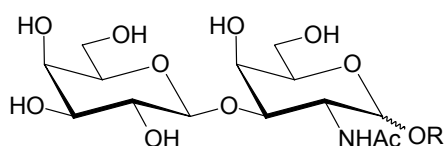


Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Darstellung einer Vielzahl modifizierter Derivate der T-Antigen-Determinante Gal β 1-3GalNAc mit chemoenzymatischen Methoden. In allen Fällen erfolgte die Modifikation an dem jeweiligen monomeren Baustein vor der Bildung des entsprechenden Disaccharids. Für die Knüpfung der glycosidischen Bindung fanden die β -Galactosidasen aus Rinderhoden, *Bacillus circulans* (bgaC-Gen) und *Xanthomonas manihotis* sowie eine Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* Anwendung. Der Einfluss der unterschiedlichen Akzeptor-Strukturen auf Ausbeute und Regioselektivität der Glycosylierung erlaubte es Rückschlüsse auf die Substratspezifität der verwendeten Enzyme zu ziehen.



T-Antigen-Determinante (Gal β 1-3GalNAc1-OR)

Für die Darstellung verschiedener α -konfigurierter *O*-Glycoside von GalNAc wurden mehrere Synthesewege von der direkten Fischer-Glycosylierung mit GalNAc bis zur Azidonitratisierung nach Lemieux mit anschließender Glycosylierung mit dem entsprechenden Trichloracetimidat-Donor **5** untersucht. Hinsichtlich der Kosten der Edukte und synthetischem Aufwand hat sich die Epimerisierung der entsprechenden GlcNAc-Derivate in Form ihrer 3,6-Dipivalote als besonders vorteilhaft erwiesen. Auch für die Darstellung des 1,5-Anhydrogalactitols **42** wurde die Epimerisierung des entsprechenden Glucitols mit Erfolg angewendet. Die chemoenzymatische Galactosylierung der α -konfigurierten Methyl- (**18**), Allyl- (**1**), Benzyl- (**20**) und 2-(Trimethylsilyl)ethyl- (**21**) Glycoside von GalNAc sowie von **42** lieferten stets die β 1-3-verknüpften Disaccharide in guten bis sehr guten Ausbeuten. Bei Verwendung der β -Galactosidasen aus *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans* konnte das ebenfalls gebildete 1-6-Regioisomer im Anschluss an die Transglycosylierung durch Zugabe der β -Galactosidase aus *Escherichia coli* hydrolysiert werden. Das gleichfalls dargestellte β -Thioglycosid **33** zeigte bei allen Enzymen inhibitorische Eigenschaften und konnte nicht galactosyliert werden. Dagegen ließen sich *C*-Glycoside als Akzeptoren für die Galactosylierung einsetzen.

In den Untersuchungen zur Darstellung von 2-Desoxy- α -glycosiden zeigte sich bei einfachen Aglycon-Strukturen die Falck-Mioskowski-Methode hinsichtlich Selektivität und Ausbeute der NBS-/NIS-Methode und der Glycosylierung nach Sabesan überlegen. Alle Enzyme glycosylierten die α -verknüpften 2-Desoxy-glycoside in niedrigeren Ausbeuten als die 2-Acetamidoverbindungen, eine Verminderung der Regioselektivität wurde dagegen nicht beobachtet. Die β -Galactosidase aus Rinderhoden glycosylierte allerdings Methyl-2-desoxy- α -D-galacto-

pyranosid (**51**) regiospezifisch in Position 3, bei Verwendung des entsprechenden 2-Desoxy- β -glycosids **52** als Akzeptor entstand ebenfalls das β 1-6-Regioisomer im Verhältnis 2:1. Die chemoenzymatische Galactosylierung von β -Alkylgalactosiden verlief mit den β -Galactosidasen nur in niedrigen Ausbeuten, und es entstand ein Gemisch aus β 1-3- und β 1-6-verknüpften Produkten. Interessanterweise konnte mit dem Enzym aus Rinderhoden ein Wechsel der Regioselektivität beobachtet werden: während das Allyl- β -D-galactopyranosid (**59**) eher an Position 3 galactosyliert wurde, entstand beim entsprechenden 2-(Trimethylsilyl)-ethylderivat **60** bevorzugt das β 1-6-verknüpfte Produkt (Verhältnis 3:1). Mit der Phosphorylase konnte in keinem Fall eine Umsetzung beobachtet werden.

D-Galactal (**62**) ließ sich nicht von den β -Galactosidasen glycosylieren, gab aber bei der selektiven Acetylierung an Position 6 mit der Lipase aus *Candida rugosa* das acetylierte Galactal **64**. Mit diesem lieferten alle Enzymen regiospezifisch das β 1-3-verknüpfte Produkt. Die entsprechenden Inkubationen mit den *gluco*-konfigurierten Derivaten **61** und **63** ergaben mit den Enzymen aus *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans* das an Position 3 galactosylierte Glucal in vergleichbaren Ausbeuten. Die β -Galactosidase aus Rinderhoden führte in guten Ausbeuten zur Bildung eines Regioisomerengemisches durch Glycosylierung an den beiden äquatorialen Positionen 3 und 4 im Verhältnis 3:1 beim ungeschützten Akzeptor **61** und 13:1 im Falle des an Position 6 acetylierten D-Glucals (**63**). Die durch Hydrierung von D-Galactal erhältliche 1,2-Didesoxyverbindung **66** wurde von allen verwendeten Enzymen in guten bis sehr guten Ausbeuten in Position 3 galactosyliert.

α -Allyl-GlcNAc (**8**) und die entsprechenden Methyl- (**24**) und Benzyl- (**25**) Derivate wurden von den β -Galactosidasen aus *Xanthomonas manihotis* und *Bacillus circulans* in guten Ausbeuten regioselektiv an Position 3 glycosyliert. Das Enzym aus Rinderhoden ergab dagegen, wie bereits beim D-Glucal, ein Regioisomerengemisch aus dem β 1-3- und dem β 1-4-Produkt, wobei die Regioselektivität mit steigendem sterischen Anspruch des Aglycons zunahm. Diese Beobachtung wurde bei der Galactosylierung des 1,5-Anhydroglucitols (**45**) bestätigt: bei Umsetzung mit der β -Galactosidase aus Rinderhoden überwog das an Position 4 galactosylierte Produkt, die anderen eingesetzten Enzyme ergaben ausschließlich das β 1-3-verknüpfte Disaccharid. Das an Position 4 desoxygenierte α -Allylderivat **69** konnte in hervorragenden Ausbeuten mittels Barton-McCombie-Desoxygenierung gewonnen werden, und es wurde von allen zur Verfügung stehenden Enzymen ausschließlich an Position 3 galactosyliert. Das 4-Fluorderivat **77** mit *galacto*-Konfiguration wird dagegen von keinem der Enzyme akzeptiert.

Die Darstellung des 2,4-Didesoxyderivats **73** erfolgte ebenfalls durch Barton-McCombie-Desoxygenierung der Position 4 vom Allyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosid (**54**) ausgehend. Die anschließende chemoenzymatische Umsetzung mit den β -Galactosidasen verlief relativ unspezifisch unter der Bildung von Gemischen, in denen das an Position 6 glycosylierte Produkt den größeren Anteil gegenüber dem β 1-3-verknüpften Disaccharid ausmachte. Die Phosphorylase

erkannte den so modifizierten Akzeptor nicht mehr. Die Darstellung von α -Allyl-FucNAc (**80**) und den an den Positionen 2 (**85**) bzw. 4 (**94**) desoxygenierten FucNAc-Derivaten wurde durchgeführt, allerdings wurde mit keinem dieser Akzeptoren die Galactosylierung mit einer der β -Galactosidasen beobachtet.

In einem zweiten Teil zur Darstellung von Derivaten der T-Antigen-Determinante wurde der Einsatz modifizierter Donoren für die chemoenzymatische Galactosylierung mit der β -Galactosidase aus Rinderhoden untersucht. Es gelang den Referenz-Akzeptor α -Allyl-GalNAc nicht nur mit *p*NP-Gal, sondern ebenfalls mit den an Position desoxygenierten und verkürzten Donoren *p*NP-D-Fuc bzw. *p*NP-L-Ara zu glycosylieren, wobei es zu einer geringen Abnahme der Ausbeute kam. Die Umsetzung von *p*NP-Gal mit der Galactoseoxidase aus *Dactylium dendroides* lieferte den Aldehyd **128** als oxidierten Donor, der aber nicht von dem Enzym aus Rinderhoden erkannt wurde. Dies gilt ebenfalls für das 6-Fluoro-*p*NP-Gal (**129**), bei dessen Synthese die Bildung des neuartigen Donors **133** erfolgte, der durch Eliminierung eine exocyclische Doppelbindung erhielt. Während **133** von der β -Galactosidase nicht erkannt wurde, konnte ein um einen Kohlenstoff verlängerter Donor **136** mit vinyli-scher Doppelbindung regioselektiv auf Position 3 von α -Allyl-GalNAc übertragen werden. Der an Position 4 epimerisierte Donor *p*NP-Glc wurde ebenfalls erkannt, allerdings erfolgte die Transglycosylierung ausschließlich auf die primäre Alkoholfunktion des Akzeptors in guten Ausbeuten. Während eine Galactosylierung von D-Galactal (**62**) mit *p*NP-Gal nicht möglich war, konnte eine langsame Addition von Wasser an die Doppelbindung beobachtet werden. Unter optimierten Reaktionsbedingungen gelang die Umsetzung von **62** mit α -Allyl-GalNAc in der Gegenwart der β -Galactosidase aus Rinderhoden unter regio-spezifischer Bildung des Disaccharids 2dGal β 1-3GalNAc α -OAll (**139**).

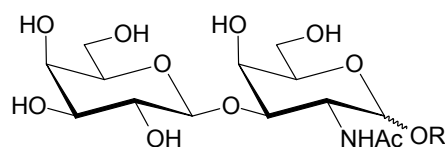
In einer vergleichenden Untersuchung mit *p*NP-Gal als Referenz-Donor wurden mehrere potentielle Donoren für β -Galactosidasen mit unterschiedlichen Abgangsgruppen synthetisiert und mit dem Enzym aus Rinderhoden umgesetzt. Einsatz fanden zunächst Disaccharide mit einer β -verknüpften Galactose am nichtreduzierenden Ende, wobei die Ausbeuten der Transglycosylierung allerdings niedrig ausfielen. Ferner wurde eine große Zahl neuartiger β -Arylgalactoside in der Regel durch Phasentransferkatalyse dargestellt, die als Abgangsgruppe unterschiedliche halogenierte Phenole, Benzylalkohol, Benzoesäure, Benzoesäuremethylester, Benzaldehyd oder ein Anilin enthalten. Erwähnt sei das Auftreten einer intermolekularen Acetylgruppenwanderung auf die benzyli-sche Alkoholgruppe bei der Galactosylierung von Hydroxybenzylalkoholen, z. B. **160** oder **167**. Die Synthese der ebenfalls untersuchten Pyridylglycoside erfolgte durch Umsetzung mit den jeweiligen Silberpyridoxinen. Bei der Transglycosylierung zeigten die Donoren mit halogenierten Phenolen, Benzylalkoholen oder Benzoesäuremethylestern als Abgangsgruppen keinen Einfluss auf die Ausbeuten. Eine leichte Verbesserung der Ausbeuten konnte mit einem Benzaldehyd als Abgangsgruppe erreicht werden, wohingegen Benzoesäuren oder Aniline niedrige bis gar keine Ausbeuten ergaben. Schließlich zeigten auch die kommerziell erhältlichen,

unpolaren Glycosyldonoren Resorufinyl- und 4-Methylumbelliferyl- β -Gal ein niedrigeres Transglycosylierungspotential als *p*NP-Gal.

Im abschließenden Teil der Arbeit wurde eine neue thermophile β -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1 zur chemoenzymatischen Galactosylierung von verschiedenen Inositolen verwendet. Hierbei handelt es sich erst um das zweite Beispiel der Anwendung einer β -Galactosidase für die Synthese derartiger Pseudo-Disaccharide mit einer deutlich breiteren Substratspezifität. Die Identifizierung der Glycosylierungsprodukte erfolgte sowohl durch umfangreiche NMR-Spektroskopie als auch die Permethylierungsanalyse nebst Gaschromatographie. 1D- und 1L-*chiro*-Inositol konnten jeweils in Position 1 und 3 galactosyliert werden, 1D-Pinitol in Position 1 und 6, 1L-Quebrachitol wurde dagegen nicht erkannt. Aus den Ergebnissen ließ sich eine Konsensuskonfiguration für die optimale Erkennung durch die β -Galactosidase aus *Thermoanaerobacter* sp. Mutante TP6-B1 ermitteln.

Summary

Within this work a multitude of modified derivatives of the T-antigen Gal β 1-3GalNAc motif were synthesised employing chemoenzymatic methods. Modifications were introduced on the stage of the monomeric building blocks prior to formation of the disaccharides. The glycosidic linkage was established by means of the β -galactosidases from bovine testes, *Bacillus circulans* (bgaC-gene) and *Xanthomonas manihotis* as well as the phosphorylase from *Bifidobacterium bifidum*. Conclusions on the substrate specificities of the employed enzymes were drawn, facilitated by the influence of the diverse acceptor structures concerning yield and regioselectivity.



T-Antigen-Determinant (Gal β 1-3GalNAc1-OR)

Different approaches for the synthesis of α -configured *O*-glycosides of GalNAc were evaluated. Epimerisation of the corresponding GlcNAc derivatives, protected in position 3 and 6 as pivaloates, proved to be beneficial compared to direct Fischer glycosylation of GalNAc or azidonitration of galactal according to Lemieux followed by trichloroacetimidate-based glycosylation. A corresponding epimerisation was successfully applied for the preparation of 1,5-anhydrogalactitol **42** as well. Enzymatic galactosylation of the α -configured methyl (**18**), allyl (**1**), benzyl (**20**) and 2-(trimethylsilyl)-ethyl (**21**) glycosides of GalNAc as well as **42** gave the β 1-3-linked disaccharide products in good to excellent yields. In the reactions utilising the β -galactosidases from *Xanthomonas manihotis* and *Bacillus circulans* the formation of a β 1-6 linked product was observed as well; these in turn could be selectively hydrolysed by the addition of a β -galactosidase from *Escherichia coli* after finishing transglycosylation. β -Thioglycoside **33**, another potential acceptor, showed inhibitory properties independent of the enzyme used. In contrast, *C*-glycosides could be galactosylated chemoenzymatically.

Investigations into the synthesis of simple 2-deoxy- α -glycosides revealed the Falck-Mioskowski method to be superior in respect to selectivity and yield compared to the NBS-/NIS-methods and the glycosylation according to Sabesan. All enzymes were able to glycosylate 2-deoxy- α -glycosides without loss of regioselectivity although the yields were generally lower. β -Galactosidase from bovine testes glycosylated methyl 2-deoxy- α -D-galactopyranoside (**51**) exclusively in position 3, however, the corresponding β -anomer gave both the β 1-3 and the β 1-6-regioisomers in a ratio of 2:1. Treatment of β -alkyl galactosides with the available β -galactosidases provided a mixture of the β 1-3- and β 1-6-linked disaccharides in low yields. The bovine testes enzyme exhibited a noteworthy regioselectivity depending on the nature of the aglycon: Whereas incubation of allyl β -D-galactopyranoside (**59**) favoured the galactosylation at position

3, the respective 2-(trimethylsilyl)-ethyl derivative **60** preferentially gave rise to the β 1-6-linked product in a ratio of 3:1. No reaction was observed in these cases employing the phosphorylase.

D-Galactal (**62**) was not an acceptor of any of the employed glycosylating enzymes, but it could be selectively acetylated at position 6 applying a lipase from *Candida rugosa*. With this acetylated galactal **64** all enzymes provided regiospecifically the β 1-3-linked product. Incubation of the corresponding *gluco*-configured derivatives **61** and **63** with the β -galactosidases from *Xanthomonas manihotis* and *Bacillus circulans* gave only rise to glycosylation at position 3 of the respective acceptor. In contrast, the enzyme from bovine testes afforded a mixture of regioisomers, glycosylated at position 3 and 4. In case of the unprotected acceptor **61** the ratio was 3:1, whereas the 6-acetylated D-glucal **63** shifted the ratio to 13:1 in favour of the β 1-3-linked product. 1,2-Dideoxy derivative **66**, formed by hydrogenation of **62**, was galactosylated by all enzymes at position 3 in good to excellent yields.

On treatment with the β -galactosidases from *Xanthomonas manihotis* and *Bacillus circulans* the allyl (**8**), methyl (**24**) and benzyl (**25**) 2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosides gave only the β 1-3-linked products. On the other hand, the enzyme from bovine testes catalysed glycosylation at position 3 and 4, the regioselectivity increasing in favour of the β 1-3-product with increasing sterical demand of the aglycon. Chemoenzymatic galactosylation of 1,5-anhydroglucitol **45** confirmed this observation: incubation with the β -galactosidase from bovine testes afforded preferentially the β 1-4-linked product, whereas the other enzymes glycosylated only position 3. The α -allyl derivative **69**, deoxygenated at position 4, was available by Barton-McCombie deoxygenation in excellent yields. Treatment with any of the enzymes resulted in regiospecific galactosylation of position 3. In contrast, the 4-fluoro derivative **77** with *galacto*-configuration was accepted by none of the enzymes.

Starting from allyl 2-deoxy- α -D-galactopyranoside (**54**), Barton-McCombie deoxygenation enabled the synthesis of the 2,4-dideoxy derivative **73**, which was not accepted by the phosphorylase. **73** was galactosylated by the β -galactosidases with low selectivity, the β 1-6-linked disaccharide being formed preferentially over its β 1-3-regioisomer. α -Allyl FucNAc (**80**) and its derivatives **85** and **94**, deoxygenated in position 2 and 4, respectively, were synthesised, however on treatment with the enzymes no galactosylation of these acceptors could be observed.

In the second part concerning the synthesis of T-antigen derivatives, the feasibility of employing modified donors in bovine testes β -galactosidase catalysed reactions was examined. The reference acceptor α -allyl-GalNAc was glycosylated in a slightly reduced yield, employing the modified donors *p*NP-D-Fuc and *p*NP-L-Ara. Oxidation of *p*NP-Gal in the presence of galactose oxidase from *Dactylium dendroides* provided aldehyde **128** as an oxidised donor, which was not recognized by the enzyme from bovine testes. The same was true for known donor 6-fluoro-*p*NP-Gal (**129**). While exploring a new access to **129**, elimination occurred and resulted in the

novel donor **133**, which contained an exocyclic double bond. **133** was not accepted by the β -galactosidase. In contrast, an elongated donor **136**, containing a vinylic double bond was transferred to position 3 of α -allyl-GalNAc. The epimeric donor *p*NP-Glc was recognized as a donor, but transglycosylation occurred only to position 6. Whereas galactosylation of D-galactal (**62**) with *p*NP-Gal was not achievable, slow addition of water was observed, resulting in 2-deoxy-D-galactose. Optimised reaction conditions enabled the condensation of **62** and α -allyl-GalNAc in the presence of β -galactosidase from bovine testes, forming the disaccharide 2dGal β 1-3GalNAc α -OAll (**139**).

In a comparative study using *p*NP-Gal as a reference, potential donors for β -galactosidases with different leaving groups were synthesised and reacted in the presence of the enzyme from bovine testes. The yields were low employing disaccharides containing a β -linked galactose moiety at the non reducing end. In addition, a large number of novel β -aryl galactopyranosides were synthesised employing phase transfer catalysis. They contained different halogenated phenols, benzyl alcohol, benzoic acid, methyl benzoate, benzaldehyde, or aniline as leaving groups. During synthesis an unusual intermolecular acetyl migration onto the benzylic alcohol group was observed during galactosylation of hydroxyl benzyl alcohols, e. g. **160** or **197**. Pyridyl glycosides were obtained by reaction with the corresponding silver pyridoxides. Donors with halogenated phenols, benzyl alcohol, or methyl benzoate as leaving groups had no influence on the yields of transglycosylation. A minor increase was achieved with a bezaldehyde as leaving group, whereas benzoic acids or aniline gave a very low or no yield of the transglycosylation product. Finally, commercially available donors resorufinyl and 4-methylumbelliferyl β -D-galactopyranosides exhibited a lower transglycosylation potential than *p*NP-Gal.

In the final part a new thermophilic β -galactosidase from *Thermoanaerobacter* sp. strain TP6-B1 was employed for chemoenzymatic galactosylations of different inositols. This is the second application of a β -galactosidase for the synthesis of such pseudo disaccharides with a noticeable broader substrate specificity. Identification was achieved by extensive NMR spectroscopy and permethylation analysis together with gas chromatography. Galactosylation of 1D- and 1L-*chiro*-inositol occurred in each case at position 1 and 3. 1D-Pinitol was glycosylated at position 1 and 6, in contrast, 1L-quebrachitol was not recognized by the enzyme. These results led to an assessment of the acceptor preferences of the β -galactosidase from *Thermoanaerobacter* sp. strain TP6-B1.