

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*-Mesityl- (**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 Aminozuckern 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 Aminozuckern **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*-methylene- (**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.