

Katharina Gallas

**Untersuchung der Kiliani-Fischer-Reaktion für die Darstellung von
Aldoheptosen und deren Anwendung für die Synthese von
C-Glycosyl-Glycokonjugaten**

DIPLOMARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Ingenieurin

erreicht an der

Technischen Universität Graz

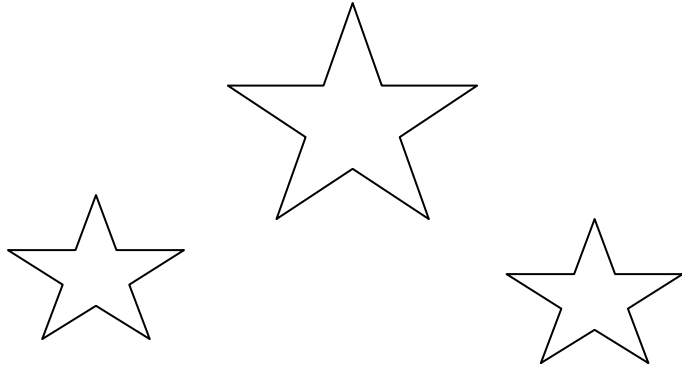
Betreuerin

Assoc. Prof. Dipl.-Ing. Dr. *techn.* Tanja M. Wrodnigg

Institut für Organische Chemie

Technische Universität Graz

2010



Deutsche Fassung:
Beschluss der Curricula-Kommission für Bachelor-, Master- und Diplomstudien vom 10.11.2008
Genehmigung des Senates am 1.12.2008

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

.....

(Unterschrift)

Englische Fassung:

STATUTORY DECLARATION

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources / resources, and that I have explicitly marked all material which has been quoted either literally or by content from the used sources.

.....

date

.....

(signature)

Danksagung

Zu allererst möchte ich Prof. DI. Dr. Tanja Wrodnigg für die Aufnahme in die Glycogroup und die interessante Themenstellung dieser Diplomarbeit danken. Du warst die Erste, die durch ihre Arbeit und ihre Begeisterung auch mich für die Chemie begeistern konnte und dafür bin ich dir wirklich dankbar. Die Zeit in dieser Gruppe war sehr lehrreich, spannend, lustig und „feierreich“.

Besonders möchte ich mich auch bei Prof. DI. Dr. Arnold E. Stütz bedanken. Die oft hilfreichen oder aufmunternden Worte haben, vor allem in nicht so angenehmen Zeiten, sehr geholfen und ohne die Schokolade wäre ich wahrscheinlich in schwere „chemische Depressionen“ versunken.

Weiters gilt mein Dank natürlich allen Kollegen am Institut für Organische Chemie für das angenehme Umfeld und die netten Gespräche. Vor allem auch Prof. Dr. Rolf Breinbauer für die großzügige Finanzierung der Arbeit. Bei Birgit Krenn bedanke ich mich für die Hilfe bei den Nitrilsynthesen und bei Carina Illaszewicz-Trattner und Prof. Dr. Jörg Weber für die Unterstützung bei der NMR Spektroskopie.

Vergessen will ich natürlich die Menschen nicht, mit denen ich die meiste Zeit verbracht habe, Flo, Gerit, Uwe, Georg, Patrick und Martin, die mit Rat und Tat immer da waren und die Zeit hier sehr angenehm gestaltet haben.

Ein Dank noch an meine rechte Seite, an Verena, die über ein Jahr fast jeden Tag mit mir verbracht hat und mit der ich so ziemlich jedes nützliche wie unnütze Gespräch geführt habe. Geholfen hats immer und ich werde es sehr vermissen einen Menschen zu haben, der schon weiß was ich denke, bevor ich es selbst weiß.

Außerdem sind da noch Menschen wie Philipp, Tobi und Clemens, die während des ganzen Studiums mit vielen guten chemischen wie menschlichen Ratschlägen für mich da waren und wenns ganz schlimm war auch ihre Freizeit für mich geopfert haben.

Meiner Familie möchte ich danken, dass sie mich finanziell und moralisch unterstützt haben und immer an mich geglaubt haben.

Meinen anderen Freunden danke ich für die Ablenkung vom Studium durch diverse Festivitäten und sinnlos oder sinnvoll verbrachte Stunden und meinen Tieren dafür, dass sie wirklich die einzigen sind, die ich immer anjammern kann, ohne einen blöden Kommentar zu erhalten und die mich trotzdem lieben.

DANKE!

Kurzfassung

Glykokonjugate, das sind Strukturen, in denen Kohlenhydrateinheiten kovalent an Biomoleküle wie Peptide, Proteine und Lipide gebunden sind, sind allgegenwärtig in jedweder Form von Leben. Sie spielen eine wichtige Rolle in Prozessen, wie der Kommunikation von Zellen, sowie Erkennungs- und Signalprozessen, die auf Kohlenhydrat-Kohlenhydrat- oder Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen basieren.

Außerdem können Modifikationen der Kohlenhydratstruktur Charakteristika von therapeutischen Komponenten, wie deren Lebensdauer, Absorption oder Wirkung in physiologischen Systemen, dramatisch ändern.

Da synthetische Glykokonjugate des C-Glycosyl-Typs eine erhöhte Stabilität gegenüber natürlich vorkommenden Glycoproteinen aufweisen, besteht Interesse daran, eine kurze, einfache Synthese für deren Herstellung zu entwickeln.

Um den Schlüsselschritt zum Erhalt dieser Glykokonjugate, die Amadori-Umlagerung durchführen zu können, wurden zuerst Heptosen aus drei wichtigen Kohlenhydratkonfigurationen hergestellt. D-Glucose, D-Galactose und D-Mannose wurden mittels einer modifizierten Kiliani-Fischer-Reaktion in die jeweiligen Heptosen kettenverlängert und anschließend mit diversen Aminen zu den gewünschten Glykokonjugaten umgesetzt, welche als Bausteine für komplexere Glycoproteine dienen können.

Abstract

Glycoconjugates – structures where carbohydrate units are bound covalently to biomolecules such as peptides, proteins or lipids – are ubiquitous in all living organisms. They participate in the cell-cell communication, recognition and signalling processes based on carbohydrate-carbohydrate or carbohydrate-protein interactions.

Furthermore, carbohydrate modifications change the characteristics of therapeutic compounds such as their life time, absorption or penetration in physiological systems dramatically.

In this diploma thesis a short and simple synthetic route towards C-glycosyl-type glycoconjugates was developed. In this context, the Amadori rearrangement was explored as the key step for this conjugation. In order to address the three important carbohydrate configurations, *D-gluco*, *D-galacto* as well as *D-manno*, the corresponding heptoses have been synthesised as starting materials by a modified Kiliani-Fischer-reaction. The Amadori rearrangement was successfully applied to the heptoses using different amines as well as amino acid derivatives. For further stabilisation of the anomeric position the corresponding cyclic carbamates were formed with participation of the introduced amine at position C-1 leading to C-glycosyl-type glycoproteins.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	9
1 EINLEITUNG	10
1.1 Kohlenhydrate	10
1.2 Glykokonjugate	14
1.3 Glycolipide	17
1.4 Glycoproteine	19
1.4.1 <i>N</i> -glycosidische Glycane	21
1.4.2 <i>O</i> -glycosidische Glycane	23
1.4.3 <i>C</i> -Glycosyl-Typ Glycane	26
1.5 Glykierung	28
1.6 Amadori-Umlagerung	30
2 ZIELE	36
3 DURCHFÜHRUNG	38
3.1 Kettenverlängerung	38
3.2 Amadori-Umlagerung	46
4 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION	52
5 EXPERIMENTELLER TEIL	55
5.1 Analytik	55
5.2 NMR-spektroskopische Daten	56
5.3 Material	56
5.3.1 HCN – Herstellung	56
5.3.2 Peracetylierung und Mikroaufarbeitung	57
5.4 Darstellung der Produkte	57
5.4.1 <i>D-gluco</i> Serie	57
<i>D-Glycero-D-gulo/D-ido</i> -heptonolacton (2)	57
<i>D-Glycero-D-ido/D-gulo</i> -heptopyranose (3)	58
1-(<i>N,N</i> -Dibenzyl)amino-1-desoxy- α - <i>D-gluco</i> -hept-2-ulopyranose (4)	59
1-(<i>N</i> -Methoxycarbonylpentyl)amino-1-desoxy- α - <i>D-gluco</i> -hept-2-ulopyranose (5)	60
1-(<i>N</i> -6-Hydroxyhexyl)amino-1-desoxy- α - <i>D-gluco</i> -hept-2-ulopyranose (6)	61

Inhaltsverzeichnis

5.4.2 D- <i>galacto</i> Serie	62
D- <i>Glycero-L-manno/L-gluco</i> -heptonolacton (8)	62
D- <i>Glycero-L-manno/L-gluco</i> -heptononitril (8C)	63
D- <i>Glycero-L-manno/L-gluco</i> -heptopyranose bzw. D- <i>Glycero-L-manno/L-gluco</i> -heptoseptanose (9)	64
1-(N,N-Dibenzyl)amino-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulopyranose bzw. 1-(N,N-Dibenzyl)amino-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulofuranose (10)	65
1-(N-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulopyranose bzw. 1-(N-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulofuranose (11)	66
1-(N-6-Hydroxyhexyl)amino-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulopyranose bzw. 1-(N-6-Hydroxyhexyl)amino-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulofuranose (12)	67
1-(N-Methoxycarbonylpentyl-14-t-butylamino)amino-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulopyranose bzw. 1-(N-Methoxycarbonylpentyl-14-t-butylamino)amino-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulofuranose (13)	68
1-(N-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-N,2-O-carbonyl-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulopyranose bzw. 1-(N-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-N,2-O-carbonyl-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulofuranose (14)	69
1-(N-6-Hydroxyhexyl)amino-1-N,2-O-carbonyl-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulopyranose bzw. 1-(N-6-Hydroxyhexyl)amino-1-N,2-O-carbonyl-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulofuranose (15)	69
5.4.3 D- <i>manno</i> Serie	70
D- <i>Glycero-D-galacto/D-talo</i> -heptonolacton (17)	70
D- <i>Glycero-D-galacto/D-talo</i> -heptononitril (17C)	71
D- <i>Glycero-D-galacto/D-talo</i> -heptopyranose (18)	72
1-(N,N-Dibenzyl)amino-1-desoxy- α -D- <i>manno</i> -hept-2-ulopyranose (19)	74
1-(N-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-desoxy- α -D- <i>manno</i> -hept-2-ulopyranose (20)	75
1-(N-6-Hydroxyhexyl)amino-1-desoxy- α -D- <i>manno</i> -hept-2-ulopyranose (21)	76
1-(N-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-N,2-O-carbonyl-1-desoxy- α -D- <i>manno</i> -hept-2-ulopyranose (22)	76
1-(N-6-Hydroxyhexyl)amino-1-N,2-O-carbonyl-1-desoxy- α -D- <i>manno</i> -hept-2-ulopyranose (23)	77
6 ANHANG	79
¹³ C-NMR –Spektren der Produkte	79
7 CURRICULUM VITAE	90
8 PUBLIKATIONSLISTE	91

Abkürzungen

$[\alpha]_D^{20}$	spezifischer Drehwert
abs.	absolutiert
AGE	Advanced Glycation Endproduct
Asn	Asparagin
BOC	tert-Butoxycarbonyl
CH	Cyclohexan
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
EE	Essigester
EtOH	Ethanol
eq	Äquivalente
Fuc	Fucose
Gal	D-Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
Glc	D-Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
H ₂ NBn ₂	Dibenzylamin
HOAc	Essigsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Man	D-Mannose
MW	Molekulargewicht
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OT	Oligosaccharyltransferase
Pd/BaSO ₄	Palladium auf Bariumsulfat
Rf-Wert	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
Ser	Serin
TEA	Triethylamin
Thr	Threonin

1 Einleitung

1.1 Kohlenhydrate

Der Ausdruck Kohlenhydrat geht auf die historische Betrachtung zurück, dass alle Komponenten, die auf der Summenformel $C_nH_{2n}O_n$ basieren, Hydrate des Kohlenstoffs sind. Ein anderer Ausdruck, Saccharid, kommt vom Griechischen Sakcharon und bedeutet Zucker.

Die strikte Definition von Kohlenhydraten hat sich seit der damaligen Zeit sehr verändert. Man betrachtet z.B. Moleküle wie Formaldehyd oder Essigsäure nicht als Saccharide, jedoch werden Strukturen, die auch Heteroatome wie Schwefel, Stickstoff oder Selen anstelle des Ringsauerstoffes enthalten sehr wohl hinzugezählt. Generell werden Polyhydroxyaldehyde und Polyhydroxyketone, die zwischen drei und neun Kohlenstoffatome beinhalten als Kohlenhydrate bezeichnet. Außerdem werden auch Oligo- und Polysaccharide, die durch Hydrolyse in ihre Monomereinheiten gespalten werden, zur Gruppe der Zucker gezählt. Ihre Klassifizierung erfolgt nach drei Charakteristika: der Anzahl der Kohlenstoffatome (Triosen C3, Tetrosen C4, usw.), der Anordnung der Carbonylgruppen (Aldose, Ketose) und ihrer Chiralität (D oder L).

Liegt die Anzahl der Zuckerreste zwischen zwei und zehn, spricht man von Di- bzw. Oligosacchariden. Diese Einheiten sind untereinander durch sogenannte glycosidische Bindungen verbunden, welche, wenn sie zwischen zwei anomeren Hydroxyfunktionen liegen, zu nicht-reduzierenden Zuckern (Saccharose) oder zwischen einer anomeren und einer Hydroxyfunktion der zweiten Einheit liegen, zu reduzierenden Zuckern führen (Lactose, Maltose).

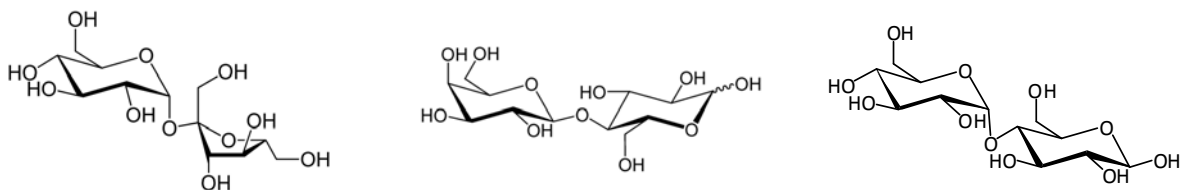


Abbildung 1: Strukturen von Saccharose, Lactose und Maltose

Sind mehr als zehn Zuckereinheiten miteinander verbunden, ist von Polysacchariden die Rede. Bei diesen Vielfachzuckern liegt oft eine unbekannte Anzahl oder statistische Molekülgrößenverteilung von Monosaccharideinheiten vor. Polysaccharide wie Cellulose und Stärke dienen als Energiegrundstoffe für Tiere und Gerüststoffe für Pflanzen.

Kohlenhydrate sind die Hauptenergiequelle von Organismen¹. Sie sind ein essentieller Teil jedes lebenden Organismus, da Kohlenhydrate Eigenschaften besitzen, durch die sie eine wichtige Rolle im Immunsystem oder in der Kommunikation von Zellen spielen. Viele Kohlenhydrate wie z.B. Glucose sind billig und leicht zu gewinnen, da sie ubiquitär vorhanden sind, aber andere sind schwer zu erhalten und teuer, was vor allem Zucker mit sieben oder mehr Kohlenstoffatomen betrifft.

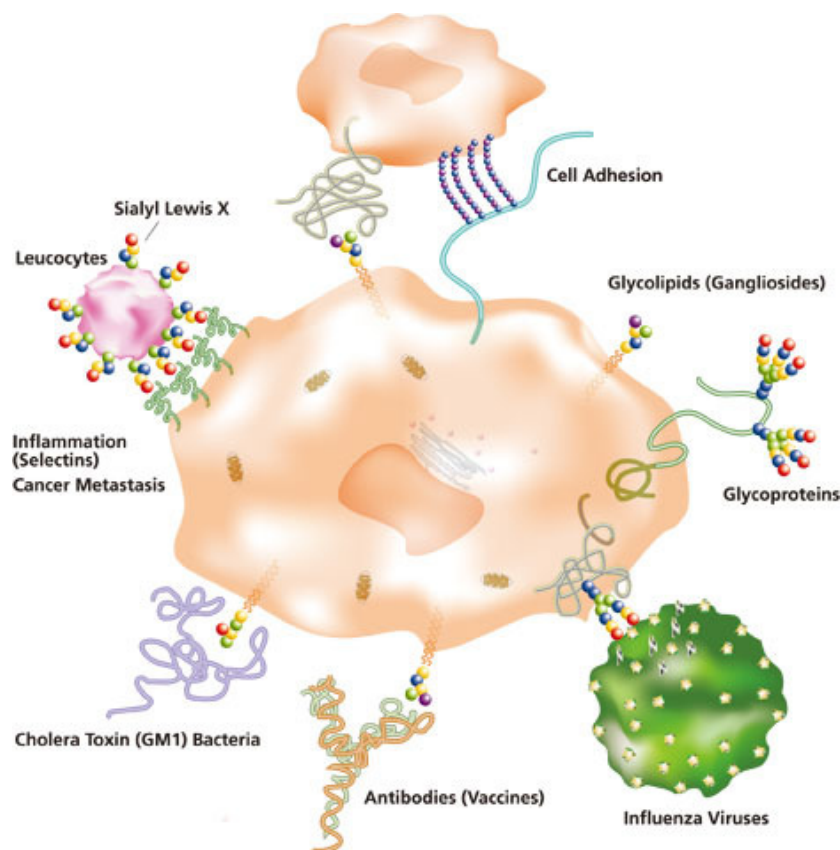


Abbildung 2²: Verschiedene Funktionen und Prozesse von Oligosacchariden an der Zelloberfläche

¹ Varki, A., *Glycobiology*, **1993**, 3, 97-130

² tansaku.otsukac.co.jp/en/images/oligo02_img1.jpg

Im menschlichen Körper gibt es viele biologisch aktive Komponenten, die Kohlenhydrate enthalten. Diese, meist komplexen, Kohlenhydratverbindungen sind beliebte Ziele von Totalsynthesen. Zwei Beispiele dafür sind Cytovaricin, das eine antineoplastische Aktivität (hemmt das abnormale Wachstum von Tumorzellen) hat³ oder Squalestatin (Zaragozic Säure A), welches eine cholesterinsenkende Wirkung besitzt⁴.

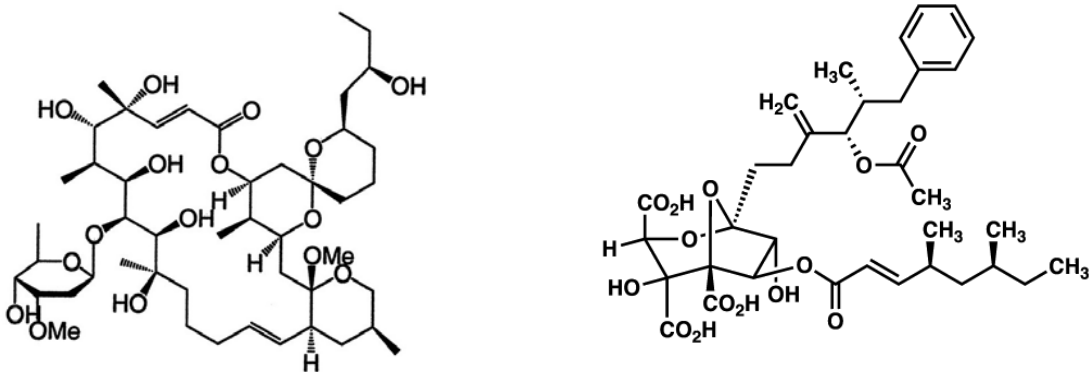


Abbildung 3: Strukturen von Cytovaricin und Squalestatin

Obwohl in der Natur ein Überfluss an Kohlenhydraten herrscht und ihre diversen Aufgaben in biologischen Systemen (Immunsystem, Pathogenese, Befruchtung, Blutgerinnung) sehr wichtig sind, wurde ihnen bis vor etwa fünfzig Jahren verhältnismäßig wenig Aufmerksamkeit gewidmet, was eine Reihe von Gründen hat. Die strukturelle Komplexität von Kohlenhydraten ist im Gegensatz zu anderen wichtigen Biopolymeren wie z.B. Proteinen, riesig, da sie viele funktionelle Gruppen besitzen und es möglich ist die verschiedenen Hydroxylgruppen zu glycosylieren und verzweigte Strukturen herzustellen. Hingegen gibt es bei Proteinen nur zwei Möglichkeiten der Verknüpfung der verschiedenen Aminosäureeinheiten. Bei einem Zucker kann jedes Stereozentrum variiert werden. Hinzu kommt, dass es noch eine große Anzahl von chemischen Funktionalisierungen am Zuckerring und an den Hydroxylgruppen gibt, welche auch in biologisch aktiven Zuckern gefunden werden. Während Oligopeptide und Oligonukleotide

³ a) Evans, D.A.; Kaldor, S.W.; Jones, T.K.; Clardy, J.; Stout, T.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 7001-7031;

b) Kihara, T.; Kusakabe, H.; Nakamura, G.; Sakurai, T.; Isono, K. *J. Antibiot.*, **1981**, *34*, 1073-1074

⁴ a) Nicolaou, K.C.; Nadin, A.; Leresche, J.E.; Yue, E.W.; Lagreca, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1994**, *33*, 2190-2191 b) Baxter, A.; Fitzgerald, B.J.; Hutson, J.L.; Mccarthy, A.D.; Motteram, J.M.; Ross, B.C.;

Sapra, M.; Snowden, M.A.; Watson, N.S.; Williams, N.S.; Williams, R.J.; Wright, C. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 11705-11708

chemisch aus monomeren Bausteinen hergestellt werden können, indem man standardisierte Methoden anwendet, obliegt man bei der Oligosaccharidsynthese einer eigens entwickelten Strategie für jedes Zielmolekül. Die chemische Anordnung von Oligosacchariden und Glycokonjugaten benötigt eine große Menge an voll funktionalisierten Monosacchariden. Üblicherweise erhält man diese aus Molekülen wie Glucose oder Galactose, die als Startmaterial mit einer Reihe von Schutzgruppenmanipulationen in die gewünschte Form gebracht werden müssen. Eine Herausforderung bei diesem Prozess stellt die Unterscheidung von bis zu fünf chemisch ähnlichen Hydroxylgruppen in Hexosen, durch temporäre und orthogonale Schutzgruppen, sowie selektive Maskierung der anomeren Hydroxylgruppe, dar.

Aufgrund der hohen Funktionalisierung von Kohlenhydraten ist es theoretisch möglich, allein aus den acht wichtigsten Monosacchariden, die in Säugetieren gefunden werden, über eine Million Tetrasaccharide herzustellen. Umgekehrt haben Untersuchungen jedoch gezeigt, dass die Natur nur eine geringe Menge der möglichen Verbindungsmöglichkeiten auch wirklich nutzt. Der Glycospace, der Grundkörper der verschiedenen Strukturen, die konstruiert werden können, ist dadurch signifikant reduziert. Chemikern reichen daher sechsunddreißig Bausteine um etwa 75% aller bekannten Oligosaccharide herzustellen, was den etwa hundert Aminosäuren für die Peptid-Synthese gegenübersteht⁵.

In der unteren Abbildung kann man zwei Beispiele für Oligosaccharide aus typischen Monomerbausteinen sehen.

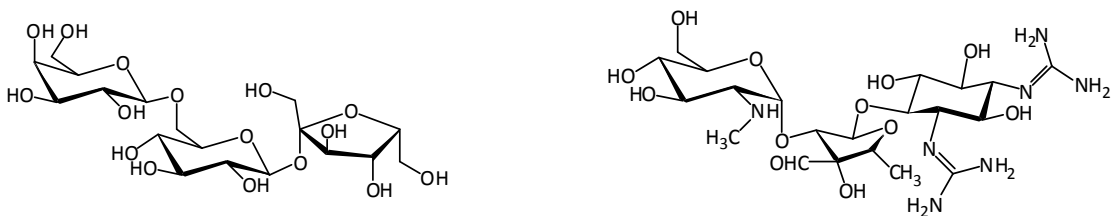


Abbildung 4: Strukturen von Raffinose und Streptomycin

⁵ Seeberger, P.H.; Werz, D.B. *Nature*, **2007**, *446*, 1046-1051

Dadurch, dass Synthesen von komplexen Kohlenhydratbausteinen sehr zeitaufwendig und teuer sind bzw. oft rund 20 Stufen haben, gerieten sie bis in die 1980er oft in den Hintergrund⁶ und trotz des häufigen Mitwirkens von Kohlenhydraten an biologischen Prozessen, gibt es überraschend wenige Therapeutika und Diagnostika, auf „Zucker“basis. Zusätzlich zu Monosaccharid Medikamenten, wie dem Mittel gegen Influenza Tamiflu^{7,8}(Oseltamivir phosphat, Roche®), gibt es noch zwei weitere Blockbuster Medikamente, nämlich Acarbose⁹ und Heparin^{10,11}. Beide Oligosaccharide wurden erhalten indem sie isoliert wurden und erreichten die klinischen Tests bevor eine detaillierte Struktur-Aktivitätsbeziehung bekannt wurde.

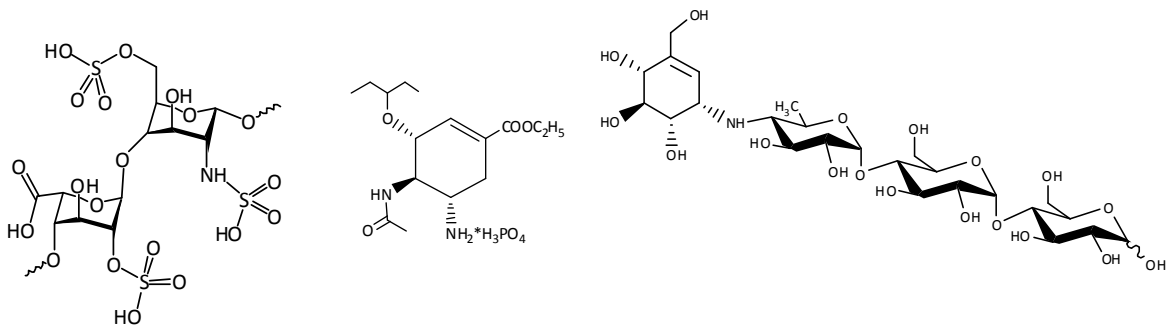


Abbildung 5: Strukturen von Heparin, Oseltamivir phosphat und Acarbose

Ein weiteres Beispiel für Saccharid-Therapeutika sind die aus Bakterien gewonnenen gereinigten Kohlenhydrate, welche mit Carrier-Proteinen verbunden, effiziente Impfstoffe gegen *Streptococcus pneumoniae*¹² und *Neisseria meningitidis*¹³ darstellen.

1.2 Glykokonjugate

Der Ausdruck Glykokonjugat definiert ganz allgemein Kohlenhydrate, die kovalent mit anderen Molekülen wie z.B. Polypeptiden verbunden sind¹⁴. Glykokonjugate sind wichtige

⁶ Ogawa, T. *Chem.Soc.Rev.*, **1994**, 23, 397-407

⁷ De Clercq, *Nature Rev.Drug Discov.*, **2006**, 5, 1015-1025

⁸ Farina, V.; Brown, J.D.*Angew.Chem.Int.Ed.*, **2006**, 45, 7330-7334

⁹ Truscheit, E.; Frommer, W.; Junge, B.; Müller, L.; Schmidt, D.D.; Wingender, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1981**, 20, 744-762

¹⁰ Petitou, M.; van Boeckel, C.A.A. *Angew.Chem.Int.Ed.*, **2004**, 43, 3118-3133

¹¹ Petitou, M.; Casu, B.; Lindahl, U. *Biochimie*, **2003**, 85, 83-89

¹² Whitney, C.G.; Farley, M.M.; Hadler, J.; Harrison, L.H.; Bennett, N.M.; Lynfield, R.; Reingold, A.; Cieslak, P.R.; Pilishvili, T.; Jackson, D. *Eng. J. Med.*, **2003**, 348, 1737-1746

¹³ Giebink, G.S.; Koskela, M.; Vella, P.P.; Harris, M.; Le, C.T. *J. Infect. Dis.*, **1993**, 167, 347-355

Biomoleküle und können in mehrere Untergruppen eingeteilt werden, z.B. in Glycoproteine, Glycolipide und Peptidoglycane¹⁵. Diese Moleküle spielen eine wichtige Rolle in inter- und intrazellulären Prozessen¹⁶.

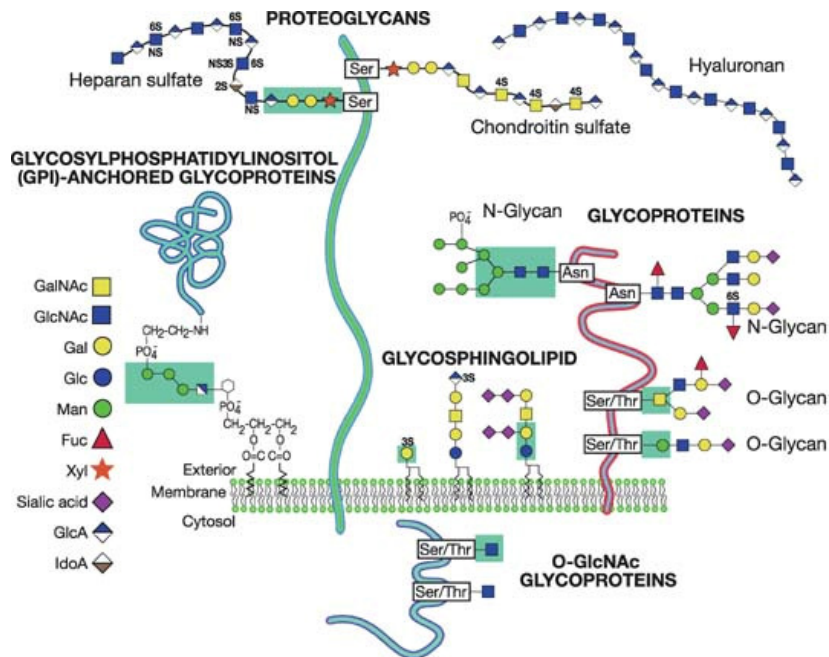


Abbildung 6¹⁷: Auswahl verschiedener Glycokonjugate

Gebildet werden Glycokonjugate durch einen Prozess, der als Glycosylierung bezeichnet wird.

In der Natur ist die Glycosylierung ein enzymatischer, regio- und stereospezifischer Vorgang, der im Gegensatz zur nicht enzymatischen, chemischen Reaktion der Glykierung steht. Die Glycosylierung verbindet Saccharide miteinander zu Glycanen, die wiederum mit Proteinen, Lipiden oder anderen organischen Molekülen verbunden sind. Weiters ist die Glycosylierung eine Form von co-translationaler und post-translationaler

¹⁴ Gottschalk, A. Historical Introduction. In *Glycoproteins* (Gottschalk, A. ed.). Elsevier Publishing, New York, 1966, 1-19,

¹⁵ T. D. H. Bugg, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 3 (Ed.: M. Pinto), Elsevier, Amsterdam, 1999, 241-294

¹⁶ Arya, P.; Sarma, B. In *The Organic Chemistry of Sugars*, Levy, D.E.; Fügedi, P.; 2006, 729-750

¹⁷ Varki, A.; Hudson, H. F.; Manzi A.E. Current Protocols in Protein Science, 2009, Online Review 12.1.1-12.1.10

Modifizierung^{1,18,19}. Die Mehrheit der Proteine, die im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden, sind einer Glycosylierungsreaktion ausgesetzt, welche außerdem im Cytoplasma und im Nucleus als O-GlcNAc Modifizierung existiert.

Es werden fünf Klassen von Glycanen produziert. N-Glycokonjugate, welche mit dem Stickstoff von Asparagin oder Arginin Seitenketten verbunden sind, O-Glycokonjugate, die mit der OH-Gruppe von Serin, Threonin, Tyrosin, Hydroxylysin oder Hydroxyprolin Seitenketten oder dem Sauerstoff von Lipiden verbunden sind. Außerdem Phospho-Glycane, die über die Phosphatgruppe von Phospho-Serin konjugiert sind, C-gebundene Glycane, bei denen ein Zucker an ein Kohlenstoffatom der Tryptophanseitenkette gebunden ist und die GPI-Anchor-Verbindung (Abbildung 7), hier wird ein Protein über eine Glycankette an einen hydrophoben Lipid-Anchor gebunden.

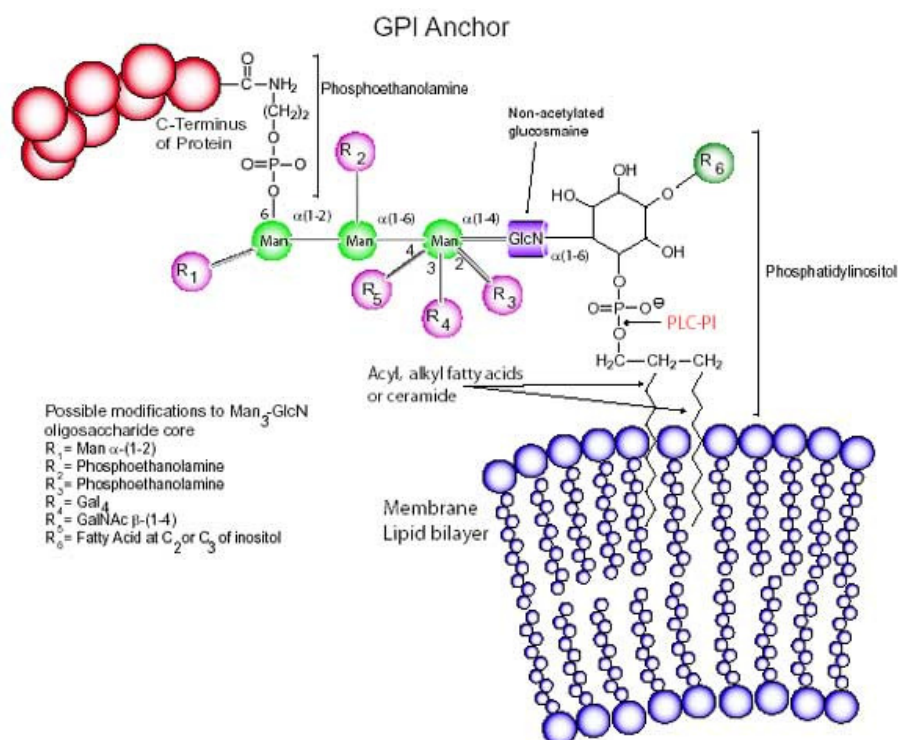


Abbildung 7: GPI - Anchor

¹⁸ Dwek, R.A. *Chem.Rev.*, **1996**, 96, 683-720

¹⁹ Sears, P.; Wong, C.H. *Cell. Mol. Life Sci.*, **1998**, 54, 223-252

Polysaccharidketten, die mit einem Protein verbunden sind, haben verschiedene Funktionen. Sie verbessern die hydrophilen Eigenschaften des Proteins, was zu einer besseren Wasserlöslichkeit führt²⁰, die korrekte Proteinfaltung wird gefördert und sie helfen die Sekundärstruktur des Proteins zu induzieren²¹.

Der Ausdruck „Glycoprotein“ tauchte das erste Mal in einem Buch von Hammerstein im Jahr 1895 auf. Jedoch wurde bis in die 1920er Jahre die Existenz von Glycoproteinen von führenden Kohlenhydratchemikern nicht akzeptiert. Dessen ungeachtet untersuchte man dieses Gebiet weiter und entdeckte im ersten Viertel des 20. Jahrhunderts einige Glycoproteine, wie Blutgruppensubstanzen und z.B. Ovalbumin, Ovomucid und Orsomucoid. Trotz allem herrschte eine gewisse Verwirrung, ob Kohlenhydrate nur „Ballast“ von Proteinen oder ein integraler Bestandteil davon seien. Anhand von Ovalbumin, das in homogener Form sehr rein durch saure Hydrolyse von Neuberger dargestellt wurde, war in den späten 1930er Jahren bestätigt worden, dass Kohlenhydrate integrale Bestandteile von Proteinen sind²². Es dauerte weitere zwei Dekaden bevor die glycosidische Bindung zwischen GlcNAc und Asparagin durch Analysen identifiziert wurde.

Da der Kohlenhydratteil von Glykokonjugaten durch die verzweigte Struktur und die vielen Stereozentren von Zuckermolekülen sehr stark variieren kann, liegt das Augenmerk seit Ende des 20. Jahrhunderts vor allem darauf, die funktionelle Signifikanz der Veränderung der Glycosylierung während der Entwicklung, dem Wachstum und Krankheiten zu untersuchen.

1.3 Glycolipide

Glycolipide sind wichtige Membrankomponenten und kommen in allen Arten von Organismen vor, von Bakterien, Pflanzen bis zu Säugetieren inklusive des Menschen. Sie sind Glykokonjugate, die mit einer oder mehreren Monosaccharideinheiten über eine glycosidische Bindung an einen hydrophoben Rest, wie Acylglycerol, Ceramid oder Prenylphosphat gebunden sind. Die Mehrheit der Glycolipide befindet sich an der

²⁰ Crocker, P.R.; Feizi, T. *Current Opinion in Structural Biology*, **1996**, *6*, 679-691

²¹ O'Connor, S.E.; Imperiali, B. *Chemistry & Biology*, **1996**, *3*, 803-812

²² Neuberger, A. *In Glycoproteins of Blood Cells and Plasma*, J.B.Lippincott, Philadelphia, **1971**, 1-15

Außenseite der Plasmamembran, wo ihre hydrophile Zuckerkette aus der Oberfläche hervorragt²³. Obwohl sie eine Heterogenität, sowohl im Zuckerteil, als auch im Ceramidteil zeigen, werden Glycolipide auf Basis ihrer Kohlenhydratstruktur identifiziert und charakterisiert. Die Haupttypen von Zuckern, die in diesem Zusammenhang im Menschen gefunden werden, sind Glucose, Galactose, Fucose, GlcNAc und GalNAc, andere kommen nur sehr selten vor. Im Allgemeinen sind sie wichtige Faktoren in der Zellstabilisierung und der Stabilität der Zelloberfläche, aber sie spielen auch eine wichtige und essentielle Rolle in biologischen Prozessen wie z.B. dem photosynthetischen Elektronentransport in Pflanzen, der Kommunikation von Zellen, der Rezeptor-Modulation und der Signaltransduktion²⁴.

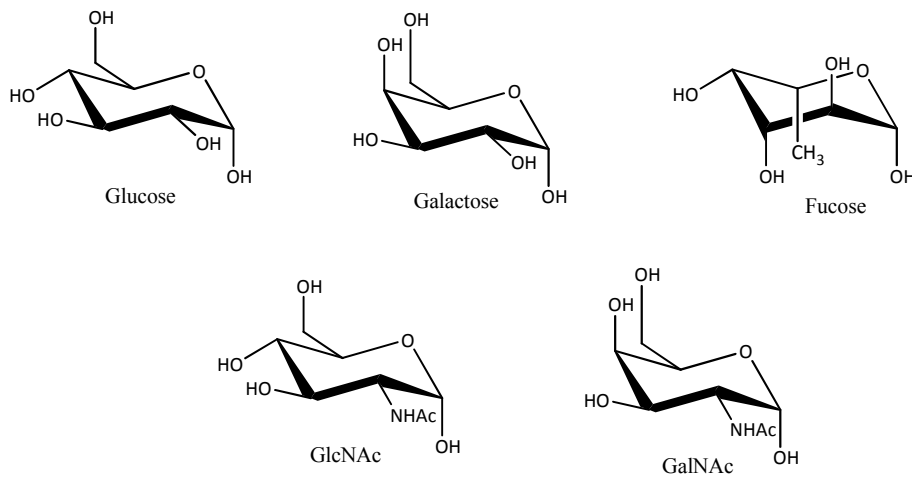


Abbildung 8: Haupttypen von Zuckern, die an Lipide gebunden sind und im Menschen gefunden werden

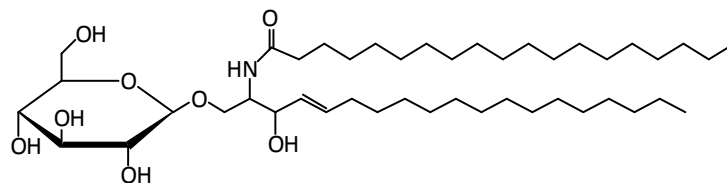


Abbildung 9: Ein Beispiel für ein Glycolipid, Galaktosylceramid

²³ Samar, K.K. In *Glycoconjugates: composition, structure, and function*, Howard, J. A. Kisailus E.C., **1992**

²⁴ Holst, O. In *Glycoscience 3, Chemistry and Chemical Biology* (Fraser-Reid, B.O.; Tatsuka, K.; Thiem, J. (Eds)) **2001**

1.4 Glycoproteine

Glycoproteine bestehen aus einem Proteinteil an den Kohlenhydrate kovalent über spezielle Aminosäuren gebunden sind¹⁶. Sie sind allgegenwärtig in Säugetieren inklusive des Menschen, eher selten in Eubakterien und haben eine Vielzahl von Aufgaben als Hormone, Toxine oder Transportproteine. Glycoproteine sind sehr vielseitig in ihrem Aufbau und ihren Aufgaben. Ihr Kohlenhydratanteil variiert von 1% in einigen Kollagenen bis zu 99% in Glycogen²⁵. Die drei Hauptbindungstypen zwischen Kohlenhydraten und Proteinen werden über das Verbindungsatom klassifiziert. Je nachdem, ob sie über Stickstoff, *N*-glycosidisch, über Sauerstoff, *O*-glycosidisch oder über ein Kohlenstoffatom, *C*-glycosidisch, gebunden sind. Durch diese Bindungen kommt es nicht nur zu unterschiedlichen Strukturen, sondern die Moleküle unterscheiden sich auch in ihren Funktionen.

Drei Beispiele für Glycoproteine bzw. ihre Unterformen

- ✿ die Glycopeptide (Abbildung 10)
- ✿ Peptidoglycan (synonym=Murein), ein Zellwandpolymer von Bakterien (Abbildung 11)
- ✿ Glycopeptidantibiotika^{26,27} (Abbildung 12).

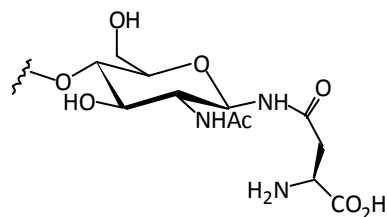


Abbildung 10: N-gebundenes Glycan in GlcNAc- β -Asn Form

²⁵ Wittman, V. In *Glycoscience—Chemistry and Chemical Biology*; Fraser-Reid, B.O.; Tatsuta, K.; Thiem, J. Ed.; Springer: Berlin Heidelberg, **2001**, 2253-2287

²⁶ Nagarajan, R. In *R. Nagarajan (ed.), Glycopeptide antibiotics*. Marcel Dekker, Inc., New York, **1994**, 195-218

²⁷ Williams, D.H.; Bardsley, B. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **1999**, 38, 1173-1193

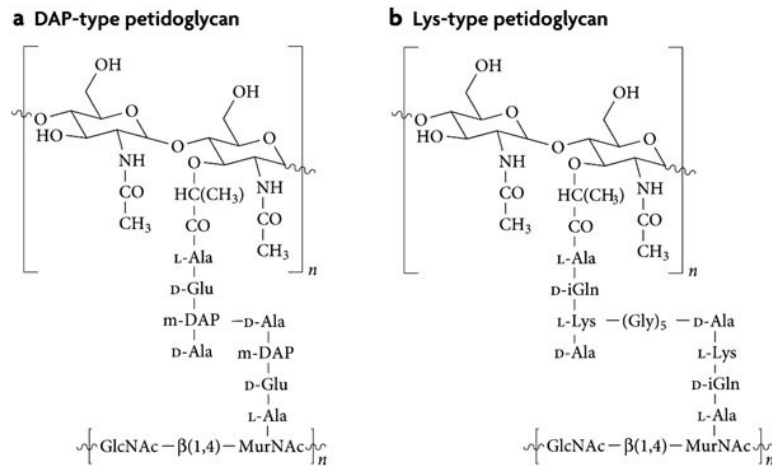


Abbildung 11²⁸: Peptidoglycan ist ein Polymer aus $\beta(1-4)$ -gebundenem *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc), typischerweise mit vier abwechselnden L- und D-Aminosäuren an MurNAc gebunden. Der DAP-Typ kommt in Gram-negativen Bakterien und Gram-positiven Bazillen vor, hier ist die dritte Aminosäure meso-Diaminopimelinsäure. Beim Lys-Typ besetzt L-Lysin die dritte Stelle der Aminosäuren und er kommt in Gram-positiven Bakterien vor.

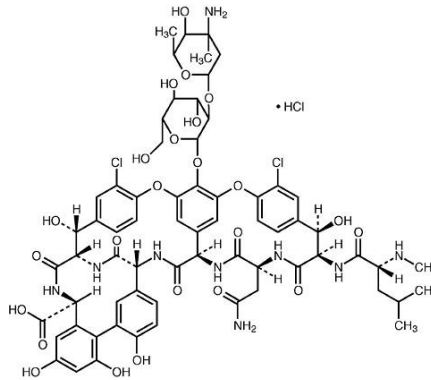


Abbildung 12: Vancomycin Hydrochlorid, ein Antibiotikum der Glycopeptidgruppe, das als Reservemedikament zur parenteralen Behandlung von Infektionskrankheiten mit resistenten Staphylokokken²⁹ und anderen bakteriellen Erregern verwendet wird.

²⁸ Royet, J.; Dziarski, R.; Nature Reviews Microbiology, **2007**, *5*, 264-277

²⁹ Williams, D.H. *Nat. Prod. Rep.*, **1996**, *13*, 469-477

1.4.1 N-glycosidische Glycane

Die Glycosylierung über die Amid-Seitenkette des Asparagins ist bekannt als eine N-glycosidische Bindung. Diese biosynthetische Modifikation eines Proteins wird co-translational im endoplasmatischen Retikulum durch eine Oligosaccharyltransferase (OT) durchgeführt³⁰. Während der Biosynthese wird durch das Enzym OT ein triantennäres Tetradecasaccharid (Glc₃Man₉GlcNAc₂) von Dolichol Pyrophosphat zum Amid Stickstoff der Asparagin-Seitenkette transferiert. Im folgenden Prozess wird das Oligosaccharid durch Glycosylhydrolasen und Glycosyltransferasen so modifiziert, dass es eine allgemeine Pentasaccharid Kernstruktur der N-Glycane erhält.

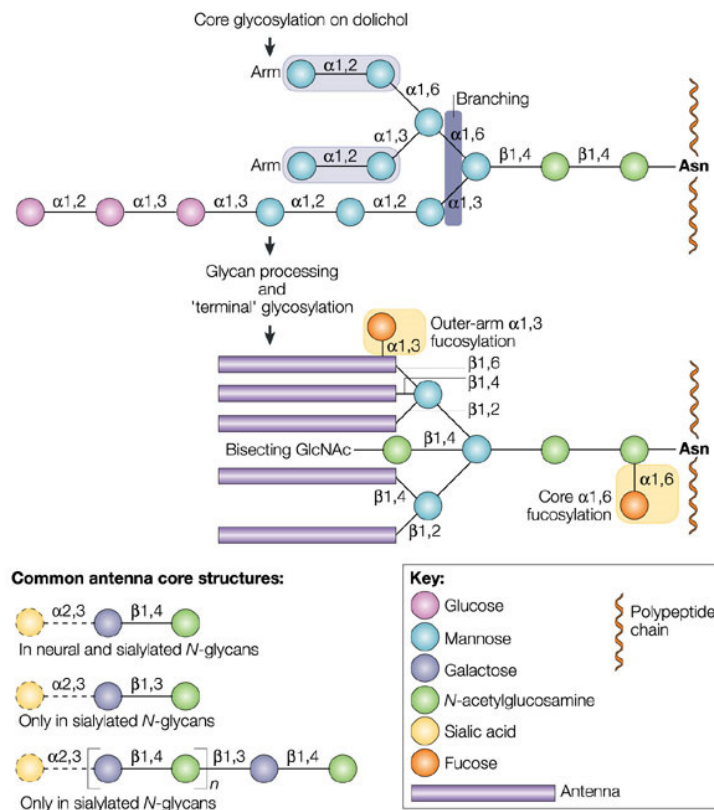


Abbildung 13³¹: Biosynthese von N-Glycanen. Der schrittweise Aufbau von drei Glucose-, neun Mannose- und zwei N-Acetylglucosaminresten in verschiedenen Bindungen an das Lipid Dolichol resultiert in der Formation eines Kern-Oligosaccharids. Diese Kernstruktur wird zu einem Asparagin transferiert. Nach dem „trimmen“ der Glucose- und eines Mannoserests wird das Glycoprotein zum Golgi-Apparat transportiert um die terminale Glycosylierung durchzuführen. Im Golgi-Apparat werden die Mannosereste entfernt und N-Acetylglucosamin, Galactose und danach Sialsäure gebunden. Verschiedene Bindungen führen zur Formation von verschiedenen Antennen.

³⁰ Silberstern, S.; Gilmore, R. *FASEB J*, **1996**, *10*, 849

³¹ Kleene, R.; Schachner, M.; *Nature Reviews Neuroscience*, **2004**, *5*, 195-208

Auf Grund dieser Biosynthese haben alle *N*-glycosidisch gebundenen Glycoproteine die gleiche Kernstruktur.

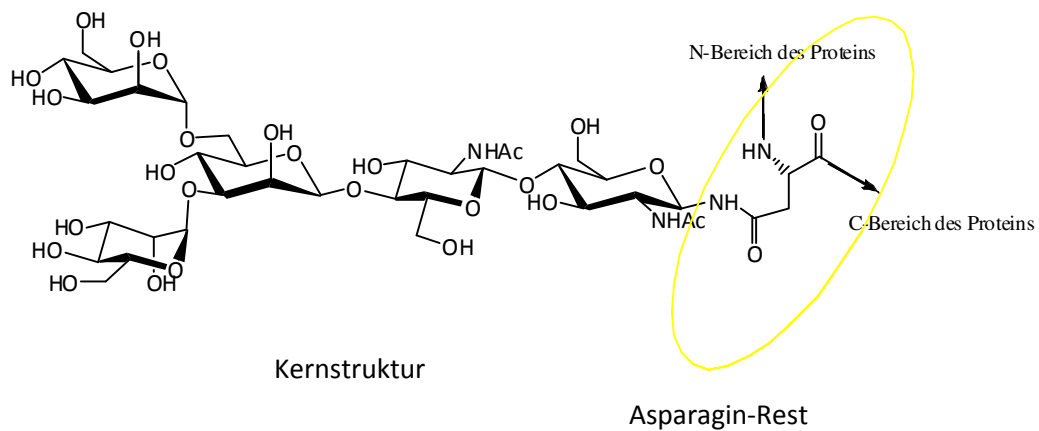


Abbildung 14: Peptid gebundene Pentasaccharid Kernstruktur Man(α 1-6)[Man(α 1-3)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc

Bis vor kurzem war die einzig bekannte Art einer *N*-glycosidischen Bindung, die *N*-Acetylglucosaminy(β 1-N)asparagin Bindung³². Neben dieser GlcNAc-Bindung wurden nun auch andere Kohlenhydrate wie α -³³ und β -Glucose³⁴, *N*-Acetylgalactosamin³⁵ und L-Rhamnose³⁶ gebunden an Asparagin gefunden, die in Glycoproteinen von Bakterien vorkommen³⁷. Die β -glucosyl-Asparagin Bindung kommt auch in dem Säugetierprotein Laminin vor³⁸.

N-Gebundene Glycoproteine zeigen trotz ihrer gemeinsamen Core-Region eine große Diversität, da durch die verschiedenen Monosaccharide und die fünf verschiedenen Antennen, eine Vielzahl von Strukturdifferenzierungen möglich sind. Daher gibt es eine weitere Einteilung in drei Gruppen, auf Grund der Struktur und Stelle, mit der das Glycan an den Trimannosylkern gebunden ist.

³² Johansen, P.G.; Marshall, R.D.; Neuberger, A. *Biochem.J.*, **1961**, 78, 518-527

³³ Shibata, S.; Takeda, T.; Natori, Y. *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 12483-12485

³⁴ Wieland, F.; Heitzer, R.; Schaefer, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1983**, 80, 5470-5474

³⁵ Paul, G.; Lottspeich, F.; Wieland, F. *J. Biol. Chem.*, **1986**, 261, 1020-1024

³⁶ Messner, P.; Sleytr, U.B. *FEBS Lett.*, **1988**, 228, 317-320

³⁷ Messner, P. *Glycoconjugate J.*, **1997**, 14, 3-11

³⁸ Schreiner, R.; Schnabel, E.; Wieland, F. *J. Cell. Biol.*, **1994**, 124, 1071-1081

Es gibt den mannosereichen Typ „High-Mannose“ bei dem zwei bis sechs Mannose-Reste an den Kern gebunden sind. Dieser Typ kommt vor allem in Hefen vor, wo es außerdem noch den „Hyper-Manose-Typ“ gibt, bei dem bis zu zweihundert Mannose-Reste gebunden sind. Den komplexen Typ „complex“, der eine variierende Anzahl von sialylierten *N*-Acetyllactosamin-Einheiten sowie auch Fucose-Reste bzw. auch jeden anderen Zucker enthalten kann. Voraussetzung hier ist, dass er mehr als die zwei ursprünglichen *N*-Acetylglucosamin-Reste enthält. Hybrid-Typen sind eine Kombination aus den beiden vorangegangenen Gruppen.

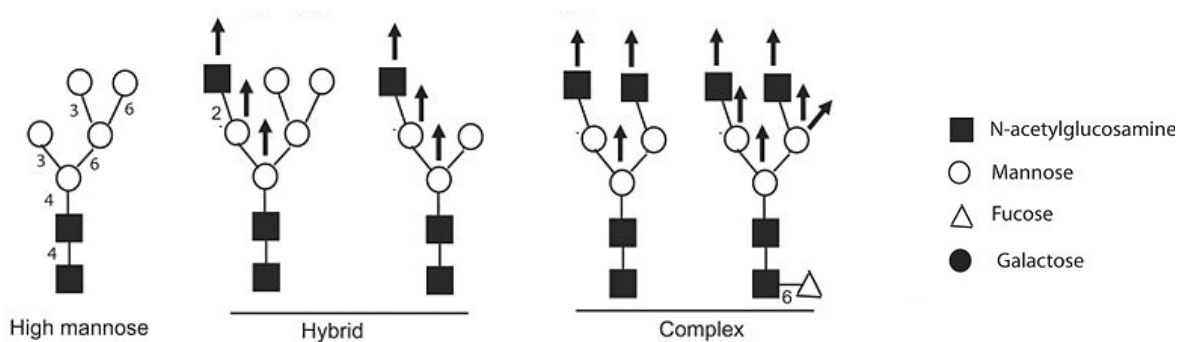


Abbildung 15: Drei Gruppen von Substrukturen

1.4.2 *O*-glycosidische Glycane

Die Biosynthese von *O*-glycosidisch gebundenen Glycoproteinen unterscheidet sich gänzlich von der *N*-glycosidischen, da es ein vollständig posttranslationaler und postfolding Prozess ist, der mit der Addition eines einzelnen Monosaccharids an eine Hydroxygruppe der Proteinseitenkette beginnt²⁵ (siehe Abbildung 16).

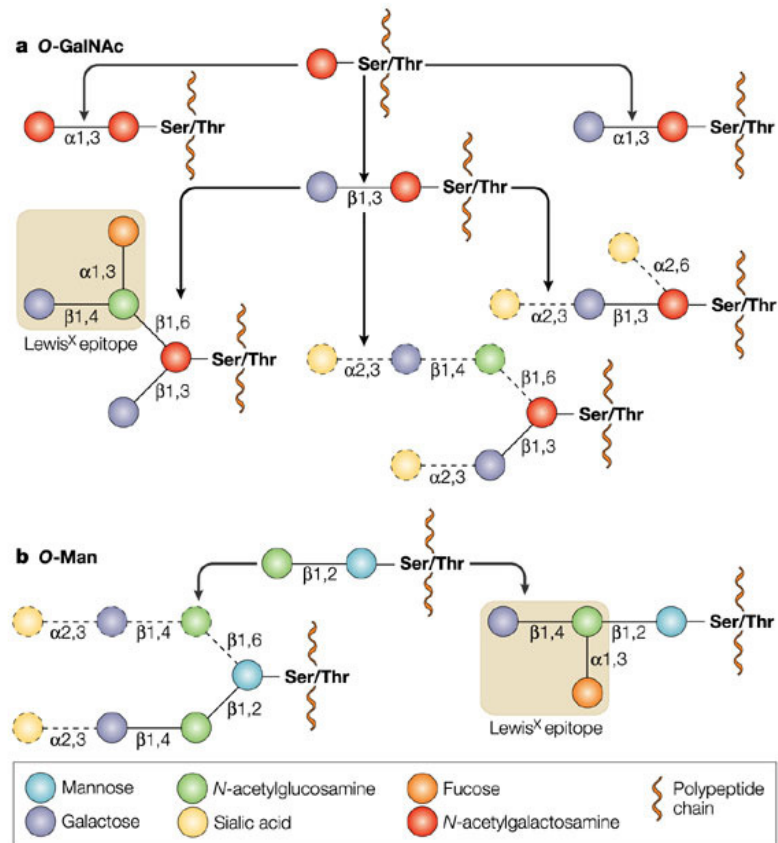


Abbildung 16³¹: Bei der *O*-Glycosylierung, die im Golgi-Apparat startet wird ein Serin- oder Threonin-Rest entweder mit einem *N*-Acetylgalactosamin-(a) oder einem Mannose-(b) Rest verbunden. Danach werden *N*-Acetylglucosamin-, Galactose-, Fucose- oder Sialinsäure-Reste schrittweise mit verschiedenen Bindungen verbunden die in verschiedenen Glycanen resultieren. Diese Strukturen inkludieren terminal α -1,3-gebundene Galactose oder *N*-Acetylgalactosamin, sowie das Lewis^x epitop. Monosaccharide, die mit gebrochenen Linien dargestellt sind können anwesend oder abwesend sein, je nach Strukturunterschied.

Dadurch entsteht eine große Vielfalt an Kohlenhydrat-Peptid Bindungen, deren größte Gruppe, die des Mucin-Typs darstellt. Diese Gruppe ist über ihre GalNAc(α 1-O)Serin/Threonin Bindung charakterisiert. Dieses Strukturelement wurde als Erstes in Mucinen identifiziert, wird aber auch in anderen Glycoproteinen gefunden. Die stückweise enzymatische Glycosylierung des monoglycosylierten Polypeptids und Modifizierung durch Sulfatierung und Acetylierung führt zu einer hohen Heterogenität. *O*-Glycane des Mucin-Typs bestehen oft aus bis zu zwanzig Monosaccharidresten und stellen Blutgruppenantigene und Erkennungssequenzen für interzelluläre Interaktionen dar.

Weil es hier nur ein einzelnes Core-Molekül gibt und der Rest variabel ist, ist die Strukturvielfalt auch größer als bei den *N*-gebundenen Glycanen. Bei den *O*-Glycanen erfolgt eine Einteilung in acht Gruppen, unter denen die Erste auch die Häufigste ist.

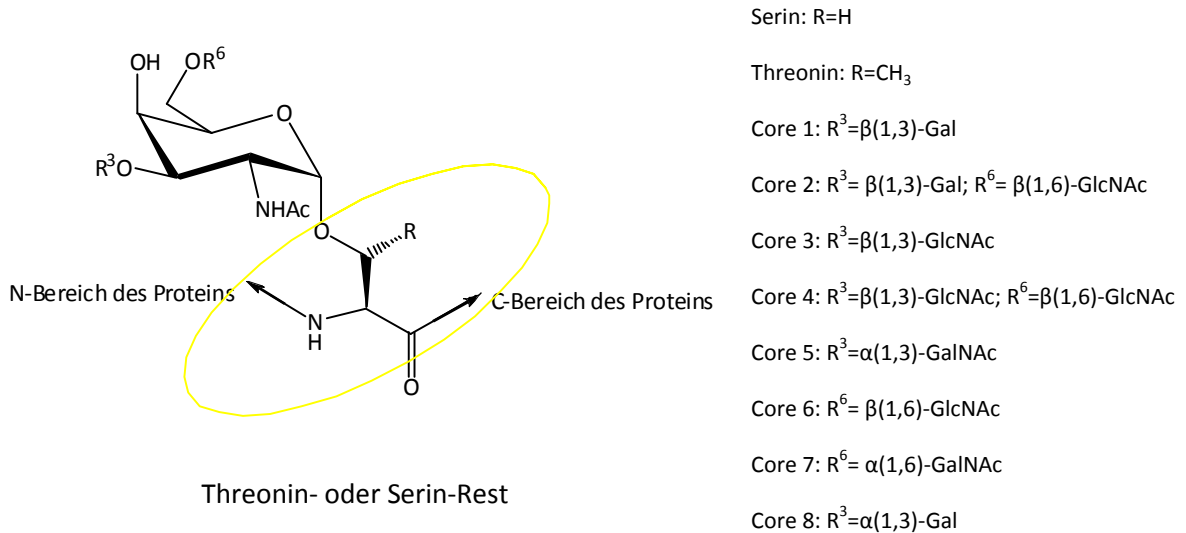


Abbildung 17: Mucin-Typ Kernstruktur

Die *O*-Glycosylierung findet hauptsächlich an exponierten Regionen der Proteinoberfläche wie β-turns oder Regionen mit erweiterten Konformationen statt. Diese Gebiete sind oft wenig hydrophob und enthalten somit selten Aminosäuren wie Tryptophan (Trp), Leucin (Leu), und Isoleucin (Ile). Stattdessen findet man dort üblicherweise Serin (Ser), Threonin (Thr) und Prolin (Pro), welche die *O*-glycosidischen Seiten besetzen. Ferner werden auf Grund der sterischen Hinderung keine großen, sperrigen Aminosäuren nahe der *O*-Glycosylierungsseite gebunden. Im Gegensatz zu *N*-glycosidisch gebundenen Glycoproteinen, welche normalerweise gut voneinander getrennt sind, kommen *O*-Glycane oft in Clustern oder kurzen Peptidsektionen, die aus Ser, Thr, Pro bestehen, vor. Generell scheint es, dass Threonin leichter gebunden wird als Serin oder Prolin.

Es ist immer noch nicht vollständig aufgeklärt, an welcher Stelle der subzellulären Kompartimente die *O*-Glycosylierung initiiert wird, da dies möglicherweise auch von der Art der *N*-Acetylgalactosaminyltransferase abhängt, von der mindestens neun verschiedene existieren.

O-Glycosidische Bindungen sind nicht auf Serin oder Threonin limitiert, im Glycogenin, dem priming Enzym für die Glycogensynthese liegt Glucose α -glycosidisch gebunden mit der Hydroxylgruppe eines Tyrosinrests vor³⁹, außerdem wurde Galactosyl(β 1-O)tyrosin als Glycoprotein des kristallinen S-Layers von Eubakterien identifiziert^{40,41}. Hydroxyprolin ist mit einer β -L-Arabinofuranose in verschiedenen Pflanzen-Glycoproteinen glycosidisch konjugiert^{42,43} und mit α -Galactose in Pflanzen und Eubakterien zu finden.

1.4.3 C-Glycosyl-Typ Glycane

Die C-C Bindung am anomeren Zentrum ist keine typische glycosidische Bindung, sie imitiert die normalerweise reaktiveren Bindungen, die an Atome wie das anomere Sauerstoffatom oder das Stickstoffatom von Nucleosiden gebunden sind.

Auf die C-Glycosylierung aufmerksam wurde man hauptsächlich durch die Tatsache, dass C-Glycane im Speziellen eine große *in vivo* Stabilität zeigen und auch sehr widerstandsfähig gegenüber Hydrolyse sind. Das Feld der C-Glycosyl-Typ Glycokonjugate wurde auf Grund dieser Eigenschaften stark erweitert. Man verlegte sich auf die Konstruktion von Glycostruktur Mimetika und ihrer relevanten Glycobiologie, hier vor allem auf Oligomere, Glycopeptide oder Stoffwechselintermediate⁴⁴. Diese Analoga zu natürlich vorkommenden Strukturen können als Glycoenzymregulatoren (Glycosylhydrolasen und -transferasen) oder künstliche Liganden zur Erforschung von Zellinteraktionen dienen.

Bei C-Glycosyl-Typ Glycokonjugaten findet sich im Kohlenhydratteil häufig Mannose, die α -glycosidisch an das C-2 Atom des Indolteils von Tryptophan-7 mittels RNase2, gebunden wird⁴⁵.

³⁹ Alonso, M.D.; Lomako, J.; Lomako, W.M.; Whelan, W.J. *FASEB J.*, **1995**, *9*, 1126-1137

⁴⁰ Bock, K.; Schuster-Kolbe, J.; Altman, E.; Allmaier, G.; Stahl, B.; Christian, R.; Sleytr, U.B.; Messner, P. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 7137-7144

⁴¹ Messner, P.; Christian, R.; Neuninger, C.; Schulz, G. *J. Bacteriol.*, **1995**, *177*, 2188-2193

⁴² Lamport, D.T.A. *Nature*, **1967**, *216*, 1322-1324

⁴³ Allen, K.A.; Desai, N.N.; Neuberger, A.; Creeth, J. M. *Biochem. J.*, **1978**, *171*, 665-674

⁴⁴ Nicotra, F. *Topics Curr Chem*, **1997**, *187*, 55-83

⁴⁵ Löffler, A.; Doucey, M.A.; Jansson, A.M.; Müller, D.R.; de Beer, T.; Hess, D.; Meldal, M.; Richter, W.J.; Vliegthart, J.F.G.; Hofsteenge, J. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 12005-12014

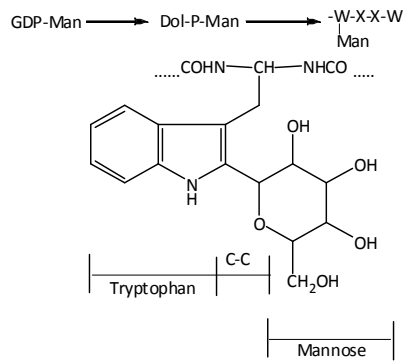


Abbildung 18: C-Glycosyl-Typ Glykokonjugat

Das oben beschriebene Molekül wurde zuerst im menschlichen Urin entdeckt. Viele tierische Zellen die RNase2 beinhalten, können Tryptophan C-mannosylieren, da sie die nötige Transferase beinhalten. Strukturanalyse und biosynthetische Studien in tierischen Zelllinien und ein spezieller Antikörper gegen diese Modifizierung haben gezeigt, dass C-Mannosylierung nicht chemisch induziert ist.

Weitere Beispiele der, in der Natur selten vorkommenden, C-Glycane sind Antibiotika wie Showdomycin, das aus *Streptomyces showdoensis* isoliert wurde⁴⁶ und dessen Totalsynthese von Kang durchgeführt wurde⁴⁷. Showdomycin ist gegen Gram-negative Bakterien aktiv. Vineomycin B2, wurde bei einem Screening von Actinomyceten gefunden und die erste Totalsynthese wurde von Danishefsky⁴⁸ durchgeführt. Es ist aktiv gegen Gram-negative Bakterien und Sarcoma 180 Tumore in Mäusen.

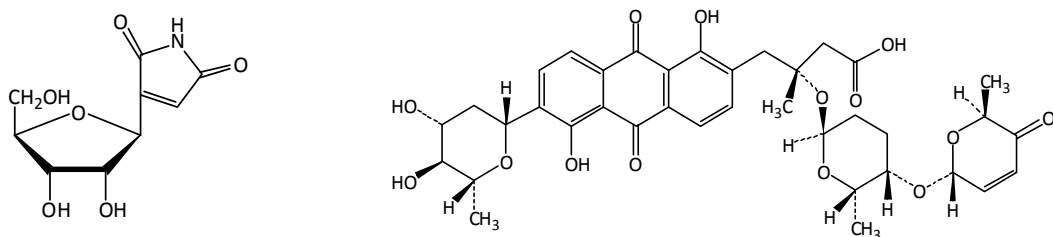


Abbildung 19: Strukturen von Showdomycin und Vineomycin

⁴⁶ Nishimura, H.; Mayama, M.; Komatsu, Y.; Kato, H.; Shimaoka, N.; Tanaka, Y.; *J. Antibiot. Ser. A.*, **1964**, *17*, 148–155

⁴⁷ Kang, S.H.; Lee, S.B. *Tetrahedron Letters*, **1995**, *36*, 4089-4092

⁴⁸ Danishefsky, S.; Uang, B.J.; Quallich, G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 1285–1293

1.5 Glykierung

Die Glykierung ist eine unspezifische, willkürliche Reaktion von reduzierenden Zuckern mit Proteinen, die ohne die Hilfe von Enzymen ausgeführt wird. Glycosylierung, die enzymatische Addition, tritt im Gegensatz dazu an einer genau definierten Seite des Zielmoleküls auf. Die beiden Ausdrücke werden oft sehr widersprüchlich verwendet, da die Bezeichnung Glycosylierung für beide Reaktionsformen verwendet werden kann. Außerdem wird die Glykierung häufig einfach als Maillard-Reaktion bezeichnet, nach ihrem Entdecker Louis Camil Maillard⁴⁹.

Die Entdeckung, dass Hämoglobin *in-vivo* spezifisch am N-Terminus der β -Kette (Val1 β) glykiert ist⁵⁰, führte zu Untersuchungen der nicht-enzymatischen Glykierung von Proteinen *in vivo* und *in vitro*. Trotz des Fokus der Wissenschaftler auf den mechanistischen Untersuchungen des Hämoglobins⁵¹, entdeckte man auch die Glykierung an Albumin⁵², Kollagen⁵³, RNase A⁵⁴ und den unterschiedlichsten erythrozytischen erythrozytischen Proteinen⁵⁵.

Glykierung kann in drei Stufen unterteilt werden: früh, mittel und spät. In der frühen Stufe reagiert Glucose (oder ein anderer reduzierender Zucker) mit einer freien Aminogruppe zu einer Schiffschen Base. Durch eine Umlagerung wird diese Base zu einem stabilen Ketoamin, dem Amadori Produkt. In der Zwischenstufe wird das Amadori Produkt durch Dehydrierung und Oxidation in eine Vielfalt von Carbonyl-Komponenten (Glyoxal, Methylglyoxal, 3-Desoxyglucoson) umgewandelt, die viel reaktiver sind, als der Zucker, aus dem sie hergestellt wurden⁵⁶. Methylglyoxal beispielweise ist ein sehr reaktiver α -Oxaldehyd, seine hohen Plasma-Konzentrationen weisen darauf hin, dass er eine sehr

⁴⁹ L. C. Maillard, C. R. Acad. Sci., Ser 2, **1912**, 154, 66; *ibid.*, L.C.Maillard, **1912**, 155, 1554

⁵⁰ Allen, D.W. ; Shroeder, W.A.; Balog, J.. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 1628–1634

⁵¹ Bookchin, R.M.; Gallop, P.M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, 32, 86–93; H.F. Bunn, D.N. Haney, Gabbay, K.H.; Gallop, P.M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, 67 103–109; Shapiro, R.; McManus, M.J.; Zalut, C.; H.F. Bunn, H.F. *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 3120–3127

⁵² Garlick, R.L.; Mazer, J.S.; *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 6142–6146; Iberg, N.; Fluckiger, R. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 13542–13545

⁵³ Reiser, K.M.; Amigable, M.A.; Last, J.A.; *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 24207–24216.

⁵⁴ Watkins, N.G.; Thorpe, S.R.; Baynes, J.W.; *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 10629–10636, R.G. Khalifah, P. Todd, Booth, A.A.; Yang, S.X.; Mott, J.D.; Hudson, B.G. *Biochemistry* **1996**, 35, 4645–4650.

⁵⁵ Kondo, T.; Murakami, K.; Ohtsuka, Y.; Tsuji, M.; Gasa, S.; Taniguchi, N.; Kawakami, Y. *Clin. Chim. Acta* **1987**, 166, 227–236

⁵⁶ Lapolla, A.; Traldi, P.; Fedele, D. *Clin. Biochem.* **2005**, 38, 103-115 (BILD?)

wichtige *in-vivo* Komponente ist. Moleküle wie diese „verbreiten“ die Reaktion weiter, indem sie wieder mit freien Aminogruppen reagieren und über Cyclisierungs- und Oxidationsschritte gelb-braune, oft fluoreszierende, unlösliche, irreversible Substanzen bilden, die man AGEs, Advanced Glycation Endproducts nennt. Diese können in langlebigen Proteinen, die keiner schnellen Synthese oder Umsatz ausgesetzt sind, akkumulieren und Schäden verursachen⁵⁷.

Die bedeutendsten chemisch-charakterisierten AGEs sind *N*^ε-(carboxymethyl)lysin⁵⁸, Pentosidin⁵⁹, Pyrralin⁶⁰ und Imidazol⁶¹.

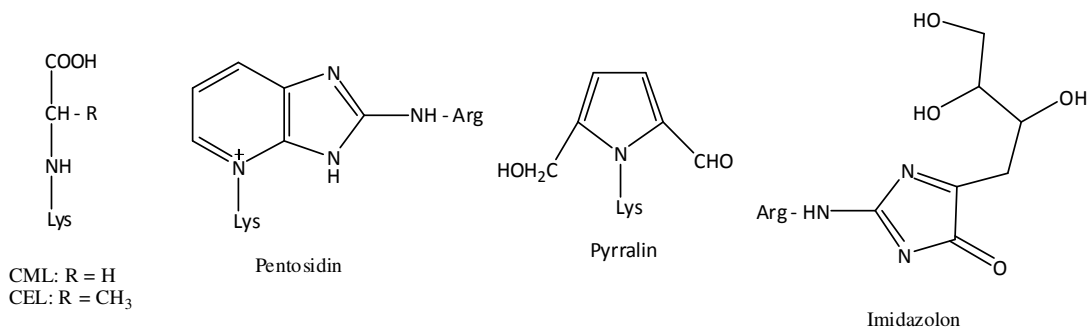


Abbildung 20: Chemische Strukturen verschiedener AGEs, CML: *N*^ε-(carboxymethyl)lysin; CEL: *N*^ε-(carboxyethyl)lysin

Proteinvernetzungen durch AGEs resultieren in der Bildung von detergensunlöslichen und proteaseresistenten Aggregaten⁶². Diese Aggregate können den interzellulären Proteinverkehr in den Neuronen stören und zu einer Blockade führen. Studien zu Krankheiten, die auf der Glykierung basieren, nehmen oft auf den Zusammenhang mit Diabetes und Komplikationen im Zusammenhang mit Diabetes Bezug^{63,64}. Aber auch mit

⁵⁷ Thorpe, S.R.; Baynes, J.W. *Drugs Aging*, **1996**, *9*, 69-77

⁵⁸ Fu, M.X.; Requena, J.R.; Jenkins, A.J.; Lyons, T.J.; Baynes, J.W.; Thorpe, S.R. *J.Biol.Chem.*, **1991**, *271*, 9982-9986

⁵⁹ Dyer, D.G.; Blackledge, J.A.; Thorpe, S.R.; Baynes, J.W. *J.Biol.Chem.*, **1991**, *266*, 11654-11660

⁶⁰ Miyata, S.; Monnier, V. *J.Clin.Invest.*, **1992**, *89*, 1102-1112

⁶¹ Niwa, T.; Katsuzaki, T.; Ishizaki, Y.; Hayase, F.; Miyazaki, T.; Uematsu, T.; Tatemichi, N.; Takei, Y. *FEBS Lett.*, **1997**, *407*, 297-302

⁶² Smith, M.A.; Richey, P.L.; Taneda, S.; Kutty, R.K.; Sayre, L.M.; Monnier, V.M.; Perry, G. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1994**, *738*, 447-454

⁶³ Myint, T.; Hoshi, S.; Ookawara, T.; Miyazawa, N.; Suzuki, K.; Taniguchi, N. *Biochim.Biophys.Acta*, **1995**, *1272*, 73-79

⁶⁴ Ryle, C.; Leow, C.K.; Donaghy, M. *Muscle Nerve*, **1997**, *20*, 577-584

einem normalen Glucose-Level kommt es zu einem bestimmten Grad an Glykierung und der dadurch entstehende Schaden akkumuliert sich mit der Zeit. Daher beeinflussen die AGEs pathologische Prozesse, die mit dem Altern einhergehen (Katarakte, Arteriosklerose usw.)⁶⁵ und neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson⁶⁶. Die Glykierung verursacht weder sehr schnelle, noch außerordentlich große Zellschäden, da sie langsam fortschreitet. Trotzdem sollte ihre Bedeutung nicht ignoriert werden, da sie mit fundamentalen Prozessen des Zellmetabolismus einhergeht.

Es gibt noch eine weitere Form der Glykierung, die exogen passiert. Hierbei entstehen AGEs dadurch, dass Zucker (Kohlenhydrate) mit Proteinen oder Fett erhitzt werden (kochen, grillen usw.). Bei dieser Maillard-Reaktion oder Bräunungsreaktion, die bei Lebensmitteln sowohl absichtlich als auch unabsichtlich passiert, können Substanzen wie z.B. Acrylamid entstehen, die erwiesenermaßen krebserregend sind⁶⁷.

1.6 Amadori-Umlagerung

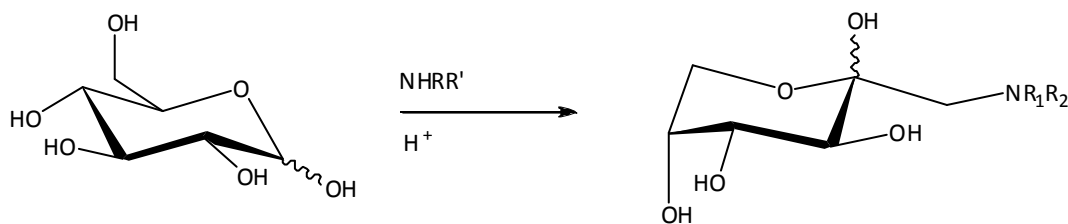


Abbildung 21: Amadori Umlagerung von Glucose zu 1-Amino-1-desoxy-fructose

Als Amadori-Umlagerung wird die Reaktion zwischen α -Hydroxy-Aldehyden und Aminen bezeichnet, die zu den entsprechenden Glycosylaminen und in der folgenden Umlagerung zu den 1-Desoxy-Ketosaminen, den sogenannten Amadori-Umlagerungsprodukten, führt. Sie ist der erste Schritt in der Maillard-Reaktionskaskade, welche eine nicht enzymatische Bräunungsreaktion von Lebensmitteln bezeichnet. Benannt wurde sie nach Mario

⁶⁵ Vlassera, H.; Bucala, R.; Striker, L. *Lab. Invest.*, **1994**, *70*, 138-151

⁶⁶ Castellani, R.J.; Smith, M.A.; Richey, P.L.; Perry, G. *Brain Res.*, **1996**, *737*, 195-200

⁶⁷ Stadler, R.H.; Blank, I.; Varga, N.; Robert, F.; Hau, J.; Guy, P.A.; Robert, M.C.; Riediker, S. *Nature*, **2002**, *419*, 449-50

Amadori, der 1925 über zwei Produkte, die bei der Reaktion zwischen D-Glucose und p-Fenetidin entstehen, berichtete⁶⁸.

Kuhn und Weygand⁶⁹ schlugen 1937 einen Mechanismus zu der von Amadori beobachteten Reaktion vor, der noch heute weitreichende Gültigkeit findet.

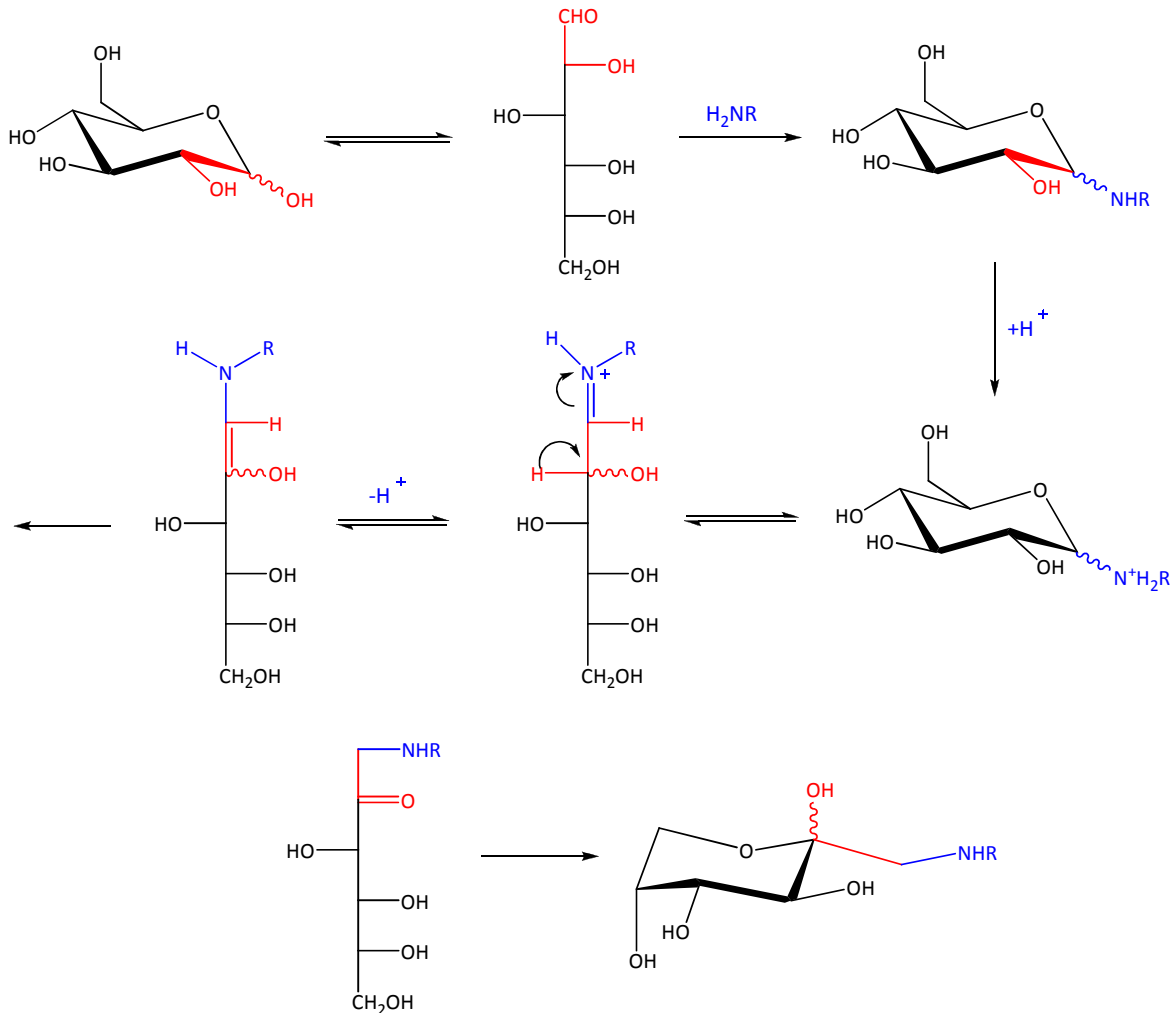


Abbildung 22: Mechanismus der Amadori Umlagerung

Laut diesem Vorschlag kommt es zu einer Anfangsreaktion zwischen der anomeren Position der Aldose, hier Glucose, und einer Aminogruppe, was zur Bildung eines N-Glycosids führt. Nach der Protonierung wird über eine Ringöffnungsreaktion eine Schiff'sche Base gebildet, welche mit der Enol-Form (Enamin-Aldimin Tautomerie) im

⁶⁸ Amadori, M. *Atti R. Accad. Lincei, Rend* **1925**, 2, [6], 337-342

⁶⁹ Kuhn, R.; Weygand, F. *Ber.*, **1937**, 70, 769-772

Gleichgewicht steht. Das Enol wird durch die Bildung einer 1-Amino-1-desoxy-ketohexose stabilisiert, welche dann wieder den Ring schließen kann und das Reaktionsprodukt ergibt. Der Verlust des Protons am C-2 der Schiff'schen Base wird als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt betrachtet.

Genauer betrachtet wurde die, nun als Amadori-Umlagerung bekannte Reaktion, schon Jahrzehnte vor Mario Amadoris Veröffentlichung entdeckt, da die Komponenten klassische Reagenzien sind, die auch von Chemikern wie Schiff⁷⁰, Fischer⁷¹ oder Sorokin⁷² benutzt wurden. Allerdings stellten erst Kuhn und Dansi⁷³ fest, dass hier etwas Neues passiert sein musste. Im Jahr 1940 wurde dann die Entdeckung gemacht, dass der Zusatz von Säuren eine katalytische Wirkung hat. Weygand erkannte, dass dadurch sowohl die Ausbeuten, als auch die Produktreinheit verbessert werden konnte⁷⁴. Bis 1944 wurde bei den Komponenten nur mit *N*-Arylaminen experimentiert, was von Mitts und Hixon auf *N*-Alkylamin Produkte erweitert wurde⁷⁵. Gottschalk zeigte, dass die Umlagerung auch mit Aminosäuren funktioniert⁷⁶. Da die Komponenten sehr variabel sind, wurden viele Untersuchungen angestellt, wie z.B. die Synthese von Amadori-Produkten aus Kohlenhydraten und Polyvinylamin⁷⁷, die Reaktion von α -Hydroxycarbonylverbindungen mit aromatischen^{78a} oder aliphatischen Aminen^{12b}, die Berücksichtigung der *o*-,*m*- oder *p*-Substituenten an aromatischen Ringsystemen und ihre dirigierende Wirkung⁷⁹, Amadori-Umlagerungen in Pyridin⁸⁰ oder aus 2-Amino-2-desoxy-D-hexosen und D-Hexuronsäuren⁸¹. In jüngerer Zeit wurde auch viel Wert auf die Synthese und Charakterisierung von Amadori-Komponenten gelegt, die *in vivo* vorkommen⁸². Dieser

⁷⁰ Schiff, H. *Ann. Chem. Pharm.*, **1870**, 154, 1-39

⁷¹ Fischer, E. *Ber.*, **1886**, 19, 1920-1924

⁷² Sorokin, B. *Ber.*, **1886**, 19, 513

⁷³ Kuhn, R.; Dansi, A. *Ber.*, **1936**, 69, 1745-1754

⁷⁴ Weygand, F. *Ber.*, **1940**, 73, 1259-1278

⁷⁵ Mitts, E.; Hixon, R.M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1944**, 66, 483-486

⁷⁶ Gottschalk, A.; Partridge, S.M. *Nature*, **1950**, 165, 684-685

⁷⁷ Micheel, F.; Büning, R. *Chem. Ber.*, **1957**, 90, 1606-1611

⁷⁸ a) Heyns, K.; Stumme, W. *Chem. Ber.*, **1956**, 89, 2833-2844, b) Heyns, K.; Stumme, W.; *Chem. Ber.*, **1956**, 89, 2844-2853

⁷⁹ Micheel, F.; Schleppeinghof, B. *Chem. Ber.*, **1956**, 89, 1702-1708

⁸⁰ Rosen, L.; Woods, J.W.; Pigman, W. *Chem. Ber.*, **1957**, 90, 1038-1046

⁸¹ Klemer, A.; Funcke, W. *Liebigs Ann. Chem.*, **1979**, 1682-1688

⁸² a) Mossine, V.V.; Glinsky, G.V.; Feather, M.S. *Carb. Res.*, **1994**, 262, 257-270 b) Day, J.F.; Thorpe, R.; Baynest, J.W. *J. Biol. Chem.*, **1979**, 254, 595-597

Prozess der Glykierung und seine Produkte, die AGEs, dürften mit der Pathologie einiger Krankheiten wie Diabetes, Alzheimer oder der Bildung von Katarakten und im Allgemeinen mit Alterungsprozessen in einem direkten Zusammenhang stehen.

Wenn Amadori-Produkte gebildet werden, treten sie zumeist in die Maillardreaktionskaskade ein. Sie sind Vorstufen von Verbindungen, die oft stark gefärbt und/oder geruchs- und geschmacksintensiv sind, wie z.B. Pyrrole, Imine, Furane, Imidazole und ihre Polymerisationsprodukte^{83,84,85}. In Lebensmitteln sind sie für Geruch, Farbe, Aromen und auch für die Haltbarkeit verantwortlich⁸⁶. Allerdings kann es bei einem weiteren Abbau der zunächst gebildeten Amadori-Verbindungen auch zur Ausbildung von aromatischen Heterocyclen kommen, die nachgewiesenermaßen karzinogene und mutagene Effekte haben⁸⁷. Andere Komponenten können mit Nitrit zu Nitrosamin⁸⁸ Komponenten wie z.B. Abbildung 23 reagieren, was auch im Magen geschehen kann.

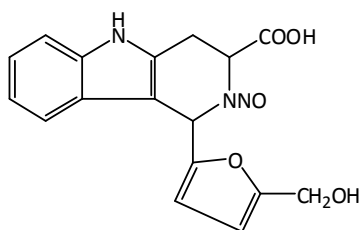


Abbildung 23: Mutagener aromatischer Heterozyklus

Eine weitere Anwendung der Amadori-Umlagerung ist die Darstellung von Lactulose über Lactose⁸⁹. Lactulose wird als Abführmittel eingesetzt, da der Zucker im Darm nicht aufgenommen werden kann und durch Bindung von Wasser das Darmvolumen zunehmen lässt und zu einer weichen Konsistenz des Stuhls führt. Eine weitere Indikation für die

⁸³ Hodge, J.E. *Agric. Food Chem.*, **1953**, *1*, 928-943

⁸⁴ Smith, M.A.; Taneda, S.; Richey, P.L.; Miyata S.; Yan, S.-D; Stern, D.; Syre, L.M.; Monnier, V.M.; Perry, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1994**, *91*, 5710-5714

⁸⁵ Reynolds, T.M. *Adv. Food. Res.*, **1963**, *12*, 1-52

⁸⁶ Mills, F.D.; Hodge, J.E. *Carbohydr. Res.*, **1976**, *51*, 9-21

⁸⁷ a) Ohgaki, H.; Kusama, K.; Matsukura, N.; Marino, K.; Hasegawa, H.; Sato, S.; Takayama, S.; Sugimura, T. *Carcinogenesis*, **1984**, *5*, 921; b) Yamaizumi, Z.; Shiomi, T.; Kasai, H.; Nishimura, S.; Takahashi, Y.; Nagao, M.; Sugimura, T. *Cancer Letter*, **1980**, *9*, 75-83

⁸⁸ Heyns, K.; Röper, B.; Meyer, B. *Angew. Chem.*, **1979**, *91*, 940-941

⁸⁹ Kuhn, R.; Krüger, G.; Seeliger, A. *Ann. Chem.*, **1959**, *628*, 240-255

Gabe von Lactulose ist die hepatische Enzephalopathie bei Leberzirrhose. Die Lactulose reduziert die Blutammoniakkonzentration um bis zu 50% und führt schon in wenigen Tagen zu einem therapeutischen Effekt.

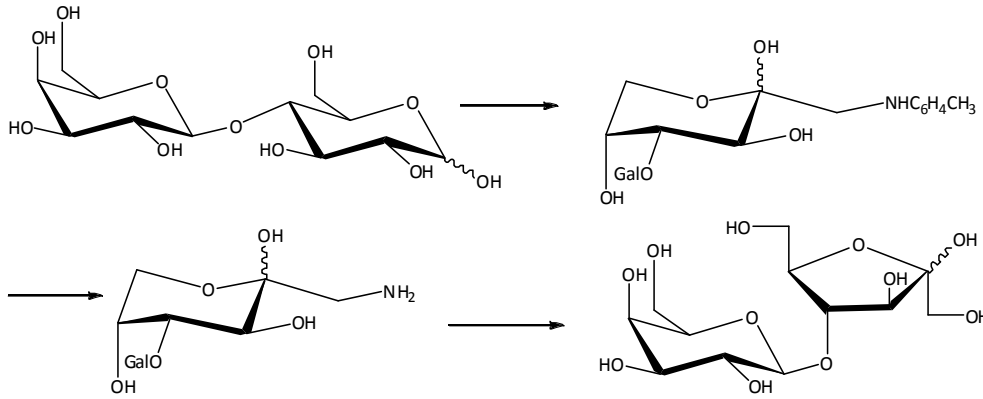


Abbildung 24: Synthese von Lactulose mittels der Amadori-Umlagerung

Paulsen entdeckte in den 1960ern eine intramolekulare Amadori-Umlagerung, die mit den passenden Aminosukzern zu Iminiosukzern führt⁹⁰. Wie man später entdeckte haben diese Iminosucker wie z.B. 1-Amino-1, 2, 5-trideoxy-2,5-imino-D-mannitol eine hohe inhibitorische Aktivität gegenüber Glycosidasen⁹¹.

N-(1-Desoxyfructos-1-yl)dipeptide (siehe Abbildung 25) sind Umlagerungsprodukte von D-Glucose und L-Isoleucyl-L-aspartamsäure und L-Valolyl-L-Aspartamsäure (Enkastine) die Endopeptidasen inhibieren⁹².

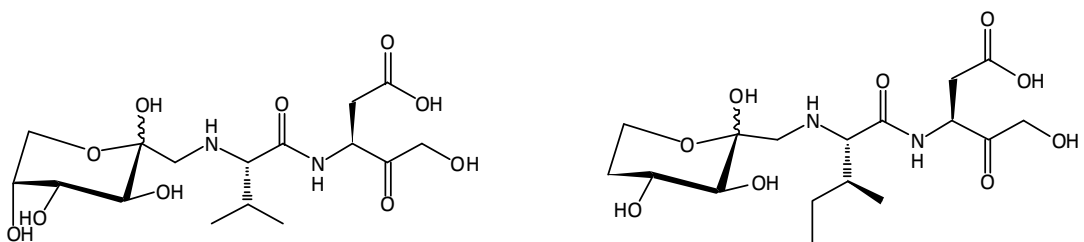


Abbildung 25 : *N*-(1-Desoxyfructos-1-yl)dipeptide

⁹⁰ a) Paulsen, H. *Liebigs Ann.*, **1965**, 683, 187-198 b) Paulsen, H.; Todt, K. *Adv. Carb. Chem. Biochem.*, **1968**, 23, 115-232

⁹¹ a) Stütz, A.E. *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**; b) Wrodnigg, T.M.; Stütz, A.E.; Withers, S.G. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 5463-5466

⁹² Vertesy, L.; Fehlhaber, H.W.; Kogler, H.; Schindler, P.W. *Liebigs Ann.*, **1996**, 121-126

Diese Enkastine sind Neuropeptide und endogene Liganden von Opiat Rezeptoren, sie sind von großer physiologischer Wichtigkeit bei der Schmerzunterdrückung⁹³. Die Komponenten aus Abbildung 25 wurden aus einer Amadori-Umlagerung isoliert, diese ungeschützten Peptide wurden in einer Ausbeute von 70% erhalten und haben nicht nur eine spezifische Aktivität gegen Metallopeptidasen, sondern inhibieren die Endopeptidase EC 3.4.24.11 praktisch exklusiv.

Obwohl die Amadori-Umlagerung eine sehr praktische chemische Reaktion ist, liegt ihre geringe synthetische Nutzung einigen Problemen, vor allem den geringen Ausbeuten von weniger als 50%, zu Grunde. Wird die Reaktion bei hohen Temperaturen für eine lange Zeit gehalten, können die Amadori-Produkte in die Maillardreaktionskaskade eintreten. Durch die Reversibilität der Reaktion kann das gebildete Glycosylamin entweder zur 1-Aminoketose isomerisieren oder zurück in die Ausgangsverbindung hydrolysieren. In vielen Fällen kommt es zu Gemischen der Amadori-Produkte mit den Glycosylaminen, welche dann schwer zu trennen sind, da sich ihre Rf Werte kaum unterscheiden.

Unter geeigneten Bedingungen bzw. einer sorgfältigen Strukturauswahl ist es jedoch möglich, gute Ausbeuten zu erhalten. Bei Reaktionen der kommerziell erhältlichen Glucoheptose konnten z.B. exzellente Ausbeuten erhalten werden. Hier war wohl die all-äquatorial Anordnung der Hydroxylgruppen im Produkt die treibende Kraft. Außerdem konnte die Produkte als reine α -Anomere isoliert werden, denn bei der ⁵C₂ pyranoiden Form kann der größere Amino Substituent die äquatoriale Position besetzen. Wenn nötig kann noch die anomere Hydroxylgruppe durch die Formierung eines cyclischen Carbamats zwischen der anomeren Hydroxylgruppe und dem Amin in C-1 Position, stabilisiert werden.

⁹³ Kosterlitz, H.W.; Smith, T.W.; Hughes, J.; Forthergill, L.A., Morgan, B.A., Morris, H.R. *Nature*, **1975**, 258, 577-580

2 Ziele

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, eine kurze, effiziente Synthese für C-Glycosyl-Typ Glycokonjugate zu entwickeln.

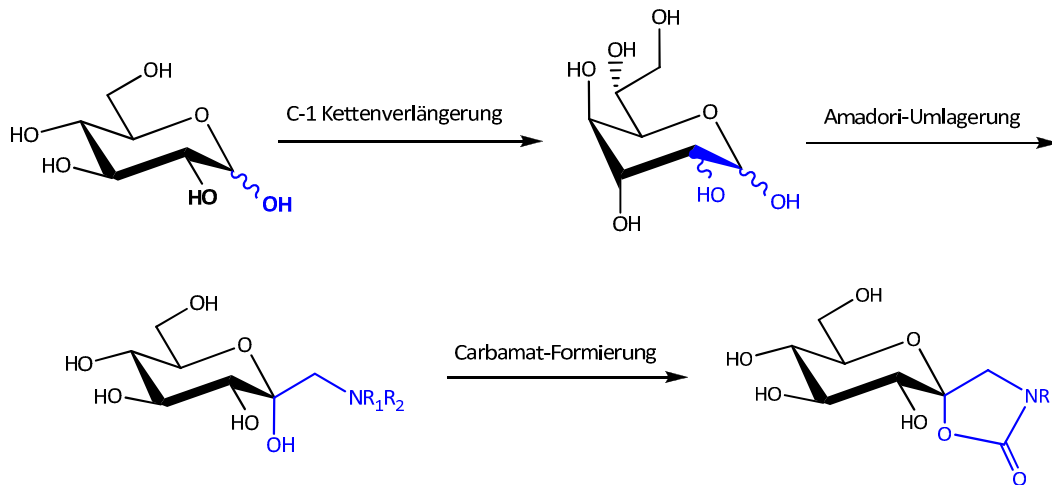
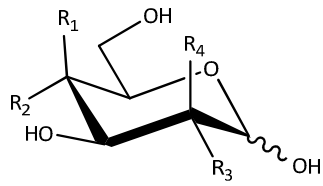


Abbildung 26: Schematische Darstellung der geplanten Synthese mit Glucose als Substrat

Es wurde mit verschiedenen Zuckern gearbeitet, um die Unterschiede in der Konfiguration und die dadurch unterschiedlichen Eigenschaften zu untersuchen.

Als Startmaterial wurden die kommerziell erhältlichen Zucker D-Glucose, D-Galactose und D-Mannose verwendet, welche im ersten Schritt der Synthese in die jeweiligen Heptosen umgewandelt werden sollten. Hierzu wurden verschiedene Möglichkeiten der C-Kettenverlängerung untersucht, um eine möglichst einfache, billige und effektive Synthesart für die Substratherstellung zu gewährleisten.

Die Schlüsselreaktion des Syntheseweges, die Amadori-Umlagerung wurde nach bereits vorliegenden Arbeiten der Gruppe reproduziert. Der Fokus hierbei lag auf einer Verbesserung der Ausbeute. Die verschiedenen Heptose-Konfigurationen wurden mit unterschiedlichen Aminen in der Amadori-Umlagerung auf ihre Umsetzung und Ausbeuten untersucht und optimiert.



1: $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OH, R_4 = H$

7: $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = H$

16: $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H, R_4 = OH$

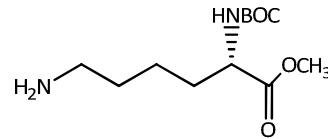
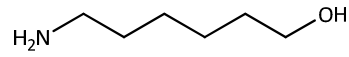
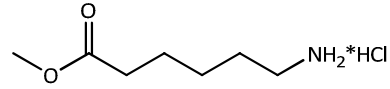
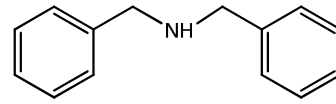


Abbildung 27: Ausgangsprodukte und Amine für die Amadori-Umlagerung

Als letzter Schritt wurde bei ausgewählten Amadori-Produkten die anomere Hydroxyfunktion durch die Formierung eines cyclischen Carbamats mit dem Amin an der C-1 Position stabilisiert.

3 Durchführung

3.1 Kettenverlängerung

In der Zucker-Chemie ist die Kiliani-Fischer-Synthese eine vielfach verwendete Methode zur Kettenverlängerung. Kiliani und Fischer entdeckten, dass die durch Hydrolyse von Cyanhydrinen gebildeten Aldonsäuren beim Erhitzen Aldonolactone liefern, welche danach bei einem eingestellten pH-Wert zwischen drei und vier mit Natriumamalgam zu einer neuen Aldose reduziert werden. Die vollständige Kiliani-Fischer-Synthese ist eine Methode um eine Aldohexose in eine Aldoheptose umzuwandeln. Die Synthese liefert immer zwei Diastereomere, gewöhnlich in ungleichen Mengen. Diese unterscheiden sich in ihrer Konfiguration am C-2 (dem ehemaligen C-1). Besonders die Synthese von ^{14}C -markierten Verbindungen wird fast ausschließlich auf dem Weg der Cyanhydrin-Synthese mit ^{14}C -Cyanid durchgeführt.

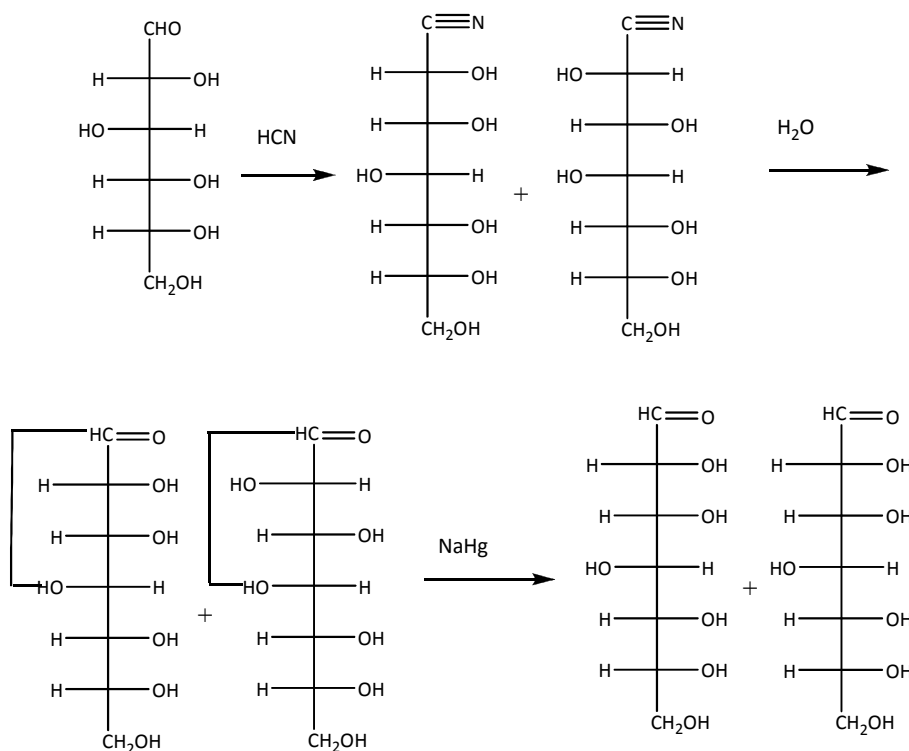


Abbildung 28: Reaktionsschema der Cyanhydrinsynthese der D-Glucose von Nelson K. Richtmyer⁹⁴

⁹⁴ Richtmyer, N.K.; *Meth. Carbohydr.Chem.* **1962**, *1*, 160-167

Laut Originalvorschrift fügt man zu einem Kohlenhydrat in wässriger Lösung HCN hinzu, hieraus werden nun zwei Cyanhydrine an Position C-1 generiert, welche dann verseift und gleich darauf angesäuert werden⁹⁵. Die so entstandenen Säuren können bei richtig eingestelltem pH-Wert als Lactone isoliert werden. Fischer fügte die nachfolgende Reduktion hinzu, welche mit Natriumamalgam in schwach saurem Medium durchgeführt wird, um die, um ein Kohlenstoffatom verlängerte, Aldose zu erhalten⁹⁶. Viele Variationen der Kiliani-Fischer-Methode wurden veröffentlicht, einige davon in einem Paper von Isbell⁹⁷. Wegen der etwas unpraktischen Handhabung von HCN, wurde zuerst eine modifizierte, schon erfolgreich eingesetzte Methode angewandt^{92,98}. Laut diesen Vorschriften wird eine wässrige Lösung der Hexose (Glucose, Galactose, Mannose) mit Eis auf 0°C gekühlt und langsam NaCN zugegeben. Nach vollständiger Umsetzung wird erhitzt und um die gewünschten Lactone zu erhalten, ist es nötig die Reaktion anzusäuern, was entweder mit Schwefelsäure⁹⁹, Essigsäure¹⁰⁰ oder mit saurem Ionentauscher IR 120 H⁺,^{75a,101} mit welchem noch zusätzlich störende Natriumionen entfernt werden können, erfolgt. Es wird erwartet, dass zumindest die beiden Epimere und möglicherweise Verunreinigungen vorhanden sind, jedoch zeigen sowohl DC- als auch NMR-Überprüfung ein eindeutiges Produkt.

Weiters muss eine reduktive Hydrolyse durchgeführt werden, hier ist die ursprüngliche Methode mit Natriumamalgam nicht anwendbar, da mit dieser giftige Stoffe, wie Quecksilber, in die Reaktion eingebracht werden. In anderen literaturbekannten Methoden werden für diesen Schritt entweder Natriumborhydrid^{97,102} oder Pd/BaSO₄ unter H₂-Atmosphäre¹⁰³ verwendet.

⁹⁵ Kiliani, H. *Ber.* **1886**, *19*, 767-772

⁹⁶ Fischer, E. *Ann.* **1892**, *270*, 64-107

⁹⁷ Isbell, H.S.; Karabinos, J.V.; Frush, H.L.; Holt, N.B.; Schwebel, A.; Galkowski, T.T. *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, **1952**, *48*, 163-171

⁹⁸ a) Hudson, C.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 4498-4499, b) Varma, R.; Dexter, F. *Carb. Res.*, **1972**, *25*, 71-79,

⁹⁹ Wolfrom, M.L.; Thompson, A. *Meth. Carbohydr. Chem.* **1962**, *1*, 65-67

¹⁰⁰ Wolfrom, M. L.; Anno, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 5583-5584

¹⁰¹ Pratt, J.W.; Richtmyer, N.K. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 6326-6328

¹⁰² a) Wolfrom, M.L.; Wood, H.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2933-2934 b) Bock, K.; Lund, I.; Pederson, C. *Carb. Res.* **1981**, *90*, 7-16

¹⁰³ a) Kuhn, R.; Kleese, P. *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 1989-1991 b) Kuhn, R.; Baschang, G. *Liebigs Ann. Chem.* **1960**, *636*, 164-173

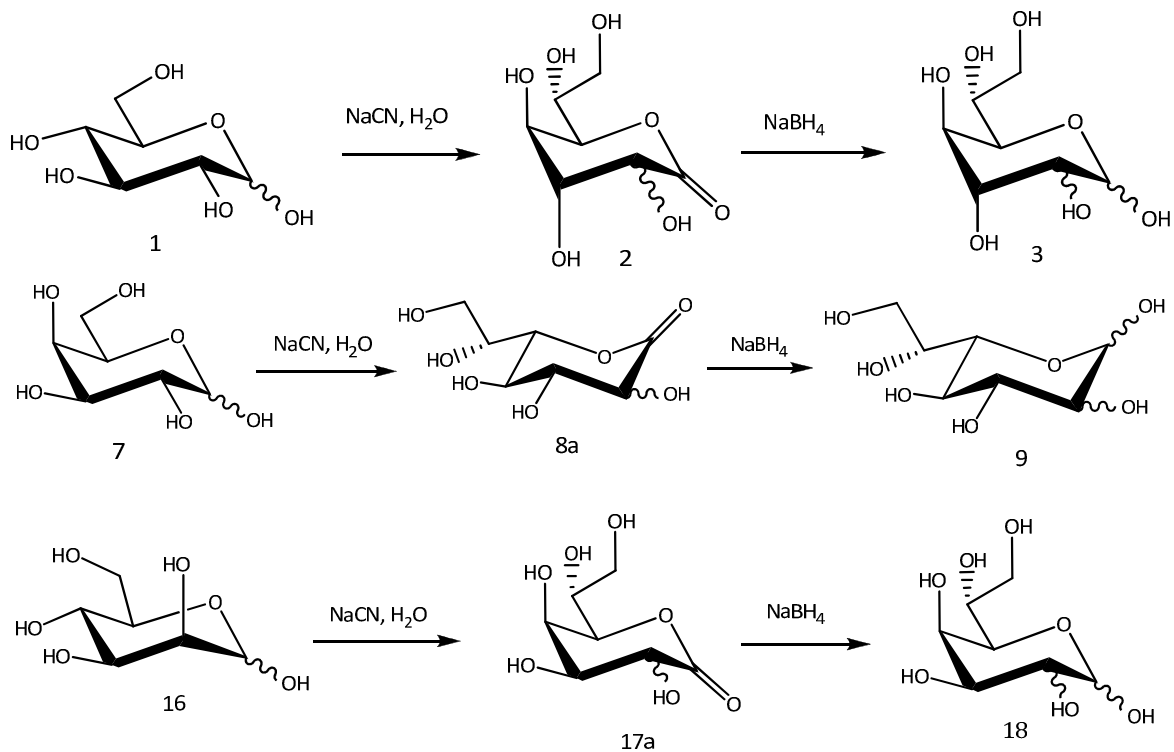


Abbildung 29: Ursprünglicher Syntheseweg zur Heptose der D-gluco-, D-galacto- und D-manno-Konfiguration

Wenngleich Natriumborhydrid nicht generell verwendet wird, um acyclische Ester zu reduzieren¹⁰⁴, ist bekannt, dass man damit intramolekulare Ester reduzieren kann⁹⁹. Daher sollte es möglich sein, die Lactone unter sauren Bedingungen zu den entsprechenden Aldehyden zu reduzieren. Hierbei ist eine genaue DC-Kontrolle unumgänglich, da gewährleistet werden muss, dass das Edukt nicht zum entsprechenden Aldit reduziert wird. Trotz Änderung der verschiedenen Parameter, der pH-Wert wurde von stark sauer bis neutral, die Temperatur von -10°C bis 0°C variiert, außerdem wurden die Mittel zur Ansäuerung gewechselt, konnte in keinem Fall ein einzelnes Endprodukt bzw. eine befriedigende Ausbeute an der gewünschten Heptose erhalten werden. Am DC konnte man sowohl das Edukt, das erwartete Produkt, den durchreduzierte Alditen und Mischprodukte erkennen. Der Produktpot der DC-Kontrolle war zwar am größten, dennoch konnte man als ungefähre quantitative Aussage von höchstens 20-30% ungereinigtem Produkt ausgehen. Hierzu muss gesagt werden, dass während der Reaktion die pyranoiden Epimere (α - und β -Anomer) als Produkt gebildet werden,

¹⁰⁴ Chaikin, S. W.; Brown, H. B.; J. Am. Chem. Soc. **1949**, *71*, 122-125

außerdem möglicherweise noch die furanoide Form des Produkts, neben den immer gebildeten Heptiten und den beiden Anomeren der Hexose. Das bedeutet, man muss von einer Reaktionsmischung aus etwa sechs bis acht Produkten und Salzen ausgehen.

Die Reduktion zeigte bei den verschiedenen Konfigurationen, *D-gluco*, *D-manno* und *D-galacto*, relativ große Unterschiede. Die beste Umsetzung zur Heptose war bei Glucose zu erkennen und die schlechteste bei D-Mannose. Hier musste auch das meiste Natriumborant zugegeben werden, bis zu viermal mehr als bei den anderen Konfigurationen, um überhaupt einen Produktpot zu erhalten.

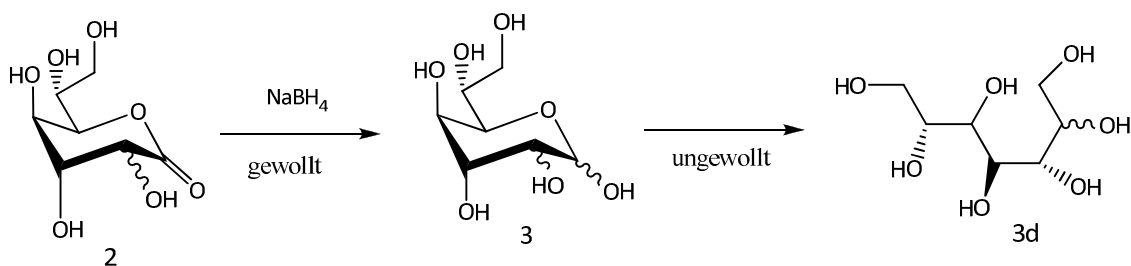


Abbildung 30: Unvollständige Reduktion mit NaBH₄ und entstandene Produkte der D-Glucose

Tabelle 1: Verschiedene Reaktionsbedingungen der Reduktion mit Natriumborant

Lösungsmittel	pH	Säure	Temperatur
H ₂ O/EtOH 2/1	1	IR 120 H ⁺	0°C
H ₂ O/EtOH 2/1	2	IR 120 H ⁺	0°C
H ₂ O/EtOH 2/1	4	IR 120 H ⁺	0°C
H ₂ O/EtOH 2/1	6	IR 120 H ⁺	0°C
H ₂ O/EtOH 2/1	3	IR 120 H ⁺	-10°C
H ₂ O/EtOH 2/1	1	IR 120 H ⁺	-10°C
H ₂ O	3-4	H ₂ SO ₄	0°C
H ₂ O/EtOH 2/1	3	CH ₃ COOH/IR 120H ⁺	0°C

Bei der Reduktion mit Schwefelsäure wurde zur Neutralisation basischer Ionenaustauscher Merck III zugegeben, dieser erwies sich leider als ungeeignet, da die Reaktion jedes Mal sofort einen pH-Wert über 8 erreichte. Danach wurde noch NaHCO₃ zur Neutralisation eingesetzt, bei diesem Versuch konnte am DC kein guter Reaktionsverlauf bzw. kein Produkt mehr festgestellt werden, da zuviele Salze in der Lösung vorhanden waren. Die Versuche mit Schwefelsäure wurden verworfen, da hier zu viele Ionen bzw. zu radikale Bedingungen vorherrschen.

Bei der Nutzung des sauren Ionentauscher IR 120 H⁺ wurde darauf geachtet, dass die Lösung am Ende einen nicht zu sauren pH-Wert erreichte, also möglichst neutral war. Bei dieser Reaktionsart werden auch die Natriumionen entfernt, und außerdem wird bei der Aufarbeitung mit MeOH die entstandene Borsäure in die flüchtige Borsäureester überführt.

Die NMR-Auswertungen dieser Reaktionen konnten zu Anfang kein befriedigendes Ergebnis liefern, es war nicht klar ersichtlich ob die gewünschten Heptosen entstanden waren. Erst in einem NMR-Vergleich mit einer kommerziell erhältlichen Heptose konnte man erkennen, dass die Produkte dasselbe Aufspaltungsmuster zeigten.

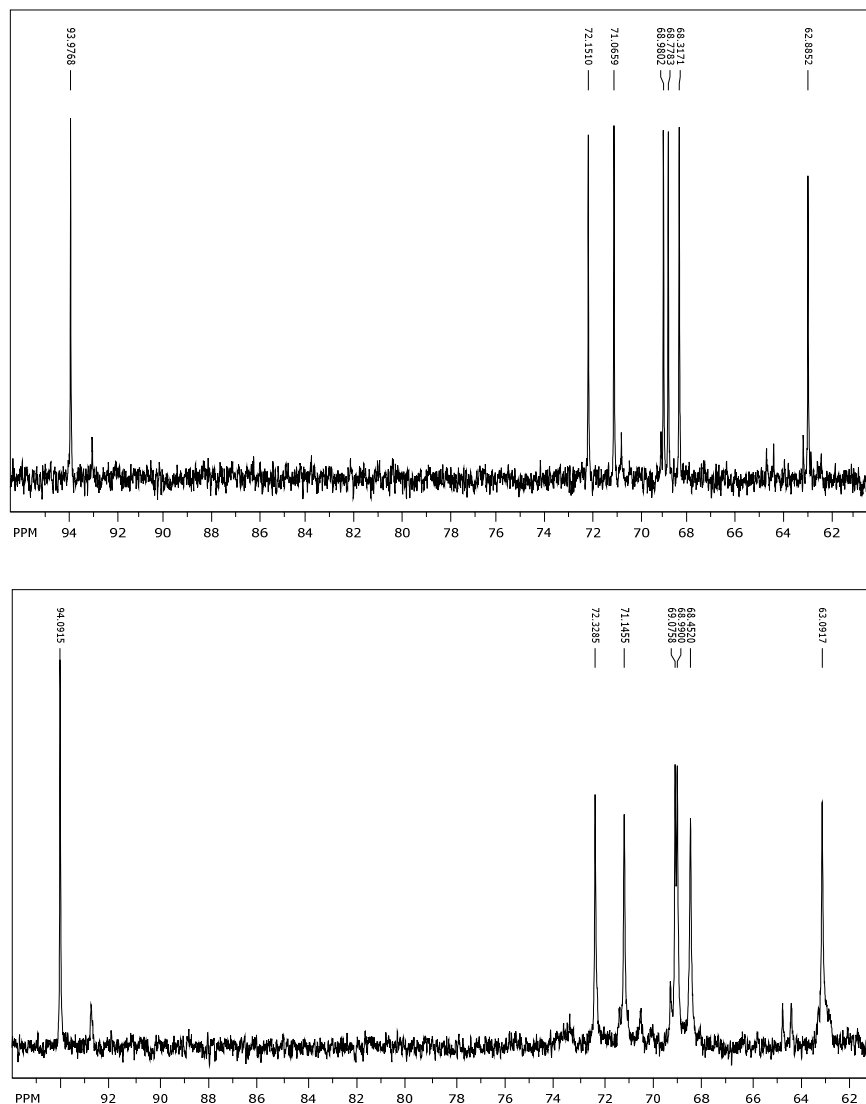


Abbildung 31: Aufspaltungsmuster der kommerziell erworbenen Glucoheptose (oben) und der durch Reduktion mit NaBH₄ selbst synthetisierten Komponente 3 (unten).

Die Reduktionsprodukte wurden ohne weitere Reinigung zur Amadori-Umlagerung angesetzt.

Bei der Umsetzung der Reduktionsprodukte musste mit viel Salz in der Reaktionslösung gearbeitet werden, dies und die sowieso schon geringe Ausbeute aus dem Reduktionsschritt ließen eine nur unbefriedigende Ausbeute an den entsprechenden Amadori-Umlagerungsprodukten zu.

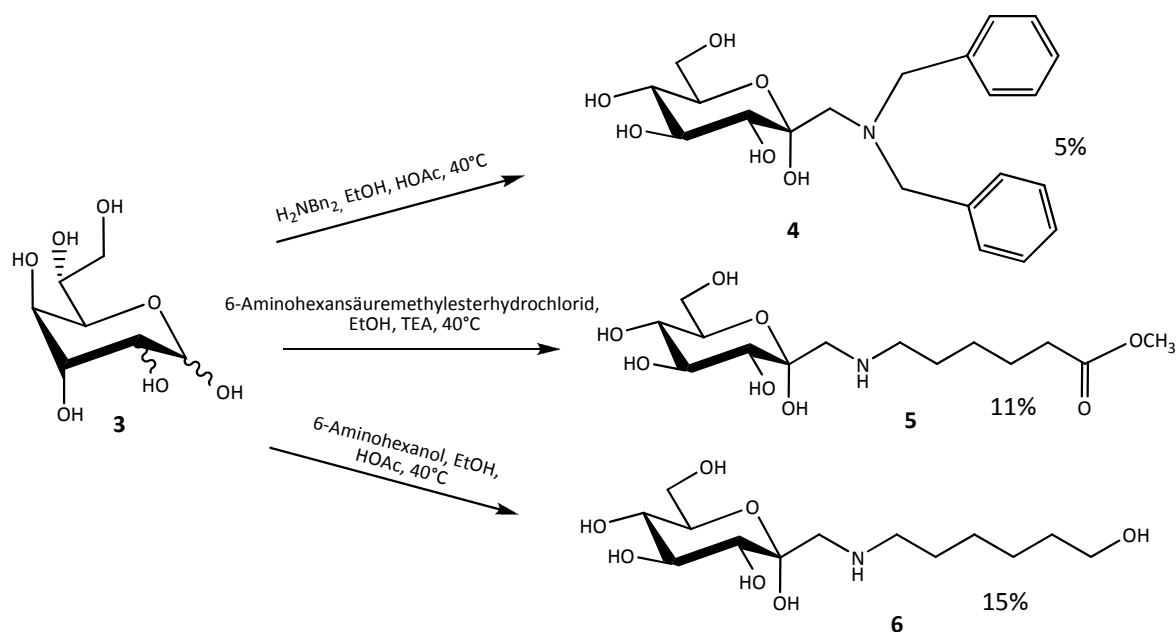


Abbildung 32: Amadori-Umlagerung der D-Glucose aus der NaBH_4 Reduktion

Wegen der angeführten Probleme wurde darauf verzichtet, bei dieser Route die Reaktionsbedingungen bzw. die Aufarbeitung zu verbessern, da die Ausbeuten von vornherein nicht sonderlich gut waren, wurde die gesamte Synthese umgestaltet und eine andere Kettenverlängerungsart herangezogen.

Um den unbefriedigenden Reduktionsschritt zu umgehen, wurde ein abgeänderter Syntheseweg nach einem Bericht von Kuhn und Baschang^{101b} herangezogen. Diese Prozedur ist eine abgewandelte Version der Kiliani-Fischer-Reaktion, wobei der Zucker in trockenem Pyridin und Triethylamin gelöst und mit frisch hergestellter HCN versetzt wird. Dieser Weg unterscheidet sich von der historischen Synthese dadurch, dass hier Pyridin anstatt Wasser als Lösungsmittel verwendet wird und die Reaktionszeit von zehn bis

fünfzehn Tagen signifikant auf etwa drei Tage verkürzt werden kann. Um den Reaktionsfortschritt mittels DC zu verfolgen, muss jeweils eine kleine Menge der Reaktionslösung mit Acetanhydrid in Pyridin behandelt werden, um die Polarität zu senken. Würde dies nicht geschehen, würden die Reaktanden zu stark von der stationären Kieselgelphase zurückgehalten werden und es wäre keine Trennung von Startmaterial, das auch acetyliert wurde, und Produkt ersichtlich. Weiters wird damit eine mögliche Hydrolyse der Cyanhydrine auf der schwach sauren DC-Oberfläche verhindert.

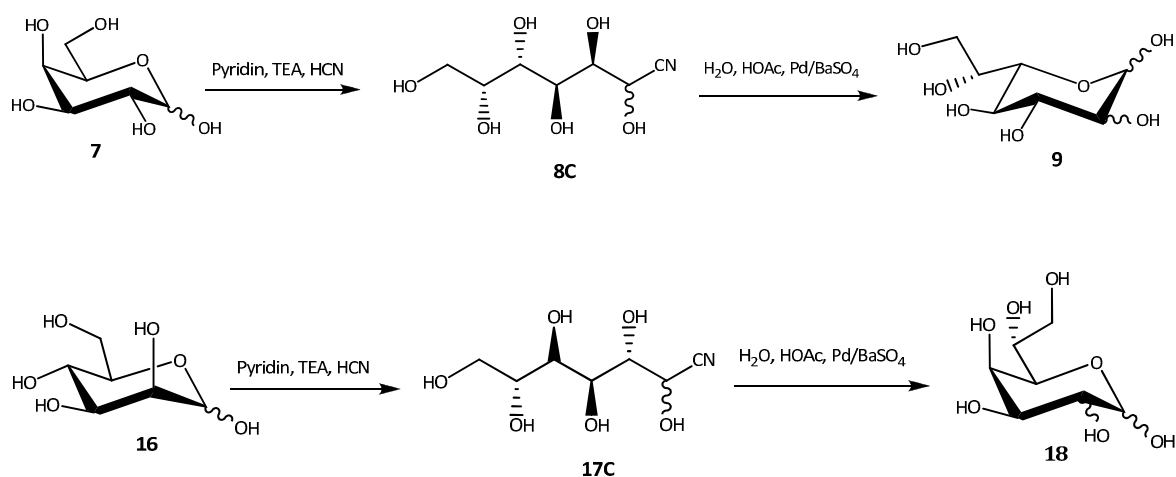


Abbildung 33: Kettenverlängerung nach Kuhn und Baschang mit frisch hergestellter HCN. Diese Reaktion wurde nur mit D-Galactose und D-Mannose durchgeführt.

Laut der Vorschrift von Kuhn und Baschang sollen die Produkte so schnell als möglich ohne weiteren Reinigungsschritt weiterbenutzt werden, nachdem sie durch Umkristallisierung mit Ether und Essigester erhalten wurden.

Auch die reduktive Hydrolyse mit Pd/BaSO₄ wurde, wie von Kuhn und Baschang^{101b} vorgeschlagen, durchgeführt. Die Aldonitrile, welche ohne Reinigung erhalten wurden, werden in Wasser gelöst und mit Essigsäure und Palladium auf Bariumsulfat (5%) versetzt. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre gerührt, um die gewünschten Heptosen zu erhalten. Nach etwa sechzehn Stunden ist die Reaktion fertig und wird über Celite abfiltriert, da der sehr feine Katalysator durch die Fritte geht und die Lösung verunreinigt. Zuletzt wird das Filtrat mit saurem Ionentauscher IR 120 H⁺ behandelt.

Die Reaktionslösung weist zwei einzelne Produktpots am DC auf entsprechend der Epimerenmischung (α - und β - Mischung). Bei der Galacto-Heptose wurde im ^{13}C -NMR-Spektrum außerdem noch die erwartete Bildung eines 7-Ringes festgestellt.

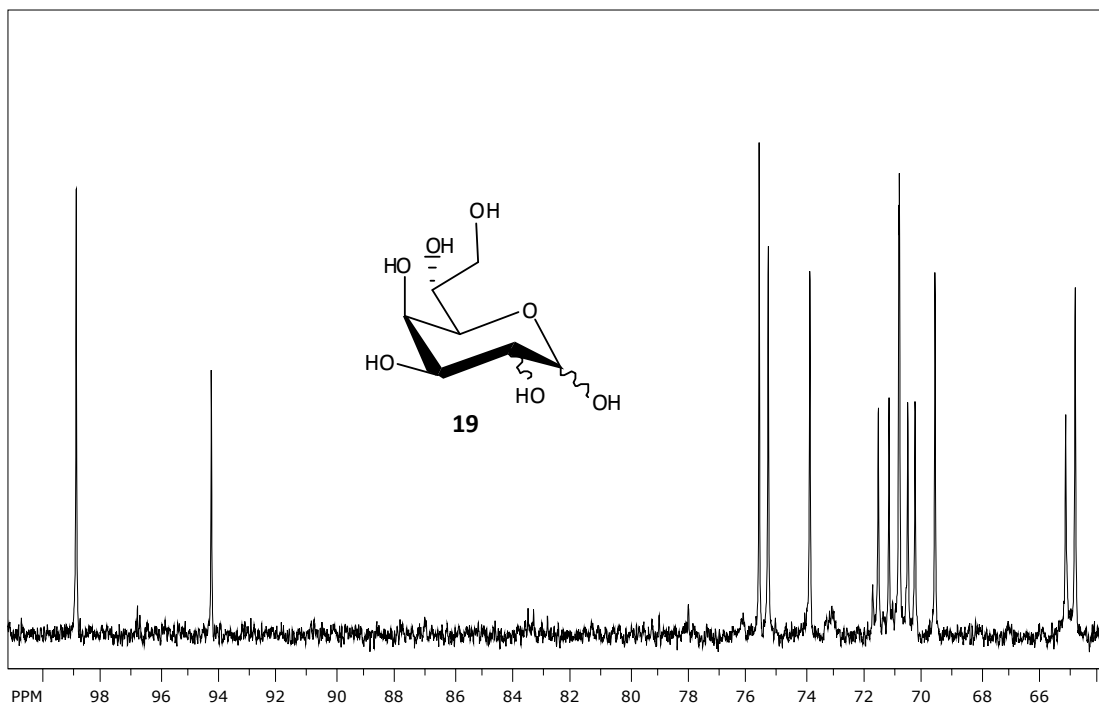
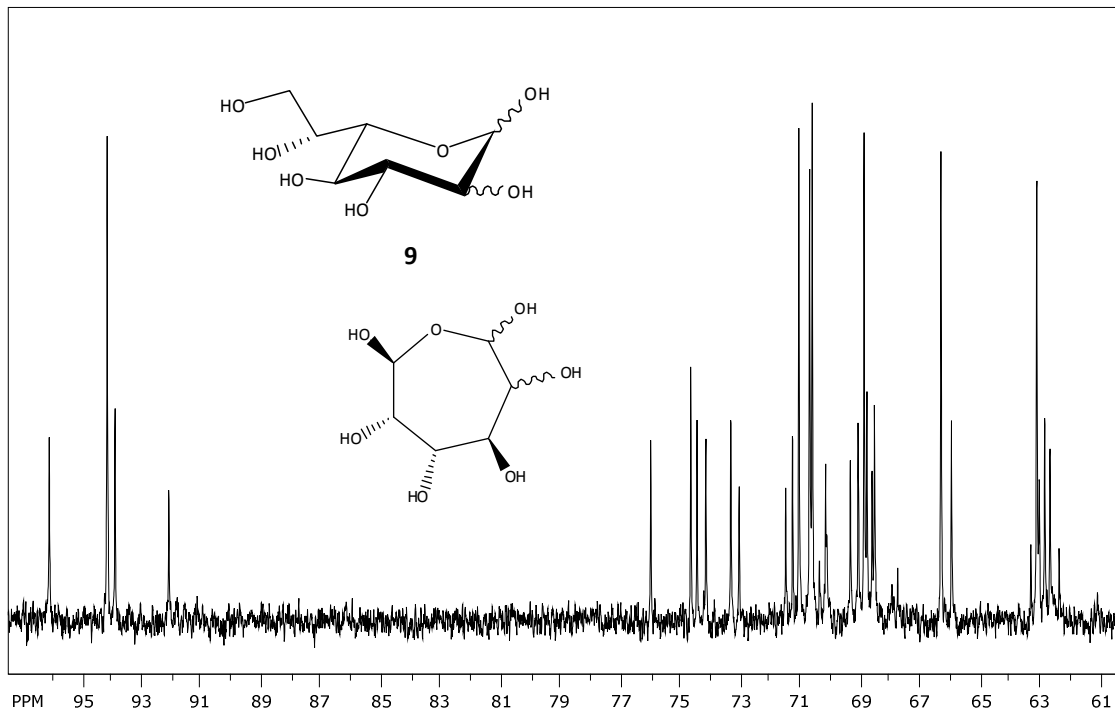


Abbildung 34: C-NMR Spektren der Komponenten 9 (oben) und 19 (unten) aus der Synthese mit HCN und Pd/BaSO₄.

3.2 Amadori-Umlagerung

Frühere Arbeiten mit einer kommerziell erwerblichen *D-Glycero-D-gulo*-heptose als Startmaterial der Amadori-Umlagerung, zeigten sehr gute Resultate, daher wurden in dieser Diplomarbeit diese Reaktionsbedingungen übernommen¹⁰⁵.

Mit der Amadori-Umlagerung als Schlüsselschritt, sollte es möglich sein schnell und einfach C-Glycosyl-Typ Glycokonjugate mit verschiedenen Konfigurationen und variierenden Amino-Komponenten herzustellen.

Zu Beginn wurde die D-Glucose untersucht, da hier schon Ergebnisse für die kommerziell erhältliche *D-gluco*-Heptose vorhanden waren, die zeigten, dass die Umsetzung mit Dibenzylamin in sehr guten Ausbeuten und auch die Umsetzung mit 6-Aminohexanol und 6-Aminohexansäuremethylester Hydrochlorid mit guten Ausbeuten funktionieren¹⁰³.

Dies konnte mit dem ersten Syntheseweg, der über NaCN und Natriumborant führte, nicht bestätigt werden, da hier nur Ausbeuten von etwa 30 % bei der Amadori-Umlagerung erhalten werden konnten. Der Grund waren aber nicht die Reaktionsbedingungen der Umlagerung, sondern die zahlreichen störenden Nebenprodukte und Salze, die bei der Kettenverlängerung erhalten wurden und eine gute Umsetzung nicht zuließen.

Auch für die *D-galacto* und *D-manno* Konfiguration wurde dieser erste Syntheseweg durchgeführt, jedoch zugunsten des weit besseren und saubereren Weges über HCN und Pd/BaSO₄ verworfen.

Für die Amadori-Umlagerung wurde die jeweilige Heptose in EtOH mit einigen Tropfen H₂O und 1,6-Dioxan gelöst und das gewünschte Amin mit saurem Katalysator (HOAc) oder Triethylamin, bei Amin-Hydrochloriden, zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde einige Tage gerührt und die Reaktionstemperatur bei jeder Reaktion individuell angepasst, abhängig vom Fortschritt, der mittels DC-Kontrolle überprüft wurde. Es wurde auch getestet, ob kurzes Erhitzen auf hohe Temperaturen von bis zu 80°C oder längere Heizperioden bei geringeren Temperaturen von etwa 40°C besser geeignet sind, um die Reaktion voranzutreiben. Die höheren Temperaturen von 80°C wurden so kurz wie

¹⁰⁵ Wrodnigg, T.M.; Kartusch, C.; Illaszewicz, C. *Carb. Res.* **2008**, *343*, 2057-2066

möglich gehalten, um mögliche Abbau- oder Nebenprodukte zu verhindern, die entstehen können, wenn die Reaktion in die Maillard-Reaktionskaskade eintritt. Die Reaktion wurde gestoppt, sobald ein befriedigendes Ergebnis am DC zu erkennen war, das Startmaterial muss nicht unbedingt zur Gänze verschwunden sein. Es gilt immer den besten Mittelweg abzuschätzen, wenn schon genug Produkt vorhanden, aber noch wenige Nebenprodukte entstanden sind. Außerdem war zu beobachten, dass während des Abziehens von Lösungsmittel die Reaktion noch weiter fortgesetzt wurde.

Bei den Produkten, die in der *D-gluco*-Konfiguration vorliegen, wird erwartet, dass die treibende Kraft die äquatorial liegenden Hydroxylgruppen sind. Die α -anomere Form der 5C_2 -Pyranose erlaubt dem größeren Dibenzylamin und den anderen Amino-Substituenten, die stabilisierende äquatoriale Position zu besetzen. Daher werden in diesem Fall bei allen Umlagerungsprodukten die α -Anomere als einziges Produkt erwartet. Auch bei der *D-galacto* und *D-manno* Serie, wo nicht alle Hydroxylgruppen in äquatorialer Position vorliegen, konnte fast ausschließlich die α -Anomere als Produkt erhalten werden, da auch hier der größere Amino-Substituent die äquatoriale Position besetzt.

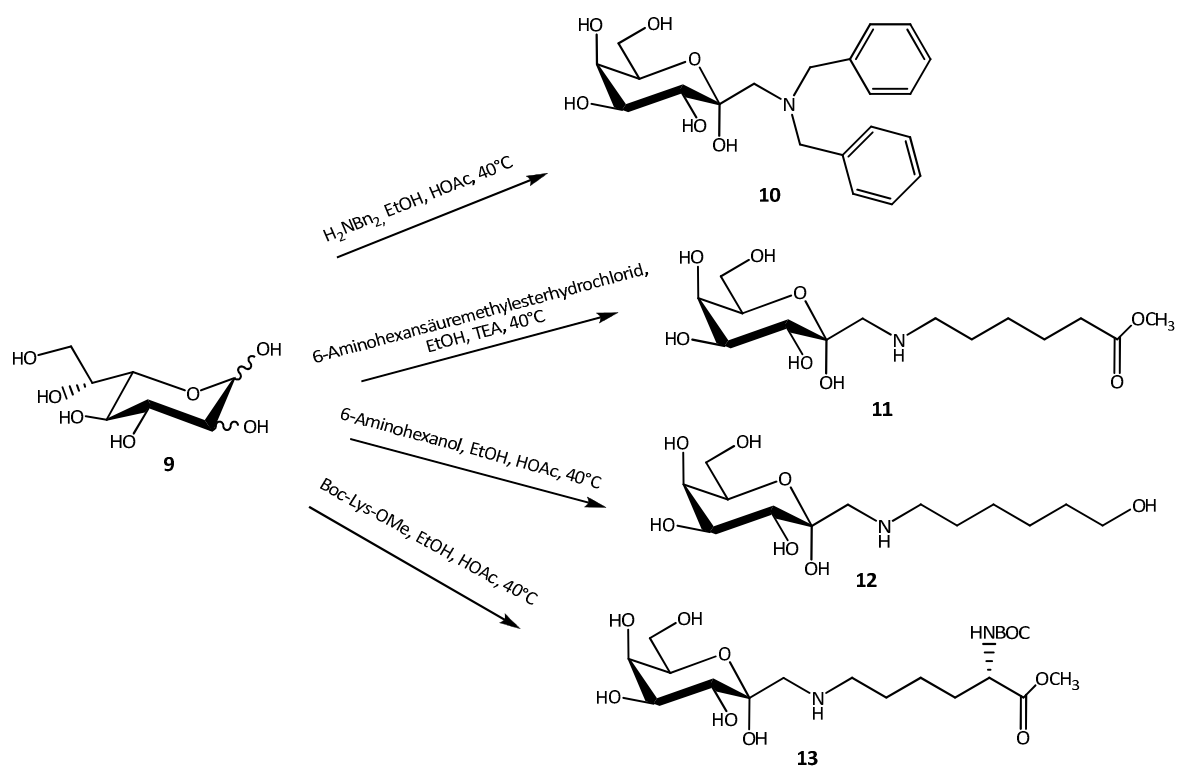


Abbildung 35: Amadori-Umlagerungen der *D-galacto*-Serie und ihre Reaktionsbedingungen

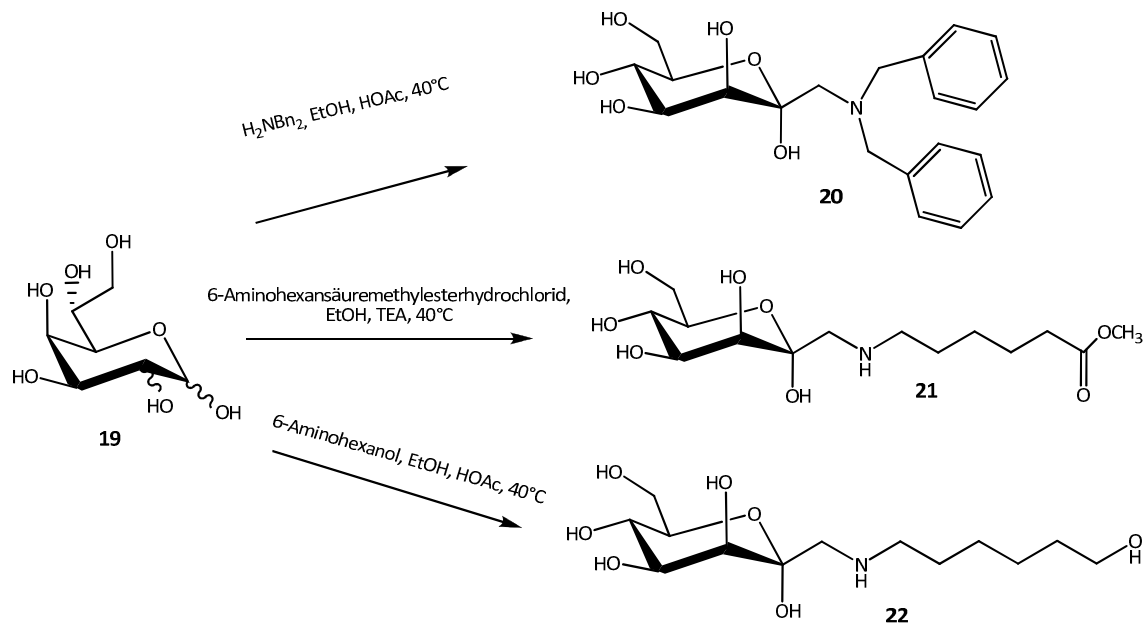


Abbildung 36: Amadori-Umlagerungen der *D-manno*-Serie und ihre Reaktionsbedingungen

Die Reaktionsbedingungen wurden zuerst mit Dibenzylamin getestet, da hier die besten Ausbeuten erwartet wurden¹⁰³. Ferner erlauben die zwei Benzylgruppen eine DC-Detektion mittels UV und man erhoffte sich eine weniger anspruchsvolle Reinigung durch die herabgesetzte Polarität. Vor allem bei der *D-manno* Serie stellte sich jedoch heraus, dass die Herstellung und Reinigung der Produkte mit 6-Aminohexanol und 6-Aminohexansäuremethylester Hydrochlorid wesentlich schneller und einfacher bzw. mit geringerem Aufwand auszuführen war, als die Umsetzung mit Dibenzylamin.

Die Reinigung der Produkte mittels Säulenchromatographie stellte sich als äußerst schwierig heraus und musste sehr umsichtig durchgeführt werden. Das größte Problem bei der Chromatographie mit Kieselgel ist die Retention der sehr polaren Reaktionsprodukte. Auf Grund dieser hohen Polarität benötigt man auch verhältnismäßig polare Säulenlaufmittel, um die Produkte vom Kieselgel zu eluieren. Außer den Produkten mit Dibenzylamin, die mit Essigester/Cyclohexan eluiert wurden, wurden Lösungsmittelsysteme aus Chloroform/Methanol/Ammoniak verwendet. Ein Problem dieses Laufmittels ist die limitierte Mischbarkeit von Chloroform und Methanol, da somit nicht alle Systeme uneingeschränkt verfügbar sind.

Des Weiteren darf man keinen Druck an die Säule anlegen, um die Reinigung zu beschleunigen, da es hierbei zu einer Entmischung der Lösungsmittel auf der Säule

kommen kann. Ein weiteres Problem bei der Reinigung war, dass auch mit einem guten Lösungsmittelsystem die Trennung schwierig war, da die R_f-Werte der Produkte und der unerwünschten Seitenprodukte sich kaum unterscheiden und teilweise eine Trennung von den, in der Reaktion vorhandenen, Salzen nicht möglich war. Durch schmalere Säulen und mehr Kieselgel konnten jedoch bei fast allen Produkten gute Ausbeuten erzielt werden. Ausnahme war hier 1-(*N*-Methoxycarbonylpentyl-14-tertbutylamino)amino-1-desoxy- α -D-galacto-hept-2-ulopyranose, bei diesem Produkt konnte die Ausbeute von 35% nicht gesteigert werden. Die Ausbeute des Umlagerungsprodukts mit BOC-geschütztem Lysin als Amin-Komponente wird hier nicht beachtet, da die Reaktion nur einmal durchgeführt wurde und keine Optimierung der Reaktions- oder Reinigungsbedingungen durchgeführt wurde.

Jeweils zwei Produkte aus der *D-galacto* und der *D-manno* Serie wurden zu den entsprechenden 1-*N*, 2-*O* Cyclischen Carbamaten umgesetzt.

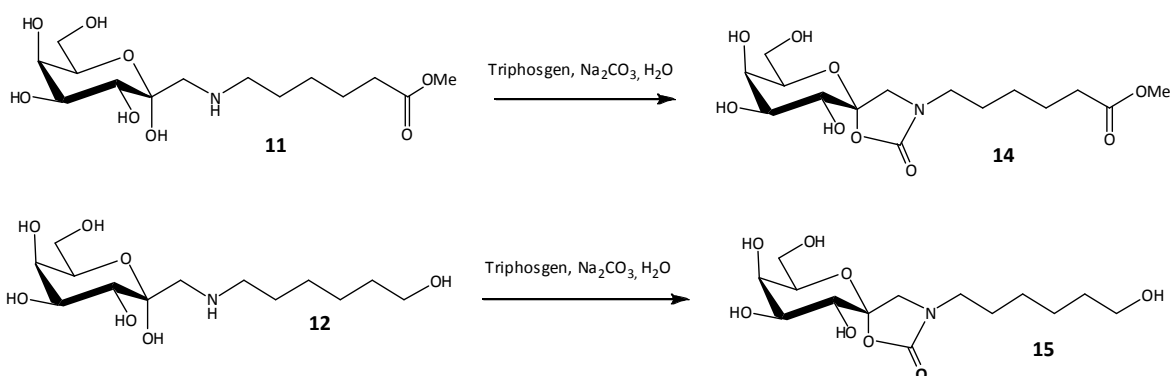


Abbildung 37: Carbamat Bildung der *D-galacto* Serie. Reaktionsbedingungen: 0°C, 20min bis RT, 5-16h rühren

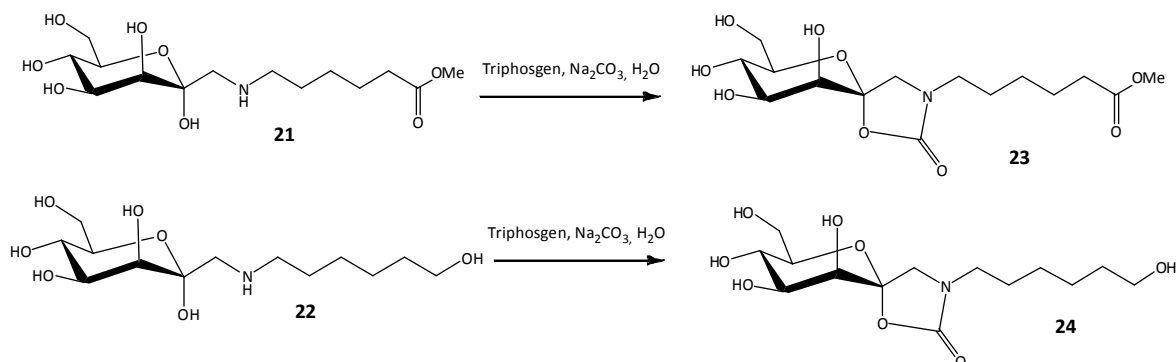
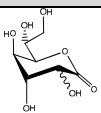
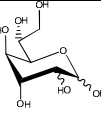
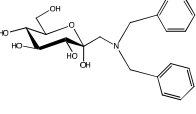
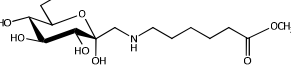
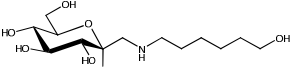
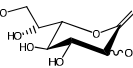
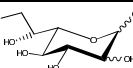
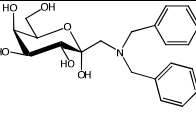
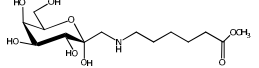
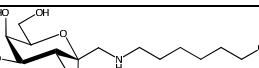


Abbildung 38: Carbamat Bildung der *D-manno* Serie. Reaktionsbedingungen: 0°C, 20min bis RT, 5-16h rühren

Die Reaktionsbedingungen waren bekannt und wurden übernommen¹⁰³. Das jeweilige Amadori-Produkt wird in Wasser und 1,6-Dioxan als Löslichkeitsvermittler gelöst und unter Eiskühlung mit Triphosgen und Natriumcarbonat als Puffer, versetzt. Dieser Schritt soll eine bessere Reinigung gewährleisten. Der Reinigungsschritt wurde mittels einer Kieselgel Säulenchromatographie durchgeführt, war relativ einfach und brachte zufriedenstellende Ergebnisse.

In der Tabelle ist eine Übersicht der Produkte und der erhaltenen Ausbeuten als Überblick zu sehen.

Tabelle 2: Produkte aller Konfigurationen und ihre Ausbeuten. Nur Produkte der D-galacto und D-manno Serie sind optimiert

Produktname	Struktur	Ausbeute
D-Glycero-D-gulo/D-ido-heptonolacton		crude 100%
D-Glycero-D-ido/D-gulo-heptose		crude 81%
1-(N,N-Dibenzyl)amino-1-desoxy- α -D-gluco-hept-2-ulopyranose		5%
1-(N-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-desoxy- α -D-gluco-hept-2-ulopyranose		11%
1-(N-6-Hydroxyhexyl)amino-1-desoxy- α -D-gluco-hept-2-ulopyranose		15%
D-Glycero-L-manno/L-gluco-heptonolacton		crude 100%
D-Glycero-L-manno/L-gluco-heptose		crude 100%
1-(N,N-Dibenzyl)amino-1-desoxy- α -D-galacto-hept-2-ulopyranose		71%
1-(N-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-desoxy- α -D-galacto-hept-2-ulopyranose		34%
1-(N-6-Hydroxyhexyl)amino-1-desoxy- α -D-galacto-hept-2-ulopyranose		74%

1-(<i>N</i> -Methoxycarbonylpentyl-14-tertbutylamino)amino-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulopyranose		27%
1-(<i>N</i> -Methoxycarbonylpentyl)amino-1- <i>N</i> ,2- <i>O</i> -carbonyl-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulopyranose		47%
1-(<i>N</i> -6-Hydroxyhexyl)amino-1- <i>N</i> ,2- <i>O</i> -carbonyl-1-desoxy- α -D- <i>galacto</i> -hept-2-ulopyranose		95%
D- <i>Glycero</i> -D- <i>galacto</i> /D- <i>talo</i> -heptonolacton		crude 100%
D- <i>Glycero</i> -D- <i>galacto</i> /D- <i>talo</i> -heptose		crude 100%
1-(<i>N,N</i> -Dibenzyl)amino-1-desoxy- α -D- <i>manno</i> -hept-2-ulopyranose		72%
1-(<i>N</i> -Methoxycarbonylpentyl)amino-1-desoxy- α -D- <i>manno</i> -hept-2-ulopyranose		90%
1-(<i>N</i> -6-Hydroxyhexyl)amino-1-desoxy- α -D- <i>manno</i> -hept-2-ulopyranose		70%
1-(<i>N</i> -Methoxycarbonylpentyl)amino-1- <i>N</i> ,2- <i>O</i> -carbonyl-1-desoxy- α -D- <i>manno</i> -hept-2-ulopyranose		47%
1-(<i>N</i> -6-Hydroxyhexyl)amino-1- <i>N</i> ,2- <i>O</i> -carbonyl-1-desoxy- α -D- <i>manno</i> -hept-2-ulopyranose		75%

4 Zusammenfassung und Diskussion

In dieser Diplomarbeit ist es gelungen, eine zweckdienliche Methode zur Herstellung von C-glycosyl Glycokonjugaten aus verschiedenen Aminen und Kohlenhydraten unterschiedlicher Konfigurationen zu finden. Die entsprechenden Hexosen wurden über eine C-Kettenverlängerung in die entsprechenden Heptosen umgesetzt, welche als Startmaterial für die Amadori-Umlagerung dienten. Durch Einsatz der Heptosen konnten nach der Umlagerung die natürlich vorkommenden Konfigurationen und Konformationen wieder erhalten werden.

Die Synthese der Heptosen über den trivialen NaCN-Weg stellte sich als unpraktikabel heraus, da hier die Reduktionsmethode zwar zu den erwünschten Produkten, aber nur in unakzeptabel schlechten Ausbeuten führte. Daher musste man auf einen verbesserten, klassischen Weg mit HCN zurückgreifen. Der größere Aufwand brachte jedoch um einiges sauberere Produkte und bessere Ausbeuten. Diese zweistufige Prozedur ist der Amadori-Umlagerung vorgelagert, die der Schlüsselschritt dieser Diplomarbeit war.

Die Ausbeuten der Umlagerungsreaktion mit Heptosen aus der NaCN-Reaktion waren im Allgemeinen etwas niedriger, da in der Reaktion einige Nebenprodukte entstehen können. Auf Grund dessen konnte man nur mit den unsaubereren Produkten der ersten Reduktion arbeiten, hier ergaben sich teilweise nur Ausbeuten von 30% oder weniger.

Mit den wesentlich reineren Heptosen aus der HCN-Methode mit anschließender Reduktion mit Pd/BaSO₄ konnten um einiges bessere Ausbeuten von bis zu 85% erreicht werden, dennoch ist eine weitere Optimierung der Bedingungen notwendig.

Bei der Auswertung der NMR-Daten wurde bei der D-galacto-Serie festgestellt, dass die Amadori-Produkte jeweils in der 6-Ring und außerdem noch in einer 5-Ring Konformation vorliegen was auf sterische Gründe zurückzuführen ist.

Ein Grund für die relativ schlechten Ausbeuten während der Synthese war das genutzte Reinigungsprotokoll. Die konventionelle Säulenchromatographie mit Kieselgel ist keine hinreichend gute Methode zur Produktgewinnung. Man sollte andere Methoden berücksichtigen, wie z.B. die Entwicklung einer passenden präoperativen HPLC Methode oder die Verwendung einer reversed-phase Chromatographie.

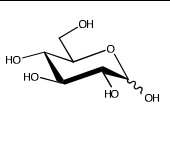
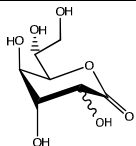
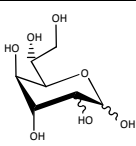
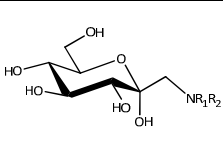
Eine weitere Möglichkeit zur besseren Reinigung könnte über eine Schutzgruppenstrategie für die Hydroxylgruppen sein, da dies die Polarität senken könnte und somit die Reinigung erleichtern. In dieser Arbeit sollte jedoch ein Syntheseweg ohne Schutzgruppentechniken gefunden werden.

Abgesehen von diesen, sicherlich problematischen Faktoren der Reinigung könnte man auch das Lösungsmittel für die Reaktion ändern. Es gibt Versuche mit *D-glycero/D-gulo*-Heptose, die in Wasser durchgeführt wurden. Diese führten jedoch nicht zu ähnlich guten Ausbeuten wie die Versuche in Ethanol. Mit den selbsthergestellten Heptosen wurden diese Versuche jedoch nicht durchgeführt. Durch das Wasser würde die Löslichkeit des Eduktes erhöht werden und eventuell auch die Bildung des positiv geladenen Imins des Glycosylamins verbessert werden.

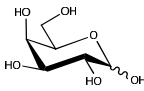
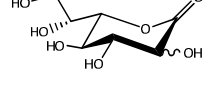
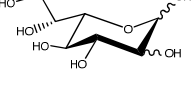
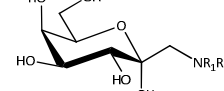
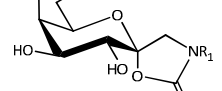
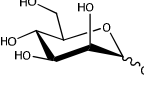
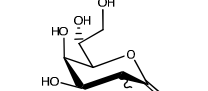
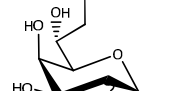
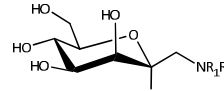
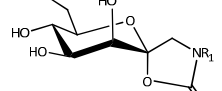
Bei der Temperatur könnte untersucht werden, ob die Bildung der Amadori-Produkte bei einer gewissen Temperatur ihr Maximum erreicht, bei welcher dies geschieht und ob damit dann der Eintritt in die Maillard-Reaktionskaskade verhindert bzw. minimiert werden kann.

Es konnten *C*-Glycosyl-Glycokonjugate aller Konfigurationen erfolgreich hergestellt und die Ausbeuten soweit verbessert werden, dass sie in einem guten bis sehr gutem Bereich liegen. Diese synthetisierten *C*-Glycosyl-Typ Glycokonjugate können sowohl als Building-Blocks für Glycosylierungsreaktionen als auch als Monomere für die Peptidsynthese eingesetzt werden.

Tabelle 3: Veranschaulichung der hergestellten Produkte und ihrer Ausbeuten

Strukturen und Ausbeuten				
				-
D-Glucose	crude 100%	crude 81% Weg B	R ₁ , R ₂ = CH ₂ Bn = 5%	
			R ₁ =H, R ₂ =C ₇ H ₁₃ O ₂ = 11%	
			R ₁ =H, R ₂ =C ₆ H ₁₂ OH = 15%	

Diskussion

				
D-Galactose	crude 100%	crude 100% Weg C	$R_1, R_2 = \text{CH}_2\text{Bn} = 71\%$	$R_1 = \text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2 = 95\%$
			$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2 = 34\%$	$R_1 = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{OH} = 47\%$
			$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{OH} = 74\%$	
			$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N} = 27\%$	
				
D-Mannose	crude 100%	crude 100% Weg C	$R_1, R_2 = \text{CH}_2\text{Bn} = 72\%$	$R_1 = \text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2 = 47\%$
			$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2 = 90\%$	$R_1 = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{OH} = 75\%$
			$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{OH} = 70\%$	

5 Experimenteller Teil

5.1 Analytik

Optische Aktivität

Zur Bestimmung der Drehwerte wird ein Perkin Elmer 341 Polarimeter verwendet. Die Messungen werden bei einer Wellenlänge von 589 nm, einer Küvettenlänge von 10 cm und einer Temperatur von 20°C durchgeführt. Die Konzentrationsberechnung bezieht sich auf g/100 mL und das Lösungsmittel für die jeweilige Messung ist in der Arbeitsvorschrift angegeben.

Chromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wird mit Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten (MERCK 5554) durchgeführt. Die verwendeten Sprühreagenzien sind Vanillin/Schwefelsäure (1 g Vanillin auf 100 mL conc. Schwefelsäure) oder Ammoniummolybdat/Cersulfat (10 g Ammoniummolybdat in 1000 mL 10%-iger Schwefelsäure + 8 g Cersulfat in 80 mL 10%-iger Schwefelsäure).

Zur Reinigung der dargestellten Produkte wird eine Säulenchromatographie durchgeführt, wobei Kieselgel 60 (230-400 mesh, MERCK) verwendet wird. Die Laufmittelzusammensetzungen unterscheiden sich und sind daher in den Arbeitsvorschriften zur Herstellung der jeweiligen Substanzen angeführt.

5.2 NMR-spektroskopische Daten

Die NMR-Spektren wurden auf einem Bruker Ultrashield 300 MHz (Multikern, CP/MAS) bei 300.36 MHz (^{13}C) bzw. bei 75.47 MHz (^1H) aufgenommen.

δ : chemische Verschiebung in ppm gegen Trimethylsilan in Klammer

^{13}C : zugeordnetes Kohlenstoffatom

^1H : Multiplizität, Anzahl der Wasserstoffe, zugeordnete Wasserstoffe,

Kopplungskonstante (J) in Hz

Multiplizität

s	Singlett	d	Dublett
bs	breites Singlett	dd	dublettisches Dublett
t	Triplet	ddd	dublettisches dd
m	Multiplet	n.a.	nicht aufgelöst

5.3 Material

Alle Chemikalien, wurden kommerziell erworben und, wenn nicht anders erwähnt, ohne weitere Reinigung verwendet.

5.3.1 HCN – Herstellung

Die jeweils benötigte Menge an HCN wurde frisch hergestellt indem gesättigte NaCN-Lösung zu einer wässrigen Lösung von Schwefelsäure (60%) bei 80°C zugetropft wurde. Die dadurch entstandene gasförmige Blausäure wurde durch eine CaCl_2 Trockensäule mittels eines Stickstoffstroms in eine Kühlfalle mit -12°C eingeleitet. Alle Arbeitsschritte, die im Zusammenhang mit der Herstellung und dem Gebrauch der HCN stehen, wurden in einem speziellen Abzug durchgeführt. Hier war eine kontinuierliche Warnung durch einen elektrochemischen Sensor gewährleistet, um vor einem möglichen Austritt des Gases zu warnen. Das Equipment wurde mit wässriger NaOCl (10%) Lösung behandelt und mit wässriger H_2SO_4 neutralisiert.

5.3.2 Peracetylierung und Mikroaufarbeitung

Als Referenz wurde der jeweilige Zucker in trockenem Pyridin gelöst, eine katalytische Menge DMAP zugegeben und etwa drei Äquivalente Essigsäureanhydrid pro Hydroxylgruppe zugetropft. Von der jeweiligen HCN Reaktion wurde eine kleine Menge entnommen in Pyridin aufgenommen und ebenfalls mit Essigsäureanhydrid behandelt.

5.4 Darstellung der Produkte

5.4.1 D-gluco Serie

D-Glycero-D-gulo/D-ido-heptonolacton (2)

Weg A:

D-Glucose (**1**) (3 g, 16,7 mmol, 1eq) wird in H₂O (20 mL) gelöst und unter Eiskühlung mit NaCN (1,5 g, 30,6 mmol, 1,84 eq) versetzt. Die Mischung wird etwa sechzehn Stunden bei RT gerührt und zwölf Stunden auf 100°C aufgeheizt, wobei sich die Reaktion gelb verfärbt. Es wird auf RT abgekühlt und der pH-Wert mit vier Spateln saurem Ionentauscher IR-120 H⁺ (gewaschen mit H₂O) auf pH = 2 eingestellt. Nach fünfzehn Minuten wird der Ionentauscher abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vollständig abgezogen.

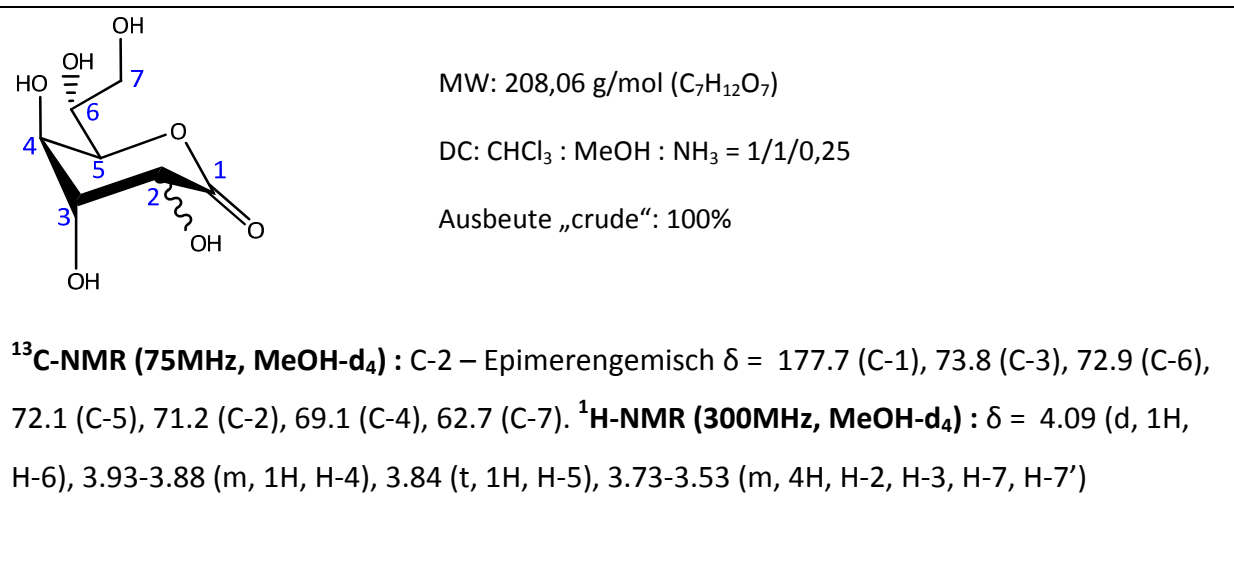
Reaktionsprodukt **2A** wird ohne weitere Reinigung für den nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

Weg B:

D-Glucose (**1**) (5 g, 27,8 mmol, 1 eq) wird in H₂O (35 mL) gelöst und unter Eiskühlung mit NaCN (2,5 g, 51,1 mmol, 1,84 eq) versetzt. Die Lösung wird vier Tage lang bei 4°C in den Kühlschrank gestellt wobei sich die Lösung gelb verfärbt. Unter Rührung und mit einem Rückflusskühler versehen, erhitzt man die Mischung fünf Stunden auf 100°C und kontrolliert

den vollständigen Umsatz mittels DC. Die basische Reaktionslösung wird auf RT gekühlt und mit vier Spateln saurem Ionentauscher IR 120 H^+ (gewaschen mit H_2O) auf einen pH-Wert von ca. 2 gebracht. Der Ionentauscher wird abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen.

Reaktionsprodukt **2B** wird ohne weitere Reinigung für den nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.



D-Glycero-D-ido/D-gulo-heptopyranose (3)

Weg A:

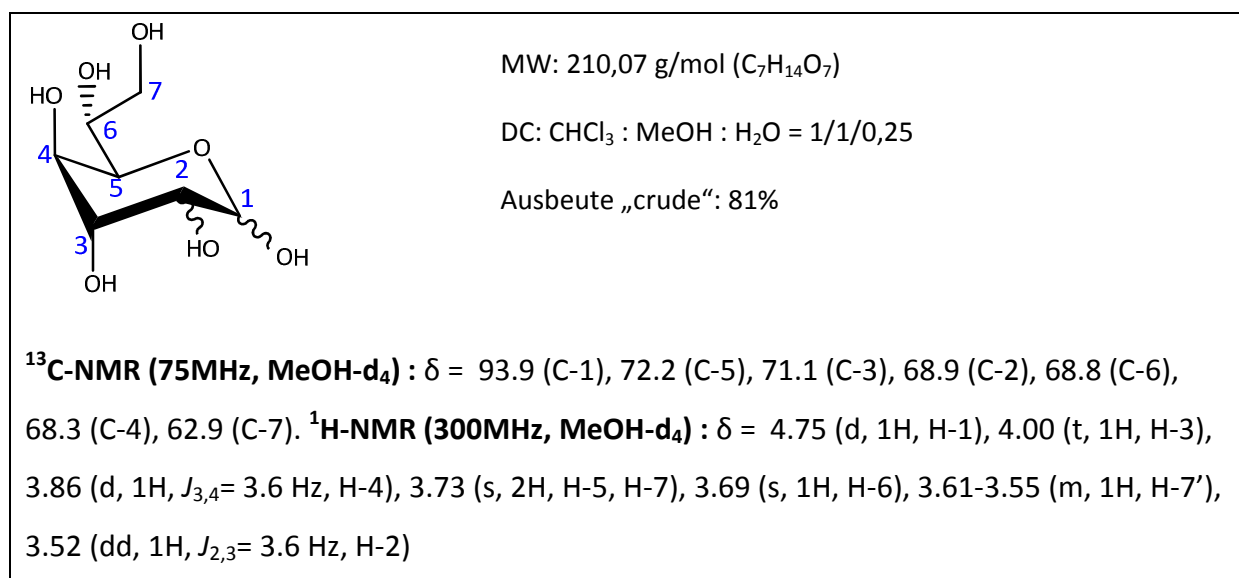
Verbindung **2A** (1,1 g, 5,04 mmol, 1 eq) wird in einer Mischung H_2O und EtOH (2/1, 10/5, 15 mL) gelöst. Der pH-Wert der Lösung sollte ungefähr 4 betragen, außerdem wird die Lösung mit Eis auf 0°C gekühlt. In drei Portionen wird $NaBH_4$ (insgesamt 0,15 g, 3,97 mmol, 0,79 eq) zugegeben und zugleich immer so viel saurer Ionentauscher IR 120 H^+ (gewaschen mit H_2O), dass der pH-Wert nicht über 4 ansteigt, aber auch nicht unter 2 sinkt. Nach DC-Überprüfung wird der Ionentauscher abfiltriert und die Lösung auf die Hälfte eingeeengt. Um den Überschuss an $NaBH_4$ zu quenchen wird MeOH (10mL) zugegeben und das Lösungsmittel abgezogen. Es wird noch zweimal mit MeOH koevaporiert, wobei ein weißer Schaum entsteht und die flüchtigen Borsäuremethylester abgezogen werden.

Das rohe Reaktionsprodukt **3A** wird ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

Weg B:

Verbindung **2B** (1,2 g, 5,76 mmol, 1 eq) wird in einer Mischung H₂O und EtOH (2/1, 10/5, 15 mL) gelöst und mit Eis auf 0°C gekühlt. In fünf Schritten wird NaBH₄ (insgesamt 0,21 g, 5,55 mmol, 0,96 eq) zugegeben und in gleichen Portionen insgesamt nicht mehr als 3 mL IR 120 H⁺ (gewaschen mit H₂O) zugegeben um den pH-Wert bei ca. 3 zu halten. Danach wird der Ionentauscher abfiltriert und das im Überschuss vorhandene NaBH₄ mit MeOH (15 mL) gequenchet. Das Lösungsmittel wird abgezogen und die Reaktion zweimal mit MeOH koevaporiert, wobei ein weißer Schaum entsteht und die flüchtigen Borsäuremethylester entfernt werden.

Das rohe Reaktionsprodukt 3B wird ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

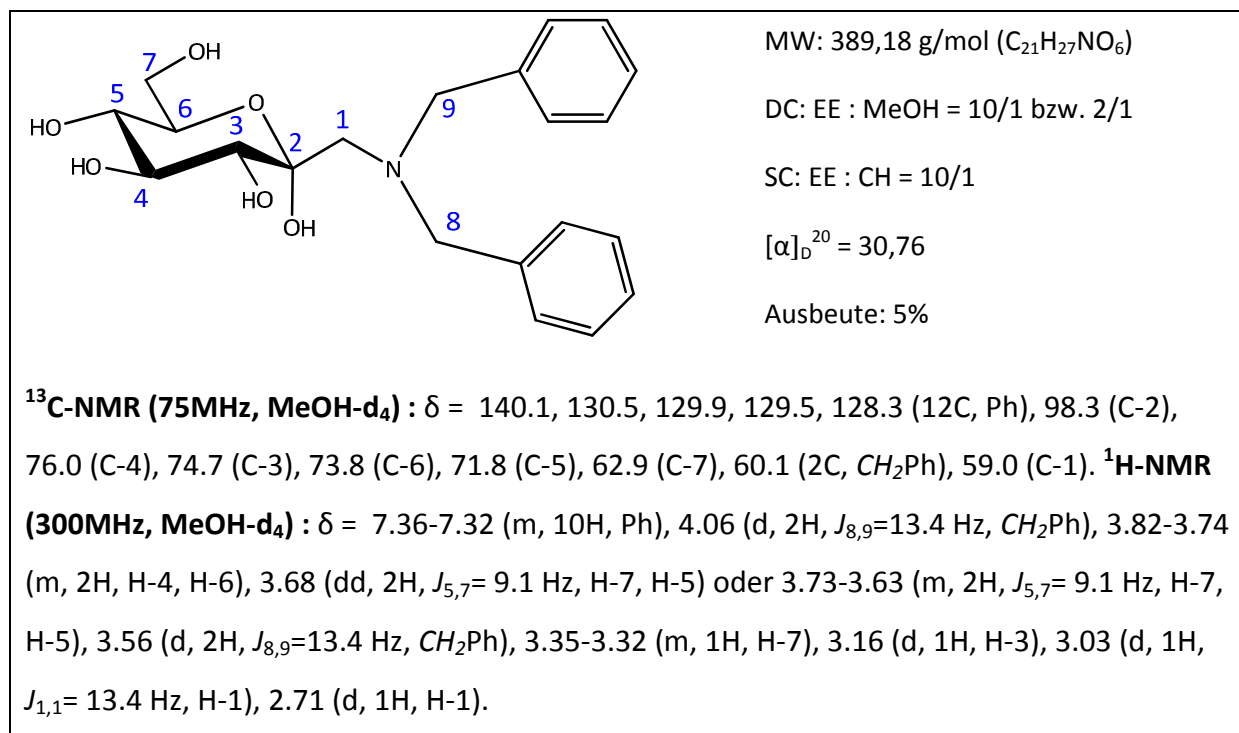


1-(N,N-Dibenzyl)amino-1-desoxy-α-D-glucopyranose (4)

Weg A:

Verbindung **3A** (0,8 g, 3,81 mmol, 1 eq) wird in EtOH (8 mL) gelöst und mit Dibenzylamin (0,73 mL, 3,81 mmol, 1 eq) und um eine bessere Löslichkeit zu erhalten, mit einigen Tropfen H₂O dest. und 1,6-Dioxan, versetzt. Es folgt die Zugabe von Essigsäure (0,1 mL, 3,81 mmol, 1 eq). Die Reaktion wird für drei Tage bei 40°C gerührt. Es wird zwar kein vollständiger Umsatz festgestellt, da sich Teile des Gemisches nicht gelöst haben, dennoch wird die Lösung am

Rotationsverdampfer vollständig eingengt. Nach diesem Vorgang werden 400 mg Rohprodukt erhalten, welche einer säulenchromatographischen Reinigung unterzogen werden. Man erhält 20mg (0,05mmol) gelbes Öl.

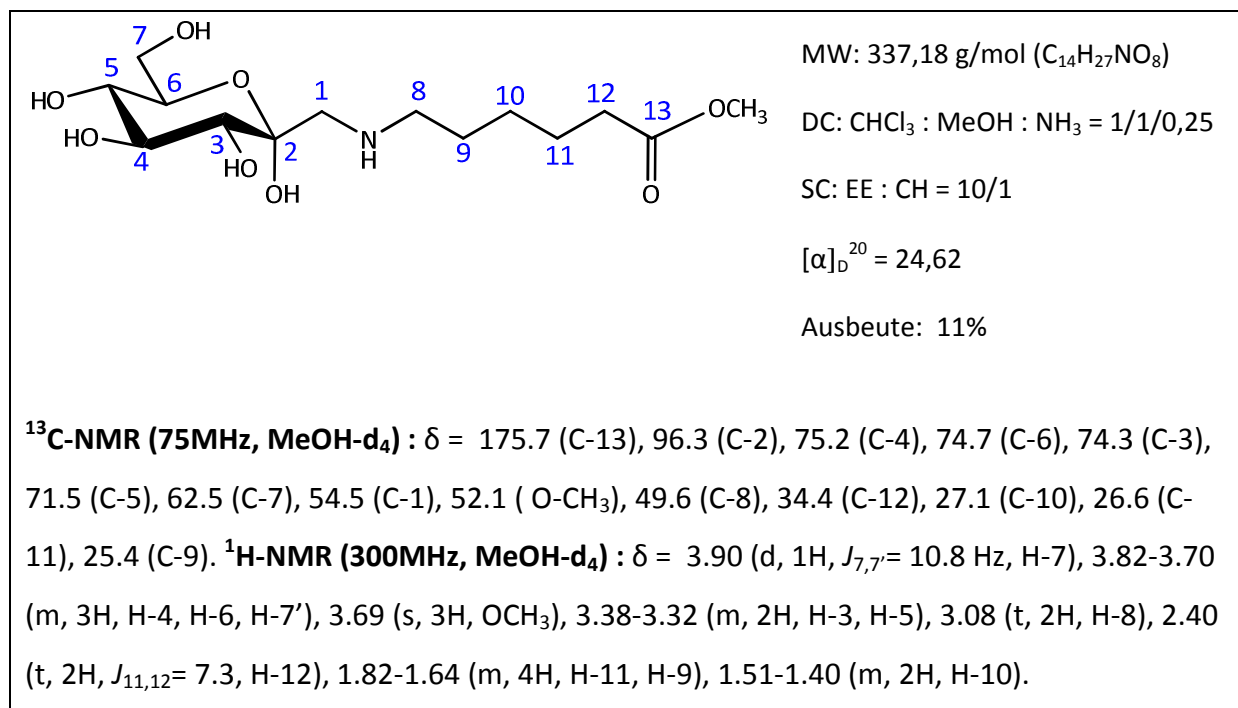


1-(N-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-desoxy-α-D-glucopyranose (5)

Weg A:

Verbindung **3A** (0,33 g, 1,57 mmol, 1 eq) wird in EtOH (3,5 mL) gelöst und mit einigen Tropfen H₂O dest. und 1,6-Dioxan versetzt um eine bessere Löslichkeit zu erhalten. Es wird nun 6-Aminohexansäuremethylesterhydrochlorid (0,26 g, 1,57 mmol, 1 eq) und Triethylamin (0,09 mL, 1,57 mmol, 1 eq) zugegeben. Die Reaktion wird über Nacht bei 40°C gerührt und nach der Überprüfung mittels DC werden noch 6-Aminohexansäuremethylesterhydrochlorid (0,26 g, 1,57 mmol, 1 eq) und Essigsäure (0,09 mL, 1,57 mmol, 1 eq) zugegeben und noch vier weitere Tage bei 40°C gerührt. Vor dem Einengen auf dem Rotationsverdampfer ist der Umsatz noch nicht vollständig, danach ist aber ein gutes Ergebnis auf dem DC ersichtlich.

Das Lösungsmittel wird abgezogen und das erhaltene Rohprodukt, 900 mg, mittels einer Säulenchromatographie gereinigt, aus der man 60 mg (0,18 mmol) Ausbeute eines braunen Öls erhält.



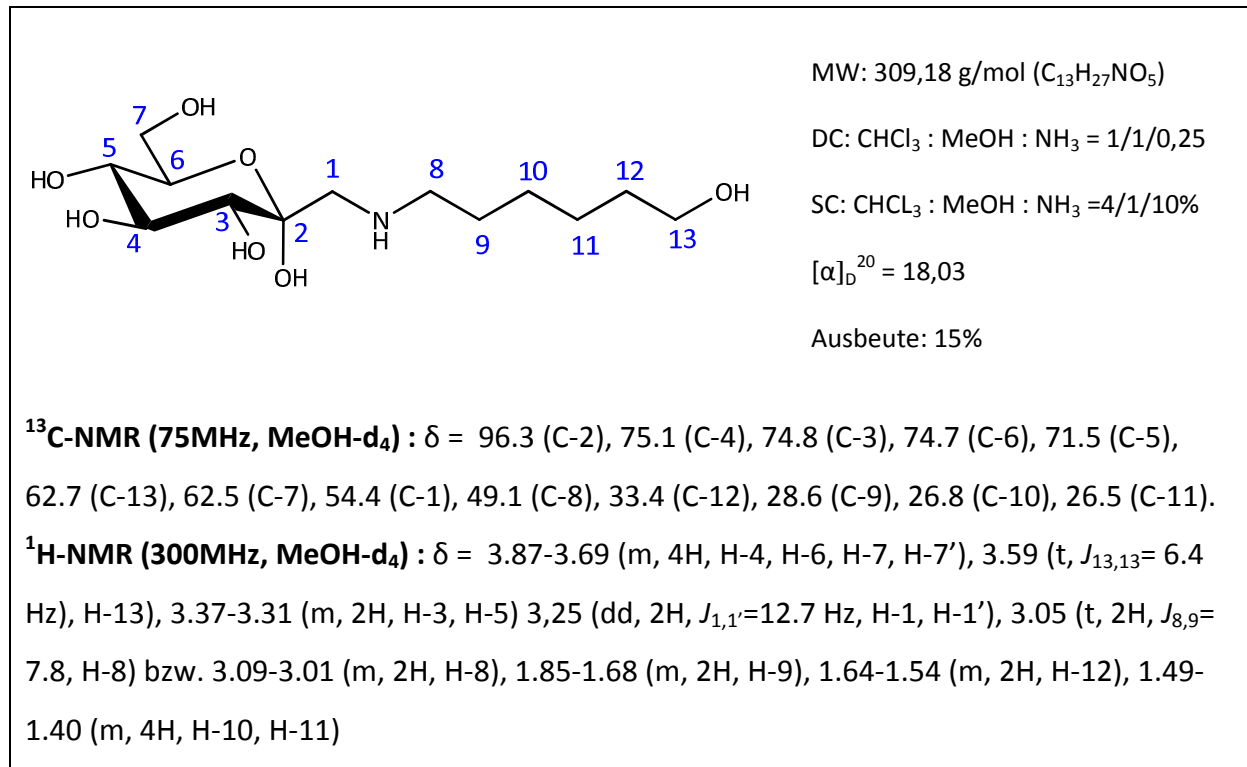
1-(N-6-Hydroxyhexyl)amino-1-desoxy-α-D-glucopyranose (6)

Weg A:

Verbindung **3A** (0,45 g, 2,14 mmol, 1 eq) wird in EtOH (5 mL) und einigen Tropfen H₂O dest. und 1,6-Dioxan gelöst (Ultraschallbad). Es werden 6-Aminohexanol (0,50 g, 4,28 mmol, 2 eq) und Essigsäure (0,24 mL, 4,28 mmol, 2 eq) zugegeben und zwei Tage bei 50°C gerührt. Danach wird das Lösungsmittel zur Hälfte abgezogen und mittels eines DC's die Reaktion überprüft. Das Rohprodukt, 1 g, wird säulenchromatographisch gereinigt und das Endprodukt sind 80 mg (0,26 mmol).

Weg B:

Verbindung **3B** (0,63 g, 2,99 mmol, 1 eq) wird in EtOH (8 mL) und etwas H₂O und 1,6-Dioxan gelöst. Es werden 6-Aminohexanol (0,351 g, 2,99 mmol, 1 eq) und Essigsäure (0,17 mL, 2,99 mmol, 1 eq) zugesetzt und die Mischung fünf Tage bei 50°C gerührt. Die Reaktion wird mittels DC auf Vollständigkeit geprüft, danach das Lösungsmittel abgezogen und das rotbraune Öl säulenchromatographisch gereinigt. Nach der Reinigung kann das Produkt nicht wiedergefunden werden, im NMR zeigt sich nur der Spacer.



5.4.2 D-galacto Serie

D-Glycero-L-manno/L-gluco-heptonolacton (8)

Weg A:

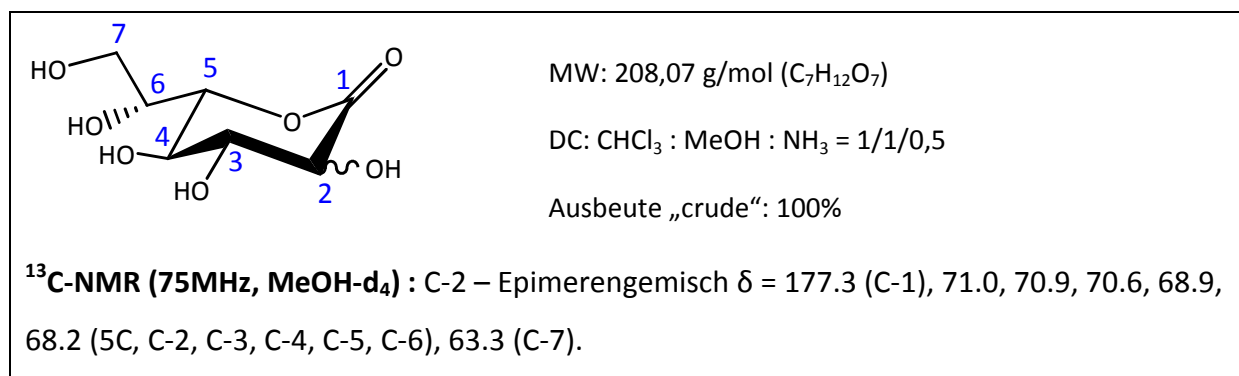
D-Galactose (**7**) (3 g, 16,7 mmol, 1 eq) wird in H₂O dest. (20 mL) gelöst und unter Eiskühlung mit NaCN (1,5 g, 30,6 mmol, 1,84 eq) versetzt. Die Mischung wird etwa sechzehn Stunden bei RT gerührt und danach für zwölf Stunden auf 100°C aufgeheizt. Danach wird wieder auf RT abgekühlt und man fügt vier Spatel sauren Ionentauscher IR 120 H⁺ (gewaschen mit H₂O) zu, um den pH-Wert auf etwa 2 einzustellen. Nach dreißig Minuten wird der Ionentauscher abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vollständig abgezogen.

Das rohe Reaktionsprodukt **8A** wird ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

Weg B:

D-Galactose (**7**) (3 g, 16,7 mmol, 1 eq) wird in H₂O dest. (20 mL) gelöst und unter Eiskühlung mit NaCN (1,5 g, 30,6 mmol, 1,84 eq) versetzt. Die Galactose löst sich nicht zur Gänze, trotzdem wird die Reaktion ohne Rührung für vier Tage in den Kühlschrank gestellt. Danach heizt man fünf Stunden auf 100°C auf, wobei sich die Reaktion gelb verfärbt. Laut DC ist der Umsatz vollständig und die basische Lösung wird mittels saurem Ionentauscher IR 120 H⁺ (gewaschen mit H₂O) auf pH = 2 eingestellt. Der Ionentauscher wird abfiltriert und die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt.

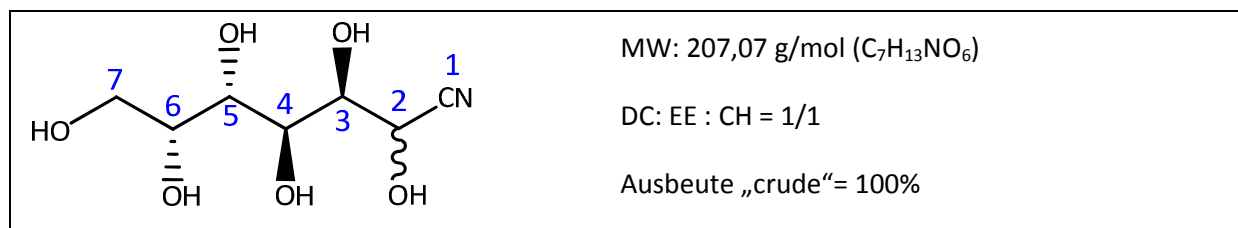
Das rohe Reaktionsprodukt **8B** wird ohne weitere Reinigung für den nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.



D-Glycero-L-manno/L-gluco-heptononitril (**8C**)

Weg C:

D-Galactose (**7**) (3 g, 16,7 mmol, 1 eq) wird in trockenem Pyridin (45 mL) suspendiert und mit Triethylamin (0,18 mL, 1,33 mmol, 0,08 eq) versetzt. Die Reaktionslösung wird mit frisch hergestellter HCN (5,57 mL, 0,14 mol, 8,5 eq) versetzt und gut verschlossen fünf Tage lang gerührt. Die Lösung verfärbt sich dabei von gelb nach dunkelbraun. Nach fünf Tagen überprüft man mittels eines DC Vergleichs mit der peracetylierten Reaktionsmischung, die Vollständigkeit der Reaktion. Danach wird eine Stunde die restliche HCN bei RT auf der Wasserstrahlpumpe abgezogen und auf der Ölpumpe, bei RT, das Pyridin entfernt. Es wird zweimal mit EtOH koevaporiert und danach mit Ether und Essigester umkristallisiert. Man erhält das Zwischenprodukt **8C**.



D-Glycero-L-manno/L-gluco-heptopyranose bzw. D-Glycero-L-manno/L-gluco-heptoseptanose (9)

Weg A:

Verbindung **8A** (1,1 g, 5,04 mmol, 1 eq) wird in einer Mischung H₂O und EtOH (2/1, 10/5, 15 mL) gelöst. Die Reaktion wird mit Eis auf 0°C gekühlt und man fügt in drei Portionen NaBH₄ (insgesamt 0,15 g, 3,97 mmol, 0,79 eq) zu und zugleich immer soviel sauren Ionentauscher IR 120 H⁺ (gewaschen mit H₂O), dass der pH-Wert ungefähr bei 3 bleibt. Nach DC-Überprüfung wird der Ionentauscher abfiltriert und die Lösung auf die Hälfte eingedampft. Das im Überschuss vorhandene NaBH₄ wird mit MeOH (15 mL) gequenchet und danach abgedampft. Es wird noch einmal mit MeOH koevaporiert, wobei ein weißer Schaum entsteht und die flüchtigen Borsäuremethylester abgezogen werden.

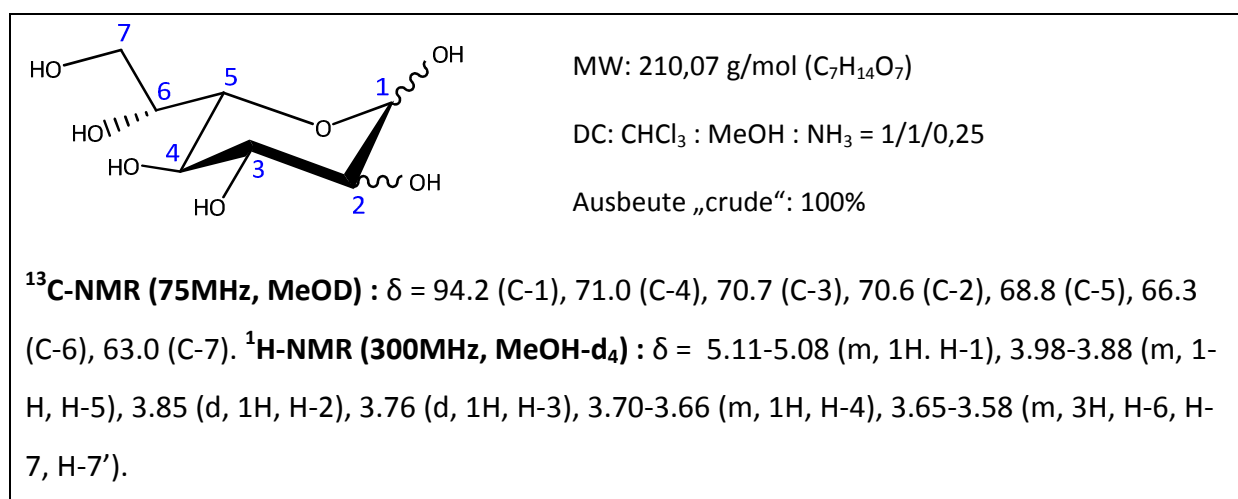
Das rohe Reaktionsprodukt **8A** wiegt 1,4 g (6,66 mmol) da es nicht ganz rein ist sondern auch Salz enthält, trotzdem wird es ohne weitere Reinigung für den nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

Weg B:

Verbindung **8B** (0,97 g, 4,66 mmol, 1 eq) wird in einer Mischung H₂O und EtOH (2/1, 10/5, 15 mL) gelöst. Unter Eiskühlung gibt man in vier Portionen NaBH₄ (insgesamt 0,11 g, 2,91 mmol, 0,62 eq) zugleich mit saurem Ionentauscher IR 120 H⁺ (gewaschen mit H₂O) zu, um den pH-Wert ungefähr bei 3 zu halten. Der Ionentauscher wird nach dreißig Minuten abfiltriert, die Lösung zur Hälfte einrotiert und dann mit MeOH überschüssiges NaBH₄ gequenchet. Man koevaporiert noch dreimal mit MeOH, wobei sich ein weißer Schaum bildet. Das rohe Reaktionsprodukt wird ohne weitere Reinigungsschritte in der nächsten Reaktion eingesetzt.

Weg C:

Das Zwischenprodukt aus **8C** wird abfiltriert und das relativ feuchte Produkt (5 g, 24,1 mmol, 1 eq) zur Reduktion weiterangesetzt, indem man es in H₂O dest. (100 mL) und Essigsäure löst (1,5 mL, 26,2 mmol, 1,1 eq) und Pd/BaSO₄ (3 g) zugibt. Die Reaktion wird zwei Tage bei RT unter H₂ Atmosphäre gerührt und der Katalysator nach erfolgter Reaktion über Celite abfiltriert. Die Produktlösung wird mit einigen Spateln Ionentauscher IR 120 H⁺ (gewaschen mit H₂O) versetzt um einen sauren pH-Wert von etwa 2 einzustellen. Danach wird der Ionentauscher abfiltriert und das H₂O am Rotationsverdampfer abgedampft. Man erhält 3,8 g (18,1 mmol) rohes Reaktionsprodukt. Dieses wird ohne weitere Reinigungsschritte im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.



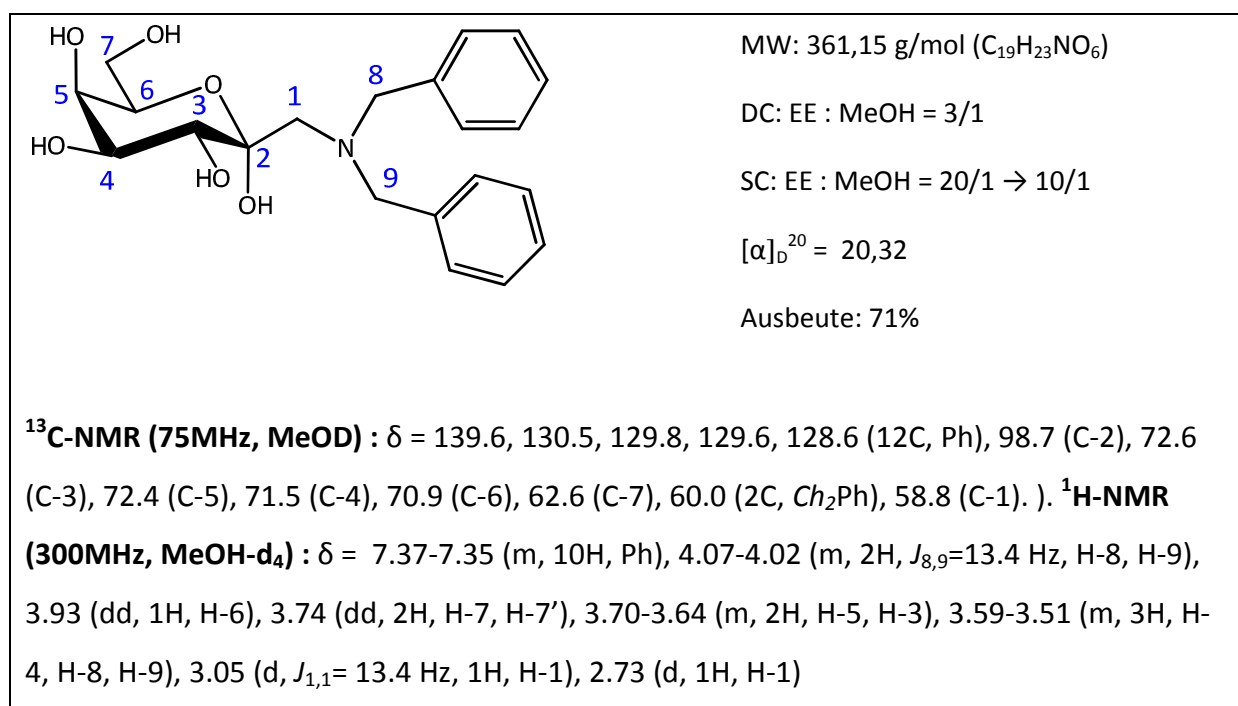
1-(N,N-Dibenzyl)amino-1-desoxy-α-D-galacto-hept-2-ulopyranose bzw. 1-(N,N-Dibenzyl)amino-1-desoxy-α-D-galacto-hept-2-ulofuranose (10)

Weg A:

Verbindung **9A** (0,11 g, 0,52 mmol, 1 eq) wird in EtOH (1,1 mL), mit einigen Tropfen H₂O dest. und 1,6-Dioxan zur besseren Löslichkeit in Lösung gebracht. Es folgt die Zugabe von Dibenzylamin (0,1 mL, 0,52 mmol, 1 eq) und Essigsäure (0,03 mL, 0,52 mmol, 1 eq). Danach wird zwei Tage bei 40°C gerührt. Nach DC Überprüfung wird das Lösungsmittel abgezogen und die 420 mg Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt. Es werden 145mg (0,37mmol) Produkt erhalten.

Weg B:

Verbindung **9B** (0,4 g, 1,9 mmol, 1 eq) wird EtOH (4 mL) gelöst und die Löslichkeit mit 1,6-Dioxan und H₂O noch verbessert. Es folgt die Zugabe von Dibenzylamin (0,36 mL, 1,9 mmol, 1 eq) und Essigsäure (0,11 mL, 1,9 mmol, 1 eq), die Lösung wird daraufhin fünf Tage bei 50°C gerührt. Danach wird der Umsatz am DC überprüft und das Lösungsmittel vollständig abgezogen. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt und man erhält 60 mg (0,15 mmol) Ausbeute.

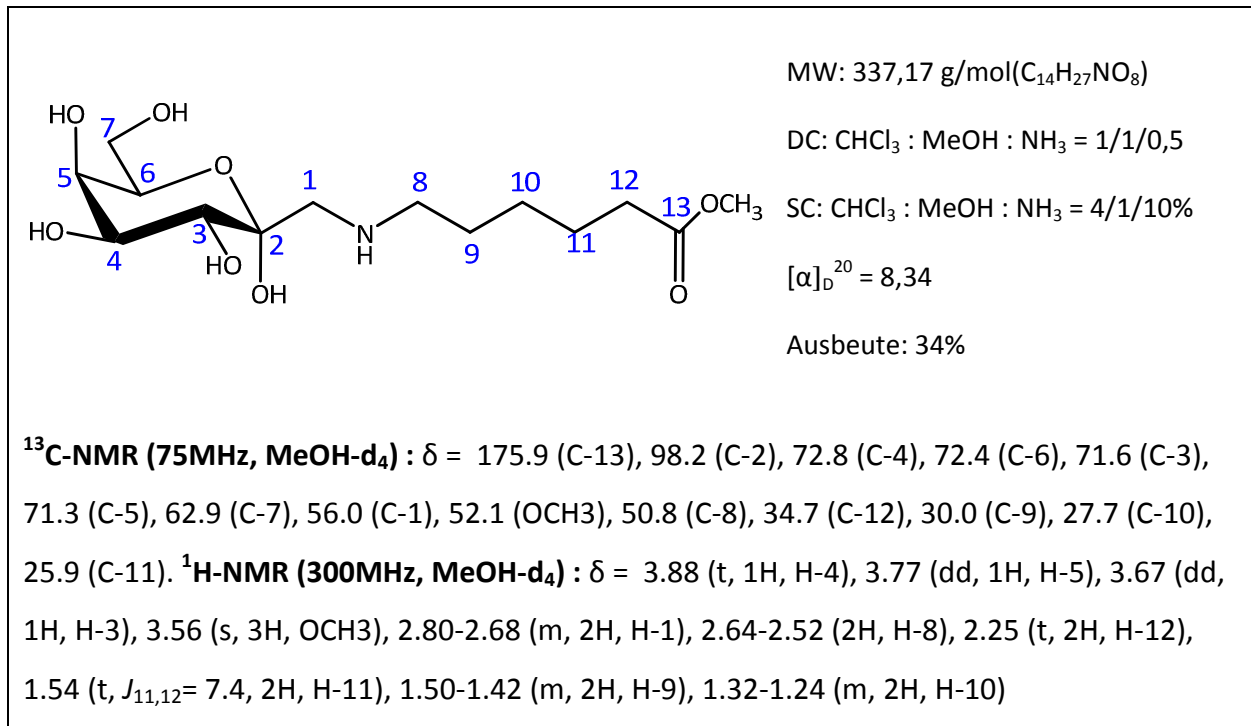


**1-(N-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-desoxy-α-D-galacto-hept-2-ulopyranose
bzw. 1-(N-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-desoxy-α-D-galacto-hept-2-ulofuranose
(11)**

Weg C:

Verbindung **9C** (0,56 g, 2,66 mmol, 1 eq) wird in EtOH (6 mL) gelöst und mit etwas 1,6-Dioxan und H₂O dest. zur besseren Löslichkeit versetzt. In der Folge fügt man 6-Aminohexansäuremethylesterhydrochlorid (0,48 g, 2,66 mmol, 1 eq) und Triethylamin (0,37 mL, 2,66 mmol, 1 eq) zu. Bei 80°C wird vier Stunden lang gerührt und dann noch einen Tag bei 50°C. Das Lösungsmittel wird abgezogen und die 1,2 g Feststoff mittels

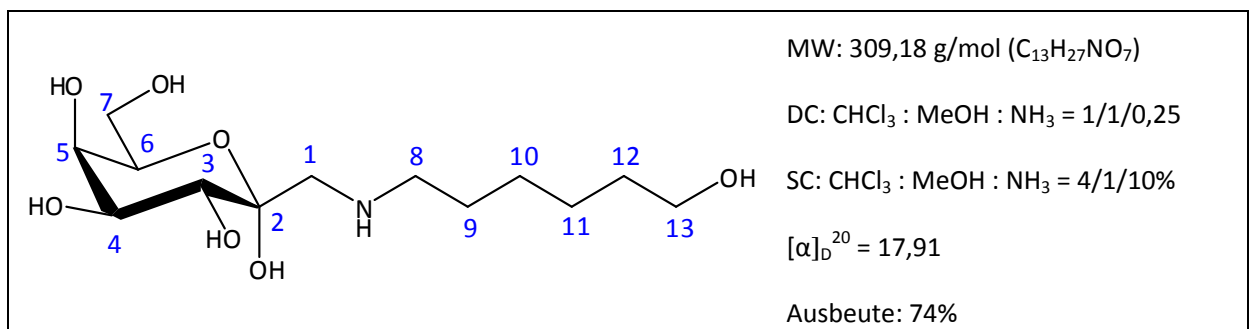
Säulenchromatographie gereinigt. Man erhält 300 mg (0,89 mmol) Ausbeute eines gelbbraunen Öls.



1-(N-6-Hydroxyhexyl)amino-1-desoxy-α-D-galacto-hept-2-ulopyranose bzw. 1-(N-6-Hydroxyhexyl)amino-1-desoxy-α-D-galacto-hept-2-ulofuranose (12)

Weg C:

Verbindung **9C** (0,37 g, 1,76 mmol, 1 eq) wird in EtOH (5 mL) mit einigen Tropfen H₂O dest. und 1,6-Dioxan gelöst. Es werden 6-Aminohexanol (0,2 g, 1,76 mmol, 1 eq) und Essigsäure (0,1 mL, 1,76 mmol, 1 eq) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird drei Tage bei 50°C gerührt und nach DC Überprüfung aufgearbeitet indem das Lösungsmittel abgezogen wird. Zur weiteren Reinigung wird eine Säulenchromatographie durchgeführt. Es werden 400 mg (1.29 mmol) Produkt erhalten.

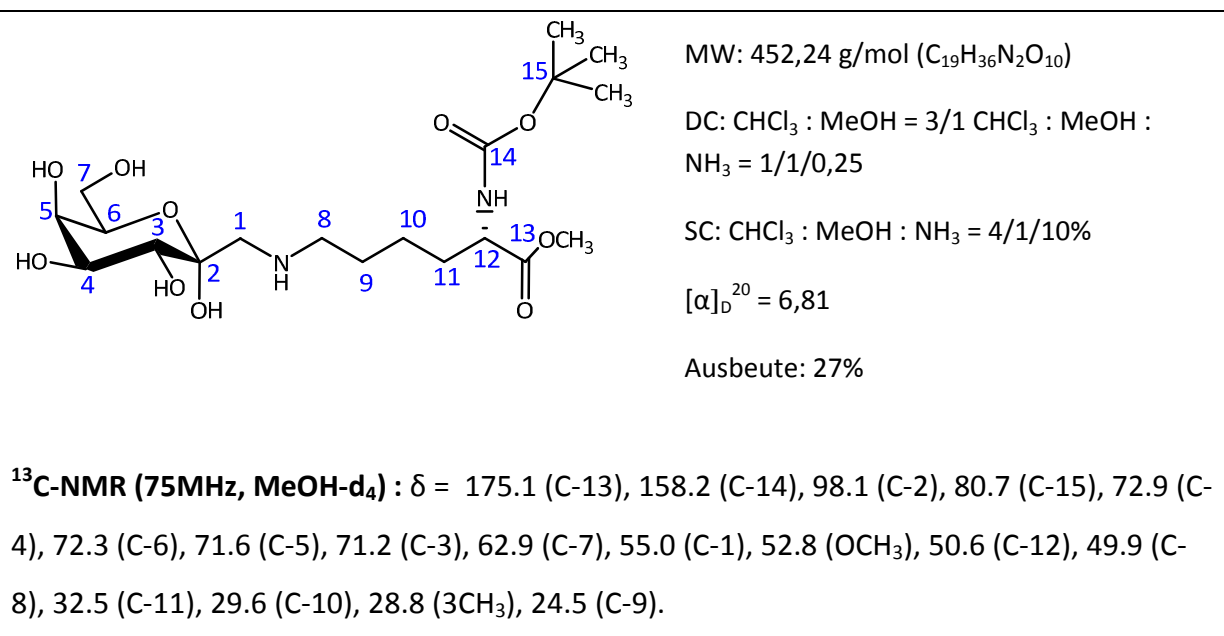


$^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, MeOH- d_4) : δ = 96.7 (C-2), 73.6 (C-4), 71.8 (C-3), 71.5 (C-6), 71.1 (C-5), 62.9 (C-7), 62.7 (C-13), 54.6 (C-1), 49.7 (C-8), 33.3 (C-12), 27.5 (C-9), 27.1 (C-10), 26.5 (C-11).
 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, MeOH- d_4) : δ = 4.0 (t, 1H, H-4), 3.88 (d, 1H, H-5), 3.81-3.61 (m, 4H, H-3, H-6, H-7, H-7'), 3.57 (t, 2H, H-13), 3.21 (dd, 2H, $J_{1,1'} = 12.5$ Hz, H-1, H-1'), 3.02 (t, 2H, $J_{8,8'} = 8.0$ Hz, H-8, H-8'), 1.78-1.68 (m, 2H, H-9), 1.60-1.52 (m, 2H, H-12), 1.47-1.38 (m, H-11, H-10).

1-(*N*-Methoxycarbonylpentyl-14-*t*-butylamino)amino-1-desoxy- α -D-galacto-hept-2-ulopyranose bzw. 1-(*N*-Methoxycarbonylpentyl-14-*t*-butylamino)amino-1-desoxy- α -D-galacto-hept-2-ulofuranose (13)

Weg C:

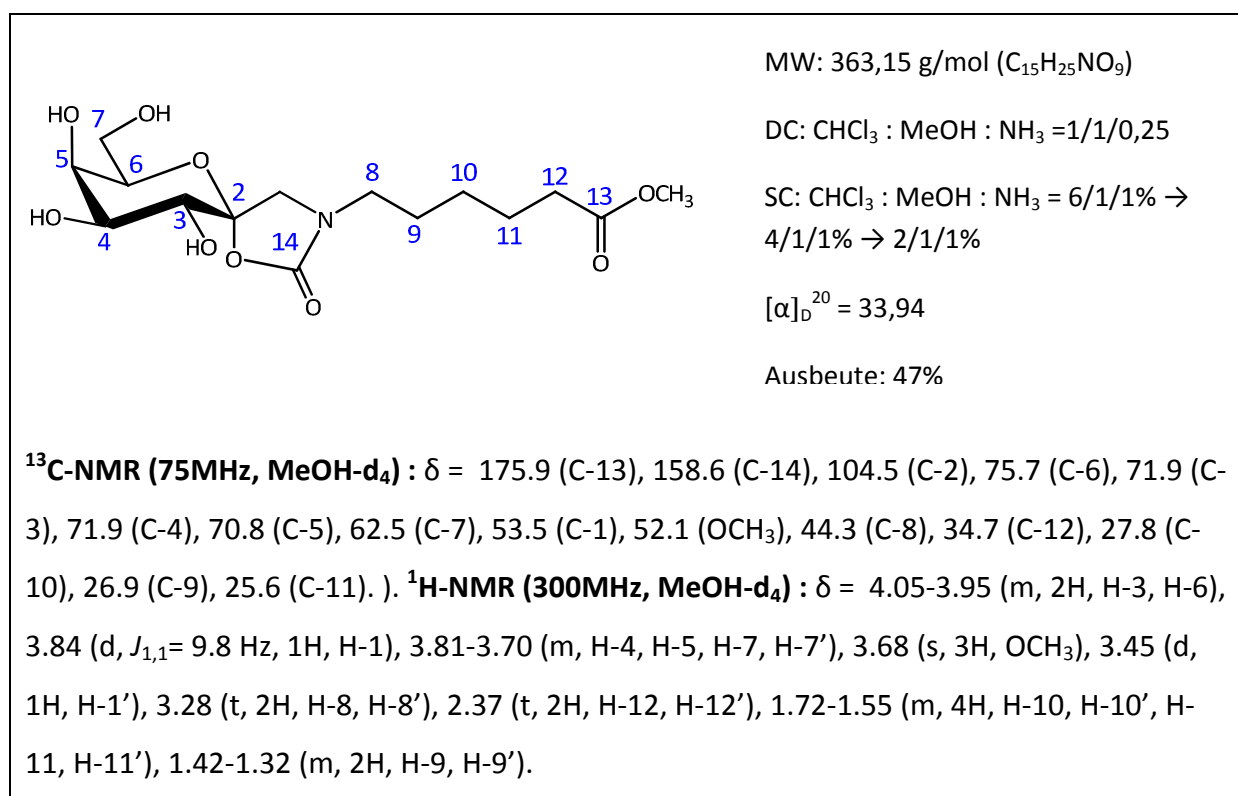
Verbindung **11** (0,51 g, 2,43 mmol, 1 eq) wird in EtOH (7 mL) und einigen Tropfen 1,6-Dioxan gelöst und Boc-Lys-Z-*O*-methyl (0,94 g, 3,64 mmol, 1,5 eq) und Essigsäure (0,2 mL, 3,64 mmol, 1,5eq) zugegeben und einen Tag bei 50°C gerührt. Nach der DC Kontrolle wird das Lösungsmittel abgezogen und die 1,7 g Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. Es werden 300 mg (0,66 mmol) Produkt erhalten.



1-(*N*-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-*N*,2-*O*-carbonyl-1-desoxy- α -D-galacto-hept-2-ulopyranose bzw. 1-(*N*-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-*N*,2-*O*-carbonyl-1-desoxy- α -D-galacto-hept-2-ulofuranose (14)

Weg C:

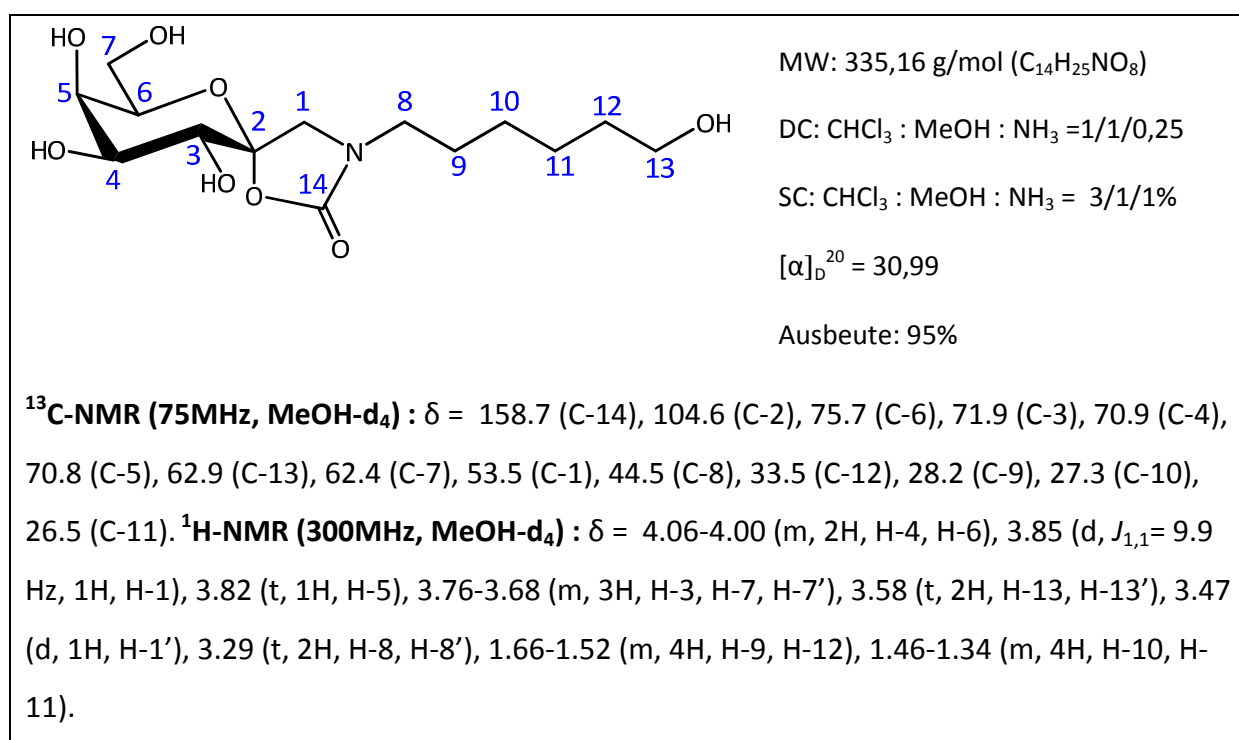
Verbindung **11** (0,2 g, 0,59 mmol, 1 eq) wird in H₂O (7 mL) gelöst und man gibt etwas 1,6-Dioxan zu um eine bessere Löslichkeit zu erhalten. Mit Eis wird auf 0°C gekühlt, Triphosgen (0,32 g, 1,06 mmol, 1,8 eq) und Na₂CO₃ (0,68 g, 6,4 mmol, 6 eq bezogen auf Triphosgen) zugegeben und danach lässt man die Reaktion auf Raumtemperatur kommen und rührt über Nacht. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wird das Lösungsmittel abgezogen und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. Man erhält 100 mg (0,28 mmol) reines Produkt.



1-(*N*-6-Hydroxyhexyl)amino-1-*N*,2-*O*-carbonyl-1-desoxy- α -D-galacto-hept-2-ulopyranose bzw. 1-(*N*-6-Hydroxyhexyl)amino-1-*N*,2-*O*-carbonyl-1-desoxy- α -D-galacto-hept-2-ulofuranose (15)

Weg C:

Verbindung **12** (0,2 g, 0,65 mmol, 1 eq) wird in H₂O (5 mL) gelöst und zur besseren Löslichkeit noch 1,6-Dioxan zugegeben (Ultraschall). Mit Eis wird auf 0°C gekühlt und man gibt Triphosgen (0,35 g, 1,16 mmol, 1,8 eq) und Na₂CO₃ (0,74 g, 6,98 mmol, 6 eq bezogen auf Triphosgen) zu. Es wird achtzehn Stunden bei RT gerührt. Nach vollständiger Reaktion (DC-Kontrolle) wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. 1,7 g des Rohproduktes werden mittels Säulenchromatographie gereinigt und man erhält 350 mg (1,04 mmol) reines Produkt.



5.4.3 D-manno Serie

D-Glycero-D-galacto/D-talo-heptonolacton (17)

Weg A:

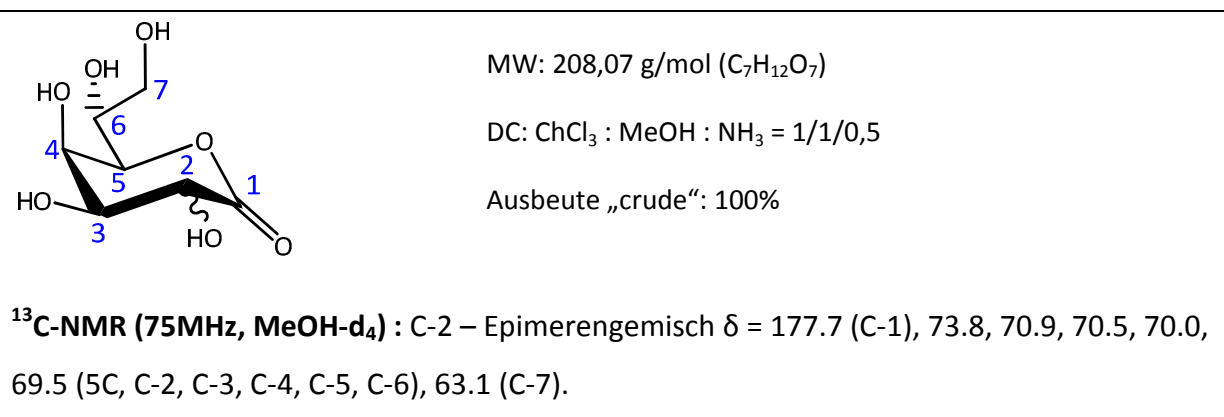
D-Mannose (**16**) (3 g, 16,7 mmol, 1 eq) wird in H₂O (20 mL) gelöst und unter Eiskühlung mit NaCN (1,5 g, 30,6 mmol, 1,84 eq) versetzt. Die Mischung wird etwa sechzehn Stunden bei RT gerührt und danach zwölf Stunden auf 100°C aufgeheizt, wobei sich die Reaktion gelb

verfärbt. Es wird auf RT abgekühlt und zur Einstellung eines sauren pH-Wertes von etwa 2, vier Spatel saurer Ionentauscher IR 120 H⁺ (gewaschen mit H₂O) zugegeben. Nach fünfzehn Minuten wird der Ionentauscher abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vollständig abgezogen.

Das rohe Reaktionsprodukt **17A** wird ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

Weg B:

D-Mannose (**16**) (3 g, 16,7 mmol, 1 eq) wird in H₂O (20 mL) gelöst und unter Eiskühlung mit NaCN (1,5 g, 30,6 mmol, 1,84 eq) versetzt. Die Reaktion wird ohne Rührung für vier Tage in den Kühlschrank (4°C) gestellt. Es fällt extrem viel weißer NS aus, der sich beim Erhitzen immer wieder auflöst. Nach fünf Stunden bei 100°C ist laut DC der Umsatz vollständig und die basische Lösung wird mittels saurem Ionentauscher IR 120 H⁺ (gewaschen mit H₂O) auf pH = 2 gebracht. Der Ionentauscher wird abfiltriert und die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt **17B** wird ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

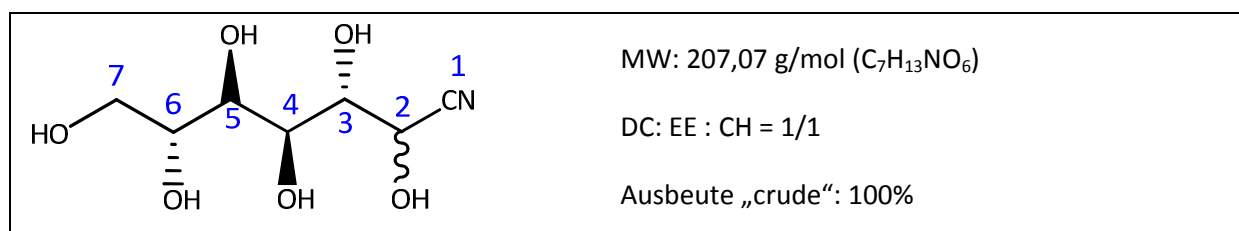


D-Glycero-D-galacto/D-talo-heptononitril (17C)

Weg C:

D-Mannose (**16**) (3 g, 16,7 mmol, 1 eq) wird in trockenem Pyridin (45 mL) gelöst und Triethylamin (0,18 mL, 1,33 mmol, 0,08 eq) zugesetzt. Danach wird frisch hergestellte HCN

(5,57 mL, 141 mmol, 8,5 eq) zugespritzt und die Reaktion gut verschlossen vier Tage bei RT gerührt. Die Lösung verändert dabei ihre Konsistenz von flüssig gelb, über weißen NS bis zu einer hellbraunen gummiartigen Masse. Eine peracetylierte Eduktprobe wird mittels DC mit der Reaktion verglichen und bei vollständigem Umsatz die HCN eine Stunde lang im Abzug bei RT mit der Wasserstrahlpumpe abgezogen. Danach wird das Pyridin auf der Ölpumpe bei RT entfernt. Nach zweimaliger Koevaporation mit EtOH, wird in Ether und Essigester umkristallisiert. Es fällt hellbrauner Niederschlag aus.



D-Glycero-D-galacto/D-talo-heptopyranose (18)

Weg A:

Verbindung **17A** (1 g, 4,8 mmol, 1 eq) wird in einer Mischung H₂O und EtOH (2/1, 10/5, 15 mL) gelöst. Die Reaktion wird mit Eis auf 0°C gekühlt und man fügt in sechs Portionen NaBH₄ (insgesamt 0,35 g, 9,25 mmol, 1,9 eq) zu und zugleich immer soviel sauren Ionentauscher IR 120 H⁺ (gewaschen mit H₂O), dass der pH-Wert etwa bei 3 bleibt. Nach DC-Überprüfung wird der Ionentauscher abfiltriert und die Lösung auf die Hälfte eingedunstet. Das im Überschuss vorhandene NaBH₄ wird mit MeOH (10 mL) gequenchet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Es wird noch einmal mit MeOH koevaporiert, wobei ein weißer Schaum entsteht und die flüchtigen Borsäuremethylester entfernt werden.

Das rohe Reaktionsprodukt **18A** wird es ohne weitere Reinigung für den nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

Weg B:

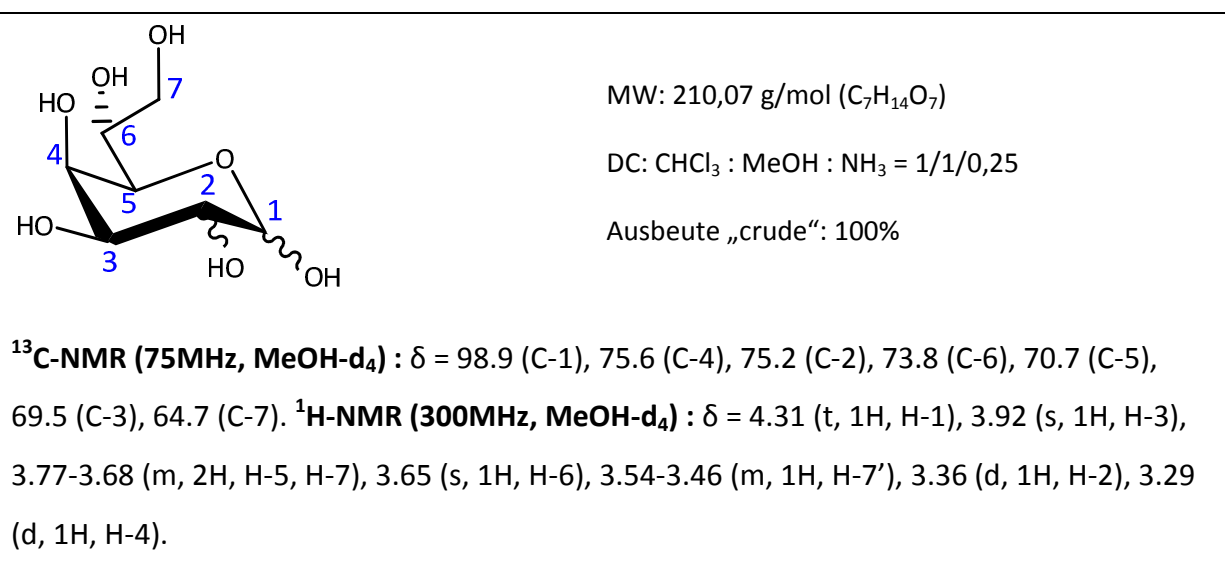
Verbindung **17B** (0,8 g, 3,8 mmol, 1 eq) wird in einer Mischung H₂O und EtOH (2/1, 10/5, 15mL) gelöst. Die Reaktion wird mit Eis auf 0°C gekühlt und man fügt in sechs Portionen

NaBH₄ (insgesamt 0,21g, 5,55mmol, 1,45eq) zu und zugleich immer soviel sauren Ionentauscher IR 120 H⁺ (gewaschen mit H₂O), dass der pH-Wert ungefähr bei 3 bleibt. Nach DC-Überprüfung wird der Ionentauscher abfiltriert und die Lösung auf die Hälfte eingengt. Das im Überschuss vorhandene NaBH₄ wird mit MeOH (10mL) gequencht und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Es wird noch einmal mit MeOH koevaporiert, wobei ein weißer Schaum entsteht.

Das rohe Reaktionsprodukt **18B** wird es ohne weitere Reinigung für den nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

Weg C:

Der relativ feuchte Feststoff aus **17C** (4 g, 19,3 mmol, 1 eq) wurde abfiltriert und wird zur Reduktion angesetzt. Dafür löst man den Niederschlag in H₂O (100 mL) und gibt Essigsäure (1,2 mL, 20,9 mmol, 1,1 eq) und Pd/BaSO₄ (4,5 g) zu. Die Mischung wird zwei Tage bei Raumtemperatur unter H₂-Atmosphäre gerührt und der Katalysator nach vollständiger Reaktion über Celite abfiltriert. Die Reaktionslösung wird mit einigen Spateln saurem Ionentauscher IR 120 H⁺ (gewaschen mit H₂O) versetzt und dreißig Minuten gerührt um einen sauren pH-Wert von 2 einzustellen. Der Ionentauscher wird abfiltriert, das Lösungsmittel abgezogen und man erhält 3,5 g Ausbeute, die ohne weitere Reinigungsschritte im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt werden.



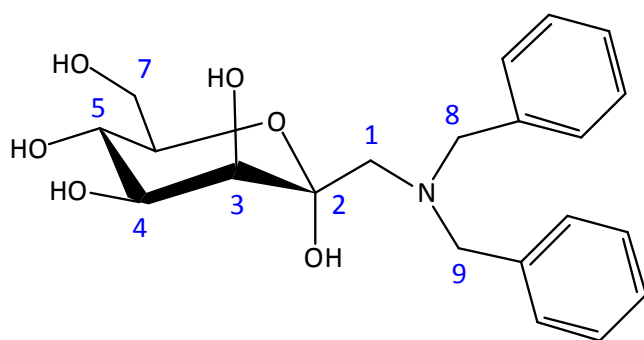
1-(*N,N*-Dibenzyl)amino-1-desoxy- α -D-manno-hept-2-ulopyranose (19)

Weg A:

Verbindung **18A** (0,26 g, 1,2 mmol, 1 eq) wird in EtOH (3 mL), mit einigen Tropfen H₂O dest. und 1,6-Dioxan zur besseren Löslichkeit, in Lösung gebracht. Es folgt die Zugabe von Dibenzylamin (0,24 mL, 1,2 mmol, 1 eq) und Essigsäure (0,07 mL, 1,2 mmol, 1 eq). Danach wird zwei Tage bei 40°C gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wird das Lösungsmittel abgezogen und die 700 mg Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt. Es werden 72 mg (0,18 mmol) Produkt erhalten.

Weg C:

Verbindung **18C** (0,4 g, 1,9 mmol, 1 eq) wird in EtOH (5 mL) gelöst und mit Dibenzylamin (0,36 mL, 1,9 mmol, 1 eq) versetzt, zur besseren Löslichkeit werden einige Tropfen H₂O dest. und 1,6-Dioxan zugesetzt. Es folgt die Zugabe von Essigsäure (0,11 mL, 1,9 mmol, 1 eq). Die Reaktion wird für drei Tage bei 40°C gerührt. Der Umsatz wird mittels DC überprüft und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Nach diesem Vorgang werden 1,7 g Rohprodukt erhalten, welche einer säulenchromatographischen Reinigung unterzogen werden. Es werden 540 mg (1,39 mmol) gelbes Öl erhalten.



MW: 361,15 g/mol (C₁₉H₂₃NO₆)

DC: EE : MeOH = 3/1

SC: EE : MeOH = 20/1 → 10/1

$[\alpha]_D^{20} = 19,7$

Ausbeute: 72%

¹³C-NMR (75MHz, MeOH-d₄) : δ = 139.8, 130.6, 130.2, 129.6 (12C, Ph), 97.5 (C-2), 75.8 (C-3), 74.7 (C-5), 73.3 (C-4), 68.7 (C-6), 63.2 (C-7), 60.2 (2C, CH₂Ph), 60.0 (C-1). **¹H-NMR (300MHz, MeOH-d₄)** : δ = 7.36-7.32 (m, 10H, Ph), 3.94 (d, 2H, CH₂Ph), 3.85-3.74 (m, 4H, H-4, H-5, H-7, H-7'), 3.73-3.60 (m, 3H, H-6, H-8, H-9), 3.47 (d, 1H, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, H-3), 2.93 (d, 1H, $J_{1,1} = 13.7$ Hz, H-1), 2.77 (d, 1H, H-1).

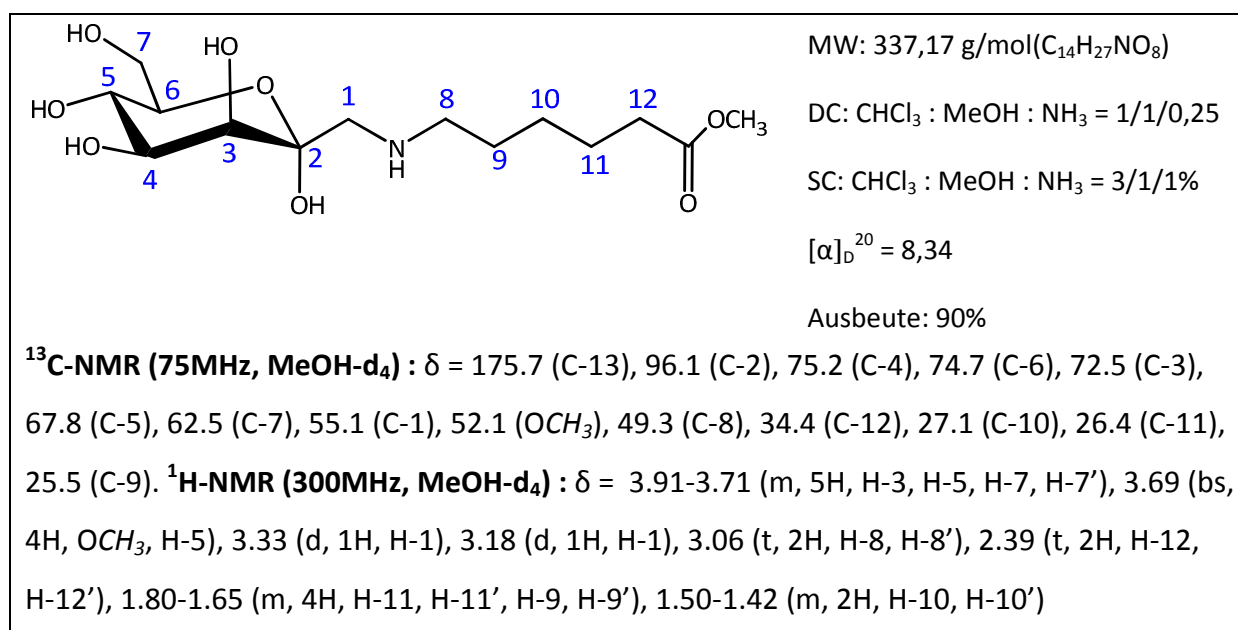
1-(*N*-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-desoxy- α -D-manno-hept-2-ulopyranose (20)

Weg B:

Verbindung **19B** (0,71 g, 3,38 mmol, 1 eq) wird in EtOH (8 mL) gelöst und mit einigen Tropfen H₂O dest. und 1,6-Dioxan versetzt um eine bessere Löslichkeit zu erhalten. Es wird nun 6-Aminohexansäuremethylesterhydrochlorid (0,61 g, 3,38 mmol, 1 eq) und Triethylamin (0,97 mL, 3,38 mmol, 1 eq) zugesetzt. Die Reaktion wird vier Tage bei 40°C gerührt und der Umsatz mittels DC überprüft. Das Lösungsmittel wird abgezogen und das erhaltene Rohprodukt mittels einer Säulenchromatographie gereinigt, aus der man 160 mg (0,47 mmol) Ausbeute eines braunen Öls erhält.

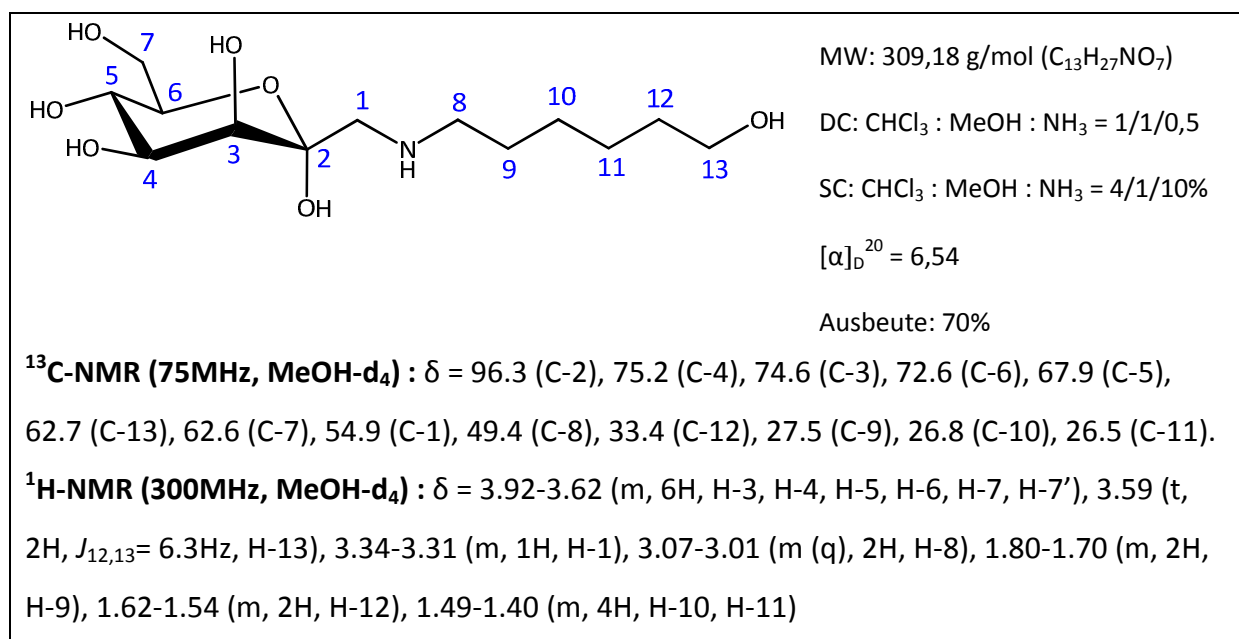
Weg C:

Verbindung **18C** (0,35 g, 1,67 mmol, 1 eq) wird in EtOH (5 mL) gelöst und mit einigen Tropfen H₂O dest. und 1,6-Dioxan versetzt, um eine bessere Löslichkeit zu erhalten. Es wird nun 6-Aminohexansäuremethylesterhydrochlorid (0,6 g, 3,37 mmol, 2 eq) und Triethylamin (0,48 mL, 3,37 mmol, 2 eq) zugesetzt. Die Reaktion wird vier Tage bei 40°C gerührt und der Umsatz mittels DC überprüft. Das Lösungsmittel wird abgezogen und das erhaltene Rohprodukt mittels einer Säulenchromatographie gereinigt, aus der man 600 mg (1,78 mmol) Ausbeute eines braunen Öls erhält.

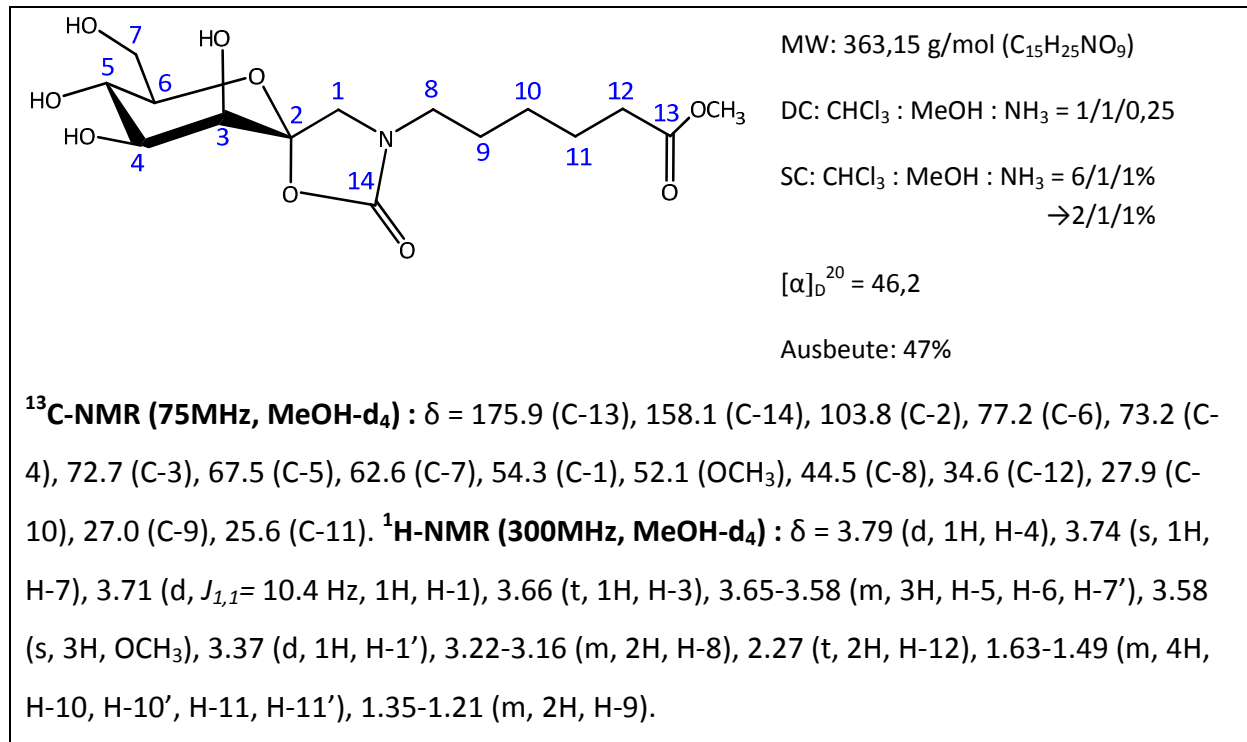


1-(N-6-Hydroxyhexyl)amino-1-desoxy- α -D-manno-hept-2-ulopyranose (21)**Weg C:**

Verbindung **18C** (0,36 g, 1,71 mmol, 1 eq) wird in EtOH (5 mL) und einigen Tropfen H₂O dest. und 1,6-Dioxan gelöst. Es werden 6-Aminohexanol (0,2g, 1,71mmol, 1eq) und Essigsäure (0,1mL, 1,71mmol, 1eq) zugegeben und drei Tage bei 50°C gerührt. Danach wird das Lösungsmittel zur Hälfte abgezogen und der vollständige Umsatz überprüft (DC-Kontrolle). Das Rohprodukt, 1,3 g, wird säulenchromatographisch gereinigt und als Endprodukt erhält man 360 mg (1,16 mmol).

**1-(N-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-N,2-O-carbonyl-1-desoxy- α -D-manno-hept-2-ulopyranose (22)****Weg C:**

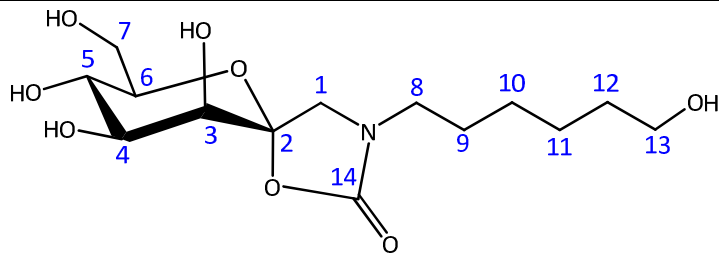
Verbindung **20C** (200 mg, 0,59 mmol, 1 eq) wird in H₂O (6 mL) gelöst und man gibt etwas 1,6-Dioxan zu, um eine bessere Löslichkeit zu erhalten. Es wird mit Eis auf 0°C gekühlt und Triphosgen (0,32 g, 1,07 mmol, 1,8 eq) und Na₂CO₃ (0,68 g, 6,4 mmol, 7,8 eq) zugegeben. Die Reaktion wird zwölf Stunden gerührt, danach das Lösungsmittel abgezogen und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. Man erhält 110 mg (0.31 mmol) Produkt.



**1-(N-6-Hydroxyhexyl)amino-1-N,2-O-carbonyl-1-desoxy-α-D-manno-hept-2-
ulopyranose (23)**

Weg C:

Verbindung **21C** (0,2 g, 0,65 mmol, 1 eq) wird in H₂O (5 mL) gelöst und einige Tropfen 1,6-Dioxan zugegeben um die Löslichkeit zu verbessern. Es wird mit Eis auf 0°C gekühlt und man fügt Triphosgen (0,35 g, 1,16 mmol, 1,8 eq) und Na₂CO₃ (0,74 g, 6,98 mmol, 6 eq) hinzu. Die Lösung wird achtzehn Stunden gerührt, der Umsatz überprüft (DC-Kontrolle) und das Lösungsmittel danach abgezogen. Das Rohprodukt wird einer säulenchromatographischen Reinigung unterzogen und man erhält 160 mg (0.48 mmol) Produkt.



MW: 335,16 g/mol (C₁₄H₂₅NO₈)

DC: CHCl₃ : MeOH : NH₃ = 1/1/0,25

SC: CHCl₃ : MeOH : NH₃ = 6/1/1%
→ 3/1/1%

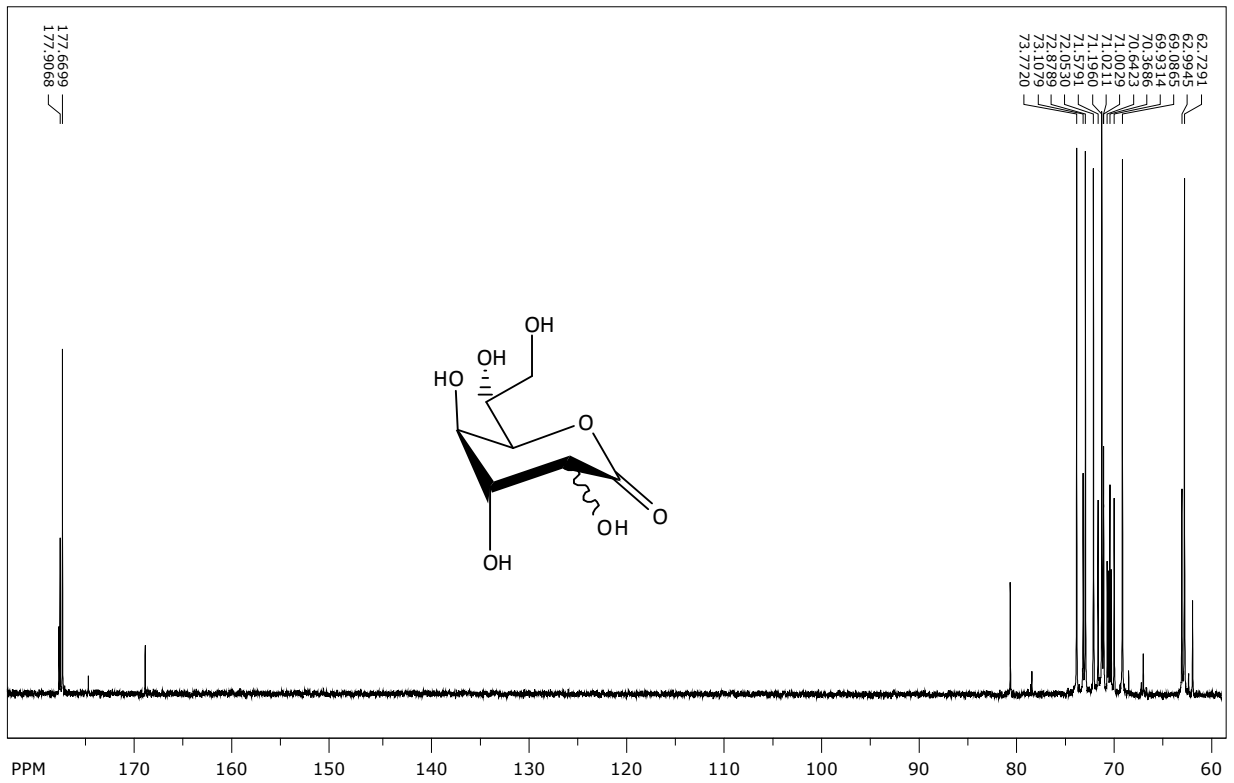
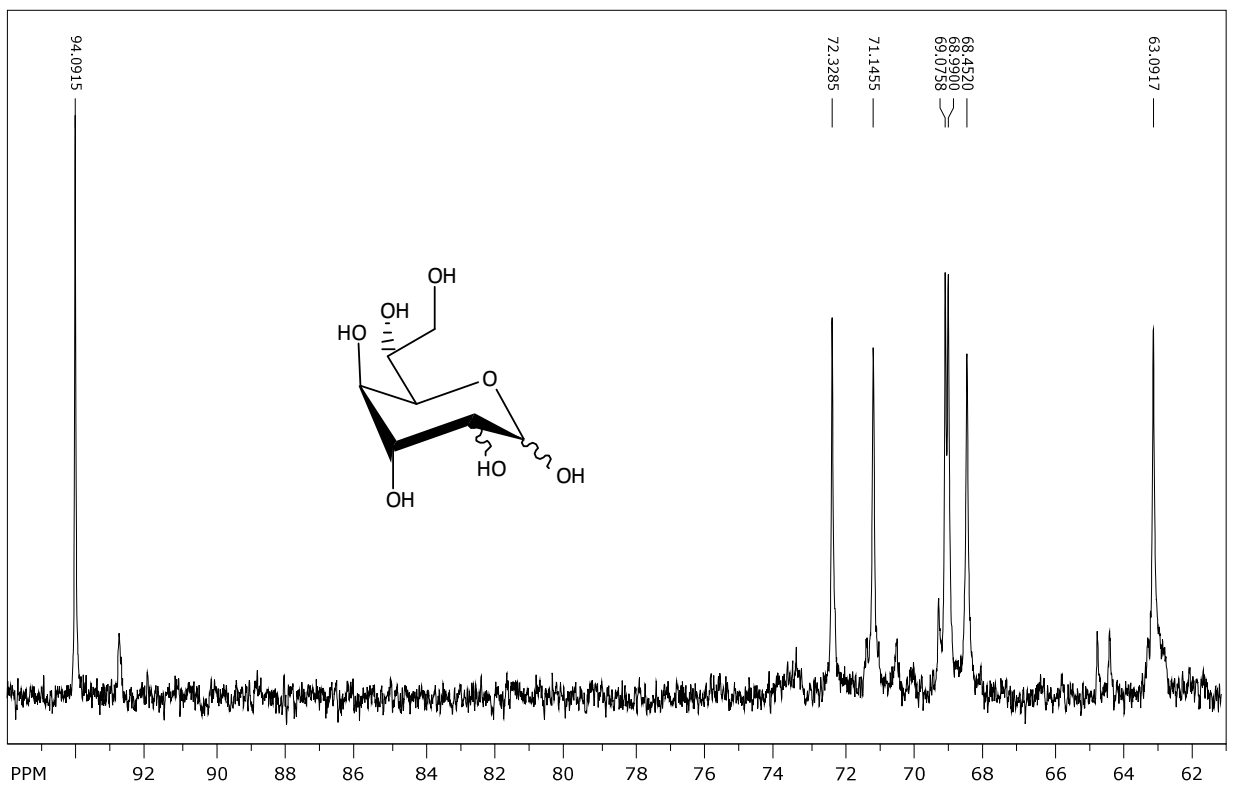
[α]_D²⁰ = 22,41

Ausbeute: 75%

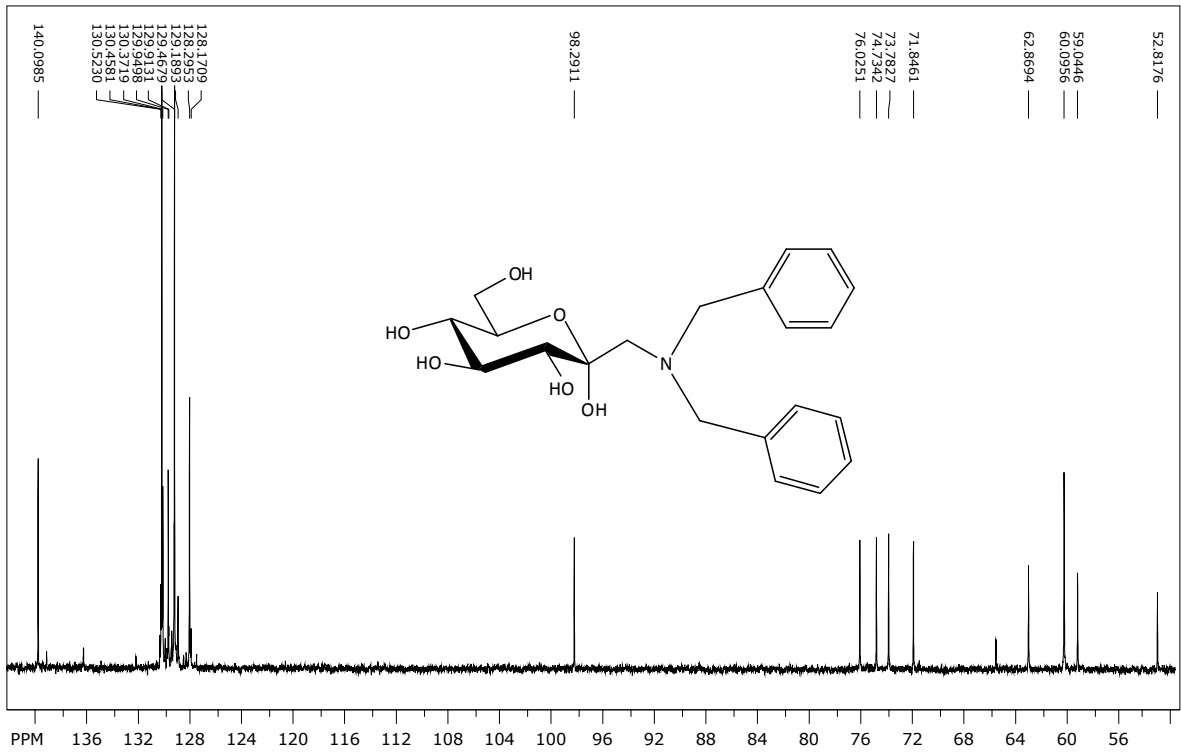
¹³C-NMR (75MHz, MeOH-d₄) : δ = 158.2 (C-14), 103.8 (C-2), 77.1 (C-6), 73.1 (C-4), 72.6 (C-3), 67.3 (C-5), 62.9 (C-13), 62.3 (C-7), 54.4 (C-1), 44.7 (C-8), 33.4 (C-12), 28.1 (C-10), 27.4 (C-9), 26.5 (C-11). ¹H-NMR (300MHz, MeOH-d₄) : δ = 3.91 (d, 1H, H-3), 3.83 (d, J_{1,1} = 10.4 Hz, 1H, H-1), 3.85-3.76 (m, 2H, H-1, H-4, H-7), 3.76-3.69 (m, 3H, H-4, H-5, H-7'), 3.58 (t, 2H, H-13), 3.48 (d, 1H, H-1'), 3.32-3.28 (m, 2H, H-8), 1.65-1.54 (m, 4H, H-9, H-9', H-12', H-12), 1.47-1.34 (m, 4H, H-10, H-10', H-11, H-11').

6 Anhang

¹³C-NMR –Spektren der Produkte

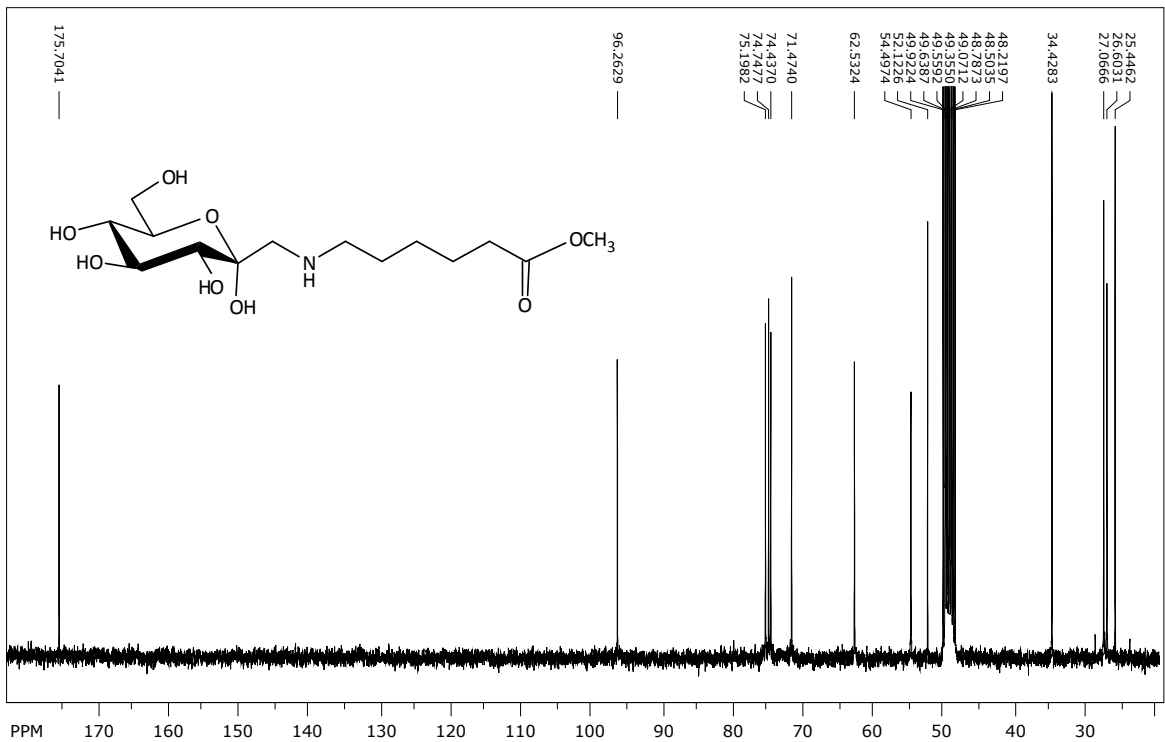
D-Glycero-D-gulo/D-ido-heptonolacton (2)**D-Glycero-D-ido/D-gulo-heptopyranose (3)**

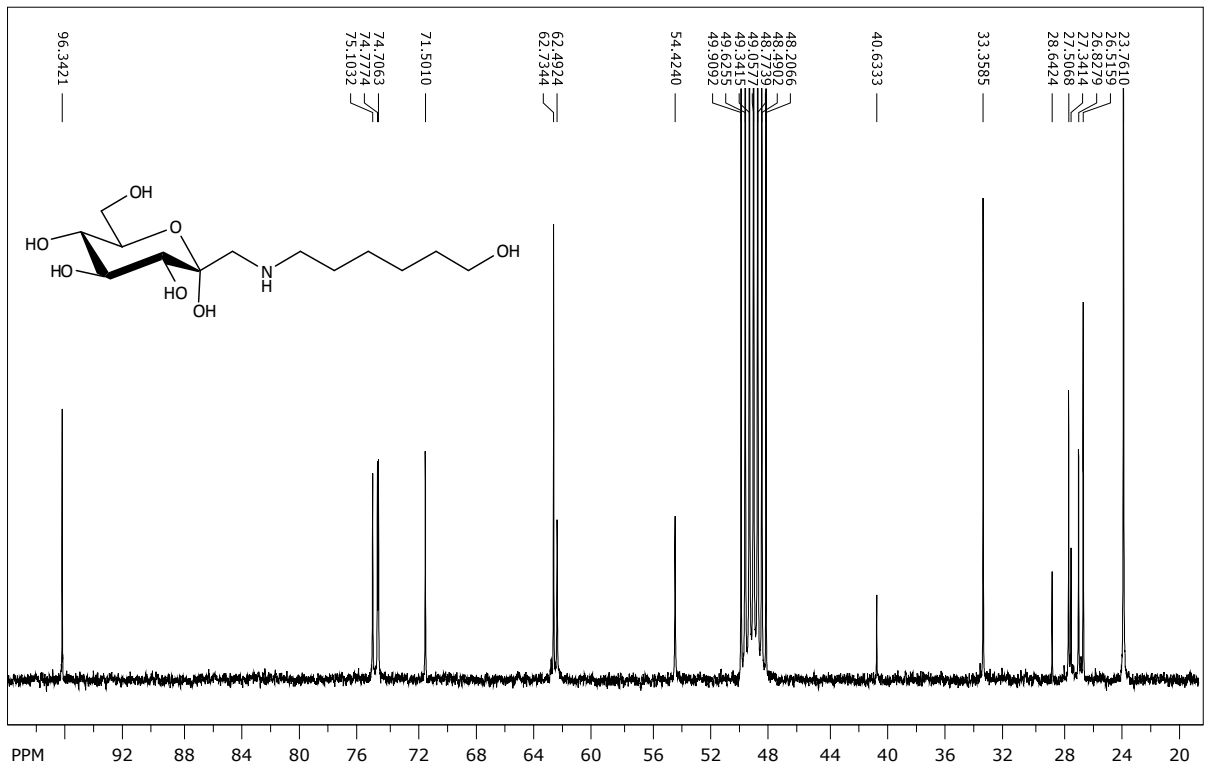
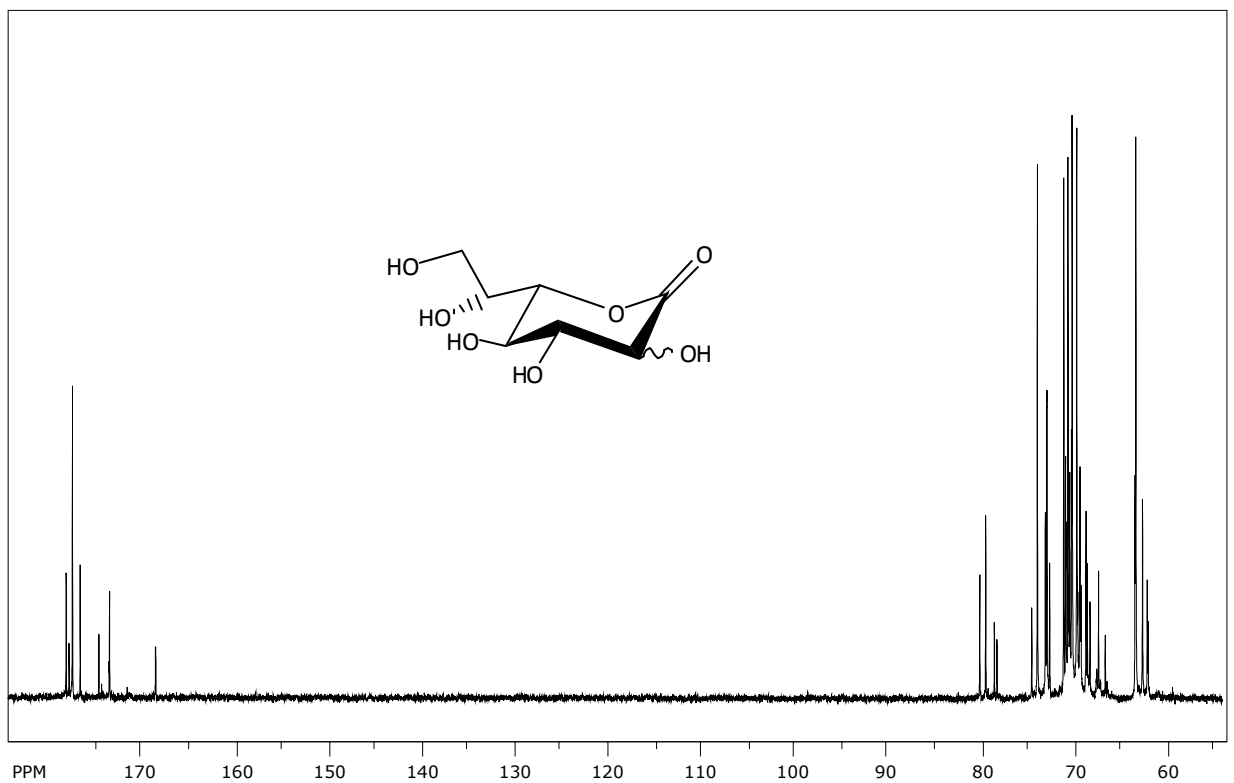
1-(*N,N*-Dibenzyl)amino-1-desoxy- α -D-gluco-hept-2-ulopyranose (4)



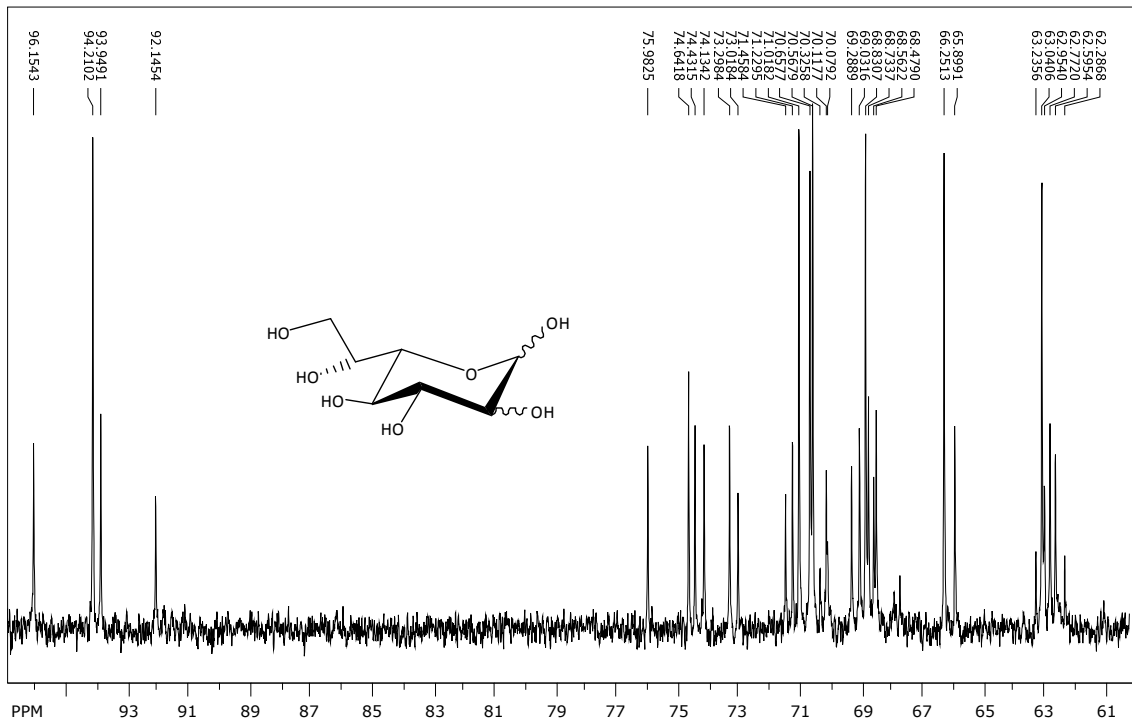
1-(*N*-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-desoxy- α -D-gluco-hept-2-ulopyranose

(5)

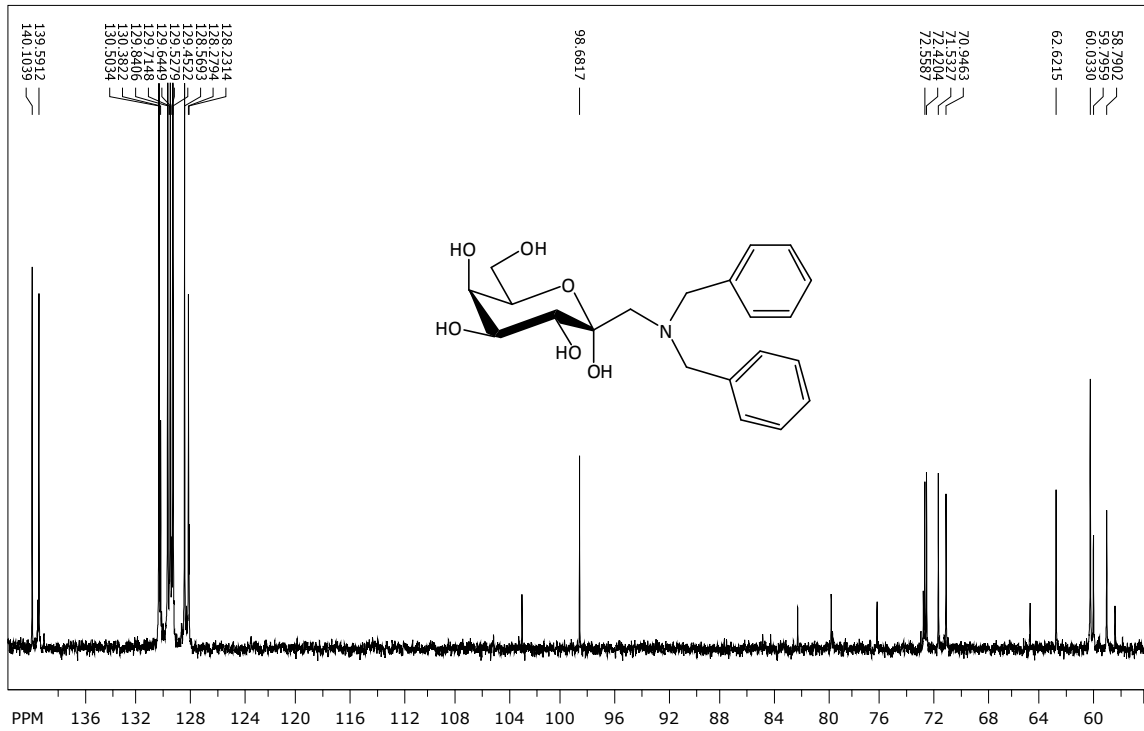


1-(N-6-Hydroxyhexyl)amino-1-desoxy- α -D-gluco-hept-2-ulopyranose (6)**D-Glycero-L-manno/L-gluco-heptonolacton (8)**

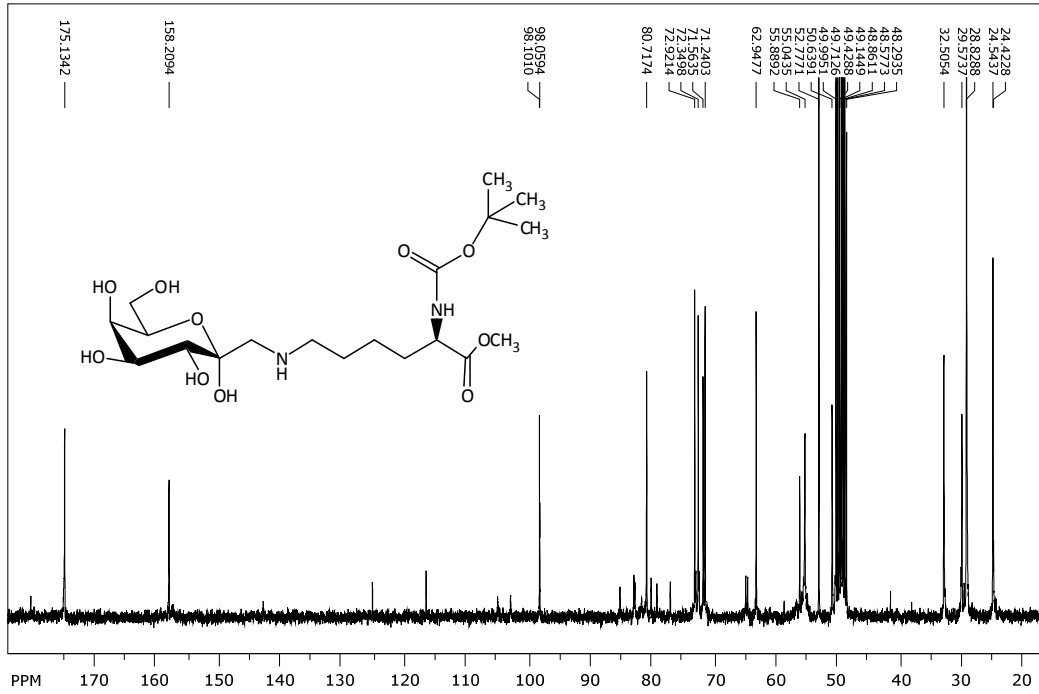
D-Glycero-L-manno/L-gluco-heptopyranose/septanose (9)



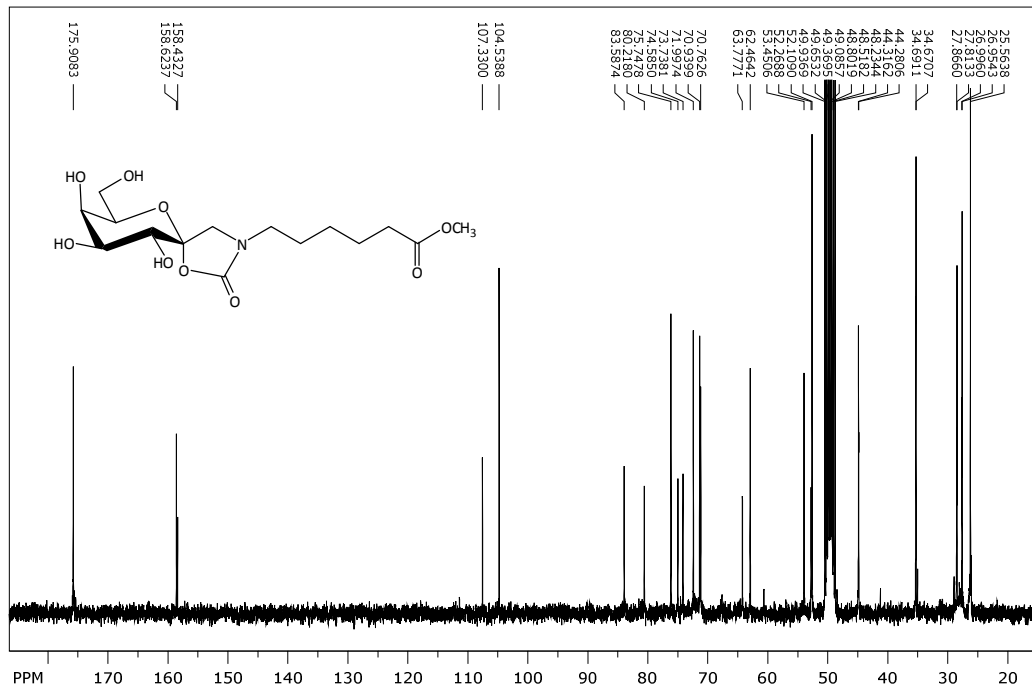
1-(N, N-Dibenzyl)amino-1-desoxy- α -D-galacto-hept-2-ulopyranose/furanose (10)



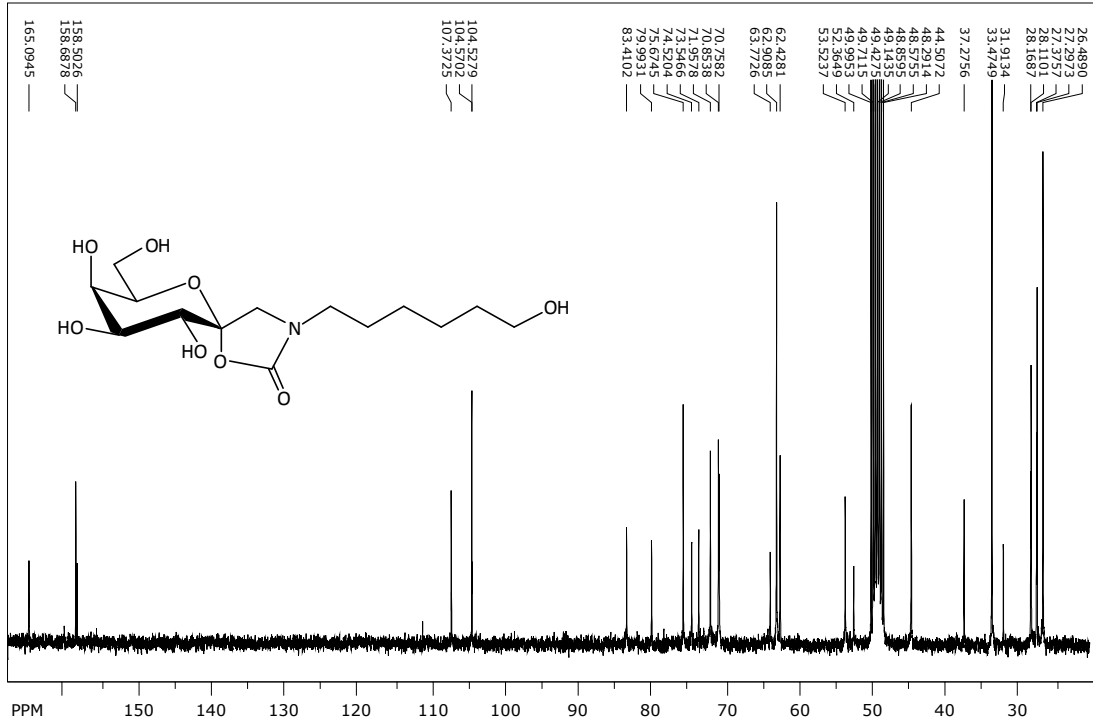
1-(*N*-Methoxycarbonylpentyl-14-tertbutylamino)amino-1-desoxy- α -D-galacto-hept-2-ulopyranose/furanose (13)



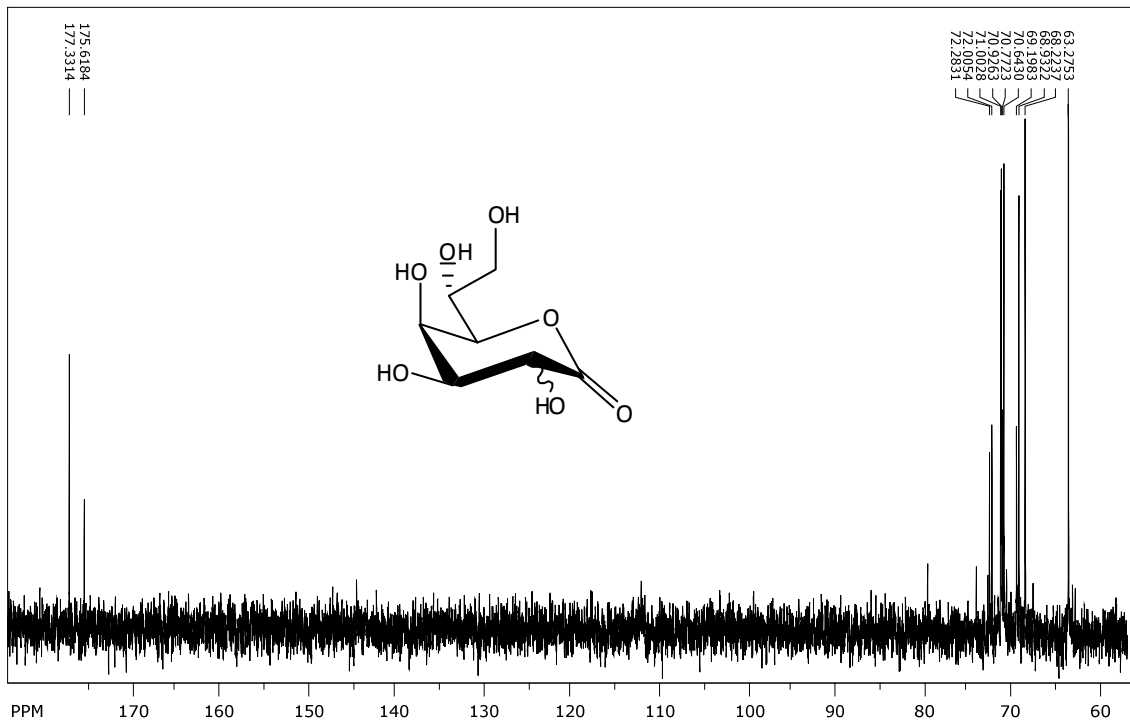
1-(*N*-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-*N*,2-*O*-carbonyl-1-desoxy- α -D-galacto-hept-2-ulopyranose/furanose (14)

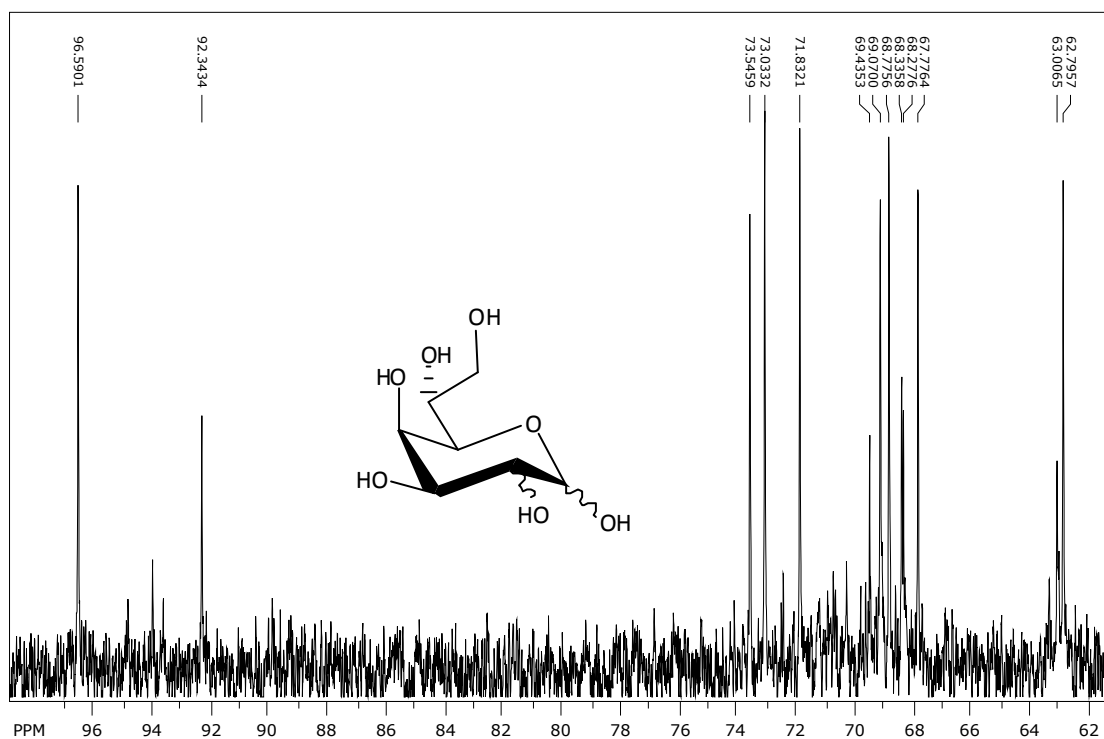
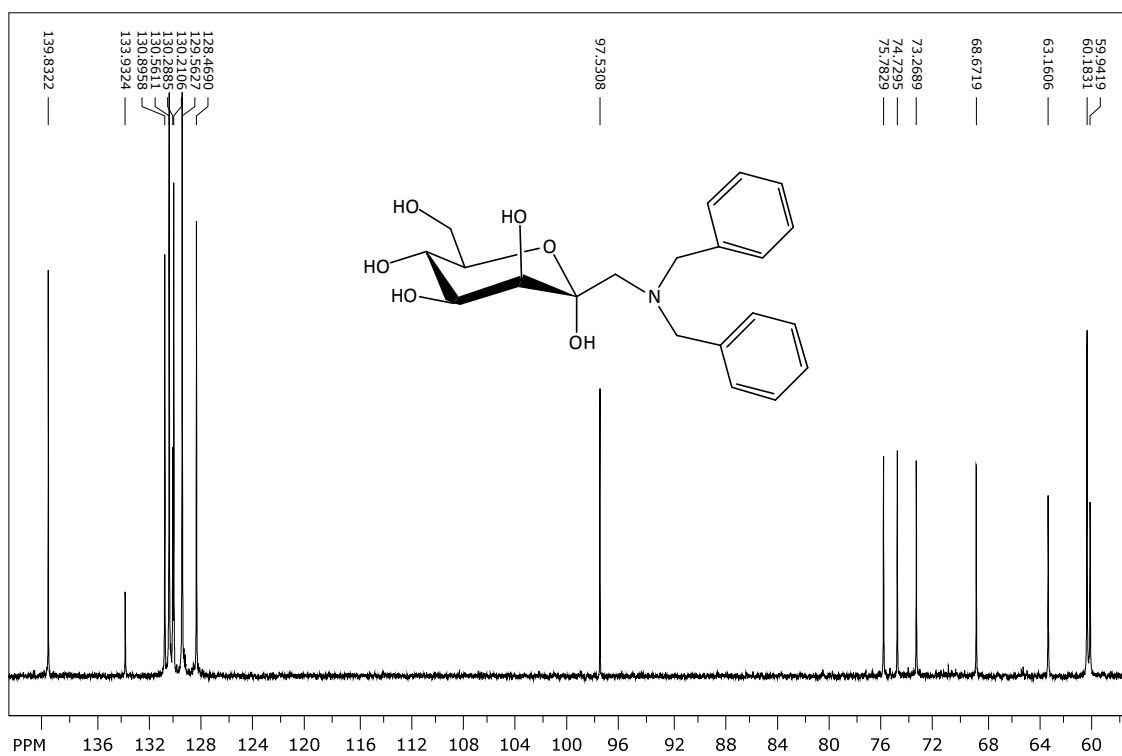


**1-(*N*-6-Hydroxyhexyl)amino-1-*N*,2-*O*-carbonyl-1-desoxy- α -D-galacto-hept-2-
ulopyranose/furanose (15)**

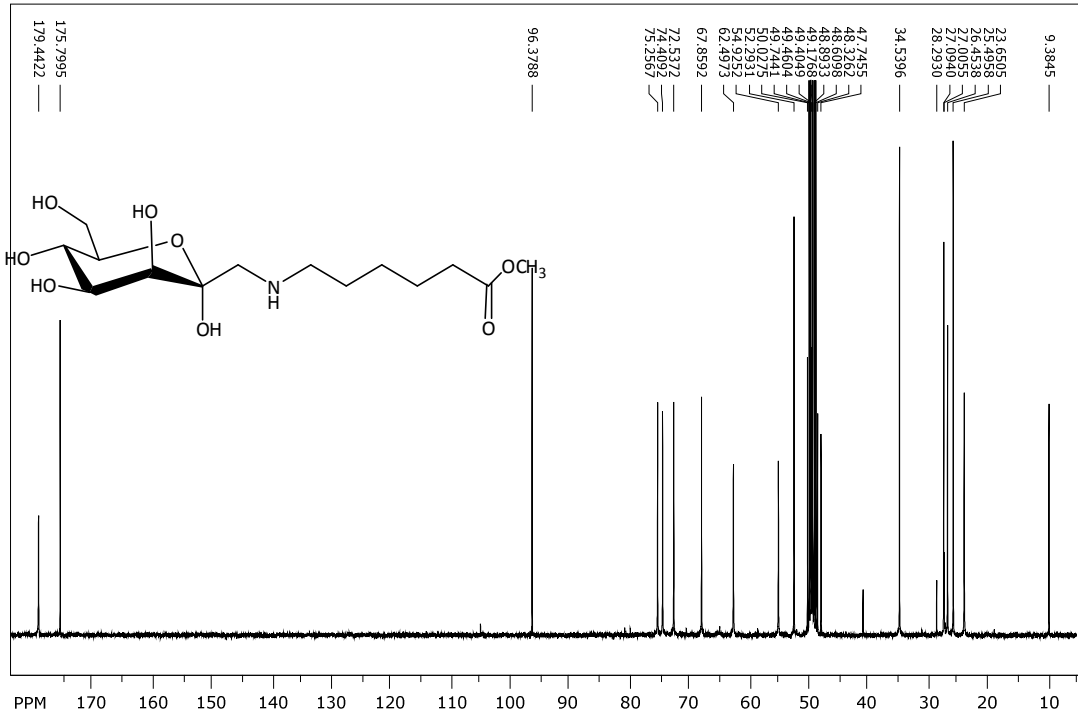


D-Glycero-D-galacto/D-talo-heptonolacton (17)

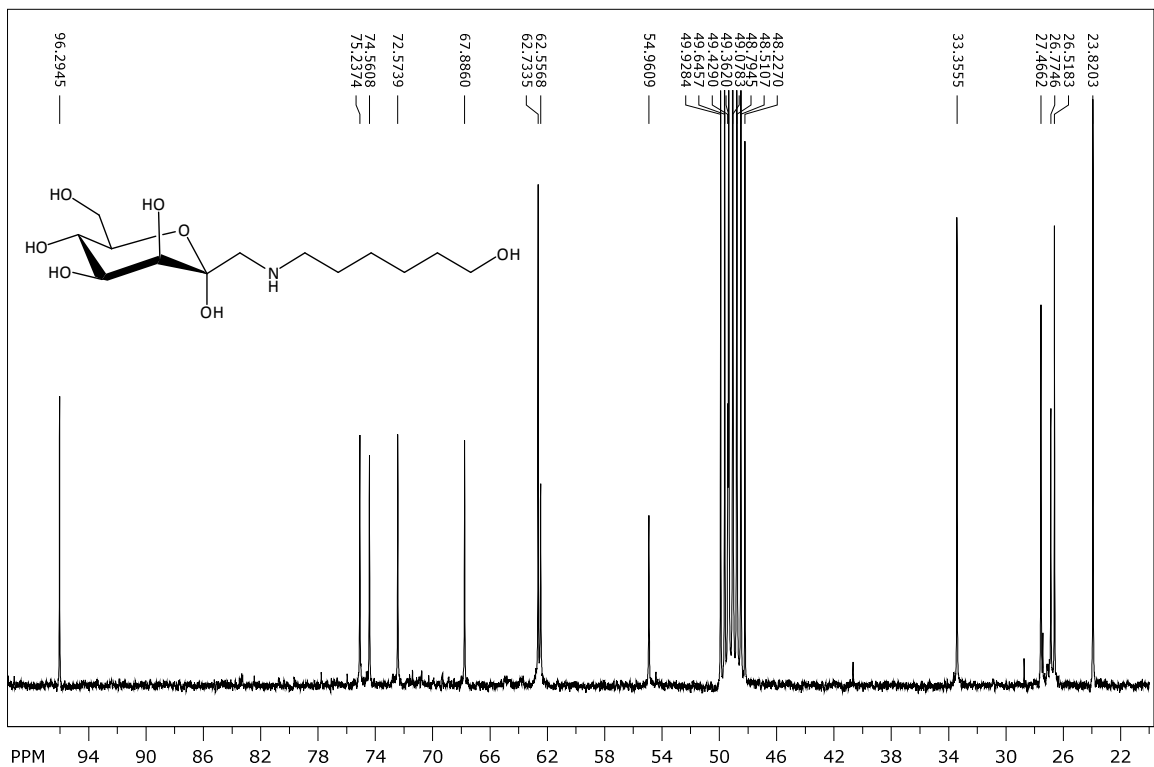


D-Glycero-D-galacto/D-talo-heptopyranose (19)**1-(*N,N*-Dibenzyl)amino-1-desoxy- α -D-manno-hept-2-ulopyranose (20)**

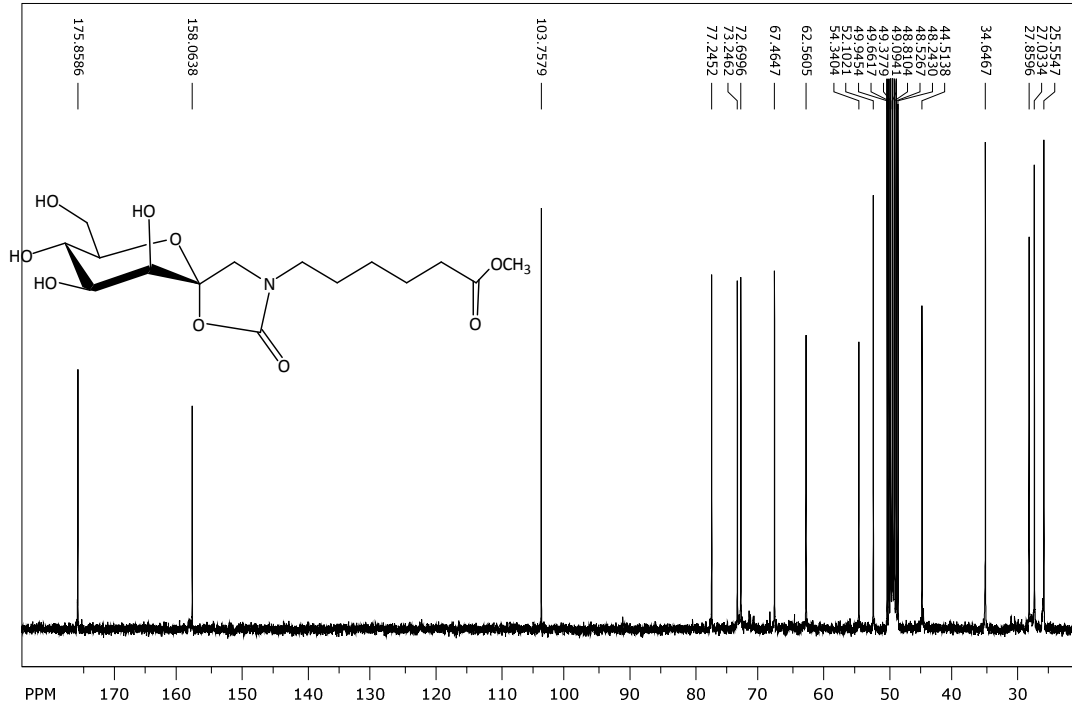
**1-(*N*-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-desoxy- α -D-manno-hept-2-ulopyranose
(21)**



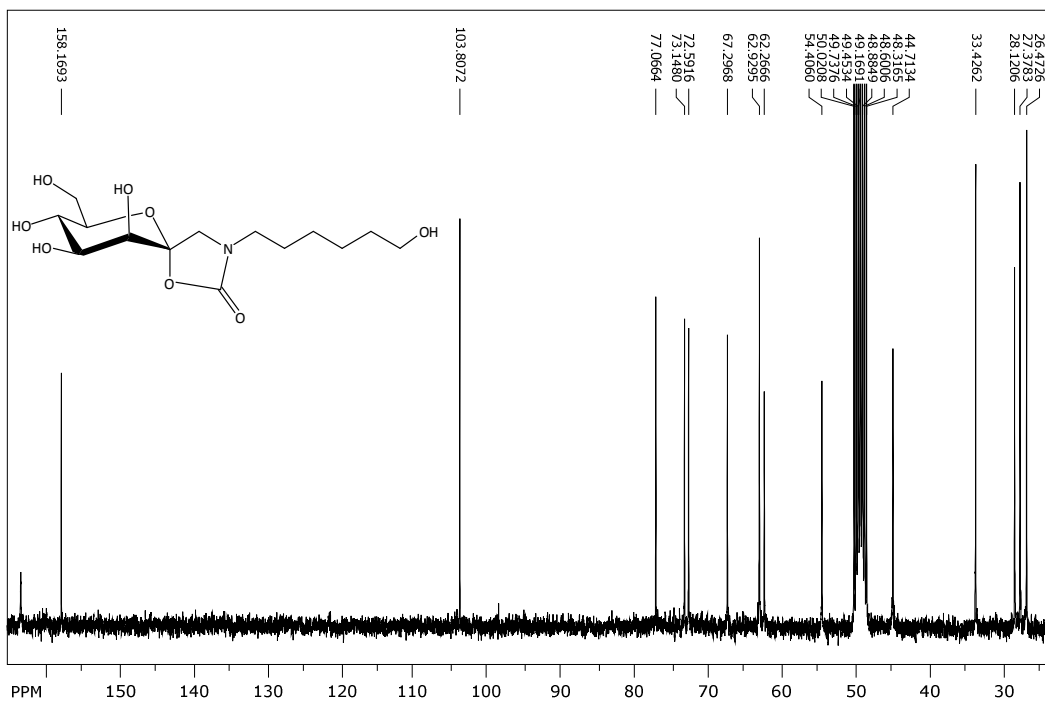
1-(*N*-6-Hydroxyhexyl)amino-1-desoxy- α -D-manno-hept-2-ulopyranose (22)



1-(*N*-Methoxycarbonylpentyl)amino-1-*N*,2-*O*-carbonyl-1-desoxy- α -D-manno-hept-2-ulopyranose (23)



1-(*N*-6-Hydroxyhexyl)amino-1-*N*,2-*O*-carbonyl-1-desoxy- α -D-manno-hept-2-ulopyranose (24)



7 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

.....

Name	Katharina Gallas
Geburtsdatum	28. November 1985
Geburtsort	Bruck an der Mur
Eltern	Peter Gallas, selbstständig Christine Gallas
Nationalität	österreichisch

Schulbildung

.....

1992 - 1996	Volksschule St.Lorenzen/Mzt
1996 - 2004	BG/BRG Kapfenberg, Sprachlicher Zweig mit Auszeichnung abgeschlossen

Studium

.....

Oktober 2004	Beginn des Studiums der Technischen Chemie an der TU-Graz
Juli 2008	1.Diplomprüfung bestanden
seit März 2009	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie bei Assoc. Prof. Dipl.-Ing. Dr. <i>techn.</i> Tanja M. Wrodnigg: Untersuchung der Kiliani-Fischer Reaktion für die Darstellung von Aldoheptosen

Sonstige Tätigkeiten

.....

Sommer 2007	Zwei Monate Praktikum am Institut für Organische Chemie bei Assoc. Prof. Dipl.- Ing. Dr. <i>techn.</i> Tanja M. Wrodnigg
Sommer 2008	Sechs Wochen Praktikum am Institut für Organische Chemie bei Assoc. Prof. Dipl.- Ing. Dr. <i>techn.</i> Tanja M. Wrodnigg

8 Publikationsliste

Poster

- „Synthesis of *D-manno* und *D-galacto* Glycoconjugates via the Amadori Rearrangement“
K. Gallas, G. Pototschnig, T.M. Wrodnigg
15th European Carbohydrate Symposium, Vienna, Austria, July 19-24, 2009
- „The Amadori Rearrangement: Synthesis of *D-manno* and *D-galacto* Glycoconjugates“
K. Gallas, G. Pototschnig, T.M. Wrodnigg
13. Österreichische Chemietage, Vienna, Austria, August 24-27, 2009
- „Synthesis of *N*-Acetylglucosamine containing Glycoconjugates via the Amadori Rearrangement
G. Pototschnig, K. Gallas, T.M. Wrodnigg
15th European Carbohydrate Symposium, Vienna, Austria, July 19-24, 2009
- „The Amadori Rearrangement as powerful method for the Synthesis of *N*-Acetylglucosamine containing Glycoconjugates“
G. Pototschnig, K. Gallas, T.M. Wrodnigg
13. Österreichische Chemietage, Vienna, Austria, August 24-27, 2009