 164-167 °C[α]_D²⁰ = 182 ° (c = 0.50 g/100 ml, H₂O)Lit.²⁷¹: [α]_D = 193 ° (c = 1 g/100 ml, MeOH)R_F = 0.57 (PrOH/H₂O 7:3 + 1 % NH₃ (25%ige wässrige Lösung))

Ausbeute: 69 %

1.54 g (4.58 mmol) Benzyl-2-acetamido-6-azido-2,6-dideoxy- α -D-glucopyranosid (**139**) werden nach AAV3 umgesetzt und säulenchromatographisch (LM EE/MeOH 4:1 + 3 % Py) gereinigt. Es werden 986 mg (3.18 mmol, 69 %) Benzyl-2-acetamido-6-amino-2,6-dideoxy- α -D-glucopyranosid erhalten.

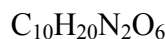
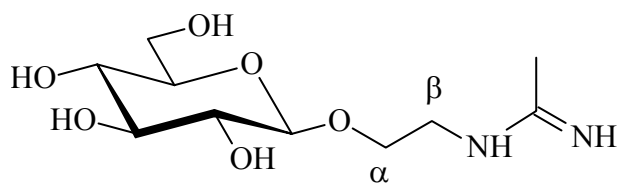
¹H-NMR (400 MHz, D₂O)

δ = 7.28–7.00 (m, 5H, CH-Bn), 4.69 (d, 1H, H-1), 4.55 (d, 1H, -CH₂-Bn), 4.33 (d, 1H, -CH₂-Bn), 3.70 (dd, 1H, H-2), 3.52 (dd, 1H, H-3), 3.45 (ddd, 1H, H-5), 3.05 (dd, 1H, H-4), 2.85 (dd, 1H, H-6a), 2.60 (dd, 1H, H-6b), 1.76 (s, 3H, NHAc) ppm.

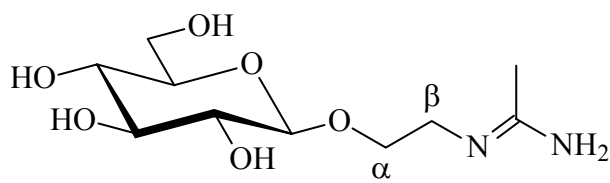
$J_{1,2}$ = 3.6, $J_{2,3}$ = 10.7, $J_{3,4}$ = 8.7, $J_{4,5}$ = 9.9, $J_{5,6a}$ = 2.8, $J_{5,6b}$ = 7.4, $J_{6a,6b}$ = 13.5, $J_{\text{CH}_2\text{-Bn}, \text{CH}_2\text{-Bn}}$ = 12.2 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O)

δ = 128.33, 128.17, 127.79 (CH-Bn), 96.65 (C-1), 73.01 (C-4), 72.20 (C-5), 71.37 (C-3), 69.44 (-CH₂-Bn), 54.36 (C-2), 42.55 (C-6), 21.43 (CH₃-NHAc) ppm.

***N*-[2-(β-D-Glucopyranosyloxy)ethyl]acetamidin (**142**)**

264.27 g/mol

R_F = 0.64 (PrOH/NH₃/H₂O 5:1:2)

264.27 g/mol

R_F = 0.64 (PrOH/NH₃/H₂O 5:1:2)

30 mg (0.10 mmol) Aldehyd **36** und 25 mg (0.11 mmol) Amin **132** werden in 0.8 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 und 0.8 ml Acetonitril gelöst. Nach der Zugabe von 14 mg (0.22 mmol) Natriumcyanoborhydrid wird die Lösung 2 ½ Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion zeigt das Auftreten von zwei neuen Spots mit *R_F*-Werten von 0.70 und 0.64 an. Das Reaktionsgemisch wird unter vermindertem Druck konzentriert, gefriergetrocknet und mittels Gelpermeationschromatographie an Biogel P2 (mit Wasser als Laufmittel) in die Fraktionen getrennt. Neben unumgesetztem Aldehyd **36** und unumgesetztem Amin **132** können 3 mg (0.01 mmol, 10 %) der als Amidin **142** identifizierbaren neuen Verbindung isoliert werden. Das gewünschte Disaccharid kann nicht gewonnen werden.

FAB (*m*-Nitrobenzylalkohol): 265.2 (M + H⁺)

In der NMR-Probe liegen die beiden Tautomere im Verhältnis 1:1 vor. Die Verschiebungen des einen Isomeren sind nicht, die des anderen mit * markiert.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O)

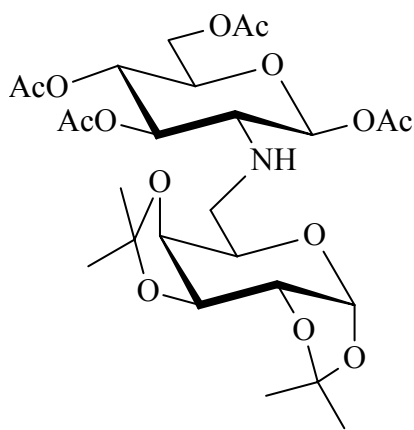
δ = 4.35 (d, 1H, H-1), 4.34 (d, 1H, H-1*), 3.92-3.86 (m, 2H, -CH₂αα, -CH₂αα*), 3.79 (dd, 1H, H-6a), 3.78 (dd, 1H, H-6a*), 3.76-3.68 (m, 2H, -CH₂αb, -CH₂αb*), 3.61 (dd, 1H, H-6b), 3.59 (dd, 1H, H-6b*), 3.45-3.41 (m, 2H, -CH₂βa,b), 3.35 (dd, 2H, H-3, H-3*), 3.34-3.28 (m, 4H, H-5, H-5*, -CH₂βa*,b*), 3.26 (dd, 1H, H-4), 3.24 (dd, 1H, H-4*), 3.17 (dd, 1H, H-2), 3.14 (dd, 1H, H-2*), 2.06 (s, 3H, -CH₃), 2.02 (s, 3H, -CH₃*) ppm.

*J*_{1,2} = 8.2, *J*_{2,3} = 8.9, *J*_{3,4} = 9.2, *J*_{4,5} = 9.5, *J*_{5,6a} = 2.2, *J*_{5,6b} = 3.2, *J*_{6a,6b} = 12.3, *J*_{1*2*} = 7.9, *J*_{2*,3*} = 9.2, *J*_{3*,4*} = 9.2, *J*_{4*,5*} = 9.8, *J*_{5*,6a*} = 2.2, *J*_{5*,6b*} = 3.2, *J*_{6a*,6b*} = 12.3 Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD)

$\delta = \sim 165$ (CN), 102.93, 102.90 (C-1, C-1*), 76.37, 76.12 (C-3, C-3*, C-5, C-5*), 73.53 (C-2, C-2*), 70.04 (C-4, C-4*), 69.27 ($-\text{CH}_2-\alpha$), 68.43 ($-\text{CH}_2-\alpha^*$), 61.18 (C-6, C-6*), 43.37 ($\text{CH}_2-\beta$), 41.41 ($-\text{CH}_2-\beta^*$), 18.74 (CH_3), 18.28 (CH_3^*) ppm.

(6-Desoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranos-6-yl)(1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranos-2-yl)amin (143**)**



gelber Sirup

$R_F = 0.14$ (PE/EE 4:3)

Ausbeute: 38 %

$\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{NO}_{14}$

589.6 g/mol

134 mg (0.51 mmol) Aldehyd **61** und 460 mg (1.20 mmol) Amin **124** werden nach AAV 4 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 4:3) können 114 mg (0.19 mmol, 38 %) des Disaccharids **143** isoliert werden.

FAB (*m*-Nitrobenzylalkohol): 590.3 ($\text{M} + \text{H}^+$)

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3)

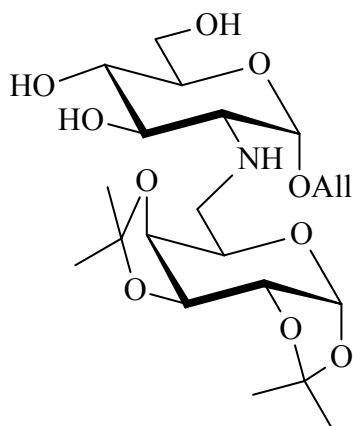
$\delta = 5.45$ (d, 1H, H-1'), 5.38 (d, 1H, H-1), 4.97 (dd, 1H, H-3' oder H-4'), 4.93 (dd, 1H, H-3' oder H-4'), 4.48 (dd, 1H, H-3), 4.21 (dd, 1H, H-2), 4.19 (dd, 1H, H-6a'), 4.60 (dd, 1H, H-4), 3.97 (dd, 1H, H-6b'), 3.69-3.62 (m, 2H, H-5, H-5'), 2.83 (dd, 1H, H-6a), 2.78 (dd, 1H, H-2'), 2.75 (dd, 1H, H-6b), 2.06 (s, 3H, Ac), 1.98 (s, 3H, Ac), 1.97 (s, 3H, Ac), 1.93 (s, 3H, Ac), 1.45 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.34 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.24 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.23 (s, 3H, $-\text{CH}_3$) ppm.

$J_{1,2} = 4.7$, $J_{2,3} = 2.2$, $J_{3,4} = 7.9$, $J_{4,5} = 1.6$, $J_{5,6a} = 7.3$, $J_{5,6b} = 6.3$, $J_{6a,6a} = 12.3$, $J_{1',2'} = 8.5$, $J_{2',3'} = 9.1$, $J_{3',4'} = 8.5$, $J_{4',5'} = 10.5$, $J_{5',6a'} = 4.4$, $J_{5',6b'} = 1.9$, $J_{6a',6b'} = 12.3$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3)

$\delta = 171.15$, 170.12 , 169.55 (4 x CO-Ac), 109.67 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 109.03 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 96.73 (C-1), 95.09 (C-1'), 74.03 (C-3' oder C-4'), 72.91 (C-5'), 71.80 (C-4), 71.14 (C-3), 70.99 (C-2), 68.86 (C-3' oder C-4'), 67.06 (C-5), 62.26 (C-6'), 61.14 (C-2'), 47.68 (C-6), 26.46 , 26.39 , 25.37 , 24.92 (4 x CH_3), 21.47 , 21.39 , 21.15 , 21.12 (4 x CH_3 -Ac) ppm.

(Allyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosid-2-yl)(6-desoxy-1,2:3,4-di-O-isopropyliden- α -D-galactopyranos-6-yl)amin (144**)**



$\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{NO}_{10}$

459.5 g/mol

weißer, amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 23^\circ$ ($c = 1.00$ g/100 ml, CH_3OH)

$R_F = 0.61$ (DCM/MeOH 4:1)

Ausbeute: quantitativ

47 mg (0.18 mmol) Aldehyd **61** und 103 mg (0.47 mmol) Amin **125** werden nach AAV 4 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (DCM/MeOH 14:1) können 84 mg (0.18 mmol, quantitativ) des Disaccharids **144** isoliert werden.

^1H -NMR (400 MHz, MeOD)

$\delta = 5.98$ (dddd, 1 H, CH-All), 5.53 (d, 1H, H-1), 5.35 (dd, 1H, $=\text{CH}_2$ -All), 5.20 (dd, 1H, $=\text{CH}_2$ -All), 5.06 (d, 1H, H-1'), 4.65 (dd, 1H, H-3), 4.38 (dd, 1H, H-2), 4.29 - 4.22 (m, 2H, H-4, - CH_2 -All), 4.07 (ddt, 1H, - CH_2 -All), 3.96 (ddd, 1H, H-5), 3.82 (dd, 1H, H-6a'), 3.69 (dd, 1H, H-6b'), 3.63 (dd, 1H, H-4'), 3.57 (ddd, 1H, H-5'), 3.32 (m, 1H, H-3'), 3.05 (dd, 1H, H-6a),

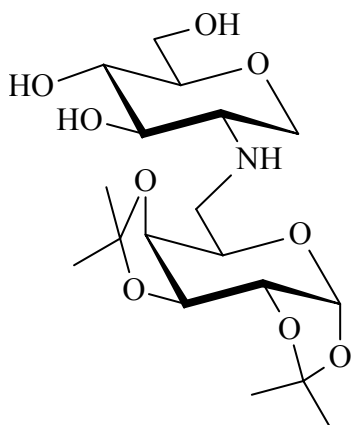
2.91 (dd, 1H, H-6b), 2.73 (dd, 1H, H-2'), 1.55 (s, 3H, -CH₃), 1.42 (s, 3H, -CH₃), 1.36 (s, 3H, -CH₃), 1.34 (s, 3H, -CH₃) ppm.

$J_{1,2} = 5.1$, $J_{2,3} = 2.3$, $J_{3,4} = 7.9$, $J_{4,5} = 1.8$, $J_{5,6a} = 8.4$, $J_{5,6b} = 3.6$, $J_{6a,6b} = 12.7$, $J_{1',2'} = 3.3$, $J_{2',3'} = 10.4$, $J_{3',4'} = 9.2$, $J_{4',5'} = 9.7$, $J_{5',6a'} = 2.3$, $J_{5',6b'} = 5.6$, $J_{6a',6b'} = 11.7$, $J_{CH-All,=CH_2c} = 10.4$, $J_{CH-All,=CH_2t} = 17.0$, $J_{CH-All,CH_2-All} = 5.1$, $J_{CH-All,CH_2-All} = 6.4$, $J_{CH_2-All,CH_2-All} = 12.7$, $J_{CH_2-All,=CH_2} = 1.3$, $J_{CH_2-All,=CH_2} = 1.5$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD)

$\delta = 135.81$ (CH-All), 118.50 (=CH₂-All), 110.90 (C(CH₃)₂), 110.37 (C(CH₃)₂), 98.20 (C-1), 97.01 (C-1'), 74.27, 74.02 (C-3', C-5'), 73.52 (C-4), 72.62 (C-3), 72.56 (C-4'), 72.25 (C-2), 69.68 (-CH₂-All), 68.22 (C-5), 63.23 (C-2'), 63.05 (C-6'), 48.42 (C-6), 26.79, 26.69, 25.56, 24.99 (4 x CH₃) ppm.

(1,5-Anhydro-2-desoxy-glucitol-2-yl)(6-desoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranos-6-yl)amin (145) und *N*-(1,5-Anhydro-2-desoxy-glucitol-2-yl)-6-amino-6-desoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden-D,L-glycero- α -D-galacto-heptopyranuronsäurenitril (145b)



C₁₈H₃₁NO₉

405.4 g/mol

weißer Feststoff

Smp. 169 °C

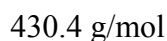
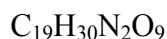
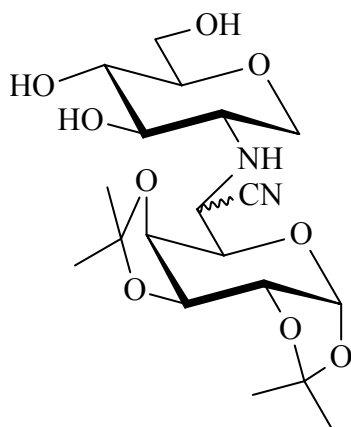
$[\alpha]^{20}_D = -18^\circ$ (c = 0.25 g/100 ml, CH₃OH)

$R_F = 0.30$ (DCM/MeOH 6:1)

Ausbeute: 76 %

ber.: C 53.33 H 7.71 N 3.46

gef.: C 49.78 H 7.78 N 3.34



120 mg (0.46 mmol) Aldehyd **61** und 240 mg (1.20 mmol) Amin **128** werden nach AAV 4 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (DCM/MeOH 14:1) können 47 mg (0.11 mmol, 24 %) des Cyano-substituierten Disaccharids **145b** (als Stereoisomerengemisch) und 142 mg (0.35 mmol, 76 %) des Disaccharids **145** isoliert werden.

^1H -NMR (500 MHz, MeOD)

δ = 5.54 (d, 1H, H-1), 4.66 (dd, 1H, H-3), 4.39 (dd, 1H, H-2), 4.27 (dd, 1H, H-4), 4.12 (dd, 1H, H-1'e), 3.97 (ddd, 1H, H-5), 3.85 (dd, 1H, H-6a'), 3.65 (dd, 1H, H-6b'), 3.36 (dd, 1H, H-3'), 3.28 (dd, 1H, H-4'), 3.25-3.19 (m, 2H, H-1'a, H-5'), 2.97 (dd, 1H, H-6a), 2.92 (dd, 1H, H-6b), 2.76 (ddd~dt, 1H, H-2'), 1.52 (s, 3H, -CH₃), 1.40 (s, 3H, -CH₃), 1.33 (s, 6H, 2 x -CH₃) ppm.

$J_{1,2} = 5.1$, $J_{2,3} = 2.2$, $J_{3,4} = 7.9$, $J_{4,5} = 1.6$, $J_{5,6a} = 8.5$, $J_{5,6b} = 4.4$, $J_{6a,6b} = 13.2$, $J_{1'e,1'a} = 11.4$, $J_{1'e,2'} = 4.7$, $J_{1'a,2'} = 10.4$, $J_{2',3'} = 10.4$, $J_{3',4'} = 8.5$, $J_{4',5'} = 9.5$, $J_{5',6a'} = 2.2$, $J_{5',6b'} = 5.7$, $J_{6a',6b'} = 12.0$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD)

δ = 109.43 (C(CH₃)₂), 108.89 (C(CH₃)₂), 96.70 (C-1), 81.63 (C-5'), 76.45 (C-3'), 71.94 (C-4), 71.27 (C-4'), 71.12 (C-2), 70.80 (C-3), 67.91 (C-1'), 66.33 (C-5), 62.03 (C-6'), 59.01 (C-2'), 46.88 (C-6), 25.37, 24.17, 23.62 (4 x CH₃) ppm.

N-(1,5-Anhydro-2-desoxy-glucitol-2-yl)-6-amino-6-desoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden-D,L-glycero- α -D-galacto-heptopyranuronsäurenitril (**145b**):

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

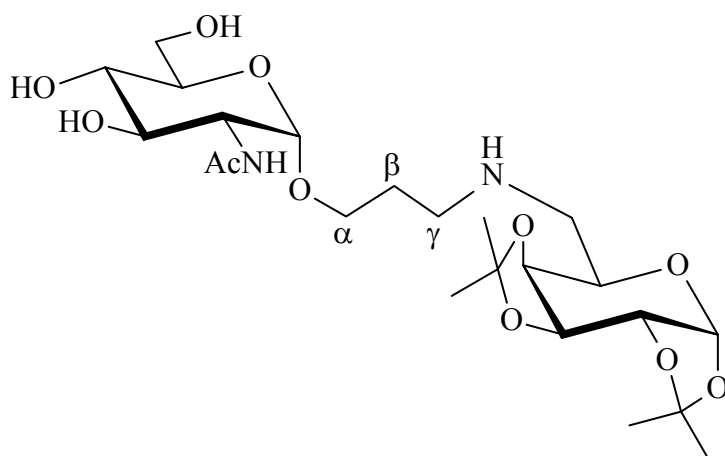
δ = 5.54 (d, 0.6H, H-1), 5.51 (d, 0.4 H, H-1*), 4.72 (dd, 0.7H, H-3), 4.68 (dd, 0.4 H, H-3*), 4.47-4.39 (m, 2H, H-2, H-4, H-2*, H-4*), 4.10-4.04 (m, 1.3H, H-1'e, H-1'e*, H-6*), 3.99 (d, 0.7H, H-6), 3.93-3.89 (m, 1H, H-5, H-5*), 3.82 (dd, 1H, H-6a', H-6a'*), 3.62 (dd, 1H, H-6b', H-6b'*), 3.28-3.08 (m, 4H, H-1'a, H-3', H-4', H-5', H-1'a*, H-3'*, H-4'*, H-5'*), 2.82 (ddd~dt, 0.7H, H-2'), 2.77-2.70 (m, 0.3H, H-2'*), 1.53 (s, 0.9H, -CH₃*), 1.50 (s, 2.6H, CH₃), 1.46 (s, 1.8H, 2 x CH₃*), 1.42 (s, 1H, -CH₃*), 1.36 (s, 2.7H, CH₃), 1.33 (s, 4.4H, 2 x -CH₃) ppm.

$J_{1,2} = 4.8$, $J_{2,3} = 2.3$, $J_{3,4} = 7.9$, $J_{5,6} = 8.1$, $J_{1'e,2'} = 4.6$, $J_{1'a,2'} = 9.9$, $J_{2',3'} = 9.9$, $J_{5',6a'} = 0.5$, $J_{5',6b'} = 5.6$, $J_{6a',6b'} = 11.7$, $J_{1*,2*} = 5.1$, $J_{2*,3*} = 2.3$, $J_{3*,4*} = 7.9$, $J_{5',6a'*} = 0.5$, $J_{5',6b'*} = 5.6$, $J_{6a'*,6b'*} = 11.7$ Hz.

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

δ = 120.28 (CN*), 118.33 (CN), 110.28 (C(CH₃)₂), 109.84 (C(CH₃)₂*), 109.24 (C(CH₃)₂, C(CH₃)₂*), 96.82 (C-1, C-1*), 81.67 (C-5'), 81.39 (C-5'*), 78.72 (C-3'*), 76.83 (C-3'), 71.03 (C-4, C-4', C-4*, C-4'*), 70.85 (C-2*), 70.77 (C-2), 70.64 (C-3*), 70.58 (C-3), 68.81 (C-5*), 68.70 (C-1'*), 68.30 (C-1'), 67.86 (C-5), 62.06 (C-6'), 62.03 (C-6'*), 59.27 (C-2'*), 57.82 (C-2'), 50.90 (C-6*), 48.97 (C-6), 25.18, 25.08, 24.05, 23.97, 23.65, 23.60 (4 x CH₃, 4 x CH₃*) ppm.

[3-(2-Acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosyloxy)propyl](6-desoxy-1,2:3,4-di-O-isopropyliden- α -D-galactopyranos-6-yl)amin (146**)**



weißer Sirup

$[\alpha]_D^{20} = -5.6^\circ$ ($c = 0.36$ g/100 ml, MeOH)

$R_F = 0.40$ (DCM/MeOH 6:1)

Ausbeute: 6 %

$C_{23}H_{40}N_2O_{11}$

520.5 g/mol

44 mg (0.17 mmol) Aldehyd **61** und 103 mg (0.37 mmol) Amin **134** werden nach AAV 4 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (DCM/MeOH 10:1) können 5 mg (0.01 mmol, 6 %) des Disaccharids **146** isoliert werden.

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

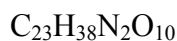
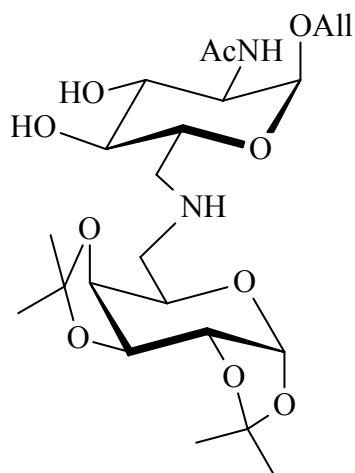
$\delta = 5.54$ (d, 1H, H-1), 4.82 (d, 1H, H-1'), 4.65 (dd, 1H, H-3), 4.39 (dd, 1H, H-2), 4.29 (dd, 1H, H-4), 4.08 (m, 1H, H-5), 3.89 (dd, 1H, H-2'), 3.83 (dd, 1H, H-6a'), 3.80-3.75 (m, 1H, -CH₂- α a), 3.69 (dd, 1H, H-6b'), 3.66 (dd, 1H, H-3'), 3.60-3.55 (m, 1H, H-5'), 3.52-3.46 (m, 1H, -CH₂- α b), 3.37 (dd, 1H, H-4'), 3.15-3.11 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.04 (t, 2H, -CH₂- γ), 2.11-2.02 (m, 2H, -CH₂- β), 1.98 (s, 3H, NHAc), 1.57 (s, 3H, -CH₃), 1.42 (s, 3H, -CH₃), 1.35 (s, 6H, 2 x -CH₃) ppm.

$J_{1,2} = 4.8$, $J_{2,3} = 2.3$, $J_{3,4} = 7.9$, $J_{4,5} = 1.8$, $J_{1',2'} = 3.6$, $J_{2',3'} = 10.7$, $J_{3',4'} = 8.9$, $J_{4',5'} = 9.7$, $J_{5',6a'} = 2.3$, $J_{5',6b'} = 5.6$, $J_{6a',6b'} = 11.7$, $J_{\text{CH}_2\alpha a/\text{CH}_2\alpha b} = 10.2$, $J_{\text{CH}_2\alpha a/\text{CH}_2\beta} = 6.1$, $J_{\text{CH}_2\beta/\text{CH}_2\gamma} = 7.6$ Hz.

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

$\delta = 172.68$ (CO-NHAc), 108.89 ($C(\text{CH}_3)_2$), 97.89 (C-1'), 96.78 (C-1), 72.83 (C-5'), 71.68 (C-4, C-3', C-4'), 71.07 (C-3), 70.75 (C-2), 66.17 (CH₂- α), 64.22 (C-5), 61.67 (C-6'), 54.39 (C-2'), 53.50 (C-6), 51.71 (-CH₂- γ), 25.47 (-CH₂- β), 25.34, 23.91, 23.40, 21.70 (4 x CH₃), 20.19 (CH₃-NHAc) ppm.

(Allyl-2-acetamido-2,6-didesoxy- α -D-glucopyranosid-6-yl)(6-desoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranos-6-yl)amin (**147**) und *N*-(Allyl-2-acetamido-2,6-didesoxy- α -D-glucopyranosid-6-yl)-6-amino-6-desoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden-D,L-*glycero*- α -D-galacto-heptopyranuronsäurenitril (**147b**)



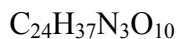
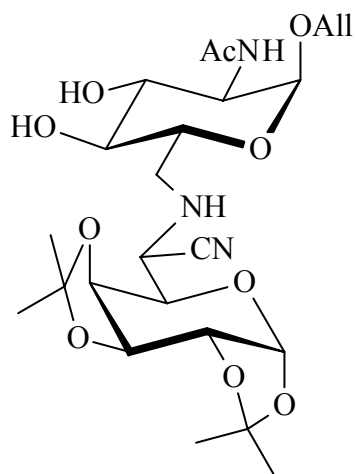
502.5 g/mol

weißer, amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 21^\circ$ ($c = 0.65$ g/100 ml, MeOH)

$R_{\text{F}} = 0.39$ (DCM/MeOH 4:1)

Ausbeute: 41 %



527.5 g/mol

$R_{\text{F}} = 0.63$ (DCM/MeOH 4:1)

44 mg (0.17 mmol) Aldehyd **61** und 96 mg (0.37 mmol) Amin **140** werden nach AAV 4 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (DCM/MeOH 12:1) können 10 mg (0.02 mmol, 11 %) des Cyano-substituierten Disaccharids **147b** und 35 mg (0.07 mmol, 41 %) des Disaccharids **147** isoliert werden.

FAB (*m*-Nitrobenzylalkohol): 503.5 ($\text{M} + \text{H}^+$)

¹H-NMR (500 MHz, MeOD)

δ = 5.95 (dddd, 1H, CH-All), 5.58 (d, 1H, H-1), 5.35 (dd, 1H, =CH₂-All), 5.22 (dd, 1H, =CH₂-All), 4.90 (d, 1H, H-1'), 4.70 (dd, 1H, H-3), 4.44 (dd, 1H, H-2), 4.30 (dd, 1H, H-4), 4.25 (dd, 1H, -CH₂-All), 4.12 (bd, 1H, H-5), 4.05 (dd, 1H, -CH₂-All), 3.95-3.88 (m, 2H, H-2', H-5'), 3.71 (dd, 1H, H-3'), 3.40 (dd, 1H, H-6a'), 3.29-3.24 (m, 2H, H-4', H-6a), 3.21-3.15 (m, 2H, H-6b, H-6b'), 2.00 (s, 3H, NHAc), 1.56 (s, 3H, -CH₃), 1.44 (s, 3H, -CH₃), 1.36 (s, 6H, 2 x -CH₃) ppm.

$J_{1,2} = 5.0$, $J_{2,3} = 2.2$, $J_{3,4} = 7.9$, $J_{4,5} = 1.5$, $J_{5,6a} = 8.5$, $J_{1',2'} = 3.5$, $J_{2',3'} = 10.7$, $J_{3',4'} = 8.8$, $J_{5',6a'} = 3.2$, $J_{6a',6b'} = 12.9$, $J_{CH-All,=CH_2c} = 10.4$, $J_{CH-All,=CH_2t} = 17.3$, $J_{CH-All,CH_2-All} = 5.1$, $J_{CH-All,CH_2-All} = 6.0$, $J_{CH_2-All,CH_2-All} = 13.2$, $J_{CH_2-All,=CH_2} = 1.6$, $J_{CH_2-All,=CH_2} = 1.3$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD)

δ = 172.68 (CO-NHAc), 134.15 (CH-All), 116.96 (=CH₂-All), 109.80 (C(CH₃)₂), 109.17 (C(CH₃)₂), 96.79, 96.58 (C-1, C-1'), 73.50 (C-4'), 71.60, 71.06 (C-3', C-3, C-4), 70.62 (C-2), 68.84 (-CH₂-All), 67.66 (C-5'), 64.14 (C-5), 54.05 (C-2'), 49.03 (C-6'), 47.30 (C-6), 25.24, 25.15, 23.90, 23.32 (4 x CH₃), 21.47 (CH₃-NHAc) ppm.

N-(Allyl-2-acetamido-2,6-didesoxy- α -D-glucopyranosid-6-yl)-6-amino-6-desoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden-D,L-glycero- α -D-galacto-heptopyranuronsäurenitril (**147b**):

FAB (*m*-Nitrobenzylalkohol): 528.7 (M + H⁺)

¹H-NMR (400 MHz, MeOD)

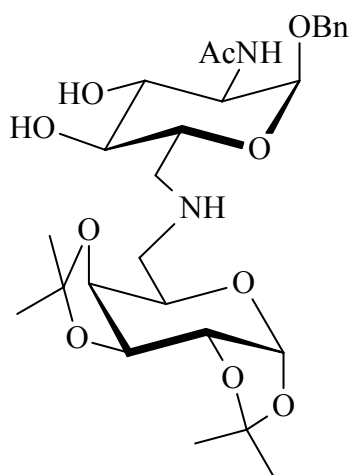
δ = 5.90 (dddd, 1H, CH-All), 5.49 (d, 1H, H-1), 5.29 (dddd~dq, 1H, =CH₂-All), 5.15 (dddd~dq, 1H, =CH₂-All), 4.74 (d, 1H, H-1'), 4.69 (dd, 1H, H-3), 4.41-4.37 (m, 2H, H-2, H-4), 4.16 (dddd~ddt, 1H, -CH₂-All), 4.00-3.92 (m, 3H, -CH₂-All, H-5, H-6), 3.88 (dd, 1H, H-2'), 3.71-3.60 (m, 2H, H-3', H-5'), 3.28 (dd, 1H, H-4'), 3.02 (dd, 1H, H-6a'), 2.94 (dd, 1H, H-6b'), 1.95 (s, 3H, NHAc), 1.49 (s, 3H, -CH₃), 1.42 (s, 3H, -CH₃), 1.34 (s, 3H, -CH₃), 1.32 (s, 3H, -CH₃) ppm.

$J_{1,2} = 4.8$, $J_{2,3} = 2.3$, $J_{3,4} = 7.9$, $J_{1',2'} = 3.8$, $J_{2',3'} = 10.7$, $J_{3',4'} = 8.7$, $J_{5',6a'} = 3.1$, $J_{5',6b'} = 7.4$, $J_{6a',6b'} = 12.5$, $J_{CH-All,=CH_2c} = 10.2$, $J_{CH-All,=CH_2t} = 17.3$, $J_{CH-All,CH_2-All} = 5.3$, $J_{CH-All,CH_2-All} = 6.1$, $J_{CH_2-All,CH_2-All} = 13.2$, $J_{CH_2-All,=CH_2} = 1.5$, $J_{=CH_2,=CH_2} = 1.5$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD)

δ = 134.33 (CH-All), 117.81, 116.77 ($=\text{CH}_2$ -All, CN), 110.16 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 109.29 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 96.78, 96.52 (C-1, C-1'), 73.13 (C-4'), 71.53 (C-3'), 71.09 (C-2), 70.93 (C-4), 70.70 (C-5'), 70.37 (C-3), 68.26 ($-\text{CH}_2$ -All), 67.63 (C-5), 54.30 (C-2'), 50.66 (C-6), 48.21 (C-6'), 25.20, 25.17, 23.95, 23.46 (4 x CH_3), 21.46 (CH_3 -NHAc) ppm.

(Benzyl-2-acetamido-2,6-didesoxy- α -D-glucopyranosid-6-yl)(6-desoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranos-6-yl)amin (148) und *N*-(Benzyl-2-acetamido-2,6-didesoxy- α -D-glucopyranosid-6-yl)-6-amino-6-desoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden-D,L-*glycero*- α -D-galacto-heptopyranuronsäurenitril (148b)



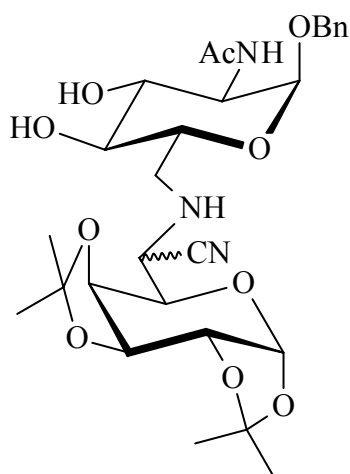
$\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{10}$

552.27 g/mol

weißer Sirup

R_F = 0.20 (DCM/MeOH 5:1)

Ausbeute: 48 %



$\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{10}$

577.27 g/mol

R_F = 0.65 (DCM/MeOH 5:1)

93 mg (0.35 mmol) Aldehyd **61** und 273 mg (0.88 mmol) Amin **141** werden nach AAV 4 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (DCM/MeOH 12:1) können 57 mg (0.10 mmol, 28 %) des Cyano-substituierten Disaccharids **148b** als Stereoisomeren-Gemisch und 92 mg (0.17 mmol, 48 %) des Disaccharids **148** isoliert werden.

FAB (*m*-Nitrobenzylalkohol): 553.4 ($M + H^+$)

^1H -NMR (500 MHz, MeOD)

δ = 7.41-7.29 (m, 5H, CH-Bn), 5.58 (d, 1H, H-1), 4.90 (d, 1H, H-1'), 4.79 (d, 1H, -CH₂-Bn), 4.69 (dd, 1H, H-3), 4.54 (d, 1H, -CH₂-Bn), 4.43 (dd, 1H, H-2), 4.27 (dd, 1H, H-4), 4.13 (ddd~dt, 1H, H-5), 3.98 (ddd~dt, 1H, H-5'), 3.89 (dd, 1H, H-2'), 3.74 (dd, 1H, H-3'), 3.41 (dd, 1H, H-6a'), 3.31 (dd, 1H, H-6a), 3.26 (dd~t, 1H, H-4'), 3.22-3.17 (m, 2H, H-6b, H-6b'), 1.94 (s, 3H, NHAc), 1.56 (s, 3H, -CH₃), 1.39 (s, 3H, -CH₃), 1.36 (s, 3H, -CH₃), 1.35 (s, 3H, -CH₃) ppm.

$J_{1,2} = 5.1$, $J_{2,3} = 2.2$, $J_{3,4} = 7.9$, $J_{4,5} = 1.9$, $J_{5,6a} = 8.8$, $J_{5,6b} = 1.9$, $J_{6a,6b} = 13.2$, $J_{1',2'} = 3.5$, $J_{2',3'} = 10.7$, $J_{3',4'} = 9.1$, $J_{5',6a'} = 3.2$, $J_{5',6b'} = 9.1$, $J_{6a',6b'} = 12.9$, $J_{\text{CH}_2\text{-Bn}, \text{CH}_2\text{-Bn}} = 12.3$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD)

δ = 174.07 (CO-NHAc), 139.03 (C-Bn), 129.94, 129.63, 129.48 (CH-Bn), 111.33 (C(CH₃)₂), 110.71 (C(CH₃)₂), 98.11, 98.00 (C-1, C-1'), 75.01 (C-4'), 73.06 (C-4), 72.56, 72.43 (C-3', C-3), 72.13 (C-2), 71.21 (-CH₂-Bn), 69.19 (C-5'), 65.65 (C-5), 55.56 (C-2'), 50.38 (C-6'), 49.09 (C-6), 26.71, 26.66, 25.39, 24.80 (4 x CH₃), 22.93 (CH₃-NHAc) ppm.

N-(Benzyl-2-acetamido-2,6-didesoxy- α -D-glucopyranosid-6-yl)-6-amino-6-desoxy-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden-D,L-glycero- α -D-galacto-heptopyranuronsäurenitril (**148b**):

FAB (*m*-Nitrobenzylalkohol): 578.5 ($M + H^+$)

^1H -NMR (500 MHz, MeOD)

δ = 7.43-7.30 (m, 5H, CH-Bn), 5.55 (d, 1H, 2 x H-1), 4.86 (d, 1H, H-1'), 4.78 (d, 0.5H, -CH₂-Bn), 4.76 (d, 0.5H, -CH₂-Bn), 4.74 (dd, 0.5H, H-3), 4.69 (dd, 0.5H, H-3), 4.52 (d, 0.5H, -CH₂-Bn), 4.51 (d, 0.5H, -CH₂-Bn), 4.47-4.41 (m, 2H, 2 x H-2, 2 x H-4), 4.09-4.04 (m, 1H, 2 x H-6), 4.04-4.00 (m, 1H, 2 x H-5), 3.94-3.90 (m, 1H, 2 x H-2'), 3.84-3.76 (m, 1H, 2 x H-5'),

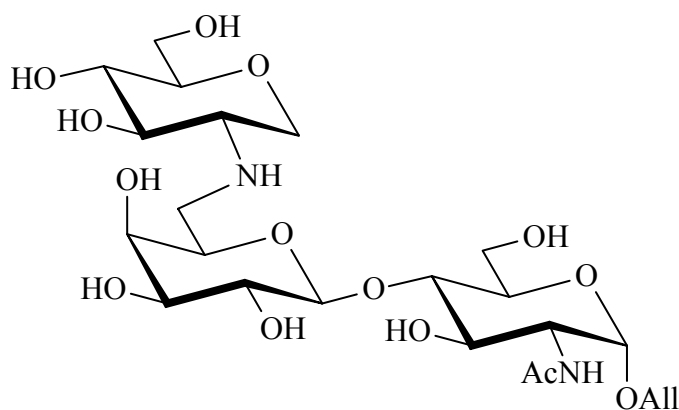
3.75-3.70 (m, 2H, 2 x H-3'), 3.42 (dd~t, 0.5H, H-4'), 3.35 (dd~t, 0.5H, H-4'), 3.19 (dd, 0.5H, H-6a'), 3.09 (dd, 0.5H, H-6a'), 3.02 (dd, 0.5H, H-6b'), 2.92 (dd, 0.5H, H-6b'), 1.96 (s, 3H, NHAc), 1.56 (s, 1.5H, -CH₃), 1.55 (s, 1.5H, -CH₃), 1.45 (s, 1.8H, -CH₃), 1.43 (s, 1.5H, -CH₃), 1.39 (s, 1.9H, -CH₃), 1.36 (s, 3.5H, 2 x -CH₃), 1.32 (s, 1.4H, -CH₃) ppm.

$J_{1,2} = 4.7$, $J_{2,3} = 2.5$, $J_{3,4} = 7.9$, $J_{1',2'} = 3.8$, $J_{2',3'} = 10.7$, $J_{3',4'} = 8.9$, $J_{4',5'} = 9.5$, $J_{5',6a'} = 2.8$, $J_{5',6b'} = 6.3$, $J_{6a',6b'} = 12.6$, $J_{\text{CH}_2\text{-Bn},\text{CH}_2\text{-Bn}} = 11.7$, $J_{\text{CH}_2\text{-Bn},\text{CH}_2\text{-Bn}} = 12.0$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD)

$\delta = 173.99$ (CO-NHAc), 139.23 (C-Bn), 129.91, 129.61, 129.45 (CH-Bn), 120.50 (CN), 119.37 (CN), 111.66 (C(CH₃)₂), 111.30 (C(CH₃)₂), 110.81 (C(CH₃)₂), 98.22 (C-1), 97.77 (C-1'), 74.66 (C-4'), 72.95 (C-3'), 72.59 (C-3), 72.44, 72.20 (C-2, C-4), 72.02 (C-5'), 70.70 (-CH₂-Bn), 69.18 (C-5), 55.79 (C-2'), 52.61 (C-6), 49.46 (C-6'), 26.74, 25.51, 25.02, 23.00 (4 x CH₃), 21.53 (CH₃-NHAc) ppm.

[Allyl-6-desoxy- β -D-galactopyranosyl-6-yl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid](1,5-anhydro-2-desoxy-glucitol-2-yl)amin (151**)**



weißer Feststoff

Smp.: 165 °C (Zersetzung)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 57^\circ$ (c = 0.35 g/100 ml, H₂O)

$R_{\text{F}} = 0.47$ (iPrOH/NH₃/H₂O 5:1:2)

Ausbeute: 73 %

61 mg (0.15 mmol) Aldehyd **109** und 71 mg (0.36 mmol) Amin **128** werden nach AAV 4 umgesetzt. Nach gelpermeationschromatographischer Reinigung an Sephadex LH 20 mit Wasser/Methanol 1:1 als Eluent werden 61 mg (0.11 mmol, 73 %) Trisaccharid **151** erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O)

$\delta = 5.90$ (ddd, 1 H, CH-All), 5.29 (d, 1H, =CH₂-All), 5.20 (d, 1H, =CH₂-All), 4.87 (d, 1H, H-1), 4.46 (d, 1H, H-1'), 4.20 (d, 1H, H-1a''), 4.15 (dd, 1H, -CH₂-All), 3.98 (dd, 1H, -CH₂-All),

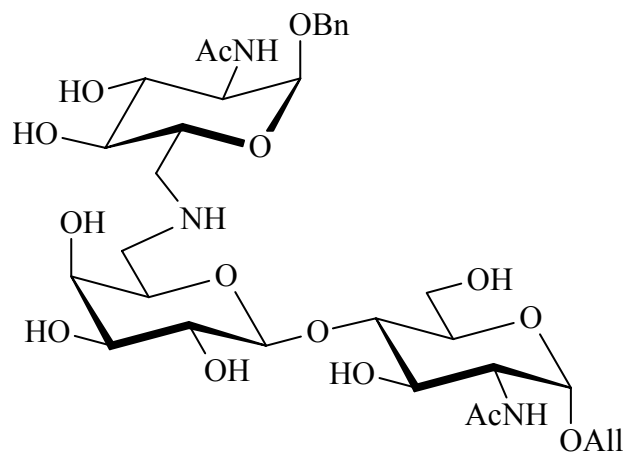
3.91 (dd, 2H, H-2, H-5'), 3.86 (d, 1H, H-4'), 3.84-3.76 (m, 6H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b, H-6a''), 3.68-3.60 (m, 3H, H-3', H-3'', H-6b''), 3.52-3.43 (m, 2H, H-2', H-1b''), 3.40-3.26 (m, 4H, H-6a', H-6b', H-4'', H-5''), 3.18 (dd, 1H, H-2''), 1.98 (s, 3H, NHAc) ppm.

$J_{1,2} = 3.5$, $J_{2,3} = 10.4$, $J_{1',2'} = 7.9$, $J_{3',4'} = 3.2$, $J_{5',6a'} = 2.8$, $J_{5',6b'} = 10.4$, $J_{1a'',1b''} = 11.4$, $J_{1a'',2''} = 4.7$, $J_{2'',3''} = 10.7$, $J_{\text{CH-All,=CH}_2\text{c}} = 10.4$, $J_{\text{CH-All,=CH}_2\text{t}} = 17.3$, $J_{\text{CH-All,CH}_2\text{-All}} = 6.0$, $J_{\text{CH-All,CH}_2\text{-All}} = 5.1$, $J_{\text{CH}_2\text{-All,CH}_2\text{-All}} = 12.9$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O)

$\delta = 133.97$ (CH-All), 118.41 (=CH₂-All), 102.63 (C-1'), 96.38 (C-1), 80.85 (C-5''), 76.98 (C-4), 74.04 (C-3''), 73.76 (C-3'), 72.68, 71.27, 71.21, 70.49, 70.19, 69.46 (C-3, C-5, C-2', C-4', C-5', C-4''), 69.00 (-CH₂-All), 65.19 (C-1''), 61.10 (C-6''), 60.06 (C-6), 57.83 (C-2''), 53.82 (C-2), 46.81 (C-6'), 22.28 (CH₃-NHAc) ppm.

[Allyl-6-desoxy- β -D-galactopyranosyl-6-yl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid](benzyl-2-acetamido-2,6-dideoxy- α -D-glucopyranosid-6-yl)amin (152**)**



weißer Feststoff

Smp.: 180 °C (Zersetzung)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 33^\circ$ (c = 0.15 g/100 ml, H₂O)

$R_{\text{F}} = 0.54$ (iPrOH/NH₃/H₂O 5:1:2)

Ausbeute: 41 %

75 mg (0.18 mmol) Aldehyd **109** und 130 mg (0.42 mmol) Amin **141** werden nach AAV 4 umgesetzt. Die Trennung des Reaktionsgemisches erfolgt mittels Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH 20 mit Wasser/Methanol 1:1 als Eluent. Es werden 53 mg (0.07 mmol, 41 %) Trisaccharid **152** erhalten.

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

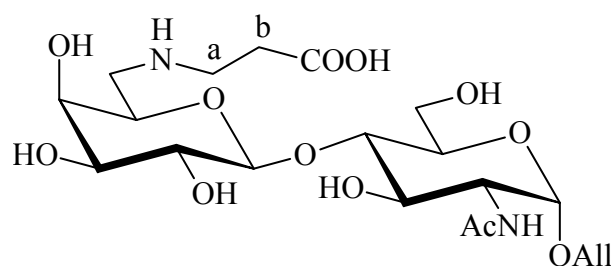
$\delta = 7.35\text{--}7.25$ (m, 5H, CH-Bn), 5.82 (ddd, 1 H, CH-All), 5.22 (d, 1H, $=\text{CH}_2\text{-All}$), 5.13 (d, 1H, $=\text{CH}_2\text{-All}$), 4.84 (d, 1H, H-1), 4.77 (d, 1H, H-1''), 4.68 (d, 1H, $-\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.43 (d, 1H, $-\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.39 (d, 1H, H-1'), 4.08 (dddd~ddt, 1H, $-\text{CH}_2\text{-All}$), 3.89 (dddd~ddt, 1H, $-\text{CH}_2\text{-All}$), 3.84–3.68 (m, 10H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b, H-4', H-5', H-2'', H-5''), 3.64 (dd, 1H, H-3''), 3.58 (dd, 1H, H-3'), 3.43 (dd, 1H, H-2'), 3.26 (dd, 1H, H-4''), 3.19–3.08 (m, 2H, H-6a', H-6a''), 2.99–2.90 (m, 2H, H-6b', H-6b''), 1.85 (s, 3H, NHAc), 1.82 (s, 3H, NHAc'') ppm.

$J_{1,2} = 3.8$, $J_{1',2'} = 7.9$, $J_{2',3'} = 9.9$, $J_{3',4'} = 3.3$, $J_{1'',2''} = 2.8$, $J_{2'',3''} = 10.7$, $J_{3'',4''} = 8.9$, $J_{4'',5''} = 9.7$, $J_{\text{CH}_2\text{-Bn}, \text{CH}_2\text{-Bn}} = 12.0$, $J_{\text{CH-All}, =\text{CH}_2\text{c}} = 10.4$, $J_{\text{CH-All}, =\text{CH}_2\text{t}} = 17.3$, $J_{=\text{CH}_2\text{t}, =\text{CH}_2\text{c}} = 1.5$, $J_{\text{CH-All}, \text{CH}_2\text{-All}} = 6.1$, $J_{\text{CH-All}, \text{CH}_2\text{-All}} = 5.3$, $J_{=\text{CH}_2, \text{CH}_2\text{-All}} = 1.5$, $J_{\text{CH}_2\text{-All}, \text{CH}_2\text{-All}} = 13.0$ Hz.

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

$\delta = 174.68$ (CO-NHAc), 137.37 (C-Bn), 133.98 (CH-All), 129.18, 128.88, 128.80 (CH-Bn), 118.37 ($=\text{CH}_2\text{-All}$), 102.74 (C-1'), 96.30 (C-1, C-1''), 77.49 (C-4), 72.78 (C-4''), 72.69 (C-3'), 71.83, 71.37, 71.20, 70.94, 69.98, 69.70, 69.02 (C-3, C-5, C-2', C-4', C-5', C-3'', C-5''), 70.38 ($-\text{CH}_2\text{-Bn}$), 68.97 ($-\text{CH}_2\text{-All}$), 60.16 (C-6), 53.96 (C-2, C-2''), 49.33, 48.77 (C-6', C-6''), 22.23, 22.17 ($\text{CH}_3\text{-NHAc}$, $\text{CH}_3\text{-NHAc''}$) ppm.

***N*-[Allyl-6-desoxy- β -D-galactopyranosyl-6-yl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid]-3-aminopropansäure (153)**



weißer Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 46^\circ$ ($c = 0.5$ g/100 ml, H_2O)

$R_F = 0.10$ (nBuOH/AcOH/ H_2O 3:1:1)

Ausbeute: 59 %

$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{12}$

494.5 g/mol

19 mg (0.06 mmol) 4-Nitrophenyl- β -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranosid (**36**) und 165 mg (0.63 mmol) Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (**46**) werden in 1.2 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 gelöst. Es werden 173 μl (9 U) β -Galactosidase aus *B.*

circulans (Lösung aus 10 mg Enzym/1ml Phosphatpuffer) zugefügt. Nach 1 Tag Reaktion bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch mit 1 ml Methanol versetzt und dann gefriergetrocknet. Der erhaltene Feststoff und 6 mg (0.07 mmol) β -Alanin werden in 2 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 gelöst, mit 12 mg (0.19 mmol) Natriumcyanoborhydrid versetzt und 8 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach gelpermeationschromatographischer Reinigung an Biogel P2 mit Wasser als Eluent werden 19 mg (0.04 mmol, 59 %) Disaccharid **153** erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O)

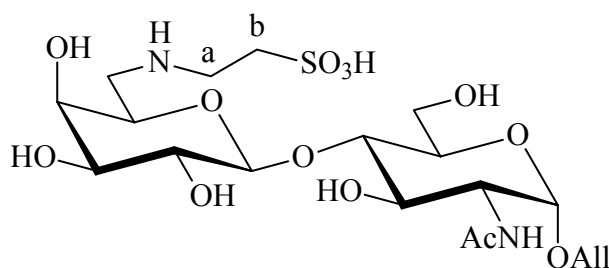
δ = 5.80 (ddd, 1 H, CH-All), 5.17 (dd, 1H, $=\text{CH}_2$ -All), 5.09 (dd, 1H, $=\text{CH}_2$ -All), 4.77 (d, 1H, H-1), 4.37 (d, 1H, H-1'), 4.04 (dd, 1H, $-\text{CH}_2$ -All), 3.90-3.83 (m, 2H, $-\text{CH}_2$ -All, H-5'), 3.81 (dd, 1H, H-2), 3.79 (d, 1H, H-4'), 3.75-3.55 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b), 3.52 (dd, 1H, H-3'), 3.40 (dd, 1H, H-2'), 3.24 (dd, 1H, H-6a'), 3.27 (dd, 1H, H-6b'), 3.11 (dd~t, 2H, $-\text{CH}_2$ -a), 2.42 (dd~t, 2H, $-\text{CH}_2$ -b), 1.88 (s, 3H, NHAc) ppm.

$J_{1,2} = 3.5$, $J_{2,3} = 10.7$, $J_{1',2'} = 7.6$, $J_{2',3'} = 10.1$, $J_{3',4'} = 3.2$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{c}} = 10.4$, $J_{\text{CH-All},=\text{CH}_2\text{t}} = 17.3$, $J_{\text{CH-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 5.7$, $J_{\text{CH}_2\text{-All},\text{CH}_2\text{-All}} = 13.9$ Hz.

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

δ = 178.15 (COOH), 174.52 (CO-NHAc), 133.65 (CH-All), 118.04 ($=\text{CH}_2$ -All), 102.45 (C-1'), 95.99 (C-1), 76.93 (C-4), 72.24, 71.45, 70.97, 70.19, 69.67, 69.36 (C-3, C-5, C-2', C-3', C-4', C-5'), 68.66 ($-\text{CH}_2$ -All), 61.26 (C-6), 53.59 (C-2), 48.02 (C-6'), 45.02 ($-\text{CH}_2$ -a), 32.27 ($-\text{CH}_2$ -b), 21.95 (CH_3 -NHAc) ppm.

***N*-[Allyl-6-desoxy- β -D-galactopyranosyl-6-yl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid]-2-aminoethansulfonsäure (**154**)**



gelber Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 50^\circ$ ($c = 0.1$ g/100 ml, H_2O)

$R_F = 0.29$ (EE/MeOH/ H_2O 7:3:1)

Ausbeute: 12 %

$\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{S}$

530.37 g/mol

65 mg (0.22 mmol) 4-Nitrophenyl- β -D-*galacto*-hexodialdo-1,5-pyranosid (**36**) und 407 mg (1.57 mmol) Allyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (**46**) werden in 2.5 ml Acetonitril und 2.5 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 gelöst. Es werden 287 μ l (15 U) β -Galactosidase aus *B. circulans* (Lösung aus 10 mg Enzym/1ml Phosphatpuffer) zugefügt. Nach 3 Tagen Reaktion bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch gefriergetrocknet. Zum erhaltenen Feststoff werden 30 mg (0.24 mmol) Taurin in 0.5 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 und 10 mg (0.16 mmol) Natriumcyanoborhydrid gegeben. Der Ansatz wird 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach gelpermeationschromatographischer Reinigung an Biogel P2 mit Wasser als Eluent werden 14 mg (0.03 mmol, 12 %) Disaccharid **154** erhalten.

MALDI-TOF (DHB, positive mode): 531.4 ($M + H^+$), 553.4 ($M + Na^+$), 569.33 ($M + K^+$), 575.3 ($M + 2 Na^+ - H^+$), 591.3 ($M + Na^+ + K^+ - H^+$), 607.3 ($M + 2 K^+ - H^+$)

1H -NMR (400 MHz, D_2O)

δ = 5.87 (ddd, 1 H, CH-All), 5.26 (d, 1H, =CH₂-All), 5.17 (dd, 1H, =CH₂-All), 4.84 (d, 1H, H-1), 4.44 (d, 1H, H-1'), 4.12 (dd, 1H, -CH₂-All), 3.95 (dd, 1H, -CH₂-All), 3.90 (dd, 1H, H-2), 3.88-3.70 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b, H-4', H-5'), 3.60 (dd, 1H, H-3'), 3.47 (dd, 1H, H-2'), 3.42 (dd~t, 2H, -CH₂-a), 3.35 (m, 1H, H-6a'), 3.29 (dd, 1H, H-6b'), 3.20 (dd~t, 2H, -CH₂-b), 1.96 (s, 3H, NHAc) ppm.

$J_{1,2} = 3.6$, $J_{2,3} = 10.4$, $J_{1',2'} = 7.6$, $J_{2',3'} = 9.7$, $J_{3',4'} = 3.3$, $J_{5',6a'} = 8.4$, $J_{5',6b'} = 3.1$, $J_{6a',6b'} = 13.2$, $J_{CH_2-a,CH_2-b} = 6.6$, $J_{CH-All,=CH_2c} = 10.7$, $J_{CH-All,=CH_2t} = 17.3$, $J_{CH-All,CH_2-All} = 6.1$, $J_{CH_2-All,CH_2-All} = 13.0$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O)

δ = 174.79 (CO-NHAc), 133.93 (CH-All), 118.33 (=CH₂-All), 102.71 (C-1'), 96.18 (C-1), 77.09 (C-4), 72.51 (C-3'), 71.28, 71.07, 70.47, 69.96, 69.62 (C-3, C-5, C-2', C-4', C-5'), 68.95 (-CH₂-All), 60.05 (C-6), 53.84 (C-2), 48.81 (C-6'), 46.88 (-CH₂-b), 43.95 (-CH₂-a), 22.23 (CH₃-NHAc) ppm.

11.4 Kinetische Messungen

1. UV/Vis-Spektren

Es werden 10^{-4} M Lösungen des jeweiligen Galactosid-Donors sowie von *p*NP-OH in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, angesetzt. 5 ml der jeweiligen Substrat-Lösung werden in eine Quarzküvette ($d = 1$ cm) gegeben und gegen reinen Kaliumphosphatpuffer (ebenfalls in einer Quarzküvette) als Hintergrund mit einem Lambda 20 Perkin Elmer UV/Vis Spektrometer im Modus „Scan“, bei einer Spaltbreite von 2.0 in einem Wellenlängenbereich von 500 bis 190 nm vermessen.

2. Ermittlung des Extinktionskoeffizienten ε

Es werden 10 Lösungen aus *p*NP-OH in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 mit Konzentrationen von 1 bis $9 \cdot 10^{-5}$ M vorbereitet. 1 ml der jeweiligen Lösung wird in eine 1 ml-Kunststoffküvette ($d = 1$ cm) gegeben und gegen reinen Kaliumphosphatpuffer (ebenfalls in einer Kunststoffküvette) als Hintergrund im Modus „conc.1“ (Ordinate mode: single wavelength, no baseline correction, curve/factor: linear, intercept: no, no. of replicates: 2) bei einer Wellenlänge von 401 nm und einer Temperatur von 22 °C vermessen. Für die graphische Auswertung (Abb. 52) wird der Mittelwert der Doppelbestimmung eingesetzt. Die Steigung der erhaltenen Geraden ergibt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz den molaren Extinktionskoeffizienten ε in $[10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$.

Tab. 8 Gemessene Absorption bei verschiedenen *p*NP-OH-Konzentrationen, 22°C, pH 7.0, 401 nm

$c_{\text{pNP-OH}} [10^{-5} \text{ M}]$	Absorption 1	Absorption 2	Mittelwert
1	0,0887	0,0887	0,089
2	0,1808	0,1807	0,181
3	0,2754	0,2753	0,275
4	0,3619	0,3619	0,362
5	0,4608	0,4608	0,461
6	0,5468	0,5468	0,547
7	0,6461	0,6460	0,646
8	0,7205	0,7204	0,721
9	0,8067	0,8065	0,807

3. Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeiten v_0

Extinktionsänderungen mit der Zeit werden im Modus „TimeDrive“ gemessen. Es werden eine Wellenlänge von 401 nm, ein Absorptionsmaximum von 2.0 und eine Spaltbreite von 2.0 eingestellt. Die Temperatur liegt bei 22 °C, die Messzeit beträgt 8-10 min, mit einem

Aufnahmeintervall von 5 sek. Als Hintergrund wird eine β -Galactosidase-Lösung (1mg/9ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0) eingesetzt. Alle Substrat-Lösungen werden kurz vor der Messung frisch angesetzt.

Zur Bestimmung der Extinktionsänderungen mit der Zeit werden in eine 1 ml Kunststoff-Küvette ($d = 1\text{ cm}$) jeweils 900 μl einer β -Galactosidase-Lösung (1mg/9ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0; 10mg/9ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 bei der Vermessung von Arabinopyranosid **101** und Olefin **56**) pipettiert, die Küvette wird in den Probenhalter des Photometers gestellt, mit 100 μl der jeweiligen Substrat-Lösung versetzt und durch nochmaliges Aufnehmen und Abgeben des Pipettenvolumens durchmischt. Die Messung wird dann unverzüglich gestartet.

An die erhaltenen Graphen wird eine Tangente angelegt, aus deren Steigung nach Gleichung (4) (Kap. 8) die zu der Substrat-Lösung gehörige Anfangsgeschwindigkeit ermittelt wird.

Beispielhaft ist die Messkurve für *p*NP-Gal mit einer Substratkonzentration von $2.5 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ abgebildet (Abb. 74). Die Tangente wurde im Bereich 0.2 bis 1 min angelegt und nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet. Die Steigung $dE/dt = 0.248\text{ min}^{-1}$ wird umgerechnet mit $V = 1\text{ ml}$, $d = 1\text{ cm}$ und $\varepsilon = 9.08 \cdot 10^3\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ nach Gleichung (4) zu $v_0 = 0.0273\text{ }\mu\text{mol/min}$.

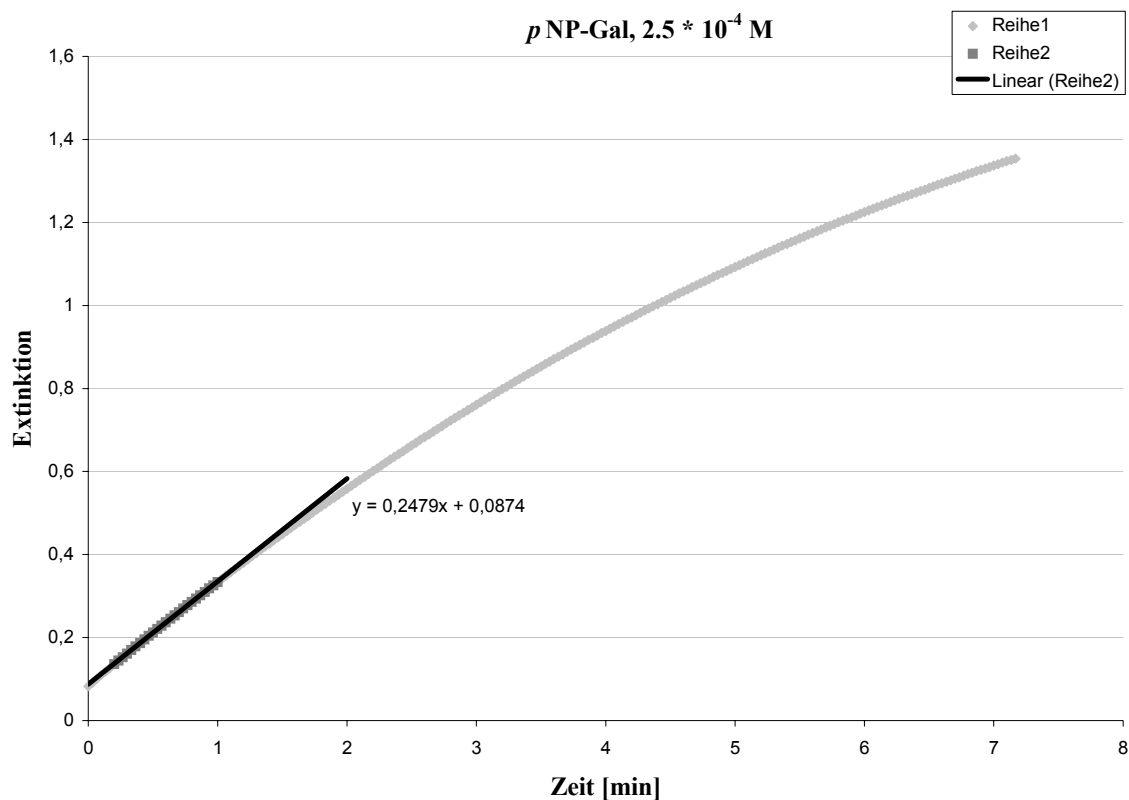


Abb. 74 E(t)-Messung für *p*NP-Gal bei einer Konzentration von $2.5 \cdot 10^{-4}\text{ M}$

Tab. 9 bis Tab. 14 geben die für die verschiedenen Donor-Konzentrationen (S) ermittelten Steigungen dE/dt und daraus berechnete, für die Linearisierungen benötigte Werte an.

Tab. 9 Daten für pNP-Gal; S = Konzentration an pNP-Gal, v = berechnete Anfangsgeschwindigkeit

dE/dt [min ⁻¹]	S [M]	v [μmol/min]	1/S [M ⁻¹]	1/v [min/μmol]	v/S [μmol/(min M)]	S/v [M min/μmol]
1,36	$7,5 \cdot 10^{-3}$	0,150	133	6,67	20,0	0,05
1,17	$5,0 \cdot 10^{-3}$	0,129	200	7,74	25,9	0,0387
0,916	$2,5 \cdot 10^{-3}$	0,101	400	9,91	40,3	0,0248
0,601	$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,0662	1000	15,1	66,2	0,0151
0,501	$7,5 \cdot 10^{-4}$	0,0552	1330	18,1	73,5	0,0136
0,409	$5,0 \cdot 10^{-4}$	0,0451	2000	22,2	90,1	0,0111
0,248	$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,0273	4000	36,6	109	0,00916
0,127	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,0140	10000	71,4	140	0,00714
0,111	$7,5 \cdot 10^{-5}$	0,0123	13300	81,6	163	0,00612
0,0755	$5,0 \cdot 10^{-5}$	0,00831	20000	120	166	0,00601
0,0426	$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,00469	40000	213	188	0,00533
0,0187	$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,00206	100000	486	206	0,00486

Tab. 10 Daten für den Aldehyd 36; S = Konzentration an 36, v = berechnete Anfangsgeschwindigkeit

dE/dt [min ⁻¹]	S [M]	v [μmol/min]	1/S [M ⁻¹]	1/v [min/μmol]	v/S [μmol/(min M)]	S/v [M min/μmol]
0,103	$2,0 \cdot 10^{-3}$	0,0113	500	88,6	5,64	0,177
0,0697	$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,00768	1000	130	7,68	0,130
0,0538	$7,5 \cdot 10^{-4}$	0,00593	1330	169	7,90	0,127
0,0374	$5,0 \cdot 10^{-4}$	0,00412	2000	243	8,24	0,121
0,0182	$2,0 \cdot 10^{-4}$	0,00200	5000	499	10,0	0,0998
0,00880	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,000969	10000	1030	9,69	0,103
0,00470	$5,0 \cdot 10^{-5}$	0,000518	20000	1930	10,4	0,0966

Tab. 11 Daten für das Olefin 56; S = Konzentration an 56, v = berechnete Anfangsgeschwindigkeit

dE/dt [min ⁻¹]	S [M]	v [μmol/min]	1/S [M ⁻¹]	1/v [min/μmol]	v/S [μmol/(min M)]	S/v [M min/μmol]
0,0151	$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,00166	1000	6010	1,66	0,601
0,0141	$9,0 \cdot 10^{-4}$	0,00155	1110	644	1,73	0,580
0,0125	$8,0 \cdot 10^{-4}$	0,00138	1250	726	1,72	0,581
0,00990	$6,0 \cdot 10^{-4}$	0,00109	1670	917	1,82	0,550
0,00820	$5,0 \cdot 10^{-4}$	0,000903	2000	1110	1,81	0,554
0,00690	$4,0 \cdot 10^{-4}$	0,000760	2500	1320	1,90	0,526
0,00370	$2,0 \cdot 10^{-4}$	0,000407	5000	2450	2,04	0,491
0,00200	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,000220	10000	4540	2,20	0,454

Tab. 12 Daten für das Amin 98; S = Konzentration an 98, v = berechnete Anfangsgeschwindigkeit

dE/dt [min ⁻¹]	S [M]	v [μmol/min]	1/S [M ⁻¹]	1/v [min/μmol]	v/S [μmol/(min M)]	S/v [M min/μmol]
0,0034	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$3,7 \cdot 10^{-4}$	500	2700	0,19	5,3
0,0015	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	1000	6100	0,17	6,1
0,0022	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	630	4100	0,15	6,5
0,0018	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-4}$	830	5100	0,16	6,1
0,00076	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$8,4 \cdot 10^{-5}$	2000	12000	0,17	6,0
0,00061	$4,0 \cdot 10^{-4}$	$6,7 \cdot 10^{-5}$	2500	15000	0,17	6,0

Tab. 13 Daten für das Arabinopyranosid 101; S = Konzentration an 101, v = berechnete Anfangsgeschwindigkeit

dE/dt [min ⁻¹]	S [M]	v [μmol/min]	1/S [M ⁻¹]	1/v [min/μmol]	v/S [μmol/(min M)]	S/v [M min/μmol]
0,0255	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$2,81 \cdot 10^{-3}$	400	356	1,12	0,890
0,0176	$1,25 \cdot 10^{-3}$	$1,94 \cdot 10^{-3}$	800	516	1,55	0,645
0,0118	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$1,30 \cdot 10^{-3}$	1330	769	1,73	0,577
0,00880	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$9,70 \cdot 10^{-4}$	2000	1030	1,94	0,516
0,00450	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$4,96 \cdot 10^{-4}$	4000	2020	1,98	0,504
0,00220	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$2,42 \cdot 10^{-4}$	8000	4130	1,94	0,516

Tab. 14 Daten für das Fucopyranosid 100; S = Konzentration an 100, v = berechnete Anfangsgeschwindigkeit

dE/dt [min ⁻¹]	S [M]	v [μmol/min]	1/S [M ⁻¹]	1/v [min/μmol]	v/S [μmol/(min M)]	S/v [M min/μmol]
0,0722	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$7,95 \cdot 10^{-3}$	500	126	3,98	0,252
0,0402	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$4,43 \cdot 10^{-3}$	1000	226	4,43	0,226
0,0345	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$3,80 \cdot 10^{-3}$	1330	263	5,07	0,197
0,0246	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$2,71 \cdot 10^{-3}$	2000	369	5,42	0,185
0,0126	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$1,40 \cdot 10^{-3}$	5000	721	6,94	0,144
0,00690	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$7,60 \cdot 10^{-4}$	10000	1320	7,60	0,132

12 Gefahrenhinweise

	Gef. St. Symbol	R	S
Aceton	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Acetylchlorid	F, C	11-14-34	9-16-26-45
AIBN	E, Xn	2-11-20/22-52/53	39-41-47.1-61
Allylalkohol	T, N	10-23/24/25- 36/37/38-50	36/37/39-38-45-61
Allylbromid	F, T, N	11-23/35-34-50	16-26-36/37/39-45- 61
Ammoniaklösung, wässrig (28.0-30.0%)	C	34-50	53-26-45-61- 36/37/39
Ammoniumcarbonat	Xn	22	
Ammoniumhydrogencarbonat	C	22	22-24/25
Bariumhydroxid-Octahydrat	C	20/22-34	26-36/37/39-45
Benzol	F, T	45-11-48/23/24/25	53.1-45
Benzoylchlorid	T	34	53-26-45
Benzylalkohol	Xn	20-22	26
Bortrifluorid-Etherat	F, T	15-34-48/23	26-36/37/39-45
2-Bromethanol	T+	26/27/28	7/9-28.1-45
Bromwasserstoff (33% in Essigsäureanhydrid)	C	34-37	7/9-23.2-26- 36/37/39-45
n-Butanol	Xn	10-20	16

	Gef. St. Symbol	R	S
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
DBU	C	22-34-52/53	26-36/37/39-45-61
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Dicyclohexylcarbodiimid	T	22-24-41-43	24-26-37/39-45
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	9-16-29-33
2,2-Dimethoxypropan	F, Xi	11-36-66	9-16-26
4-Dimethylaminopyridin	T	25-36/38	37-45
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	T	61-36-20/21	53-45
Dimethylsulfoxid	Xi	36/37/38	26-36
Essigsäure	C	34	23-26-45
Essigsäureanhydrid	C	10-34	26-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethylacetat	F, Xi	11-36-66-67	16-26-33
Hydrazinhydrat (ca. 80 %)	T, N	45-E23/24/25-34- 43-50/53	53-26-36/37/39-45- 60-61
Kaliumbromat	O, T	45-9-E25	53-45
Kalium- <i>tert</i> -Butylat	F, C	11-14-22-35	8-16-36/37/39- 43.3-45
Methanol	F, T	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45
Methansulfonsäurechlorid	T+	21/22-26-34-37- 52/53	26-28.1-36/37/39- 45

	Gef. St. Sym.	R	S
Methyltriphenyl- phosphonium-bromid			22-24/25
Methyltriphenyl- phosphonium-bromid + Natriumamid	C	14-34	6.1-22-24/25-26- 36/37/39-43.6-45
Natriumacetat			22-24/25
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Natriumcarbonat	X _i	36	22-26
Natriumcyanoborhydrid	F, C	15-32-34	26-36/37/39- 43.6-45
Natriumhydroxid	C	45	26-37/39-45
Natriumhypochloritlösung (6-14 %)	C	31-34	26-28.1-36/37/39- 45-50.1
Natriummethanolat	F, C	11-14-34	8-16-26-43.6-45
<i>p</i> -Nitrophenol	X _n	20/21/22-33	28.1
Oxalsäure	X _n	21/22	24/25
Phosphorsäure	C	34	26-45
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	7-16-26-24/25
Pyridin	F, X _n	11-20/21/22	26-28
Salzsäure (konz.)	C	34-37	26-36/37/39-45
Schwefelsäure (konz.)	C	35	26-30-45
TEMPO	C	34	26-36/37/39-45
Tetrahydrofuran	F, Xi	11-19-36/37	16-29-33

	Gef. St. Sym.	R	S
Toluol	Xn	11-20	16-25-29-33
<i>para</i> -Toluolsulfonsäure	Xi	36/37/38	26-37
<i>para</i> -Toluolsulfonsäure-chlorid	C	34	26-36/37/39-45
Tributylzinnhydrid	T, N	21-25-36/38-48/23/25-50/53	35-36/37/39-45-60-61
Trichloracetonitril	T, N	23/24/25-51/53	45-61
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Trifluoressigsäure	C	20-35	9-26-27-28-45
Triphenylmethylchlorid	C	34	26-36/37/39-45
Triphenylphosphin	Xn, C	43-48/20/22-50-53	22-24-37
Wasserstoff	F+	12	9-16-33
Wasserstoffperoxid	C	34	3-26-36/37/39-45

13 Literatur

- ¹ French, A. R., Yokoyama, W. M., *Curr. Opin. Immunol.* **2003**, *15*, 45-51.
- ² Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H., *Eur. J. Immunol.* **1975**, *5*, 112-117.
- ³ Kuby, J., *Immunology*, 3. Aufl., Freeman, New York **1997**, 3-23.
- ⁴ Podack, E. R., Young, J. D. E., Cohn, Z. A., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82*, 8629-8633.
- ⁵ Masson, D., Tschopp, J., *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 9069-9072.
- ⁶ Russell, J. H., Ley, T. J., *Ann. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 323-370.
- ⁷ Heusel, J. W., Wesselschmidt, R. L., Shresta, S., Russell, J. H., Ley, J. T., *Cell* **1994**, *76*, 977-987.
- ⁸ Martz, E., *Transplantation* **1976**, *21*, 5-11.
- ⁹ Young, J. D.-E., Cohn, Z. A., *Sci. Am.* **1988**, *258*, 38-44.
- ¹⁰ Kuby, J., *Immunology*, 3. Aufl., Freeman, New York **1997**, 387-390.
- ¹¹ Middleton, D., Curran, M., Maxwell, L., *Transplant Immunology* **2002**, *10*, 147-164.
- ¹² Karlhofer, F. M., Ribaud, R. K., Yokoyama, W. M., *Nature* **1992**, *358*, 56-70.
- ¹³ Hakomori, S., *Cancer Res.* **1985**, *45*, 2405-2414.
- ¹⁴ Bezouška, K., *Biochem. Soc. Trans.* **1996**, *24*, 156-161.
- ¹⁵ Chambers, W. H., Vujanovic, N. L., DeLeo, A. B., Olszowy, M. W., Herberman, R. B., Hiserodt, J. C., *J. Exp. Med.* **1989**, *169*, 1373-1389.
- ¹⁶ Chambers, W. H., Adamkiewicz, T., Hochins, J. P., *Glycobiology* **1993**, *3*, 9-14.
- ¹⁷ Bezouška, K., Vlahas, G., Horváth, O., Jinochová, G., Fišerová, A., Giorda, R., Chambers, W. H., Feizi, T., Pospíšil, M., *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 16945-16952.
- ¹⁸ Bezouška, K., Yuen, C.-T., O'Brien, J., Childs, R. A., Chai, W., Lawson, A. M., Drbal, K., Fišerová, A., Pospíšil, M., Feizi, T., *Nature* **1994**, *372*, 150-157.
- ¹⁹ Bezouška, K., Nepovím, A., Horváth, O., Pospíšil, M., Hamann, J., Feizi, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *208*, 68-74.
- ²⁰ Bezouška, K., Křen, V., Kieburg, C., Lindhorst, T. K., *FEBS Letters* **1998**, *426*, 243-247.
- ²¹ Křen, V., Dvořáková, J., Gambert, U., Sedmera, P., Havlíček, V., Thiem, J., Bezouška, K., *Carbohydr. Res.* **1998**, *305*, 517-523.
- ²² Sedmera, P., Příkrylová, V., Bezouška, K., Rajnochová, E., Thiem, J., Křen, V., *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, *17*, 1351-1357.
- ²³ Krist, P., Herkommerová-Rajnochová, E., Rauvolfová, J., Semeňuk, T., Vavrušková, P., Pavlíček, J., Bezouška, K., Petruš, L., Křen, V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *287*, 11-20.

- ²⁴ Bezouška, K., Sklenář, J., Dvořáková, J., Havlíček, V., Pospíšil, M., Thiem, J., Křen, V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *238*, 149-153.
- ²⁵ Pospíšil, M., Vannucci, L., Horváth, O., Fišerová, A., Krausová, K., Bezouška, K., Mosca, F., *Int. J. Onc.* **2000**, *16*, 267-276.
- ²⁶ Lu, X., Young, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6814-6815.
- ²⁷ Chapleur, Y., (Ed.), *Carbohydrate Mimics*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- ²⁸ Witczak, Z. J., Nieforth, K. A. (Eds.), *Carbohydrates in Drug Design*, Marcel Dekker Inc., New York, **1997**.
- ²⁹ Martens, C. L., Cwirla, S. E., Lee, R. Y. W., Whitehorn, E., Chen, E. Y. F., Bakker, A., Martin, E. L., Wagstrom, C., Goplain, P., Smith, C. W., Tate, E., Koller, K. H., Schatz, P. J., Dower, W. J., Barrett, W.R., *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 129-131.
- ³⁰ Paulsen, H., Sangster, I., Heyns, K., *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 802-815.
- ³¹ Stütz, A. E. (Ed.), *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- ³² Chrétien, F., Khaldi, M., Chapleur, Y. in *Carbohydrate Mimics*, Chapleur, Y. (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, 143-157.
- ³³ Horii, S., Fukase, H., Matsuo, T., Kameda, Y., Asano, N., Matsui, K., *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1038-1046.
- ³⁴ Billington, D.C., Perron-Sierra, F., Picard, I., Beaubras, S., Duhault, J., Espinal, J., Challal, S. in *Carbohydrate Mimics*, Chapleur, Y. (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, 433-443.
- ³⁵ Spearman, M. A., Jamieson, J. C., Wright, J. A., *Expt. Cell Res.* **1987**, *168*, 116-126.
- ³⁶ Gruters, R. A., Neefjes, J. J., Tersmette, M., DeGoede, R. E., Tulp, A., Huisman, H. G., Miedena, F., Ploegh, H. L., *Nature* **1987**, *330*, 74-77.
- ³⁷ Ogawa, S. in *Carbohydrate Mimics*, Chapleur, Y. (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, 87-104.
- ³⁸ Driguez, H., *Topics Curr. Chem.* **1997**, *187*, 85-116.
- ³⁹ Hoffmann, M., Burkhart, F., Hessler, G., Kessler, H., *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1519-1532.
- ⁴⁰ Rodriguez, E. C., Marcaurelle, L. A., Bertozzi, C. R., *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7134-7135.
- ⁴¹ Bertozzi, C., Bednarski, M., *Carbohydr. Res.* **1992**, *223*, 243-253.
- ⁴² Westermann, B., Walter, A., Diedrichs, N., *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3554-3556; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3381-3383.
- ⁴³ Ramos, D., Rollin, P., Klaffke, W., *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 406-408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 393-395.
- ⁴⁴ Haneda, T., Goekjian, P. G., Kim, S. H., Kishi, Y., *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 490-498.

- ⁴⁵ Stick, R. V., Tilbrook, D. M. G., Williams, S. J., *Aust. J. Chem.* **1999**, 52, 885-894.
- ⁴⁶ Leeuwenburgh, M. A., Picasso, S., Overkleeft, H. S., van der Marel, G. A., Vogel, P., van Boom, J. H., *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1185-1189.
- ⁴⁷ Johns, B. A., Pan, Y. T., Elbein, A. D., Johnson, C. R., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 4856-4865.
- ⁴⁸ Matteucci, M. D., Wagner, R. D., *Nature* **1996**, 384, 20-22.
- ⁴⁹ Wessel, H. P., Chucholowski, A., Fingerle, J., Iberg, N., Märki, H. P., Müller, R., Pech, M., Pfister-Downar, M., Rouge, M., Schmid, G., Tschopp, T., in *Carbohydrate Mimics*; Chapleur, Y., (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, 417-432.
- ⁵⁰ Gruner, S. A. W., Locardi, E., Lohof, E., Kessler, H., *Chem. Rev.* **2002**, 102, 491-514.
- ⁵¹ McGavin, R. S., Bundle, D. R., *Poster PB117, 12th European Carbohydrate Symposium – Grenoble, 2003*.
- ⁵² Lindhorst, Th. K., *Topics Curr. Chem.* **2002**, 218, 201-235.
- ⁵³ Tronchet, J. M. J., Habashi, F., Martin, O. R., Bonenfant, A. P., Baehler, B., Zumwald, J.-B., *Helv. Chim. Acta* **1979**, 62, 894-898.
- ⁵⁴ Freudenberg, K., Doser, A., *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1925**, 58, 294-303.
- ⁵⁵ a) Myers, W. H., Robertson, G. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, 65, 8-11.
b) Wiggins, L. F., *J. Chem. Soc.* **1947**, 18-21.
c) Coxon, B., Hough, L., *Carbohydr. Res.* **1979**, 73, 47-57.
- ⁵⁶ Corbett, W. M., *J. Chem. Soc.* **1961**, 2926-2930.
- ⁵⁷ Baer, H. H., Rajabalee, F., *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 4086-4089.
- ⁵⁸ Bolton, C. H., Khan, M. Y., Hough, L., *Carbohydr. Res.* **1966**, 1, 493-494.
- ⁵⁹ Corbett, W. M., McKay, J. E., *J. Chem. Soc.* **1961**, 2930-2935.
- ⁶⁰ Tronchet, J. M. J., Baehler, B., Zumwald, J.-B., *Helv. Chim. Acta* **1977**, 60, 1932-1934.
- ⁶¹ Skita, A., Keil, F., Baesler, E., Boente, L., *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1928**, 61, 1682-1692.
- ⁶² Kagan, F., Rebenstorf, M. A., Heinzelman, R. W., *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 3541-3544.
- ⁶³ Gray, G. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, 163, 426-428.
- ⁶⁴ DeMesmaeker, A., Waldner, A., Sanghvi, Y. S., Lebreton, J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 395-398.
- ⁶⁵ Sanghvi, Y. S., in *Carbohydrate Mimics*; Chapleur, Y., (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, 523-536.
- ⁶⁶ Tarasevich, V. A., Kozlov, N. G., *Russ. Chem. Rev.* **1999**, 68, 55-72.
- ⁶⁷ Borch, R. F., Bernstein, M. D., Durst, H. D., *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 2897-2904.
- ⁶⁸ Lane, C. F., *Synthesis* **1975**, 135-146.

- ⁶⁹ Abbadi, A., van Bakkum, H. in *Fine Chemicals through Heterogeneous Catalysis*, Sheldon, R. A., van Bakkum, H. (Eds.), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**, 380-388.
- ⁷⁰ Cervigni, S., Dumy, P., Mutter, M., *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1325-1328; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1230-1232.
- ⁷¹ Gray, G. R., *Methods Enzymol.* **1978**, *50*, 155-161.
- ⁷² Saito, H., Nishimura, Y., Kondo, S., Komura, K., Takeuchi, T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 2493-2497.
- ⁷³ Kottenhahn, M., Harr, H., Drauz, K., Degussa AG, Ger. Offen. DE 4123248, **1993**; *Chem. Abstr.* **1993**, 119, P73120z.
- ⁷⁴ Walton, D. J., Ison, E. R., Szarek, W. A., *Carbohydr. Res.* **1984**, *128*, 37-49.
- ⁷⁵ Hall, L. D., Yalpani, M., *Macromolecules* **1984**, *17*, 272-281.
- ⁷⁶ Liu, X.-C., Dordick, J. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 466-467.
- ⁷⁷ Limberg, G., Thiem, J., *Synthesis* **1994**, 317-321.
- ⁷⁸ Lee, R. T., Lee, Y. C., *Methods Enzymol.* **1989**, *179*, 257-261.
- ⁷⁹ Hall, L. D., Yalpani, M., *Carbohydr. Res.* **1980**, *81*, C10-C12.
- ⁸⁰ Cederberg, B. M., Gray, G. R., *Anal. Biochem.* **1979**, *99*, 221-230.
- ⁸¹ Zhang, J., Kováč, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 487-490.
- ⁸² Gradnig, G., Legler, G., Stütz, A. E., *Carbohydr. Res.* **1996**, *287*, 49-57.
- ⁸³ Baxter, E. W., Reitz, A. B., *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3175-3185.
- ⁸⁴ Alper, P. B., Hendrix, M., Sears, P., C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1965-1978.
- ⁸⁵ Wong, C.-H., Hendrix, M., Manning, D. D., Rosenbohm, C., Greenberg, W. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8319-8327.
- ⁸⁶ Ender, S., *Diplomarbeit, Universität Hamburg*, **1999**.
- ⁸⁷ Feizi, T., *Nature* **1985**, *314*, 53-57.
- ⁸⁸ Varki, A., *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- ⁸⁹ Fraser-Reid, B., Tatsuta, K., Thiem, J. (Eds.), *Glycoscience – Chemistry and Chemical Biology*, Springer Verlag, Berlin, **2001**.
- ⁹⁰ Mukaiyama, T., Murai, Y., Shoda, S., *Chem. Lett.* **1981**, 431-432.
- ⁹¹ Kochetkov, N. K., Bochkov, A. F., Sokolovskaya, T. A., Synatkova, V. J., *Carbohydr. Res.* **1971**, *16*, 17-27.
- ⁹² Schmidt, R. R., Kinzy, W., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21-123.
- ⁹³ Fügedi, P., Garegg, P. J., Lönn, H., Norberg, T., *Glycoconjugate J.* **1987**, *4*, 97-108.
- ⁹⁴ Mootoo, D. R., Date, V., Fraser-Reid, B., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2662-2663.

- ⁹⁵ Griffith, D. A., Danishefsky, S. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5811-5819.
- ⁹⁶ Thiem, J., Karl, H., Schwentner, J., *Synthesis* **1978**, 696-698.
- ⁹⁷ Hanessian, S., Banoub, J., *Carbohydr. Res.* **1977**, *59*, 261-267.
- ⁹⁸ Ogawa, T., Beppu, K., Nakabayashi, S., *Carbohydr. Res.* **1981**, *93*, C-6-C-9.
- ⁹⁹ Lerner, L. M., *Carbohydr. Res.* **1990**, *207*, 138-141.
- ¹⁰⁰ Toshima, K., Tatsuta, K., *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1503-1531.
- ¹⁰¹ Fügedi, P., Garregg, P. J., *Carbohydr. Res.* **1986**, *149*, C-9-C12.
- ¹⁰² Gijzen, H. J. M., Qiao, L., Fitz, W., Wong, C.-H., *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 443-473.
- ¹⁰³ van den Eijnden, D. H. in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*; Ernst, B., Hart, G. W., Sinaÿ (Eds.); Wiley-VCH, Weinheim **2000**, *2*, 589-624.
- ¹⁰⁴ Ajisaka, K., Yamamoto, Y. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **2002**, *14*, 1-11.
- ¹⁰⁵ Thiem, J., *FEMS Microbiol. Rev.* **1995**, *16*, 193-211.
- ¹⁰⁶ Shoda, S.-I., in *Glycoscience – Chemistry and Chemical Biology*, Fraser-Reid, B., Tatsuta, K., Thiem, J. (Eds.) Springer Verlag, Berlin, **2001**, *2*, 1465-1496.
- ¹⁰⁷ Vocadlo, D. J., Withers, S. G. in *Carbohydrates in Chemistry and Biology*; Ernst, B., Hart, G. W., Sinaÿ (Eds.); Wiley-VCH, Weinheim **2000**, *2*, 723-844.
- ¹⁰⁸ Wong, C.-H. in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Drauz, K., Waldmann, H. (Eds.), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, *2*, 609-653.
- ¹⁰⁹ Gambert, U., Thiem, J., *Topics Curr. Chem.* **1997**, *186*, 21-43.
- ¹¹⁰ Křen, V., Thiem, J., *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 463-473.
- ¹¹¹ Crout, D. H., MacManus, D. A., Critchley, P., *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1990**, 1865-1868.
- ¹¹² Křen, V., *Topics Curr. Chem.* **1997**, *186*, 45-64.
- ¹¹³ Recombinant Biocatalysis Inc., San Diego, CA, USA.
- ¹¹⁴ Li, J., Wang, P. G., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7967-7970.
- ¹¹⁵ Finch, P., Yoon, J.-H., *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 339-345.
- ¹¹⁶ Yoon, J.-H., Ajisaka, K., *Carbohydr. Res.* **1996**, *292*, 153-163.
- ¹¹⁷ Zilliken, F., Smith, P. N., Rose, C. S. Gyorgy, P., *J. Biol. Chem.* **1955**, *217*, 79-82.
- ¹¹⁸ Sakai, K., Katsumi, H., Ohi, H., Usui, T., Ishido, Y., *J. Carbohydr. Chem.* **1992**, *11*, 553-565.
- ¹¹⁹ Daiwa Kasei K. K., 7-12, Uehonmachi 5-chome, Tennoji-ku, Osaka, 543-0001, Japan.
- ¹²⁰ Mozzafer, Z., Nakanishi, K., Matsuno, R., Kamikubo, T., *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 3053-3061.

- ¹²¹ Usui, T., Morimoto, S., Hayakawa, Y., Kawaguchi, M., Murata, T., Matahira, Y., Nishida, Y., *Carbohydr. Res.* **1996**, *285*, 29-39.
- ¹²² Priya, K., Loganathan, D., *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1119-1128.
- ¹²³ Usui, T., Kubota, S., Ohi, H., *Carbohydr. Res.* **1993**, *244*, 315-323.
- ¹²⁴ Vic, G., Hastings, J. J., Howarth, O. W., Crout, D. H. G., *Tetrahedron: Asymm.* **1996**, *7*, 709-720.
- ¹²⁵ Takayama, S., Shimazaki, M., Qiao, L., Wong, C.-H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1123-1126.
- ¹²⁶ Farkas, E., Thiem, J., *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3073-3077.
- ¹²⁷ Vetere, A., Paoletti, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *219*, 6-13.
- ¹²⁸ Schmidt, U., *Dissertation*, Universität Hamburg **1999**.
- ¹²⁹ a) Singh, S., Scigelova, M., Vic, G., Crout, D. H. G., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1996**, 1921-1926. b) Singh, S., Packwood, J., Samuel, C. J., Critchley, P., Crout, D. H. G., *Carbohydr. Res.* **1995**, *279*, 293-305. c) Singh, S., Crout, D. H. G., Packwood, J., *Carbohydr. Res.* **1995**, *279*, 321-325.
- ¹³⁰ Vetere, A., Novelli, L., Paoletti, S., *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 515-521.
- ¹³¹ May, E., Thiem, J., unveröffentlichte Arbeitsergebnisse
- ¹³² Herrman, G. F., Kragl, U., Wandrey, C., *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1399-1400; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1342-1343.
- ¹³³ Hernaiz, M. J., Crout, D. H. G., *J. Mol. Cat. B:Enzymatic* **2000**, *10*, 403-408.
- ¹³⁴ Hart, J., Falshaw, A., Farkas, E., Thiem, J., *Synlett* **2001**, 329-332.
- ¹³⁵ Herrman, G. F., Ichikawa, Y., Wandrey, C., Gaeta, F. C. A., Paulson, J. C., Wong, C.-H., *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3091-3094.
- ¹³⁶ Nilsson, K. G. I., *Carbohydr. Res.* **1987**, *167*, 95-110.
- ¹³⁷ Yanahira, S., Kobayashi, T., Suguri, T., Nakakoshi, M., Miura, S., Ishikawa, H., Nakajima, I., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, *59*, 1021-1026.
- ¹³⁸ Murata, T., Akimoto, S., Horimoto, M., Usui, T., *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1997**, *61*, 1118-1120.
- ¹³⁹ Fang, J., Xie, W., Li, J., Wang, P. G., *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 919-922.
- ¹⁴⁰ Komba, S., Ito, Y., *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 1174-1185.
- ¹⁴¹ Werschkun, B., König, W. A., Křen, V., Thiem, J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1995**, 2459-2466.
- ¹⁴² Kiso, T., Nakano, H., Nakajima, H., Terai, T., Okamoto, K., Kitahata, S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 1702-1706.

- ¹⁴³ Kimura, T., Takayama, S., Huang, H., Wong, C.-H., *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2503-2505; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2348-2350.
- ¹⁴⁴ Murata, T., Kosugi, M., Nakamura, T., Urashima, T., Usui, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 2456-2464.
- ¹⁴⁵ Lee, R. T., Lee, Y. C., *Carbohydr. Res.* **1974**, *37*, 193-201.
- ¹⁴⁶ Warren, C. D., Jeanloz, R. W., *Carbohydr. Res.* **1977**, *53*, 67-84.
- ¹⁴⁷ Avigad, G., Amaral, D., Asensio, C., Horecker, B. L., *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 2736-2743.
- ¹⁴⁸ Whittaker, J. W., *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2347-2364.
- ¹⁴⁹ Knowles, P., Ito, N. in *Perspect. Bioinorg. Chem.* **1993**, *2*, 207-244.
- ¹⁵⁰ Ito, N., Phillips, S. E. V., Stevens, C., Ogel, Z. B., McPherson, M. J., Keen, J. N., Yadav, K. D. S., Knowles, P. F., *Nature* **1991**, *350*, 87-90.
- ¹⁵¹ Itoh, S., Taki, M., Fukuzumi, S. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *198*, 3-20.
- ¹⁵² Whittaker, J. W., in *Metal Ions in Biological Systems*; Sigel, H. (Ed.); Marcel Dekker: New York **1994**, *30*, 315-360.
- ¹⁵³ McPherson, M. J., Parsons, M. R., Spooner, R. K., Wilmot, C. R., in *Handbook of Metalloproteins*; Messerschmidt, A., Huber, R., Wieghardt, K., Poulos, T. (Eds.); Wiley: Hoboken **2001**, 1272-1283.
- ¹⁵⁴ Whittaker, J. W., Whittaker, M. M., *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 903-910.
- ¹⁵⁵ Whittaker, M. M., Whittaker, J. W., *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6074-6080.
- ¹⁵⁶ Schlegel, R. A., Gerbeck, C. M., Montgomery, R., *Carbohydr. Res.* **1968**, *7*, 193-199.
- ¹⁵⁷ Bretting, H., Jacobs, G., *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *913*, 342-348.
- ¹⁵⁸ Andreana, P. R., Xie, W., Cheng, H. N., Qiao, L., Murphy, D. J., Gu, Q.-M., Wang, P. G., *Org. Lett.* **2002**, 1863-1866.
- ¹⁵⁹ Mazur, A. W., Hiler, G. D., *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4471-4475.
- ¹⁶⁰ Petterson, B., Theander, O. *Acta. Chem. Scand.*, **1974**, *28*, 29-35.
- ¹⁶¹ Wolfrom, M. L., Thompson, A., *Methods Carbohydr. Chem.* **1963**, *2*, 65-68.
- ¹⁶² Sowden, J. C., Schaffer, R. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 4662-4664.
- ¹⁶³ Peirce, G., *J. Biol. Chem.* **1915**, *23*, 327-337.
- ¹⁶⁴ Anthonsen, T., Sallam, M. A. E., *Carbohydr. Res.* **1980**, *78*, 368-371.
- ¹⁶⁵ Campbell, R. E., Tanner, M. E., *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1593-1595, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1520-1522.
- ¹⁶⁶ Lombardo, L., *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 4293-4296.
- ¹⁶⁷ Lay, H., Lehmann, J., Ziser, L., *Carbohydr. Res.* **1989**, *195*, 145-149.

- ¹⁶⁸ Müller, T., Schmidt, R. R., *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1467-1468; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1328-1329.
- ¹⁶⁹ Martins Alho, M. A., D'Accorso, N. B., Thiel, I. M. E., *J. Heterocycl. Chem.* **1996**, *33*, 1339-1343.
- ¹⁷⁰ Horton, D., Nakadate, M., Tronchet, J. M. J., *Carbohydr. Res.* **1968**, *7*, 56-65.
- ¹⁷¹ Howarth, G. B., Lance, D. G., Szarek, W. A., Jones, J. K. N., *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 75-79.
- ¹⁷² Lehmann, J., Schäfer, H., *Chem. Ber.* **1972**, *105*, 969-974.
- ¹⁷³ Lee, H. H., Hodgson, P. G., Bernacki, R. J., Korytnyk, W., Sharma, M., *Carbohydr. Res.* **1988**, *176*, 59-72.
- ¹⁷⁴ Blake, A. J., Gould, R. O., Paton, R. M., Young, A. A., *J. Chem. Res. Miniprint* **1993**, *12*, 3173-3190.
- ¹⁷⁵ Jenkins, D. J., Riley, A. M., Potter, B. V. L., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7719-7726.
- ¹⁷⁶ Johns, B. A., Pan, Y. T., Elbein, A. D., Johnson, C. R., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4856-4865.
- ¹⁷⁷ a) Tatsuta, K., Niwata, Y., Umezawa, K., Toshima, K., Nakata, M., *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1171-1172, b) Tatsuta, K., Niwata, Y., Umezawa, K., Toshima, K., Nakata, M., *Carbohydr. Res.* **1991**, *222*, 189-204.
- ¹⁷⁸ Halmos, T., Komiotis, D., Antonakis, K., *Carbohydr. Res.* **1986**, *156*, 256-263.
- ¹⁷⁹ Paulsen, H., Rutz, V., Brockhausen, I., *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, 735-745.
- ¹⁸⁰ Smits, E., Engberts, J. B. F. N., Kellogg, R. M., van Doren, H. A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1996**, 2873-2877.
- ¹⁸¹ Ferrier, R. J., Tyler, P. C., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1980**, 2762-2766.
- ¹⁸² Capon, B., *Chem. Rev.* **1969**, *69*, 407-498.
- ¹⁸³ Schengrund, C.-L., Kováč, P., *Carbohydr. Res.* **1999**, *319*, 24-28.
- ¹⁸⁴ Kleine, H. P., Weinberg, D. V., Kaufman, R. J., Sidhu, R. S., *Carbohydr. Res.* **1985**, *142*, 333-337.
- ¹⁸⁵ Grabowska, U., MacManus, D. A., Biggadike, K., Bird, M. I., Davies, S., Gallagher, T., Hall, L., D., Vulfson, E. N., *Carbohydr. Res.* **1998**, *305*, 351-361.
- ¹⁸⁶ Vogel, C., Bergemann, C., Ott, A. J., Lindhorst, T. K., Thiem, J., Dahlhoff, W. V., Hallgren, C., Palcic, M. M., Hindsgaul, O., *Liebigs Ann.* **1997**, 601-612.
- ¹⁸⁷ Györgydeak, Z., Szilagyi, L., *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 235-242.
- ¹⁸⁸ H. Lay, J. Lehmann, L. Ziser, *Carbohydr. Res.* **1989**, *195*, 145-149.
- ¹⁸⁹ Itoh, Y., Tejima, S., *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 957-966.

- ¹⁹⁰ Paulsen, H., Heume, M., Nürnberger, H., *Carbohydr. Res.* **1990**, *200*, 127-166.
- ¹⁹¹ Goebel, W. F., Babers, F. H., *J. Biol. Chem.* **1935**, *111*, 347-353.
- ¹⁹² Helferich, B., Berger, A., *Chem. Ber.* **1957**, *90*, 2492-2498.
- ¹⁹³ Schmidt, R. R., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21-123.
- ¹⁹⁴ Mikamo, M., *Carbohydr. Res.* **1989**, *191*, 150-153.
- ¹⁹⁵ Koeman, F. A. W., Meissner, J. W. G., van Ritter, H. R. P., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 1-25.
- ¹⁹⁶ Herzner, H., Eberling, J., Schultz, M., Zimmer, J., Kunz, H., *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, *17*, 759-776.
- ¹⁹⁷ Schmidt, R. R., Michel, J., Roos, M., *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1343-1357.
- ¹⁹⁸ Schmidt, R. R., Michel, J., *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 763-764; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 731-732.
- ¹⁹⁹ Fischer, B., Nudelman, A., Ruse, M., Herzig, J., Gottlieb, H. E., Keinan, E., *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4988-4993.
- ²⁰⁰ Hakamata, W., Nishio, T., Sato, R., Mochizuki, T., Tsuchiya, K., Yasuda, M., Oku, T., *J. Carbohydr. Chem.* **2000**, *19*, 359-377.
- ²⁰¹ De Nooy, A. E. J., Besemer, A. C., van Bakkum, H., *Synthesis* **1996**, 1153-1175.
- ²⁰² Anelli, P. L., Biffi, C., Montanari, F., Quici, S., *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2559-2562.
- ²⁰³ Siedlecka, R., Skarzewski, J., Mlochowski, J., *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2177-2180.
- ²⁰⁴ Cottier, L., Descotes, G., Lewkowski, J., Skowronski, R., Viollet, E., *J. Heterocycl. Chem.* **1995**, *32*, 927-930.
- ²⁰⁵ Bragd, P. L., Besemer, A. C., van Bakkum, H., *Carbohydr. Res.* **2000**, *328*, 355-364.
- ²⁰⁶ Jiang, B., Drouet, E., Milas, M., Rinaudo, M., *Carbohydr. Res.* **2000**, *327*, 455-461.
- ²⁰⁷ Dess, D. B., Martin, J. C., *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155-4156.
- ²⁰⁸ Ireland, R. E., Liu, L., *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2899.
- ²⁰⁹ Dess, D. B., Wilson, S. R., Martin, J. C., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2488-2495.
- ²¹⁰ De Munari, S., Frigerio, M., Santagostino, M., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9272-9279.
- ²¹¹ Dess, D. B., Martin, J. C., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7277-7287.
- ²¹² Bretting, H., Jacobs, G., *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *913*, 342-348.
- ²¹³ Hall, L. D., Yalpani, M., *Carbohydr. Res.* **1980**, *81*, C10-C12.
- ²¹⁴ Osuga, D. T., Feather, M. S., Shah, M. J., Feeney, E., *J. Protein Chem.* **1989**, *8*, 519-528.
- ²¹⁵ Eyrisch, O., Keller, M., Fessner, W.-D., *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9013-9016.
- ²¹⁶ Lee, R. T., Lee, Y. C., *Methods Enzymol.* **1989**, *179*, 257-261.
- ²¹⁷ Liu, X.-C., Dordick, J. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 466-467.

- ²¹⁸ a) Mazur, A. W. in *Enzymes in Carbohydrate Synthesis*; Bednarski, M. D., Simon, E. S. (Eds.), ACS Symposium Series 466, Washington, DC, **1991**, 99-110. b) Crane, L. J., Mazur, A. W., Nau, D. R., Kluesener, B. W., The Procter & Gamble Company, US Patent 5149646, **1991**; *CAS* **1991**, 112, P 158826q.
- ²¹⁹ Hinweise, technischer Kundendienst der Firma Sigma
- ²²⁰ Maradufu, A., Perlin, A. S., *Carbohydr. Res.* **1974**, 32, 127-136.
- ²²¹ Ekborg, G., Vranesic, B., Bhattacharjee, A. K., Kovac, P., Glaudemans, C. P. J., *Carbohydr. Res.* **1985**, 142, 203-211.
- ²²² Bernet, B., Vasella, A., *Helv. Chim. Acta* **1979**, 62, 1990-2016.
- ²²³ Ireland, R. E., Norbeck, D. W., *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3279-3285.
- ²²⁴ Werschkun, B. *Dissertation, Universität Hamburg*, **1997**, 126-127.
- ²²⁵ Kunz, H., Weißmüller, J., *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1561-1575.
- ²²⁶ Binkley, R. W., *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 1216-1221.
- ²²⁷ Cree, G. M., Mackie, D. M., Perlin, A. S., *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 511-512.
- ²²⁸ Gurjar, M. K., Chakrabarti, A., Rao, V. B., Kumar, P., *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 6885-6888.
- ²²⁹ Grzeszczyk, B., Zamojski, A. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2000**, 65, 610-620.
- ²³⁰ Barili, P. L., Berti, G., Catelani, G., Colonna, F., Marra, A., *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 2307-2310.
- ²³¹ Barili, P. L., Berti, G., Catelani, G., Colonna, F., Marra, A., *Tetrahedron* **1990**, 46, 5365-5376.
- ²³² Catelani, G., Colonna, F., Marra, A., *Carbohydr. Res.* **1988**, 182, 297-300.
- ²³³ Knapp, S., Carlos, J., Freeman, B., *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4800-4804.
- ²³⁴ Vogel, C., Steffan, W., Ott, A. Y., Betaneli, V. I., *Carbohydr. Res.* **1992**, 237, 115-129.
- ²³⁵ Barili, P. L., Berti, G., D'Andrea, F., Di Bussolo, V., Granucci, I., *Tetrahedron* **1992**, 48, 6273-6284.
- ²³⁶ Barragan, V., Menger, F. M., Caran, K. L., Vidil, C., Morère, A., Montero, J.-L., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **2001**, 85-86.
- ²³⁷ Kötter, S., Krallmann-Wenzel, U., Ehlers, S., Lindhorst, T. K., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1998**, 2193-2200.
- ²³⁸ Szarek, W. A., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1973**, 28, 225-306.
- ²³⁹ Staudinger, H., Mayer, J., *Helv. Chim. Acta* **1919**, 2, 635-646.
- ²⁴⁰ Gololobov, Y. G., Kasukhin, L. F., *Tetrahedron* **1992**, 48, 1353-1406.

- ²⁴¹ France, C. J., McFarlane, I. M., Newton, C. G., Pitchen, P., Barton, D. H. R., *Tetrahedron* **1991**, 47, 6381-6388.
- ²⁴² Horner, L., Gross, A., *Liebigs Ann. Chem.* **1955**, 591, 117-134.
- ²⁴³ Mosby, W. L., Silva, M. L., *J. Chem. Soc.* **1965**, 1003-1012.
- ²⁴⁴ Kroshefsky, R. D., Verkade, J. G., *Inorg. Chem.* **1975**, 14, 3090-3095.
- ²⁴⁵ Staudinger, H., Hauser, E., *Helv. Chim. Acta* **1921**, 4, 861-886.
- ²⁴⁶ Leffler, E., Honsberg, U., Tsuno, Y., Forsblad, I., *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 4810-4814.
- ²⁴⁷ Wittig, G., Schwarzenbach, K., *Liebigs Ann. Chem.* **1961**, 650, 1-20.
- ²⁴⁸ MacManus, D. A., Grabowska, U., Biggadike, K., Bird, M. I., Davies, S., Vulfson, E. N., Gallagher, T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 295-305.
- ²⁴⁹ Weingarten, S., Thiem, J., *Synlett* **2003**, 1052-1054.
- ²⁵⁰ Brown, A. J., *J. Chem. Soc. (Trans.)* **1892**, 61, 369-385.
- ²⁵¹ Henri, V., *C. R. hebd. Acad. Sci. Paris* **1902**, 135, 916-919.
- ²⁵² Henri, V., *Lois Générales de l' Action des Diastases* **1903**, Hermann, Paris.
- ²⁵³ Michaelis, L., Menten, M. L., *Biochem. Z.* **1913**, 49, 333-369.
- ²⁵⁴ Briggs, G. E., Haldane, J. B. S., *Biochem. J.* **1925**, 19, 338-339.
- ²⁵⁵ A. Werner, *Dissertation, Martin-Luther-Univ. Halle-Wittenberg* **2002**, 19-20.
- ²⁵⁶ Stewart, L., Klinman, J. P., *FEBS Letters* **1999**, 454, 229-232.
- ²⁵⁷ Gray, G. R., *Methods Enzymol.* **1978**, 50, 155-161.
- ²⁵⁸ Bergmann, M., Zervas L., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1931**, 64, 975-980.
- ²⁵⁹ Medgyes, A., Farkas, E., Lipták, A., Pozsgay, V., *Tetrahedron* **1997**, 53, 4159-4178.
- ²⁶⁰ Schäfer, A., *Dissertation, Universität Hamburg*, **1999**.
- ²⁶¹ Bamford, M. J., Castro Pichel, J., Husman, W., Patel, B., Storer, R., Weir, N. G., *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1995**, 1181-1187.
- ²⁶² Kieburg, C., *Dissertation, Universität Hamburg*, **1997**.
- ²⁶³ Tagmose, T. M., Bols, M., *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 453-462.
- ²⁶⁴ Susaki, H., Suzuki, K., Ikeda, M., Yamada, H., Watahabe, H. K., *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 2090-2096.
- ²⁶⁵ Kuhn, R., Baer, H. H., Seeliger, A., *Liebigs Ann. Chem.* **1958**, 611, 236-241.
- ²⁶⁶ Morís-Varas, F., Qian, X.-H., Wong, C.-H., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7647-7652.
- ²⁶⁷ Black, W.A. P., Colquhoun, J.A., Dewar, E.T., *Carbohydr. Res.* **1967**, 5, 362-365.
- ²⁶⁸ DeGarcia-Martin, G., Gasch, C., Gomez-Sanchez, A., Dianez, J., Castro, A. L., *Carbohydr. Res.* **1987**, 162, 181-198.
- ²⁶⁹ Coles, H. W., Dodds, M. L., Bergeim, F. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, 60, 1020-1022.

-
- ²⁷⁰ Chernyak, A. Y., Sharma, V. M., Kononov, L. O., Krishna, P. R., Levinsky, A. B., Kochetkov, N. K., Rao, A. R., *Carbohydr. Res.* **1992**, 223, 303-309.
- ²⁷¹ Meyer zu Reckendorf, W., Rolf, L., Wassiliadou-Micheli, N., *Carbohydr. Res.* **1975**, 45, 307-311.

Zum Schluss möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mir während der Anfertigung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen:

Ulrich, Lilia, den ehemaligen und jetzigen Mitgliedern des AK Thiem, meinen Schwerpunktpraktikantinnen Maren, Hülya und Janna, allen ISP-, OC-F- und Biochemie-Studenten, die bei mir gearbeitet haben, dem AK Margaretha für das zur-Verfügung-Stellen des Photometers und Fernando für die Hilfe bei der LCMS-Messung.

Saskia Weingarten

Geburtstag: 11.11.1974
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: verheiratet

Ausbildung

08/1981 – 07/1985 Grundschole Gottfried-Keller-StraÙe, Norderstedt
08/1985 – 07/1994 Copernicus-Gymnasium, Norderstedt
07/1994 Abitur
seit 10/1994 Studium der Chemie an der Universität Hamburg
09/1996 Vordiplomprüfung
02/1999 Diplomprüfung
03/1999 – 09/1999 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. J. Thiem
Synthese von Glycomimetika mit ionischen Funktionen
09/1999 Diplom
10/1999 – 08/2003 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. J. Thiem

Beruflicher Werdegang

11/1996 – 01/1997 Studentenbetreuung in praktischen Kursen der Organischen Chemie,
Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg
06/1998 – 07/1998 Synthese und Analytik im Rahmen des Sonderforschungsbereichs
470 „Glycostrukturen in Biosystemen“
04/1999 – 09/1999 Studentische Hilfskraft am Institut für Organische Chemie
04/2000 – 06/2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen des AIF-Projektes
„Enzymsynthese präbiotischer Oligosaccharide“
07/2000 – 03/2002 Stipendiatin der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der
Chemischen Industrie
seit 04/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin als Assistentin im Integrierten
Synthesepraktikum für Chemiker und im Organisch-Chemischen
Fortgeschrittenenpraktikum für Chemiker