

# **Orthogonal geschützte Zuckerdiaminosäuren als monomere Bausteine für die Synthese von Aminoglycosidmimetika**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) an der Universität Konstanz

Naturwissenschaftliche Sektion der Universität Konstanz  
Fachbereich Chemie

vorgelegt von

**Marco Worch**

Konstanz 2011

Datum der mündlichen Prüfung: 15.04.2011

1. Referent: Prof. Dr. Valentin Wittmann
2. Referent: Prof. Dr. Jörg Hartig

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2003 bis Mai 2008 im Fachbereich Chemie der Universität Konstanz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Valentin Wittmann angefertigt.

### *Danksagung*

Prof. Dr. Valentin Wittmann danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, sowie für seine großzügige Unterstützung, freundliche Betreuung und sein immer offenes Ohr bei Fragestellungen aller Art.

Herrn Prof. Jörg S. Hartig möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Wittmann bedanken, mit denen ich Höhen und Tiefen des Forscher- und Arbeitslebens erleben durfte. In diesem Rahmen ein besonderer Dank an Christian Risinger, mit dem ich drei Jahre das Labor teilen durfte und dessen Musikarsenal und Tanzeinlagen mir manche durchgearbeitete Nacht und manchen Arbeitstag versüßt haben.

Bei Anne Neef und Mirko Zierke möchte ich mich für die Mitarbeit während ihrer Bachelorarbeiten bedanken, durch deren Betreuung ich einen Blick auf „die andere Seite“ werfen durfte.

Ein weiterer Dank geht an Anne Neef, Christian Risinger, Dominik Gauss und Magnus Schmidt für die aufmerksame und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Bei Olga Tšubrik und Ivan Zemskov möchte ich mich für die Nachsynthese von einigen Zuckerdiaminosäurebausteinen bedanken, die ich bei der Synthese von Oligomeren verwenden konnte.

Bei Anke Friemel möchte ich mich für die Unterstützung bei den NMR-spektroskopischen Aufnahmen an einem der 600 MHz Spektrometer der Universität Konstanz bedanken.

Dr. Werner Sulger danke ich für die Einweisung in das Technikum der Universität Konstanz und die Möglichkeit, Erfahrungen im Umgang mit der Chemie der großen Kolben zu machen.

Reinhold Weber danke ich für die Aufnahme zahlreicher hochaufgelöster FT-ICR-Spektren, die in schwierigen Fällen eine Elementaranalyse ersetzen.

Ein besonderer Dank richtet sich an Kristina Powa und Jörg Hauser. Durch ihre selbstlose Unterstützung und Hilfsbereitschaft waren sie mir lange Zeit und gerade in den Anfängen meiner Arbeit eine große Hilfe und haben nicht zuletzt hierdurch einen sehr großen Anteil daran, dass diese Arbeit letztlich zu einem guten Ende gelangt ist.

Ein ganz besonders herzlicher Dank an Anne für die Unterstützung und Zuwendung, den notwendigen Ansporn und all die netten Kleinig- und Großigkeiten in den vergangenen vier Jahren. In der Hoffnung, dass noch manches Jahr hinzukommen möge.

Mein herzlicher Dank gilt zum Abschluss meiner Familie, meinen Eltern und deren Lebenspartnern und insbesondere meiner Mutter, sowie meinen Grosseltern die mir durch ihre fortwährende Unterstützung in allen Bereichen immer ein großer Rückhalt und eine nicht zu ersetzende Stütze waren und damit maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

*Gewidmet allen die mich begleitet, mir Freude geschenkt und mich zum Lachen gebracht  
haben.*

*Man kann das Leben nur vorwärts Leben, aber nur rückwärts verstehen.*

Søren Kierkegaard

*Mein Herz tanzt und jedes Molekül bewegt sich.*

MIA

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>KONZEPTION UND ZIELSETZUNG</b> .....	- 1 -
<b>2</b>	<b>RNA</b> .....	- 3 -
2.1	Sekundärstrukturelemente in RNA .....	- 4 -
2.2	Tertiäre RNA-RNA Wechselwirkungen .....	- 7 -
2.3	Faltung von RNA zu Strukturen höherer Ordnung .....	- 9 -
2.4	Funktionen von RNA .....	- 10 -
<b>3</b>	<b>RNA-LIGANDEN</b> .....	- 23 -
3.1	Aminoglycoside .....	- 25 -
<b>4</b>	<b>RESISTING RESISTANCE - AMINOGLYCOSIDMIMETIKA</b> .....	- 34 -
4.1	Zuckerdiaminosäuren als Bausteine für die Entwicklung neuer Aminoglycosidmimetika-	36
	-	
<b>5</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG</b> .....	- 41 -
<b>6</b>	<b>SYNTHESE VON ZUCKERDIAMINOSÄUREBAUSTEINEN DER D-ALLOSE</b> .....	- 44 -
6.1	Synthesestrategien zur Darstellung von Allofuranosederivaten .....	- 44 -
6.2	Synthese von Zuckerdiaminosäuren der D-Allofuranose .....	- 46 -
6.3	Bildung von Zuckertetrazolen bei Versuchen zur Synthese von Zuckerdiaminosäuren mit D-Allopyranosekonfiguration .....	- 71 -
<b>7</b>	<b>SYNTHESE VON ZUCKERDIAMINOSÄUREBAUSTEINEN DER D-MANNOSE</b> .....	- 81 -
7.1	Retrosynthetische Betrachtung .....	- 81 -
7.2	Versuche zur Synthese von Zuckerdiaminosäurebausteinen mit D-Mannokonfiguration.	- 82
	-	
<b>8</b>	<b>SYNTHESE VON ZUCKERDIAMINOSÄUREOLIGOMEREN</b> .....	- 89 -
8.1	Synthese von Zuckerdiaminosäureoligomeren an fester Phase .....	- 90 -
8.2	Synthese von Zuckerdiaminosäureoligomeren in Lösung .....	- 105 -
<b>9</b>	<b>STRUKTURAUFKLÄRUNG DER OLIGOMERE DURCH NMR-SPEKTROSKOPIE</b> .....	- 117 -
<b>10</b>	<b>RNA-BINDUNGSSTUDIEN</b> .....	- 124 -
10.1	Ergebnisse der RNA-Bindungsstudien .....	- 126 -
10.2	Vergleich der Ergebnisse der RNA-Bindungsstudien .....	- 130 -
<b>11</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....	- 135 -
11.1	Synthese von Zuckerdiaminosäurebausteinen der D-Allose .....	- 136 -
11.2	Synthese von Zuckertetrazolen und Untersuchungen zum Mechanismus ihrer Bildung.	- 137 -
11.3	Synthese von Zuckerdiaminosäurebausteinen der D-Mannose .....	- 139 -
11.4	Zuckerdiaminosäureoligomere .....	- 141 -
<b>12</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....	- 145 -
12.1	Allgemeines .....	- 145 -
12.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften .....	- 147 -
12.3	Beschreibung der Versuche .....	- 151 -
<b>13</b>	<b>AUSGEWÄHLTE NMR- UND MASSENSPEKTREN</b> .....	- 219 -
<b>14</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	- 248 -



## Abkürzungen

18-K-6	18-Krone-6
A	Adenosin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	Absolut
Ac	Acetyl
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
Ala	Alanin
Ber.	Berechnet
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert.</i> -Butylmethoxycarbonyl
Boc <sub>2</sub> O	Di- <i>tert.</i> -butyl-dicarbonat
Bz	Benzoyl
C	Cytosin
c-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	konzentrierte Schwefelsäure
CHCA	Cyanohydroxymimtsäure
COSY	Korrelationspektroskopie
d	Tag(e)
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCU	Dicyclohexylharnstoff
DHB	2,5-Dihydroxybenzoësäure
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DIU	Diisopropylharnstoff
DMF	Dimethylformamid
DMM	Dimethoxymaleoyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E. coli	Escherichia coli
eds	Editosom
EE	Essigsäureethylester
eq.	Äquivalente
ESI	Elektrospray Ionisation
Et	Ethyl
FA	Ferulasäure
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FmocOSu	Fmoc- <i>O</i> -succinimid

## Abkürzungen

---

G	Guanosin
Gef.	Gefunden
gRNA	guide RNA
h	Stunde(n)
HATU	2-(1H-9-Azobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-
HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus immunodeficiency virus)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HOAt	Hydroxyazabenzotriazol
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektroskopie
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC	Inhibitionskonstante
IR	Infrarot
M	molar
MALDI-MS	Matrixunterstützte Laserdesorptions-Ionisierungs- massenspektroskopie
Me	Methyl
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
MMT	4'-Monomethoxytrityl
MOM	Methoxymethyl
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
NMP	N-Methylpyrolidin
NMR-Spektroskopie	Kernresonanzspektroskopie
NOESY	Nuclear Overhauser Effekt Spektroskopie
PE	Petrolether
PFPA	Pentafluorpropionsäure
PG	Schutzgruppe
Ph	Phenyl
Phth	Phthaloyl / Phthalimido
ppm	parts per million
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Umkehrphase
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
rRNA	ribosomale RNA
RRE	Rev-response Element
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg (Einheit des Sedimentationskoeffizienten)

## Abkürzungen

---

SAA	Zuckeraminosäure
SDA	Zuckerdiaminosäure
SG	Schutzgruppe
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAR	Trans-Aktivierungsregion
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TCP	Tetrachlorophthaloyl
tert.	tertiär
Tf	Trifluormethansulfonyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Trimethylsilyl
TMSCN	Trimethylsilylcyanid
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TOF	Time of flight
tRNA	transfer RNA
Ts	Toluolsulfonyl
U	Uridin
UV	Ultraviolett
snRNA	small nuclear RNA

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Durch wegweisende Entdeckungen in der Biologie und in der Biochemie zu Beginn der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde deutlich, dass RNA aktiv in Prozesse *in vivo* einzugreifen vermag und nicht wie bis dahin vermutet eine rein passive Rolle als Überträger von Informationen wahrnimmt. Mit der Entdeckung der Ribozyme durch T. R. Cech und S. Altman war ein erster Beweis gefunden worden, dass in Zellen RNA-Moleküle existieren, die über katalytische Aktivität verfügen<sup>1-4</sup> - eine Fähigkeit, die man bis dahin lediglich den Proteinen zugeschrieben hatte.

Durch diese herausragende Entdeckung, die 1989 mit dem Nobelpreis belohnt wurde und gleichzeitig die These einer RNA-Welt in den frühen Phasen des Lebens auf der Erde stützte, gerieten RNA-Moleküle in den Blickpunkt der medizinischen Forschung. Sie wurden als so genanntes „*drug-target*“ erkannt und boten einen neuen Ansatz für die gezielte Entwicklung pharmazeutischer Wirkstoffe.<sup>5-9</sup>

Gute Leitmotive für die Synthese RNA-bindender Moleküle sind Naturstoffe, deren RNA-Bindungseigenschaften schon seit längerem bekannt und daher oftmals gut untersucht sind. Eine Klasse von Naturstoffen, deren Fähigkeit mit RNA-Molekülen zu interagieren, schon vor über 60 Jahren entdeckt wurde, sind die Aminoglycoside. Aminoglycoside sind in der Lage RNA-gesteuerte Prozesse in der Zelle zu inhibieren oder zu modifizieren, indem sie an passende RNA-Motive binden und so eine strukturelle Veränderung oder Blockierung essentieller katalytischer Zentren verursachen. So wechselwirken sie beispielsweise mit dem Hammerhead- und dem Hairpinribozym, greifen durch Bindung an das Ribosom in die Proteinbiosynthese ein und vermögen es auch an virale RNA zu binden und so Einfluss auf die Replikation von Viren zu nehmen.<sup>10</sup>

Mit Neomycin B ist in Abbildung 1.1 ein Aminoglycosid gezeigt, welches auch heute noch in der Behandlung zahlreicher bakterieller Infektionen Anwendung findet.

Aminoglycoside enthalten ein zentrales Aminocyclitol, welches *O*-glycosidisch mit einem oder mehreren Mono- und Diaminozuckern verknüpft ist.

Mehrere Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass

den Aminogruppen der Aminoglycoside eine Schlüsselrolle bei der Bindung an

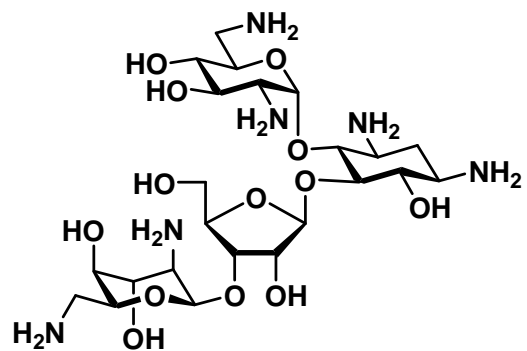


Abb. 1.1: Neomycin B.

unterschiedliche RNA-Moleküle im Körper und damit auch eine Schlüsselrolle bei der Entfaltung ihrer biologischen Wirkung zukommt. Dieser Befund lässt schließen, dass durch Synthese beliebig verknüpfter Diaminozucker, die als Substrukturen in den Aminoglycosiden enthalten sind, neue RNA-Liganden gefunden werden können, die verbesserte RNA-Bindungseigenschaften zeigen oder gegebenenfalls zur Entdeckung neuer RNA-Bindungsmotive und somit zu neuen, interessanten Wirkstoffen führen.

Im Fall der Aminoglycoside sind die Kohlenhydratbausteine *O*-glycosidisch miteinander verknüpft. Diese Art der Verknüpfung ist bei einem rein synthetischen Ansatz zur Entwicklung neuer RNA-Liganden von Nachteil. Zwar existiert eine Reihe von etablierten Methoden für die Synthese von *O*-Glycosiden,<sup>11</sup> jedoch gelingt deren Synthese nicht immer mit den gewünschten Ausbeuten und Stereoselektivitäten. Aus diesem Grund werden modifizierte Aminoglycoside fast immer aus biosynthetisch gewonnenen Aminoglycosiden dargestellt.

Im Gegensatz zur *O*-glycosidischen Verknüpfung stellen Stereoselektivitäten und Ausbeuten bei der chemischen Verknüpfung einzelner Bausteine durch eine Peptidbindung für gewöhnlich kein Problem dar.<sup>12</sup> Unterschiedliche Arbeiten in den letzten Jahren zeigen, dass auch Carboxyl- und Aminogruppen-tragende Kohlenhydratbausteine, so genannte Zuckerdiaminosäuren, auf diese Art mit hohen Ausbeuten verknüpft werden können.<sup>13-17</sup> Zentrale Idee des vorliegenden Projekts war daher die Synthese neuartiger Zuckerdiaminosäuren, - Kohlenhydrate mit zwei Aminogruppen und einer Carboxylgruppe - welche im Sinne einer Peptidkupplung mit etablierten Methoden verknüpft werden können. Dieses Konzept führt schon mit wenigen unterschiedlichen Zuckerdiaminosäurebausteinen zu einer Vielzahl an möglichen neuen RNA-Liganden und bietet durch das Vorhandensein zweier geeignet geschützter Aminogruppen die Möglichkeit neben linearen, auch verzweigte Oligomere zu synthetisieren.

Die Entwicklung neuer RNA-Liganden ist heutzutage von besonderer Bedeutung, da zunehmend multiresistente Keime auftreten, die mit den zur Verfügung stehenden Wirkstoffen nicht mehr bekämpft werden können. Auch im Hinblick auf die Weiterentwicklung wirksamer Medikamente gegen virale Infektionen, insbesondere gegen das HI-Virus, stellen neue RNA-Liganden eine interessante Alternative dar.

# ***Kennntnisstand***

## 2 RNA

Die Bestandteile der Ribonukleinsäure (RNA) sind die vier Nucleobasen Uracil (U), Cytosin (C), Guanin (G) und Adenin (A), die jeweils über einen Stickstoff mit dem anomeren Zentrum einer Ribose verknüpft sind. Die Riboseeinheiten sind untereinander über das 3' und das 5' C-Atom mit einem Phosphatrest zu einer Kette verknüpft. RNA und DNA unterscheiden sich lediglich in den Basen Uracil und Thymin, sowie durch den Austausch der Zucker Ribose und 2-Desoxyribose. Als Primärstruktur einer RNA wird die Abfolge der Nucleotide in einer RNA-Sequenz bezeichnet. Ein einfaches RNA-Tetramer zeigt Abbildung 2.1.

Analog zu DNA können gepaarte RNA-Bereiche vor allem durch die Ausbildung sogenannter Watson-Crick-Basenpaare entstehen. Dabei paaren sich die Basen A und U, bzw. C und G. Die treibende Kraft für die Ausbildung dieser Basenpaare sind Wasserstoffbrücken zwischen Amino- und Carbonylgruppen der Nucleotidbasen. Neben den Watson-Crick-Paaren existieren auch sogenannte Hogsteen-Basenpaare, die sich von den Watson-Crick-Paaren durch die Position der H-Brückenbindungen unterscheiden. Zusätzlich

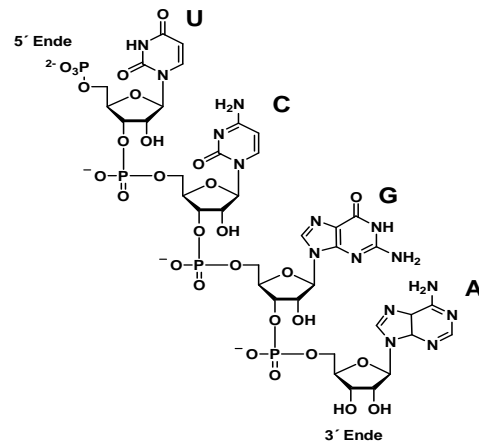


Abb. 2.1: Ein RNA Tetramer.

können Fehlpaarungen (*mismatches*) und Paarungen mit nichtkanonischen Basen auftreten. Beispiele für nichtkanonische Basen sind Pseudouracil ( $\Psi$ ) oder Dihydrouridin (D). Sowohl Hogsteen-Paare als auch Fehlpaarungen und Paarungen mit nichtkanonischen Basen sind seltener anzutreffen als Watson-Crick-Paare, spielen aber oftmals eine wichtige Rolle bei der Ausbildung spezifischer Sekundär- und Tertiärstrukturen (siehe Kapitel 2.1.1 und 2.1.2). Eine ausführliche Zusammenfassung unterschiedlicher Möglichkeiten der Basenpaarung in RNA-Molekülen findet sich in Übersichtsartikeln von Chastain et al.<sup>18</sup> und Batey et al.<sup>19</sup>

RNA ähnelt in vielerlei Hinsicht mehr den Proteinen als der DNA. Wie Proteine nehmen auch RNA-Moleküle komplexe, dreidimensional gefaltete Strukturen an, durch die chemische Gruppen präzise positioniert werden können. Auf Funktionen von RNA-Molekülen als Katalysatoren und als Regulatoren der Genexpression, sowie auf ihre Bedeutung als Angriffspunkt für pharmazeutische Wirkstoffe soll in den nächsten Kapiteln näher eingegangen werden. Zum Verständnis der Wirkungsweise von RNA und zum Verständnis

vieler Ansätze, die sich mit der Entwicklung spezifischer RNA-Liganden beschäftigen, ist es nützlich, häufig auftretende Strukturmerkmale von RNA-Molekülen zu kennen. Daher soll in den folgenden Abschnitten zunächst ein kurzer Überblick über wichtige Strukturmerkmale von RNA gegeben werden.

## 2.1 Sekundärstrukturelemente in RNA

Die Sekundärstruktur von RNA wird durch die zweidimensionale Darstellung ihrer gepaarten Bereiche und dazwischen liegender ungepaarter Bereiche wiedergegeben. Man unterscheidet im Wesentlichen sechs Sekundärstrukturelemente, die in einer vereinfachten Darstellung in Abbildung 2.2 gezeigt sind.

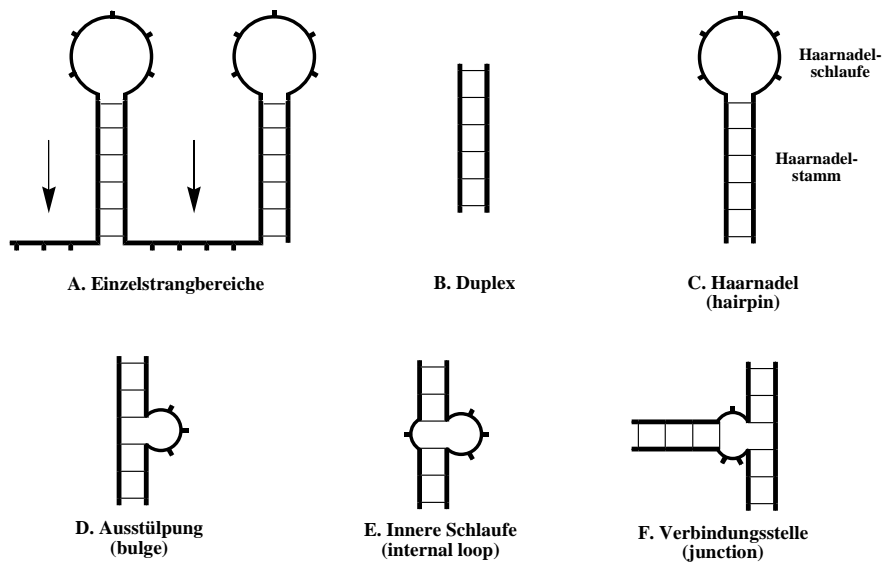


Abb. 2.2: Häufige Sekundärstrukturelemente in RNA- Molekülen.

### A. Einzelstrangbereiche

Einzelstrangbereiche bestehen aus ungepaarten Nucleotiden. Sie kommen am 3'- oder am 5'- Ende der RNA, sowie zwischen gepaarten Bereichen vor. Diese Bereiche sind durch günstige Stapelwechselwirkungen der Nucleotidbasen meist helical angeordnet und unterscheiden sich dadurch in ihrer Konformation von den Einzelsträngen in Schlaufenstrukturen (*loops*).

### B. Duplexbereiche

Duplex RNA bildet in der Regel eine rechtsgängige Doppelhelix, die durch Basenstapelung und Basenpaarung mit Basen im zugehörigen antiparallelen Strang stabilisiert wird. Die Helix liegt praktisch immer in der A-Form vor (siehe Abb. 2.3), wobei die Ribosereste eine 3'-endo-Konformation einnehmen. Bei einer A-Helix ist die kleine Furche (*minor groove*)

weit und flach und die große Furche (*major groove*) schmal und tief. RNA unterscheidet sich hierin wesentlich von DNA, die in der Regel eine B-Helix ausbildet, bei der die Ribosereste eine 2'-endo-Konformation einnehmen.

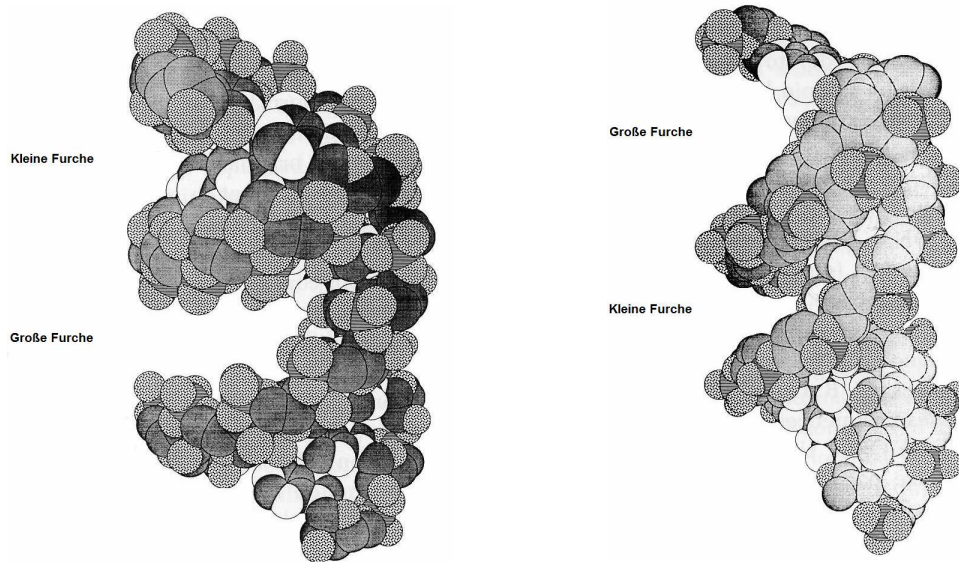


Abb. 2.3: Unterschiedliche Helixkonformationen. Links: A-Helix (RNA). Rechts: B-Helix (DNA).

Ungewöhnliche Sequenzen können in Ausnahmefällen zur Ausbildung anderer RNA-Helix-Konformationen führen. So kann beispielsweise beim Auftreten vieler C-G-Paare und hoher Salzkonzentrationen eine Helix in der Z-Form ausgebildet werden.<sup>18</sup>

### C. Haarnadeln (*hairpins*)

Eine Haarnadel besteht aus einem Duplex, dem Haarnadelstamm (*hairpin stem*), der mit einer einzelsträngigen Haarnadelschleife (*hairpin loop*) überbrückt wird. Untersuchungen unterschiedlicher Schlaufensequenzen zeigen, dass Schleifen immer durch zusätzliche Wasserstoffbrücken und durch Basenstapelung innerhalb der Schleife stabilisiert werden; ihre Stabilität ist von der Anzahl der Nucleotide in einer Schleife und von ihrer Sequenz abhängig. Die stabilsten bekannten Schlaufenstrukturen bestehen aus vier bis fünf Nucleotiden.<sup>20,21</sup> Die Ribosereste liegen in Haarnadelschleifen fast immer in einer 2'-endo-Konformation vor und unterscheiden sich dadurch von Riboseresten in helicalen Bereichen.

### D. Ausstülpungen (*bulges*)

Ausstülpungen sind Bereiche ungepaarter Nucleotide in einem der beiden Stränge eines Duplexbereichs. Der andere Strang ist durchgehend gepaart. Die Basen einer Ausstülpung können in die Doppelstranghelix intercalieren oder aus ihr herausstehen. Welche Orientierung

die einzelnen Basen einnehmen ist von der Base selbst, von dem sie umgebenden Duplexbereich und auch von der Temperatur abhängig.<sup>22</sup> Ausstülpungen beeinflussen die Langreichweiten-Struktur einer Helix, da sie einen Knick (*bend*) in der Helixstruktur des Duplexbereichs verursachen können. Die Stärke und Struktur des Knicks hängt dabei von der Sequenz der Ausstülpung ab.<sup>23,24</sup> Ausstülpungen verändern im Gegensatz zu Haarnadelschlaufen und Verbindungsstellen die Helixstruktur der sie umgebenden Doppelstrangbereiche im Bereich einiger Basenpaare.<sup>25</sup>

### **E. Innere Schlaufen (*internal loops*)**

Innere Schlaufen sind Bereiche die mindestens ein ungepaartes Nucleotid in jedem Strang eines Duplexbereichs enthalten. Zählt man die ungepaarten Basen in beiden Strängen zusammen, bestehen sie aus insgesamt drei oder mehr Nucleotiden, die nicht in der Lage sind Watson-Crick-Paare zu bilden. Symmetrische innere Schlaufen, also innere Schlaufen mit gleicher Anzahl an ungepaarten Nucleotiden in jedem Strang, sind thermodynamisch stabiler als unsymmetrische.<sup>26</sup> Prinzipiell besteht bei inneren Schlaufen die Möglichkeit, durch Fehlpaarungen (*mismatches*) von der offenen in eine geschlossene Form zu wechseln. Lässt sich dieser Übergang durch äußere Einflüsse steuern, kann man von einem molekularen Schalter sprechen, der je nach Konformation unterschiedliche Funktionen haben und durch den regulatorisch in biochemische Prozesse eingegriffen werden kann.

### **F. Verbindungsstellen (*junctions*)**

Verbindungsstellen (*junctions* oder *multibranched loops*) beinhalten drei oder mehr doppelsträngige helicale Bereiche mit einer variablen Anzahl an ungepaarten Nucleotiden, welche die Helices miteinander verknüpfen. Solche Verknüpfungsstellen bieten helicalen Bereichen die Möglichkeit eine coaxiale Stapelwechselwirkung einzugehen und sich dadurch spezifisch auszurichten und Tertiärstrukturen auszubilden. Ein Beispiel für eine sehr gut untersuchte Verknüpfungsstelle ist die *4-stem* Verknüpfungsstelle der tRNA. Der Akzeptorstamm geht hier eine coaxiale Stapelwechselwirkung mit dem T-Stamm und der D-Stamm eine coaxiale Stapelwechselwirkung mit dem Anticodon-Stamm ein (siehe auch Abb. 2.4), was zur Bildung zweier langer helicaler Regionen führt, die in etwa senkrecht zueinander stehen und dem Molekül seine typische L-Form geben.<sup>19</sup>

## 2.2 Tertiäre RNA-RNA Wechselwirkungen

Durch verbesserte Techniken bei der Synthese großer RNA-Moleküle<sup>27</sup>, sowie durch Verbesserungen in der Röntgenkristallographie<sup>28</sup> und der NMR-Spektroskopie<sup>29</sup>, konnten in den letzten beiden Jahrzehnten zunehmend tertiäre Wechselwirkungen unterschiedlicher RNAs identifiziert werden. Sie können nach Westhof und Michel<sup>30</sup> in drei Kategorien eingeteilt werden:

- Wechselwirkungen zwischen doppelsträngigen, helicalen Bereichen,
- Wechselwirkungen zwischen helicalen und ungepaarten Motiven ,
- und Wechselwirkungen zwischen ungepaarten Bereichen.

### I. Wechselwirkungen zwischen doppelsträngigen, helicalen Bereichen

Die wichtigste Wechselwirkung zweier helicaler Bereiche zur Erzeugung einer Tertiärstruktur ist die *coaxiale Stapelung*. Hierbei werden helicale Bereiche unterschiedlicher Duplexe durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen der Nucleotidbasen „gestapelt“. Diese energetisch günstigen Stapelwechselwirkungen tragen zur Gesamtstabilität einer Nucleotidsequenz bei.<sup>31</sup> Die Bedeutung der Basenstapelung für die Stabilisierung der RNA-Struktur lässt sich besonders eindrucksvoll am Beispiel von tRNA zeigen. Hier sind 72 von 76 Basen an Stapelwechselwirkungen beteiligt, wohingegen lediglich 41 der 76 Basen an der Ausbildung helicaler Strukturen beteiligt sind.<sup>32</sup> Durch coaxiale Stapelwechselwirkungen erhält die tRNA ihre typische L-Form.

Im Fall von Verbindungsstellen wird die coaxiale Stapelung häufig durch das Vorhandensein und die Konzentration zweiwertiger Metallkationen, wie beispielsweise  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$  bestimmt. Dies konnte an Kristallstrukturen des Hammerhead-Ribozyms gezeigt werden.<sup>33-35</sup> Zwei der drei Helices des Ribozyms sind coaxial gestapelt, während sich die dritte durch andere tertiäre Wechselwirkungen und spezifisch gebundene hydratisierte Magnesiumionen entlang der beiden gestapelten Helices ausrichtet. Es konnte gezeigt werden, dass die coaxiale Stapelung, und daraus resultierend die Orientierung der Helices relativ zueinander, stark von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration abhängig ist.<sup>36,37</sup> In Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen liegt das Hammerhead-Ribozym als ausgedehnte Struktur vor, in der keinerlei coaxiale Stapelung der Helices beobachtet wird.<sup>36</sup>

Zusätzlich können *2'-Hydroxygruppen-vermittelte tertiäre Wechselwirkungen* zwischen helicalen Motiven auftreten. Diese spielen unter anderem bei kleinen, doppelsträngigen RNA-Duplexen eine Rolle, denen aufgrund ihrer streng helicalen Anordnung die Diversität zur Ausbildung komplexer dreidimensionaler Strukturen fehlt.

## II. Wechselwirkungen zwischen helicalen und ungepaarten Motiven

Eine der Wechselwirkungen dieses Typs ist das *Tetraloop/Tetralooprezeptor-Motiv* (*tetraloop-motif*). Bei Gruppe-I- und Gruppe-II-Introns wurden sogenannte Tetralooprezeptoren entdeckt, die mit Schleifen des GNRA-Typs (N = beliebiges Nucleotid; R = A oder G) tertiäre Wechselwirkungen eingehen.<sup>19</sup> Bei den Rezeptoren handelt es sich um RNA-Motive, die aufgrund ihrer Form ein Netz von Wasserstoffbrücken zwischen ihrer kleinen Furche und den Nucleotidbasen der GNRA-Schleife ausbilden und so eine spezifische Bindung eingehen können.<sup>38-41</sup> Die Bedeutung der breiten „kleinen Furche“ der A-Helix bei der Vermittlung tertiärer Wechselwirkungen, wie im Beispiel der Tetraloop/Tetralooprezeptor-Wechselwirkung, könnte eine der grundlegenden Ursachen dafür sein, dass RNA im Gegensatz zu DNA in der Lage ist, komplexe, dreidimensional gefaltete Strukturen auszubilden.<sup>19</sup> Die kleine Furche der DNA B-Helix ist im Gegensatz zur kleinen Furche der A-Helix schmal und daher nur schwer zugänglich.<sup>19</sup>

Auch Metallionen können zur Ausbildung von tertiären Wechselwirkungen zwischen helicalen und einzelsträngigen Bereichen beitragen. Diese Form der Stabilisierung ist unter anderem in der TAR-Region des HI-Virus von Bedeutung.<sup>42</sup> In der TAR-RNA binden Calciumionen an eine Ausstülpung mit der Sequenz UCU. Diese Ionen können nun zusätzlich an Sauerstoffatome von Phosphatgruppen in und um die Ausstülpung herum binden, wodurch sich die drei Pyrimidinbasen von der Helix weg orientieren. Durch diese von den Calciumionen stabilisierte Struktur können die RNA-Stämme, welche die Ausstülpung flankieren, coaxial stapeln und so eine zusätzlich stabilisierte Tertiärstruktur ausbilden.

## III. Tertiäre Wechselwirkungen zwischen ungepaarten Bereichen

Neben den erwähnten Tetraloop/Tetralooprezeptor-Wechselwirkungen bieten Haarnadelschleifen eine weitere Möglichkeit zur Ausbildung tertiärer RNA-Wechselwirkungen. So existieren reine *Schleifen-Schleifen-Wechselwirkungen* (*loop-loop interactions*) durch deren Kontakt neue Helixstrukturen zwischen den Schleifen gebildet werden („*kissing loops*“). Diese Form der RNA-RNA-Wechselwirkung wird unter anderem bei der Ausbildung der Tertiärstruktur von tRNA und in der TAR-Region von HIV-2 beobachtet.

Eine weitere Form dieses Typs der tertiären Wechselwirkung wird durch einen *Pseudo-Knoten* beschrieben. Er besteht aus einer Haarnadelschleife, die mit einer einzelsträngigen Sequenz Basenpaare bildet und so analog zu den „*kissing loops*“ eine zusätzliche helicale Struktur erzeugt. Sowohl bei Verbindungsstellen, als auch bei „*kissing loops*“ und Pseudoknoten sind Metallionen oftmals zur Stabilisierung der Struktur notwendig.

## 2.3 Faltung von RNA zu Strukturen höherer Ordnung

Im ungefalteten Zustand der RNA ist, im Gegensatz zu den Proteinen, bereits der größte Teil der Sekundärstruktur vorgeformt. Der Faltungsvorgang umfasst daher im Wesentlichen die Ausbildung tertiärer Wechselwirkungen.

Die meisten großen RNA-Moleküle in biologischen Systemen sind in Domänen organisiert – großen Sekundärstrukturbereichen, die sich als unabhängige Einheit falten können.

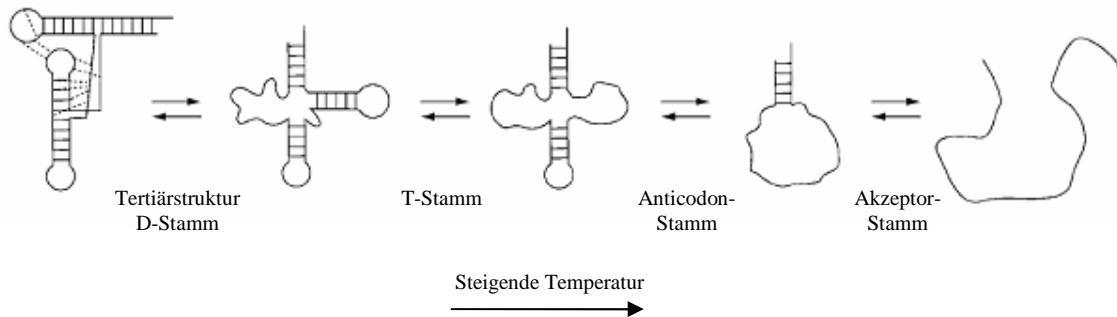


Abb. 2.4: Hierarchische Faltung der tRNA.

Um eine Vorstellung des RNA-Faltungsvorgangs zu vermitteln, wird an dieser Stelle das *hierarchische Modell der RNA-Faltung* vorgestellt, welches auf Untersuchungen an tRNA zurückgeht. Durch Temperatursprung-Relaxationsmessungen und NMR-Spektroskopie an tRNA<sup>fMet</sup> aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass tRNA während der thermisch induzierten Entfaltung fünf definierte Strukturen durchläuft (siehe Abb. 2.4).<sup>43</sup>

Zunächst werden durch Temperaturerhöhung die tertiären Wechselwirkungen gelöst, durch welche die tRNA ihre typische L-Form erhält. Anschließend werden die schwachen Sekundärstrukturelemente im D-Stamm zerstört.<sup>44</sup> Weitere Temperaturerhöhungen führen schließlich zum stufenweisen Abbau aller weiteren Sekundärstrukturelemente und zur Bildung einer „random coil“-Struktur. Dieser Vorgang der thermischen Denaturierung ist reversibel. Bei der Rückreaktion werden fast alle Sekundärstrukturelemente vor Ausbildung der Tertiärstruktur zurückgebildet, woraus eine hierarchische RNA-Strukturbildung (Bildung der Sekundärstruktur vor der Tertiärstruktur) entlang des Faltungswegs gefolgert wurde.<sup>45,46</sup>

Eine detaillierte Beschreibung von Faktoren, die zur RNA-Faltung beitragen, kann einem Übersichtsartikel von Batey et al. entnommen werden.<sup>19</sup>

## 2.4 Funktionen von RNA

RNA wurde bis zu Beginn der 80er Jahre eine rein passive Rolle als Überträger von Informationen bei der Expression von Genen und der daraus resultierenden Proteinbiosynthese zugeschrieben. Erst mit der Entdeckung der Ribozyme durch T. R. Cech und S. Altman wurde deutlich, dass RNA auch aktiv in Prozesse *in vivo* eingreifen kann. In den folgenden Jahren wurden zahlreiche RNA-Moleküle identifiziert, die über katalytische Aktivität verfügen - eine Fähigkeit, die man bis dahin lediglich von den Proteinen kannte.<sup>1-4</sup> Weitere Forschungen in den letzten zwei Jahrzehnten zeigten, dass RNA neben ihrer Bedeutung als Informationsüberträger und Katalysator viele weitere Funktionen in biologischen Systemen einnimmt und dass unser Verständnis der RNA-Welt wahrscheinlich noch in den Kinderschuhen steckt.

Es werden nachfolgend einige der heute bekannten Funktionen von RNA in biologischen Systemen näher betrachtet, wodurch verdeutlicht werden soll, dass RNA-Moleküle nicht nur essentiell für viele biologische Prozesse sind, sondern zudem eine große Chance bieten gezielt in diverse biologische Prozesse eingreifen zu können.

### 2.4.1 RNA als Übermittler genetischer Information

Die wohl bekannteste und am besten untersuchte biologische Funktion von RNA ist ihr Mitwirken als Übermittler genetischer Information während der Proteinbiosynthese. Die Übertragung von Informationen einer gegebenen DNA-Sequenz zur Synthese von Proteinen lässt sich dabei in drei Hauptschritte gliedern, die in einer vereinfachten Darstellung in Abb. 2.5 gezeigt sind: *Transkription*, *Prozessierung* (nicht bei Prokaryoten) und *Translation*.

Bei der Transkription wird ein DNA-Abschnitt (Gen) abgelesen und in RNA umgeschrieben. Dabei setzt sich eine RNA-Polymerase an eine Promotor-Sequenz der DNA (*Initiation*) und öffnet die DNA-Doppelhelix in einem kurzen Bereich durch Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen, wobei die sogenannte *Transkriptionsblase* entsteht. Innerhalb der Transkriptionsblase lagern sich nun am codogenen DNA-Strang die komplementären RNA-Nucleotide durch Basenpaarung an und werden unter Eliminierung von Pyrophosphat aus Nucleosidtriphosphaten im Sinne einer Esterbindung zwischen Phosphat und Ribose miteinander verknüpft. Die Ableserichtung bei diesem als *Elongation* bezeichneten Vorgang verläuft vom 3'- zum 5'-Ende der DNA; der komplementäre RNA-Strang wird demzufolge von 5' nach 3' synthetisiert.

tRNA, rRNA und mRNA werden nach dem gleichen Prinzip an der DNA synthetisiert. Bei Prokaryoten findet die Transkription im Cytoplasma unter Verwendung einer einzigen

RNA-Polymerase statt. Bei Eukaryoten erfolgt die Synthese unterschiedlicher RNA-Typen hingegen im Zellkern unter Verwendung von drei RNA-Polymerasen. So wird die eukaryotische mRNA-Synthese durch die RNA-Polymerase II katalysiert, während die tRNA-Synthese durch die RNA-Polymerase III und ein Großteil der rRNA-Synthese durch die RNA-Polymerase I katalysiert werden.<sup>47,48</sup>

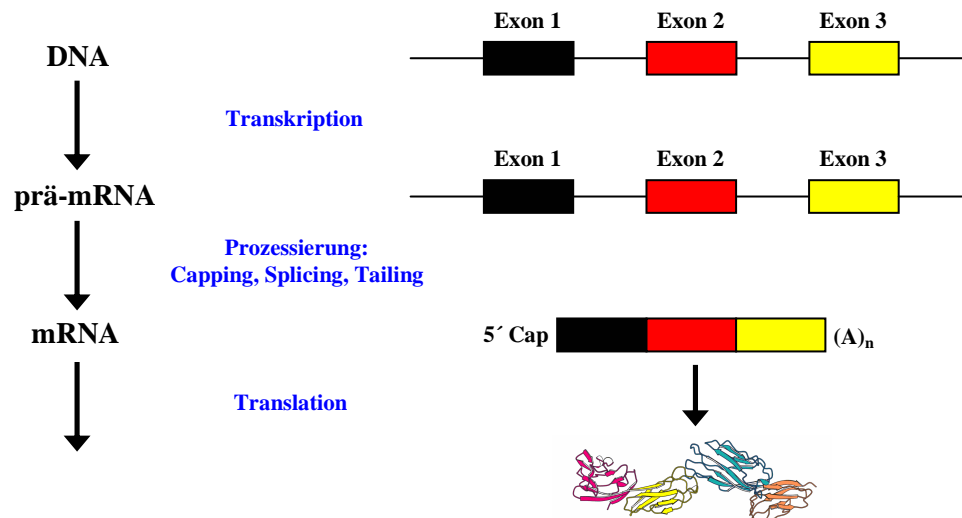


Abb. 2.5: Vereinfachtes Schema der Übermittlung des genetischen Codes von der DNA zu den Proteinen.

Die Synthese der RNA wird durch Erreichen einer sogenannten Terminator-Sequenz beendet (*Termination*). Im Fall der einfachen Termination (*rho*-unabhängige Termination) bei Prokaryoten führt die Terminator-Sequenz zur Bildung einer RNA-Haarnadelschleife, die den Transkriptionsvorgang behindert und dadurch zum Erliegen bringt. Das RNA-Transkript wird aus der Transkriptionsblase entlassen und die RNA-Polymerase löst sich von der DNA ab. Bei Eukaryoten sind die wesentlichen Terminationsschritte komplizierter und für jede RNA-Polymerase existiert ein eigener Terminationsmechanismus.<sup>47</sup>

In prokaryotischen Zellen kann die synthetisierte mRNA nach der Termination direkt zum Ribosom wandern. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass sich ein Ribosom cotranskriptionell an die naszierende RNA-Kette anlagert und die Translation schon vor der Termination beginnt. Bei Eukaryoten verlässt das primäre RNA-Transkript selbst nicht den Zellkern. Die im ersten Schritt der Transkription entstandene RNA wird auch als prä-mRNA bezeichnet und kann vor Beginn der Translation durch *Capping* des 5'-Endes, *Spleißen* und *Polyadenylierung* des 3'-Endes (*Tailing*) weiter modifiziert werden.<sup>47</sup>

Prä-mRNA enthält neben *Exons* (codierende Abschnitte) auch *Introns* (nicht-codierende Abschnitte). Beim Spleißen werden die Introns entfernt und die angrenzenden Exons zur fertigen mRNA verknüpft. Das Spleißen findet in den meisten Fällen an einem großen Komplex aus snRNAs und Proteinen - dem *Spleißosom* - statt, welcher den Vorgang

katalysiert. Daneben existieren auch RNAs, die ihre Introns ohne die Hilfe eines Spleißosoms entfernen können. Sie gehören zur Klasse der *Ribozyme*, die über die Fähigkeit verfügen, chemische Reaktionen zu katalysieren. Ihre Funktion und die Mechanismen ihrer katalytischen Aktivität werden in Kapitel 2.4.2 beschrieben und sollen an dieser Stelle nicht näher erläutert werden.

Bei Eukaryoten wird die reife mRNA nach Beendigung der Prozessierung mit dem 5'-Ende voran durch eine Kernpore in das Cytoplasma geschleust und sofort mit Ribosomen besetzt. Dort beginnt nun die Translation, also die Übersetzung des genetischen Codes in eine Aminosäuresequenz. Der genetische Code ist in Form von Basentriplets (*Codons*) auf der mRNA gespeichert. Zu jedem Codon existiert eine passende tRNA, die mit einem komplementären Basentriplett (*Anticodon*) an die reife mRNA bindet und zuvor von einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase mit der jeweils passenden Aminosäure über eine terminale 3'-OH-Gruppe beladen wurde.<sup>47</sup>

Die Bindung von Codon und Anticodon, sowie die darauf folgende Verknüpfung der Aminosäuren, finden am Ribosom statt. Nach Andocken der ersten tRNA an ein Start-Codon setzt sich eine zweite tRNA mit passendem Anticodon an das danebenliegende mRNA-Triplett. Die tRNA-gebundenen Aminosäuren werden mit Hilfe des Ribosoms verknüpft und die erste tRNA wird ohne Aminosäure aus dem Ribosom entlassen. Das Ribosom wandert bei diesem Prozess immer um ein Codon auf der mRNA weiter, bis ein Stop-Codon erreicht wird für das kein passendes tRNA-Anticodon existiert. Das Ribosom ist die zentrale molekulare Maschine des Translationsvorgangs und dient als Katalysator für die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren zum fertigen Protein. Der genaue Aufbau und die Wirkungsweise des Ribosoms werden in Kapitel 2.4.3 besprochen.

Eine etwas andere Form der Informationsspeicherung und Informationsübertragung durch RNA liegt bei den RNA-Viren vor. Sie haben ein Genom, das nicht aus DNA, sondern vollständig aus RNA besteht und daher oftmals direkt als mRNA zur Proteinsynthese benutzt werden kann.

Eine Unterklasse der RNA-Viren sind die Retroviren, zu denen auch das HI-Virus zählt. Sie enthalten als Genträger zwei identische RNA-Moleküle, die wie typische eukaryotische mRNAs am 5'-Ende gecappt sind und am 3'-Ende einen poly-Adenosin-Schwanz tragen. Nach Einschleusen in die Wirtszelle wird die RNA in einer komplizierten Folge von Syntheseschritten mit Hilfe der *reversen Transkriptase* in DNA umgeschrieben und mit einer *Integrase* in das Genom der Wirtszelle eingebaut.<sup>47</sup> Von dort aus kann die Information wie bei gewöhnlicher zellulärer DNA in mRNA transkribiert und im Anschluss durch Translation

in ein Protein umgewandelt werden. Auf diese Weise nutzen Viren wie das HI-Virus die Transkriptions- und Translationsmaschinen fremder Zellen für ihre eigene Replikation.

## 2.4.2 Ribozyme

Ribozyme sind RNA-Moleküle, die über die Fähigkeit verfügen, chemische Reaktionen zu katalysieren. Alle bislang entdeckten natürlichen Ribozyme, das Ribosom ausgenommen, katalysieren die gleichen chemischen Reaktionen: die Spaltung und die Ligation von Polynucleotiden. Tabelle 2.1 zeigt eine Auflistung einiger Ribozyme, deren Strukturmerkmale und Funktionen in den letzten Jahren durch Röntgenstrukturanalyse und andere Techniken aufgeklärt werden konnten.<sup>28,29,49,50</sup>

Tab. 2.1: Ribozym-Klassen und Vorkommen in der Natur. \*Hepatitis  $\delta$  Virus, \*\* Funktion nicht sicher geklärt \*\*\* co-transcriptional cleavage ribozyme.

Klasse	RNA-Typus	Ribozym	Funktion	Ligand	Größe (Basen)	Vorkommen
<b>Spaltende Ribozyme</b>						
Selbst-spaltend	Satelliten-RNA	Hammerhead	Prozessierung multimerer RNAs zu Monomeren bei der „rolling circle replication“		65	Viroide, Eukaryoten, pflanzenvirale Satelliten-RNA
	Satelliten-RNA	Hairpin			75	Pflanzenvirale Satelliten-RNA
	Satelliten-RNA	HDT*			85	Humanes Satelliten Virus
	mRNA	CoTC***	Abbruch der Transkription**	GTP	190	Primaten
	mRNA	<i>glmS</i>	Gen Kontrolle	GlcN6P	170	Gram(+) Bakterien
Trans-spaltend	mRNA	RNase P	Prozessierung der tRNA		140-500	Prokaryoten und Eukaryoten
<b>Spleißende Ribozyme</b>						
Gruppe I Introns	mRNA		Selbst-spleißend	Guanosin	200-1500	Bakterien, Bakteriophagen, tierische Mitochondrien
Gruppe II Introns	mRNA		Selbst-spleißend		300-3000	Bakterien, Archaea

Die natürlichen Ribozyme lassen sich in *spaltende Ribozyme (cleaving ribozymes)* und *spleißende Ribozyme (splicing ribozymes)* unterteilen. Unter den spaltenden Ribozymen unterscheidet man weiterhin selbstspaltende (intramolekular spaltende) und trans-spaltende (intermolekular spaltende) Ribozyme, deren einzige bislang entdeckte Vertreterin die *RNase P* ist.<sup>49</sup> Die vermutlich prominentesten Vertreter der selbstspaltenden Ribozyme sind das Hammerhead- und das Hairpin-Ribozym, die ihre Namen der zweidimensionalen Darstellung ihrer Sekundärstruktur verdanken. Beide sind an der Prozessierung von RNA pflanzlicher Satelliten-Viren während der „rolling circle replication“ beteiligt<sup>49</sup> und katalysieren ihre Spaltreaktionen nach einem Säure/Base-Mechanismus (siehe Abb. 2.6).<sup>51</sup>

Abb. 2.6 zeigt ein allgemeines Schema für die Spaltreaktionen von selbstspaltenden und spleißenden Ribozymen. Die Reaktionen bestehen jeweils aus zwei aufeinander folgenden Umesterungen, bei denen ein trigonal-bipyramidaler Übergangszustand durchlaufen wird. Bei den selbstspaltenden Ribozymen greift die 2'-OH-Gruppe eines Riboserests auf der 5'-splice-site nucleophil am Phosphor an, während bei den spleißenden Ribozymen eine exogene Hydroxyquelle oder eine 2'-OH-Gruppe eines weit von der splice-site entfernten Adenosinrests für den nucleophilen Angriff verantwortlich sind (siehe Abb. 2.7). Daher entstehen bei selbstspaltenden und selbstspleißenden Ribozymen unterschiedliche Reaktionsprodukte.

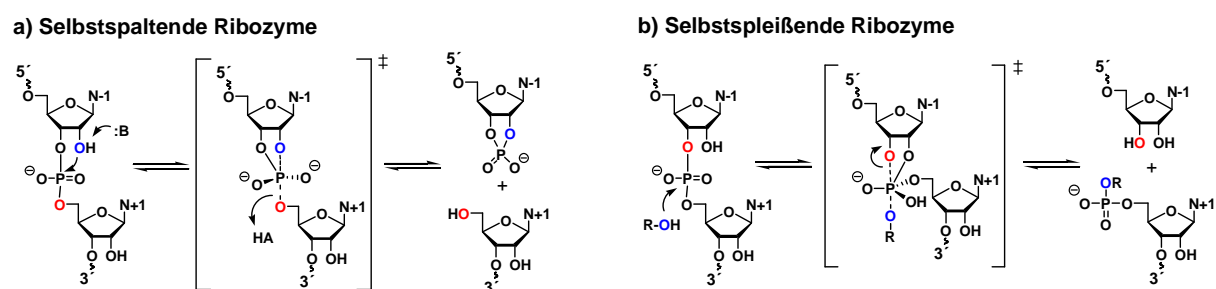


Abb. 2.6: a) Modell der Säure/Base-katalysierten Spaltreaktion selbstspaltender Ribozyme.  
 b) Schema der Spaltreaktion spleißender Ribozyme.

Die Spaltreaktionen können, wie im Fall der Gruppe-I-Introns, durch die Anwesenheit divalenter Metallkationen<sup>52-54</sup> oder - wie in Abb. 2.6 für die selbstspaltenden Ribozyme gezeigt - durch Säuren und Basen katalysiert werden.<sup>51,53</sup> Einige Ribozyme sind zudem auf spezielle Liganden angewiesen (siehe Tab. 2.1),<sup>49,51,52</sup> eine Eigenschaft die sie mit den Proteinen teilen, da diese ebenfalls oftmals auf das Mitwirken von Cofaktoren für die Katalyse angewiesen sind.

Normalerweise benötigt das Spleißen, also das Herausschneiden der Introns und das Zusammenfügen der Exons, die Hilfe des Spleißosoms, eine komplexe molekulare Maschine, die aus mehreren snRNAs und einer Reihe von Proteinen besteht.<sup>47</sup> Spleißende Ribozyme sind jedoch in der Lage diesen Vorgang auch ohne die Hilfe von Proteinen präzise durchzuführen. Im Gegensatz zu den spaltenden Ribozymen katalysieren sie neben der Spaltung auch die Ligation von Polynucleotidsträngen. Die Gruppe der spleißenden Ribozyme umfasst im Wesentlichen die selbstspleißenden Gruppe-I- und Gruppe-II-Introns.<sup>49</sup> Gruppe-I-Introns benötigen für den ersten Spaltschritt die 3'-OH-Gruppe eines exogenen Guanosinrests ( $\alpha$ G). Nach Abtrennen auf der 5'-splice-site greift das Exon mit seinem nun freien 3'-Ende am Phosphat eines terminalen Guanosinrests des Introns ( $\omega$ G) an. Das Intron wird auf diese Weise abgetrennt und die Exons werden miteinander verknüpft.

Gruppe-II-Introns hingegen nutzen die 2'-OH-Gruppe eines internen Adenosins als Nucleophil für die erste Spaltreaktion. Diese Reaktion führt zu einer Zyklisierung des Introns, das in dieser Form als Lariat bezeichnet wird. Die zweite Spalt-, sowie die Ligrationsreaktion entsprechen denen der Gruppe-I-Introns.

Abbildung 2.7 fasst die wesentlichen Schritte des Spleißvorgangs für Gruppe-I- und Gruppe-II-Introns zusammen.

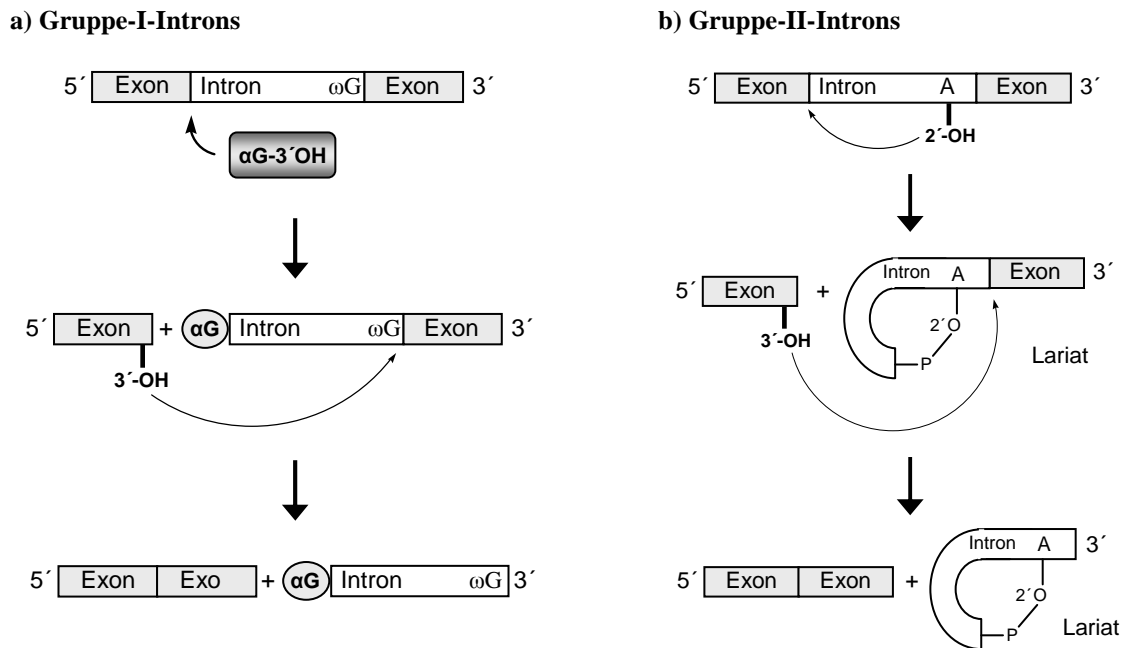


Abb. 2.7: Vereinfachte Darstellung des Spleißens a) bei Gruppe-I- und b) bei Gruppe-II-Introns

Neben der Entdeckung natürlicher Ribozyme und der Aufklärung ihrer Katalyseeigenschaften wurde in den letzten Jahren vornehmlich durch SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) eine Reihe nichtnatürlicher Ribozyme dargestellt. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Entwicklung eines Ribozyms, das eine Diels-Alder-Reaktion und damit die Knüpfung von C-C-Bindungen katalysieren kann.<sup>50,55</sup> Die Entdeckung dieses Ribozyms zeigt, dass RNA in einer postulierten RNA-Welt in der Lage gewesen sein könnte auch komplexe chemische Reaktionen zu katalysieren.

### 2.4.3 Ein besonderes Ribozym – das Ribosom

Ribosomen sind archaische, molekulare Maschinen, die in der Lage sind, die Verknüpfung von Aminosäuren während der Translation zu katalysieren, und die Peptidyltransferreaktion um einen Faktor von etwa  $10^7$  beschleunigen.<sup>56</sup> Dieser Prozess ist von einer geradezu verwirrenden Komplexität, was auch an den über 100 Makromolekülen deutlich wird, die an der Proteinbiosynthese beteiligt sind.<sup>47</sup> Trotz vieler wichtiger Detailunterschiede haben die Ribosomen von Prokaryoten und Eukaryoten einige gemeinsame Eigenschaften. Sie setzen sich aus zwei Untereinheiten zusammen; eine kleine Untereinheit, in der mRNA und tRNAs zusammentreffen und eine große Untereinheit in der das Peptidyltransferasezentrum, also die zentrale katalytische Einheit der Verknüpfung von Aminosäuren zum Protein, liegt. Des Weiteren ist jede Untereinheit aus ein bis drei RNA-Molekülen und diversen Proteinen mit einem Gewichtsverhältnis von etwa 60 % RNA zu 40 % Protein zusammengesetzt.<sup>47</sup> Es gibt wie Tabelle 2.2 verdeutlicht aber auch prinzipielle Unterschiede im Aufbau prokaryotischer und eukaryotischer Ribosomen.

Tab. 2.2: Unterschiede im Aufbau prokaryotischer und eukaryotischer Ribosomen

Prokaryoten			Eukaryoten		
Ribosom	Untereinheit	rRNA	Ribosom	Untereinheit	rRNA
70 S	50 S	23 S	80 S	60 S	28 S
		5 S			5,8 S
	30 S	16 S		40 S	5 S
					18 S

Die Größe eines Ribosoms und seiner Untereinheiten wird durch ihr Sedimentationsverhalten charakterisiert und daher durch den Sedimentationskoeffizienten S in *Svedberg* angegeben.

Obwohl das Ribosom schon seit einigen Jahrzehnten im Blickpunkt der Forschung steht,<sup>57</sup> wurden erst in den letzten Jahren entscheidende Fortschritte im Verständnis seiner Funktion gemacht.<sup>56,57</sup> Diese Fortschritte wurden vor allem durch hochaufgelöste Röntgenstrukturen bakterieller Ribosomen möglich, die einen tieferen Einblick in den Aufbau und die dreidimensionale Struktur der Ribosomen gestatteten.<sup>57</sup> Sie zeigen, dass das Peptidyltransferasezentrum, welches in der 50 S Untereinheit der prokaryotischen Ribosomen lokalisiert ist, vollständig aus RNA besteht. Folglich ist das Ribosom ein Ribozym, da es die Bildung von Peptidbindungen allein durch RNA und ohne die Hilfe von Proteinen zu katalysieren vermag.<sup>57</sup> Der nicht unerhebliche Anteil an Proteinen im Ribosom erfüllt also weniger funktionelle, als viel mehr stützende und strukturgebende Aufgaben.

Die am Ribosom stattfindende Translation lässt sich in drei wesentliche Schritte unterteilen, die *Initiation*, die *Elongation* und die *Termination*. Sie soll hier am Beispiel bakterieller

Ribosomen beschrieben werden, da die Vorgänge dort etwas weniger komplex sind als bei eukaryotischen Zellen.<sup>47</sup> Die Initiation erfordert bei bakteriellen Ribosomen die Anwesenheit von drei Initiationsfaktoren (IF 1, IF 2 und IF 3), die an der kleinen ribosomalen Untereinheit mit der mRNA zusammenkommen. In der Regel wird als Startaminosäure bei der Proteinbiosynthese ein N-formyliertes Methionin (fMet) eingebaut. Das Ribosom mit gebundener mRNA und gebundener tRNA<sup>fMet</sup> wird daher auch als Initiator-Komplex bezeichnet. IF 3 verdrängt so genannte Nicht-Initiator-tRNAs vom Ribosom und fördert damit die Anlagerung der tRNA<sup>fMet</sup>. IF 2 bindet an die Initiator-tRNA<sup>fMet</sup> und leitet sie zum P-Ort (siehe Abb. 2.9).

Im Anschluss beginnt die Elongation: die programmierte Verknüpfung von Aminosäuren zum Protein. Für ein besseres Verständnis der Elongation muss man zwei Bindungsstellen für beladene tRNAs am Ribosom unterscheiden, den *A-Ort* (*Aminoacyl- oder auch Erkennungsort*) und den *P-Ort* (*Peptidyl- oder Bindungsort*), die sich in der kleineren ribosomalen Untereinheit (30 S) befinden. Die an A- und P-Ort gebundenen, beladenen tRNAs zeigen in Richtung 50 S Untereinheit und befinden sich mit ihren Akzeptorenden in einer Spalte der großen Untereinheit. Dort werden ihre konservierten 3'-terminalen CCA-Einheiten durch Wechselwirkungen mit der 23 S rRNA am Platz gehalten und für die nachfolgende Aminosäureverknüpfung im Peptidyltransferasezentrum ausgerichtet.<sup>56</sup>

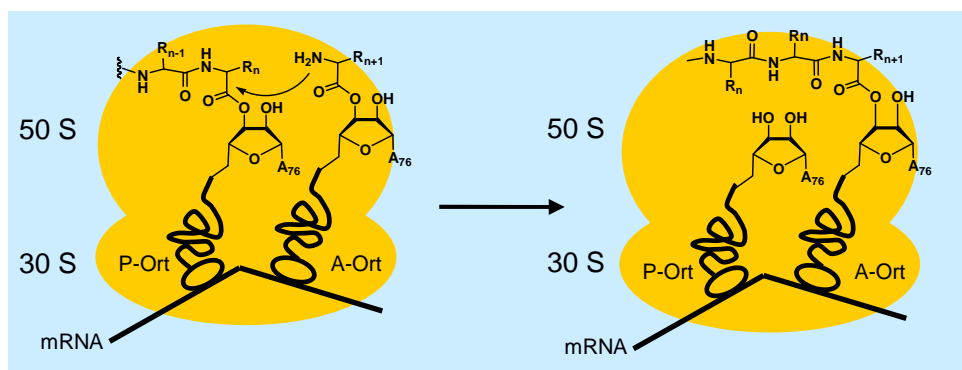


Abb. 2.8: Verknüpfung von Aminosäuren am Ribosom: P-Ort und A-Ort befinden sich in der kleinen ribosomalen Untereinheit. Die Akzeptorenden der tRNAs befinden sich in einer Spalte in der 50 S Untereinheit und werden durch Wechselwirkung mit der 23 S rRNA in die richtige Position für die Verknüpfungsreaktion gebracht.

Zu Beginn der Elongation bindet eine Initiations-tRNA<sup>fMet</sup> an den P-Ort. Die zum nachfolgenden Basentriplett komplementäre, beladene tRNA wird mit Hilfe eines Elongationsfaktors (EF-Tu) und GTP am A-Ort gebunden. Nun findet die eigentliche Peptidyltransferase-Reaktion statt. Die Aminosäure am P-Ort wird über ihre Carboxylgruppe in Form einer Peptidbindung mit der freien Aminogruppe der Aminosäure am A-Ort verknüpft. Nach Beendigung der Reaktion liegt am A-Ort also eine Dipeptidyl-tRNA vor. Ein

Schema dieser Reaktion ist in Abbildung 2.8 für die Verknüpfung einer bestehenden Peptidyl-tRNA mit einer beliebigen Aminosäure gezeigt.

Nachfolgend beginnt die *Translokation* und das Ribosom bewegt sich relativ zur mRNA um ein Basentriplett weiter. Bei diesem Vorgang wird die tRNA am P-Ort abgespalten und wandert als unbeladene tRNA zum E-Ort (*Exit-Ort*). Gleichzeitig gelangt die Dipeptidyl-tRNA zum P-Ort und der A-Ort wird für die Beladung der nächsten Aminoacyl-tRNA frei gemacht.<sup>47</sup> Abbildung 2.9 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Elongation und der Translokation an einer bestehenden Peptidyl-tRNA.

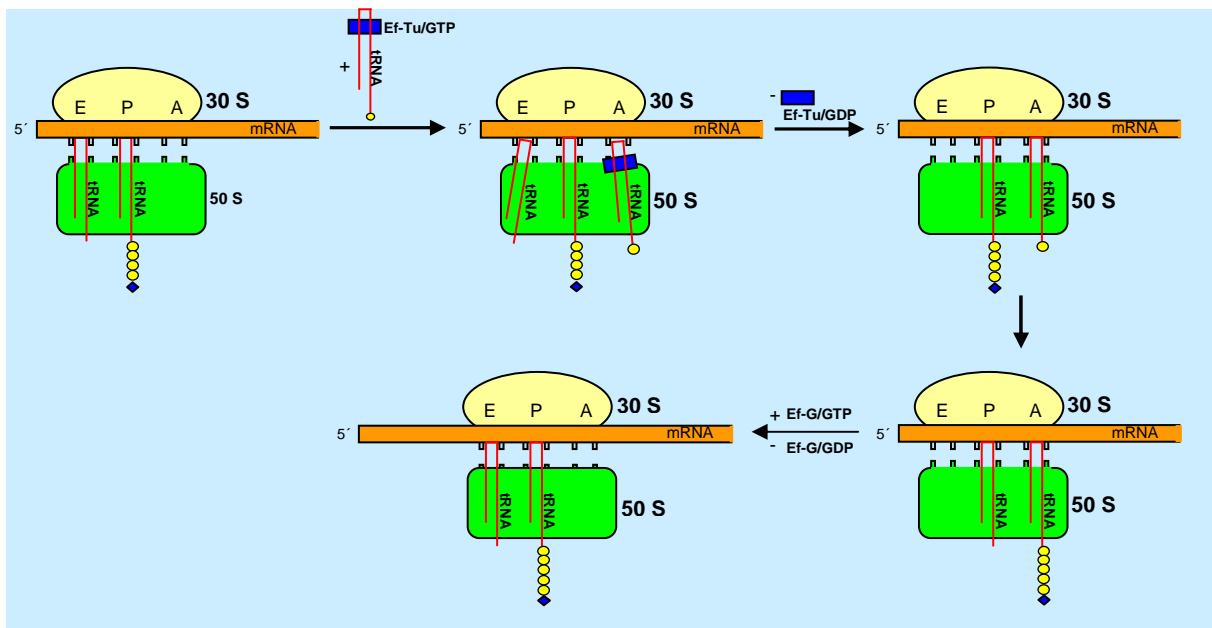


Abb. 2.9: Vereinfachtes Schema der Elongation mit anschließender Translokation des Ribosoms: fMet (blaue Karos) liegt am aminoterminalen Ende der wachsenden Peptidkette (gelbe Kreise). Im abschließenden Translokationsschritt wandert das Ribosom um ein Basentriplett an der mRNA weiter und die wachsende Peptidylkette gelangt vom A-Ort zum P-Ort.

Der Zyklus der Aminosäureverknüpfung wiederholt sich fortlaufend mit einer Geschwindigkeit von 10-20 Verknüpfungsreaktionen pro Sekunde<sup>47</sup> bis eines der drei *Stop-Codons* UAG, UAA oder UGA erreicht wird. Hier beginnt die Termination der Proteinbiosynthese. Da in den Zellen keine tRNAs mit passenden Anticodons zu den drei Stop-Codons existieren, kommt die Proteinbiosynthese zum Erliegen. In Gegenwart dreier Terminationsfaktoren (RF 1, RF 2 und RF 3) wird die Peptidkette von der Peptidyl-tRNA gelöst und das fertige Protein freigesetzt.<sup>47</sup>

Mit der Katalyse der Verknüpfung von Aminosäuren zu Proteinen erfüllen die Ribosomen eine der wichtigsten Aufgaben in der Zelle, da Proteine durch ihre Funktion als Enzyme, Wachstumsfaktoren, Gerüstsubstanzen und vieles mehr, essentiell für alle Lebewesen sind. Durch den Aufbau aus Proteinen und RNA enthält das Ribosom zahlreiche Strukturelemente, die Wechselwirkungen mit anderen Molekülen ermöglichen (siehe auch Kapitel 2.1 und

2.2).<sup>47,48</sup> Manche hochkonservierte Regionen in bakteriellen und eukaryotischen Ribosomen unterscheiden sich in einigen RNA-Basen, wodurch eine strukturelle Unterscheidung dieser Regionen möglich ist.<sup>58</sup> Daher sind diese für alle Lebewesen essentiellen, molekularen Maschinen ein interessantes Ziel für die Entwicklung von Wirkstoffen und für das gezielte Eingreifen in biomolekulare Prozesse (siehe auch Kapitel 3).<sup>58-62</sup>

#### 2.4.4 Riboswitches

Der Begriff Riboswitch wird gewöhnlich für eine Klasse von RNA-Sensoren benutzt, die selektiv an Metabolite binden können. Daneben existieren andere RNA-Sensoren, die nicht auf die Bindung an Metabolite, sondern beispielsweise auf Temperaturänderungen oder die Bindung bestimmter Kationen (z. B.  $Mg^{2+}$ ) reagieren.<sup>49</sup> Tabelle 2.3 zeigt eine Auswahl von Riboswitches und den zugehörigen Metaboliten, die in den letzten Jahren in unterschiedlichen Organismen identifiziert werden konnten.

Tab.2.3: Riboswitch-Klassen und Vorkommen in der Natur; TPP = Thiaminpyrophosphat; FMN = Flavinmononucleotid; AdoCbl = Adenosylcobalamin; SAM = S-Adenosylmethionin; preQ1 = prä-Quenosin

Name des Riboswitch	Ligand (Metabolit)	Funktion	Größe (Basen)	Vorkommen
<b>Coenzym-bindende Riboswitches</b>				
TPP	TPP	Gen Kontrolle	100	Bakterien, Archaea, Eukaryoten (Pilze, Pflanzen)
FMN	FMN	Gen Kontrolle	120	Bakterien
AdoCbl	AdoCbl	Gen Kontrolle	200	Bakterien
SAM-I	SAM	Gen Kontrolle	105	Hauptsächlich Gram(+) Bakterien
SAM-II	SAM	Gen Kontrolle	60	$\alpha$ - und $\beta$ -Proteobakterien
<b>Nucleobasen-bindende Riboswitches</b>				
Guanin	Guanin, Hypoxanthin	Gen Kontrolle	70	Gram(+) Bakterien
Adenin	Adenin	Gen Kontrolle	70	Bakterien
preQ <sub>1</sub>	preQ <sub>1</sub>	Gen Kontrolle	35	Bakterien
<b>Aminosäuren-bindende Riboswitches</b>				
Lysin	Lysin	Gen Kontrolle	175	$\gamma$ -Proteobakterien, Thermotogales
Glycin I	Glycin	Gen Kontrolle	110	Bakterien
Glycin II	Glycin	Gen Kontrolle	110	Bakterien
<b>Kohlenhydrat-bindende Riboswitches</b>				
glmS	GlcN6P	Gen Kontrolle	170	Gram(+) Bakterien

Riboswitches sind im Wesentlichen durch zwei Eigenschaften definiert: Sie können einen Metaboliten ohne die Hilfe von Proteinen binden und vermitteln durch die Bindung des Metaboliten eine Änderung in der Genexpression.

Man kann sie in zwei Domänen unterteilen: ein Aptamer und eine Expressions-Plattform.<sup>63,64</sup> Dabei ist das Aptamer als die Einheit des Schalters definiert, die den Metaboliten selektiv bindet und bei der Anlagerung des Metaboliten eine andere, durch die Bindung stabilisierte Konformation eingeht. Das Aptamer ist in der Regel stark gefaltet und verfügt über Metabolit-spezifische Bindungsmotive. Die Expressions-Plattform dient zur Weitergabe der Information nach der Bindung und wandelt die Konformationsänderung in Änderungen in der Genexpression um (siehe Abb. 2.11 und 2.12).

Gene, die von Riboswitches kontrolliert werden, codieren meist Proteine, die an der Biosynthese oder am Transport der Metabolite beteiligt sind, die vom betreffenden Schalter gebunden werden. Die Bindung ist von der Konzentration des Metaboliten abhängig, daher kann man einen Riboswitch als eine Art Feedback-Inhibitor bezeichnen, der bei einer hohen Metabolit-Konzentration die Expression derjenigen Genprodukte herunterregelt, die für die Synthese seines gebundenen Metaboliten verantwortlich sind. Somit bieten Riboswitches einem Organismus die Möglichkeit, regulatorisch in die Genexpression einzugreifen.

Riboswitches liegen oftmals in der so genannten 5'-UTR (5'-*untranslated region*).<sup>49,64</sup> Es handelt sich dabei um einen mRNA-Abschnitt, der zu Beginn der Transkription synthetisiert und bei der darauf folgenden Translation nicht übersetzt wird. Die 5'-UTR endet bei einem Startcodon (meistens AUG) und beinhaltet bei Bakterien die Shine-Dalgarno-Sequenz, die vom Ribosom als Bindungsstelle erkannt wird.<sup>63</sup>

Im Fall einer niedrigen Metabolit-Konzentration wird zunächst wie in Abbildung 2.10 gezeigt die 5'-UTR, in der auch die Riboswitch RNA enthalten ist, von der RNA-Polymerase synthetisiert. Während dieses Vorgangs kann die naszierende mRNA-Kette Sekundärstrukturelemente ausbilden und tertiäre Wechselwirkungen eingehen.

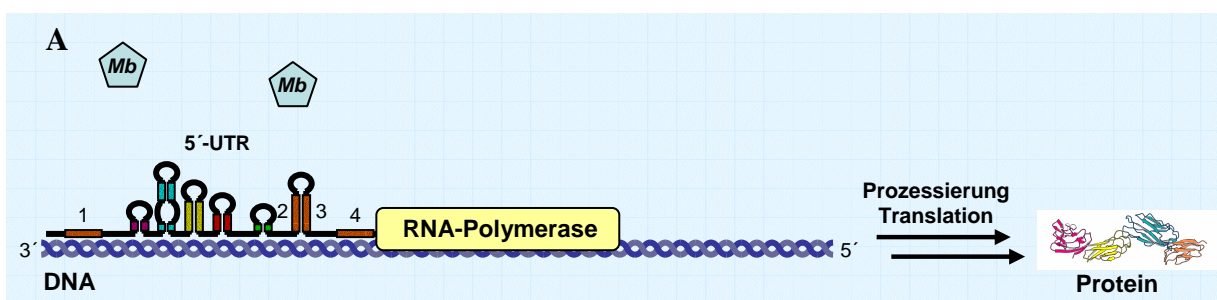


Abb. 2.10: Synthese einer 5'-UTR bei niedriger Konzentration des Metaboliten (Mb entspricht Metabolit). Nach Beendigung der mRNA-Synthese wird die reife mRNA am Ribosom übersetzt.

Die orange markierten Bereiche 2 und 3 bilden in diesem Fall einen Duplexbereich. Aufgrund der niedrigen Metabolit-Konzentration findet keine Bindung an den Riboswitch statt und die

mRNA-Synthese wird bis zur Terminatorsequenz fortgesetzt. Anschließend wird die mRNA prozessiert und am Ribosom übersetzt.

Liegt der Metabolit mit einer hohen Konzentration vor, bindet er an den betreffenden Riboswitch und stabilisiert dadurch eine neue Konformation des Schalters schon vor Beendigung der kompletten 5'-UTR (siehe Abb. 2.11 **B** und **C**). Eine entscheidende Rolle kommt im hier gezeigten Beispiel den orange gekennzeichneten Bereichen 1-4 zu (siehe Abb. 2.10). Die Bereiche 1 und 2 gehen durch die Bindung des Metaboliten von einer einzelsträngigen in eine doppelsträngige Struktur über und ermöglichen es der RNA so eine neue Konformation einzunehmen (**C**). Induziert durch diese vorgelagerte Strukturänderung können die Bereiche 2 und 3 nun nicht mehr wie im Fall **A** einen Duplex ausbilden. Stattdessen bildet sich durch Wechselwirkung der Bereiche 3 und 4 ein Terminator (**D**). Er sorgt dafür, dass sich die RNA-Polymerase und das 5'-UTR Transkript von der DNA ablösen und die Synthese der mRNA noch vor Erreichen des Startcodons zum Erliegen kommt (**E**).

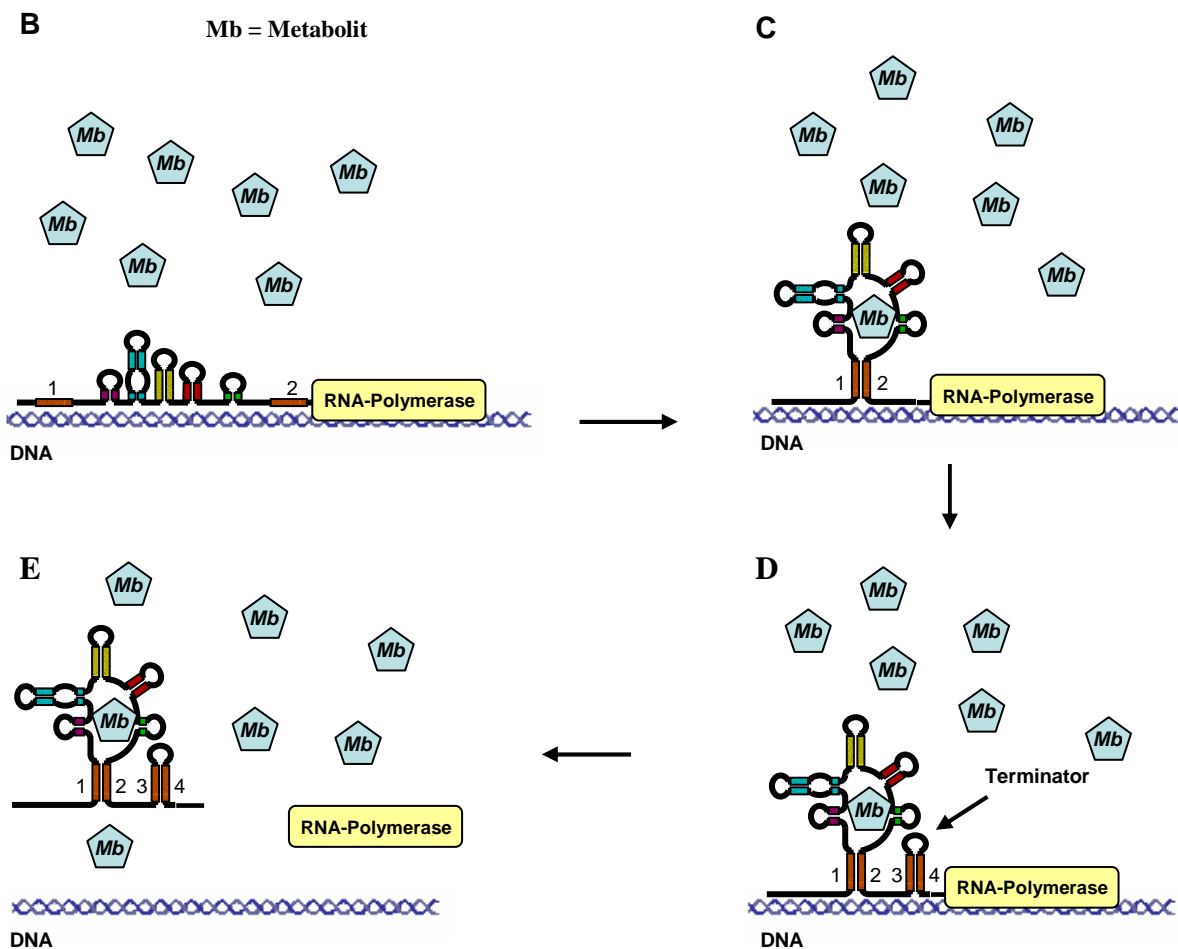


Abb. 2.11: Termination der Genexpression nach Bindung eines Metaboliten an einen Riboswitch in der 5'-UTR.

Zur anschaulichen Erläuterung der Begriffe Aptamer und Expressionsplattform an oben gezeigtem Beispiel dient Abb. 2.12.

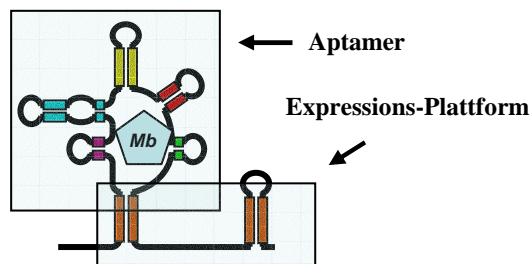


Abb. 2.12: Aptamer und Expressionsplattform

Neben dem gezeigten Mechanismus, durch den Riboswitches in die Genexpression eingreifen können, sind weitere Mechanismen zur Änderung der Proteinbiosynthese möglich. So kann die Bindung des Metaboliten eine Änderung in der Konformation der Shine-Dalgarno-Sequenz hervorrufen, wodurch

die Anlagerung am Ribosom und damit die Translation verhindert wird. Des Weiteren kann eine geänderte Konformation der mRNA nach Metabolitbindung Änderungen beim Spleißen hervorrufen und damit die Synthese geänderter Proteine oder eine verminderte Stabilität der reifen mRNA bedingen.<sup>64</sup> Die Bindung von Metaboliten kann aber auch zu Antitermination führen, falls die mRNA durch die Konformationsänderung nicht mehr in der Lage ist die räumliche Struktur des Terminators einzunehmen. In diesem Spezialfall erfüllt der Riboswitch das genaue Gegenteil seiner bislang besprochenen Funktion. Er sorgt dafür, dass die Synthese bestimmter Proteine nicht heruntergeregelt, sondern durch die Bindung des Metaboliten gefördert wird.<sup>64</sup>

Eine Besonderheit unter den Riboswitches bildet *glmS*. Bei *glmS* handelt es sich um ein selbstspaltendes Ribozym, das *GlcN6P* als Ligand benötigt. Durch Bindung des Liganden wird jedoch nicht nur die Ribozymaktivität induziert, sondern gleichzeitig die Genexpression der *Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Amidotransferase* gedrosselt, die an der *GlcN6P*-Synthese beteiligt ist.<sup>63</sup> Daher kann *glmS* sowohl der Klasse der Ribozyme, als auch den Riboswitches zugeordnet werden. Es handelt sich also um einen Kohlenhydrat-bindenden Riboswitch mit Ribozymaktivität.

Untersuchungen an *Bacillus subtilis* zeigen, dass etwa 2 % der Gene dieses Bakteriums durch Riboswitches kontrolliert werden.<sup>64</sup> Diese Zahl verdeutlicht, dass Riboswitches ein wichtiges Kontrollelement für die Genexpression sind.

### 3 RNA-Liganden

Die in Kapitel 2 beschriebenen Funktionen von RNA-Molekülen in Viren, eukaryotischen und prokaryotischen Zellen verdeutlicht, dass strukturelle und funktionelle Modifikationen dieser Biomoleküle, zum Beispiel durch Bindung von RNA-Liganden, ein großes Potential für das gezielte Eingreifen in biologische Prozesse birgt.

Das Andocken von Wirkstoffen an RNA-Bindungsstellen kann durch Wechselwirkungen mit Phosphatgruppen, RNA-Basen (Imitation von Basenstapelung oder Ausbildung von Pseudobasenpaaren), Magnesiumionen, gleichzeitige Wechselwirkung mit Phosphatgruppen und RNA-Basen oder im Falle des Ribosoms auch durch zusätzliche Bindung an Proteinseitenketten ermöglicht werden. Da RNA sowohl in Viren als auch in Bakterien zu finden ist, stellt sie ein äußerst interessantes Ziel für die gezielte Synthese neuer Wirkstoffe dar.

Die Funktionalität eines großen RNA-Moleküls wird vor allem durch die Art seiner Faltung, also durch die Ausbildung tertiärer RNA-RNA-Wechselwirkungen erzeugt. Dabei führt die Vielzahl an möglichen tertiären Wechselwirkungen<sup>19</sup> (siehe Kapitel 2.2) zu einer großen Flexibilität bei der Erzeugung unterschiedlicher Bindungsstellen und daraus resultierend zu einer großen Bandbreite an möglichen Angriffspunkten für RNA-Liganden.<sup>58</sup> Doch nicht nur tertiäre Wechselwirkungen, sondern auch Sekundärstrukturelemente (große Furche, kleine Furche, Schlaufen, Ausstülpungen) bilden räumliche Strukturen, mit denen unterschiedliche Liganden eine Bindung eingehen können. Der Energiegewinn bei der Ausbildung räumlicher RNA-Strukturen liegt in der Regel zwischen -5 und -10 kcal/mol und ist vergleichbar mit dem Energiegewinn bei der Ausbildung der Tertiärstruktur von Proteinen. Dieser Energiegewinn resultiert jedoch vor allem aus der Bildung der RNA-Sekundärstrukturelemente und nicht aus tertiären Wechselwirkungen. Bindet ein Molekül an eine RNA mit einer Bindungskonstante im nanomolaren Bereich ist dies absolut ausreichend, um mit der RNA-Faltung zu konkurrieren und so die Struktur und damit die Funktion der betreffenden RNAs *in vivo* zu beeinflussen.

Die Faltung der RNA durch tertiäre Wechselwirkungen führt zur Bildung von Taschen (*pockets*) und Höhlen (*cavities*), die analog zu den Proteinen, eine formspezifische Bindung ermöglichen. Bedingt durch die elektronische Struktur der RNA ist innerhalb dieser Taschen und Höhlen die Anwesenheit von positiv geladenen Ionen oder gebundenem Wasser notwendig, um der elektronischen Abstoßung der Phosphatgruppen entgegen zu wirken. Dies legt nahe, dass neben der Formspezifität auch die präzise Positionierung positiver Ladung bei

potentiellen RNA-Liganden eine wichtige Rolle spielt. Diese These wurde als „Konzept der strukturellen, elektrostatischen Komplementarität“ bezeichnet und zunächst anhand von Moleküldynamikrechnungen der Aminoglycoside Tobramycin und Neomycin im Komplex mit dem Hammerhead-Ribozym gestützt.<sup>65,66</sup> Die Berechnungen zeigen, dass die Positionen der Ammoniumgruppen von Tobramycin und Neomycin sehr genau mit den Positionen von drei, bzw. vier der natürlich gebundenen Magnesiumionen übereinstimmen. Bei der Bindung nimmt das Aminoglycosid eine Konformation ein, bei der die Abstände zwischen den Ammoniumgruppen vergleichbar mit den Abständen von Magnesiumionen in vielen katalytisch aktiven RNAs sind. Viele weitere Arbeiten in den letzten Jahren zeigen, dass die Verwendung des Konzepts der strukturellen, elektrostatischen Komplementarität ein viel versprechender Ansatz für die Synthese und Entwicklung neuer RNA-Liganden ist.

Ein bedeutendes Ziel für RNA-Liganden bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen ist das Ribosom, das durch seinen Aufbau aus großen RNAs und Proteinen vielfältige Bindungsmotive für Wirkstoffe aller Art bereitstellt. Über 50 % aller bekannten Antibiotika binden an ribosomale RNA und erlangen ihre antibiotische Wirkung indem sie in die Proteinbiosynthese eingreifen.<sup>58</sup> Sehr interessant ist die Entwicklung von RNA-Liganden auch in Bezug auf Retroviren wie dem HI-Virus. Retroviren gehören zur Klasse der RNA-Viren, da ihre Erbinformation nicht als DNA, sondern als Einzelstrang-RNA vorliegt. Das Genom der Retroviren ist diploid angelegt, wird nach Eintritt in die Wirtszelle durch die *reverse Transkriptase* in DNA umgeschrieben und anschließend mit Hilfe der Integrase in das Genom der Wirtszelle eingebaut. Eine Bindung von Liganden an die virale RNA und ein dadurch bedingtes Eingreifen in ihren Replikationszyklus stellt einen möglichen Ansatz zu ihrer Bekämpfung dar.

Eine sehr gut untersuchte Klasse von RNA-Liganden sind die Aminoglycoside. Sie binden an das Ribosom und greifen so in den Translationsprozess ein. An ihnen werden in den nächsten Kapiteln stellvertretend für viele unterschiedliche Gruppen von RNA-Liganden grundlegende Mechanismen der Bindung an RNA erläutert. Zusätzlich sollen einige Modifikationen, die zum Erwerb von Resistenzen führen, sowie Probleme der Toxizität durch RNA-bindende Moleküle am Beispiel der Aminoglycoside dargelegt werden.

### 3.1 Aminoglycoside

Aminoglycoside sind strukturell ähnliche, Aminogruppen-tragende Zuckerderivate, welche in der Lage sind, an RNA-Sequenzen mit bestimmten Sekundärstrukturelementen zu binden. Sie

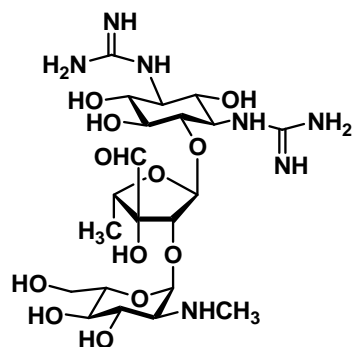


Abb. 3.1: Streptomycin

vermögen es durch Bindung an das bakterielle Ribosom in die Proteinbiosynthese einzugreifen und werden daher in der Therapie von Infektionen Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien als Antibiotika mit bakterizider Wirkung eingesetzt.<sup>67,68</sup> Aminoglycoside zeigen einen ausgeprägten postantibiotischen Effekt, wirken vielfach synergistisch mit anderen Wirkstoffen und besitzen oft vorhersagbare pharmakokinetische Eigenschaften, was sie für den klinischen Einsatz als Breitbandantibiotika prädestiniert.<sup>68-70</sup>

Im Jahr 1944 konnte mithilfe des Aminoglycosids Streptomycin - für dessen Entdeckung im Jahr 1952 der Nobelpreis verliehen wurde - ein erster therapeutischer Erfolg im Kampf gegen die durch das *Mycobacterium tuberculosis* verursachte Tuberkulose erzielt werden.

Streptomycin wurde wenige Jahre zuvor an der Rutgers University in New Jersey von A. Schatz und S. A. Waksman entdeckt<sup>71</sup> und ist eines von vielen natürlichen Aminoglycosiden, die heutzutage Anwendung in der Behandlung bakterieller Infektionen finden.<sup>67</sup> Neben den natürlichen Aminoglycosiden, die überwiegend biosynthetisch aus *Actinomyceten* der Gattungen *Streptomyces* und *Micromonospora* gewonnen werden, wurde eine Reihe von semisynthetischen Aminoglycosiden entwickelt, die vor allem durch das Auftreten von resistenten Bakterienstämmen zunehmend an Bedeutung gewinnen.<sup>67,72</sup> Die Anwendungsbereiche einer kleinen Auswahl unterschiedlicher Aminoglycoside sind in Tabelle 1 zusammengefasst und verdeutlichen ihren Wert im Kampf gegen unterschiedliche bakterielle Infektionen.

Tab. 3.1: Anwendungsgebiete verschiedener Aminoglycosid-Antibiotika

<i>Aminoglycosid</i>	<i>Therapeutische Anwendung</i>
Streptomycin	Tuberkulose, Pest, Hasenpest
Neomycin	Verbrennungen, Dermatitis, Harnwegsinfektionen
Paromomycin	Amöbenruhr, Leishmaniose
Gentamicin	Pneumonie, Morbus Ménière, Augeninfektionen
Kanamycin	Tuberkulose, Augeninfektionen, Mastitis

### 3.1.1 Struktur und Wirkmechanismus von Aminoglycosiden

Die Aminoglycoside verdanken ihren Namen ihrem Aufbau aus einem zentralen Aminocyclitol, welches *O*-glycosidisch mit einem oder mehreren Zuckern und Aminozuckern verknüpft ist. Im Fall von Streptomycin (siehe Abb. 3.1) bildet ein Streptaminring das zentrale Aminocyclitol. Bei den meisten klinisch relevanten Aminoglycosiden hingegen bildet ein 2-Desoxystreptaminring die zentrale Einheit (siehe Ring II in Abb. 3.2).<sup>72</sup> Die Aminoglycoside der 2-Desoxystreptamin-Klasse lassen sich in 4,5-disubstituierte und 4,6-disubstituierte Verbindungen unterteilen und enthalten typischerweise drei bis sechs Aminogruppen.

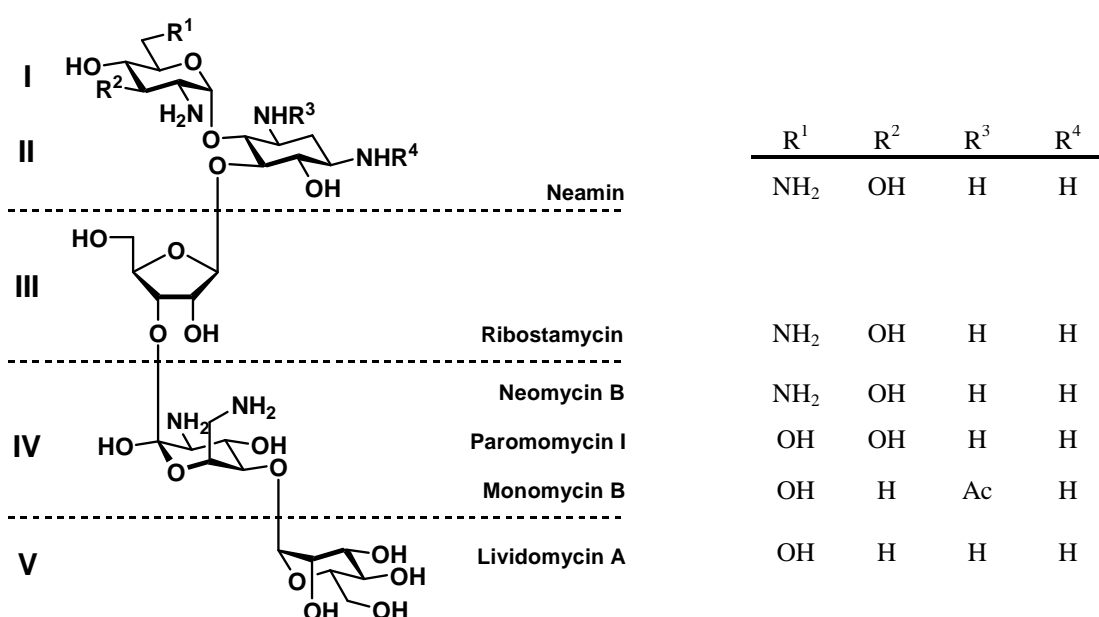


Abb. 3.2: Aminoglycoside der 4,5-disubstituierten 2-Desoxystreptamin-Klasse

Die Abbildungen 3.2 und 3.3 zeigen eine Auswahl unterschiedlicher Aminoglycoside der 2-Desoxystreptamin-Klasse. Bei allen Aminoglycosiden dieses Typs ist der als Ring I gekennzeichnete Pyranring *O*-glycosidisch mit der 4-OH-Gruppe des 2-Desoxystreptaminrings verbunden, wobei er stets in einer Glucopyranosekonfiguration vorliegt. Weitere Ringe sind entweder mit der 5-OH (4,5-disubstituierte) oder mit der 6-OH-Gruppe (4,6-disubstituierte) des zentralen Aminocyclitols verknüpft.

Untersuchungen zur Basizität der Aminofunktionalitäten zeigen, dass die Aminoglycoside unter physiologischen Bedingungen mit pKs-Werten zwischen 5.7 und 10.1 als Polykationen vorliegen.<sup>73-77</sup> Neben den hier gezeigten, existieren weitere Aminoglycoside, die ungewöhnliche Substituenten und Verknüpfungsmuster aufweisen. Ihre Strukturen können Übersichtsartikeln von Magnet et al.<sup>72</sup>, sowie Silva et al.<sup>67</sup> entnommen werden.

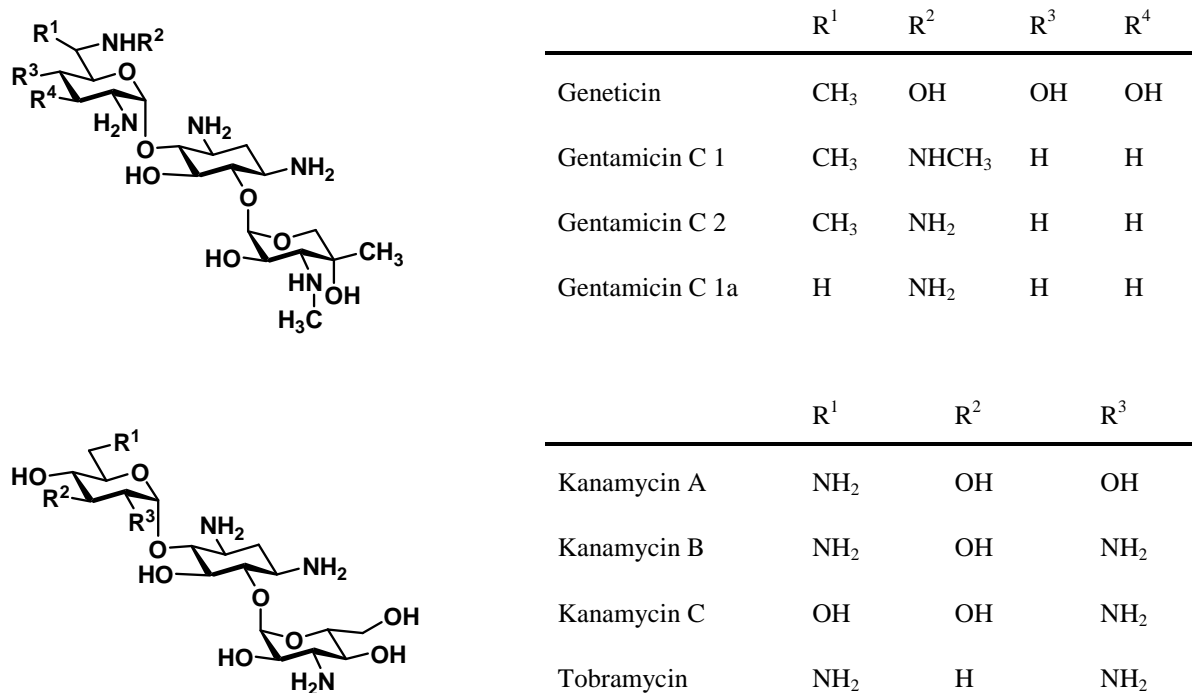


Abb. 3.3: Aminoglycoside der 4,6-disubstituierten 2-Desoxystreptaminklasse

Durch die Bindung der bei physiologischem pH-Wert positiv geladenen Aminogruppen an konformativ rigide Sechsringe, wird eine präzise Positionierung der Ladungsträger bei den Aminoglycosiden möglich. Dies gestattet eine formspezifische Bindung an vorgegebene räumliche RNA-Strukturen und macht die Aminoglycoside und ihre Mimetika im Hinblick auf das Konzept der strukturellen, elektrostatischen Komplementarität (siehe Einleitung zu Kapitel 3) zu einer interessanten Substanzklasse.

Das intrazelluläre Target fast aller Aminoglycoside ist die 16S rRNA bakterieller Ribosomen. Die Aminoglycoside der Tobramycin- und der Paromomycinklasse beispielsweise erlangen ihre biologische Wirkung indem sie an den A-Ort der 16S rRNA binden und so in den Translationsprozess eingreifen.<sup>58,72</sup>

Die Aufklärung des Wirkmechanismus von Aminoglycosiden wurde unter anderem durch hochaufgelöste Röntgenstrukturen unterschiedlicher Aminoglycoside in Komplexen mit Modell-RNAs möglich. Diese, im Verhältnis zur natürlichen Struktur sehr kurzen RNA-Moleküle, imitieren die Bindungsstelle der Aminoglycoside am A-Ort und sind in der Lage die Aminoglycoside auf die gleiche Weise wie das vollständige Ribosom zu binden.<sup>58</sup> Abbildung 3.4A zeigt eine Schlüsselsequenz innerhalb der 16S rRNA von *E. coli*, die für den Dekodierungsschritt (korrekte Anlagerung der tRNA an die mRNA) bei der Elongation von entscheidender Bedeutung ist. Sie ist Teil einer kleinen Furche innerhalb einer helicalen

Struktur am A-Ort und fungiert als molekularer Schalter, der bei der Dekodierung von einer „off-Konformation“ in eine „on-Konformation“ übergeht.<sup>58</sup>

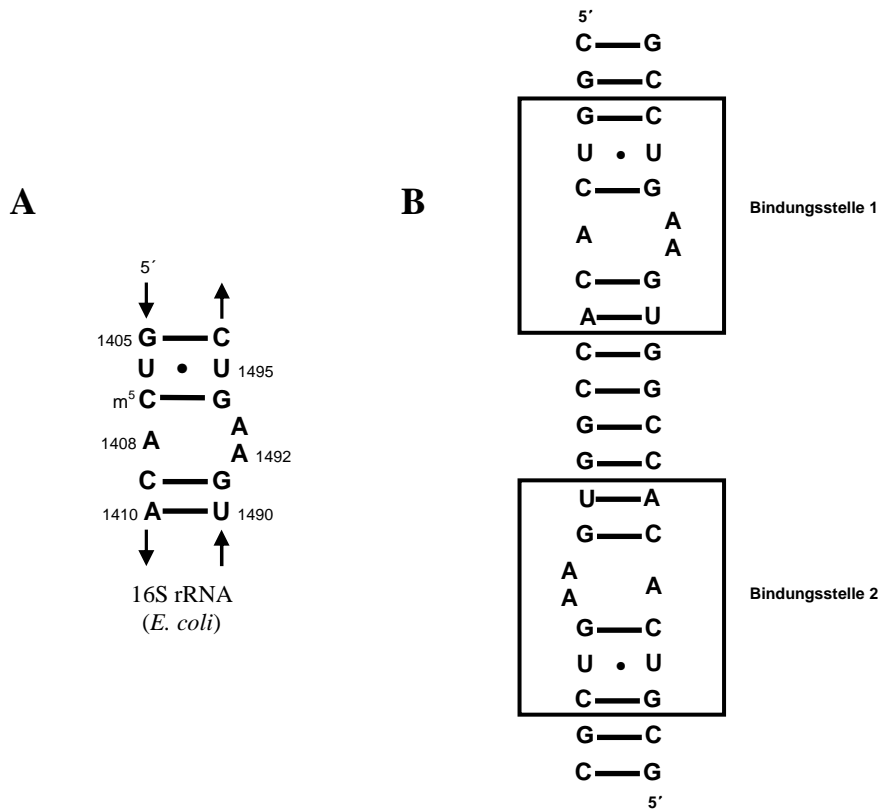


Abb. 3.4: Sequenz aus einer prokaryotischen 16S rRNA (A), die eine zentrale Rolle bei der Codon-Anticodon-Erkennung spielt, im Vergleich zu einer von Westhof et al. verwendeten Modell-RNA (B) für die kristallographische Aufklärung der Bindung unterschiedlicher Aminoglycoside an den A-Ort.<sup>78-80</sup>

An der in Abbildung 3.4A gezeigten Struktur ist zu erkennen, dass die drei Adenosinreste 1408, 1492 und 1493 eine innere Schlaufe bilden. In der „off-Konformation“ sind die Adenosinreste 1492 und 1493 in die kleine Furche hinein gefaltet, während sie in der „on-Konformation“ eine Ausstülpung in ihrem Strang bilden.<sup>81,82</sup> Dieser Übergang ermöglicht A1492 und A1493 eine spezifische Wechselwirkung mit zwei von drei Basenpaaren, welche bei der Codon-Anticodon-Erkennung gebildet werden. Diese Wechselwirkung ist essentiell für die Anlagerung der korrekten tRNA (*cognate tRNA*)<sup>58</sup> und führt dazu, dass das Ribosom von einer offenen in eine geschlossene Form übergeht. Die geschlossene Form wird durch Anlagerung der *cognate tRNA* stabilisiert.<sup>83,84</sup>

Die Bindung eines Aminoglycosids bewirkt nun, dass das Ribosom in der offenen Form bleibt und der Übergang in die geschlossene Form verhindert wird. Dadurch verliert das Ribosom seine Fähigkeit zwischen *cognate* und *noncognate* tRNA-mRNA-Wechselwirkungen zu unterscheiden, wodurch falsche Aminosäuren in die wachsende Peptidkette eingebaut und fehlerhafte Proteine synthetisiert werden.<sup>58</sup> Die Aminoglycoside greifen in diesem Fall also in

die Elongation der Peptidketten ein. Neben Fehlern bei der Elongation können verschiedene Aminoglycoside auch Fehler bei der Translokation auslösen. Dieser Vorgang ist jedoch noch nicht in allen Einzelheiten verstanden.<sup>58,72</sup>

Abbildung 3.4B zeigt eine von Westhof et al. synthetisierte Modell-rRNA, die ein Motiv aus der Sequenz einer prokaryotischen 16S rRNA repräsentiert und eine zentrale Rolle bei der Codon-Anticodon-Erkennung spielt. Von dieser Modell-rRNA wurden Kristallstrukturen im Komplex mit Tobramycin, Paromomycin und Geneticin gelöst.<sup>78-80</sup> Sie gestatten einen tiefgehenden Einblick in die unterschiedlichen Wechselwirkungen die Aminoglycoside mit der ribosomalen 16S rRNA eingehen.

In Abbildung 3.5 ist die Struktur der in Abbildung 3.4B gezeigten Modell-rRNA im Komplex mit Paromomycin gezeigt. Man erkennt, dass der Großteil der zur Bindung beitragenden Wechselwirkungen von den Ringen I und II, also von der Neamineinheit des Aminoglycosids ausgeht.

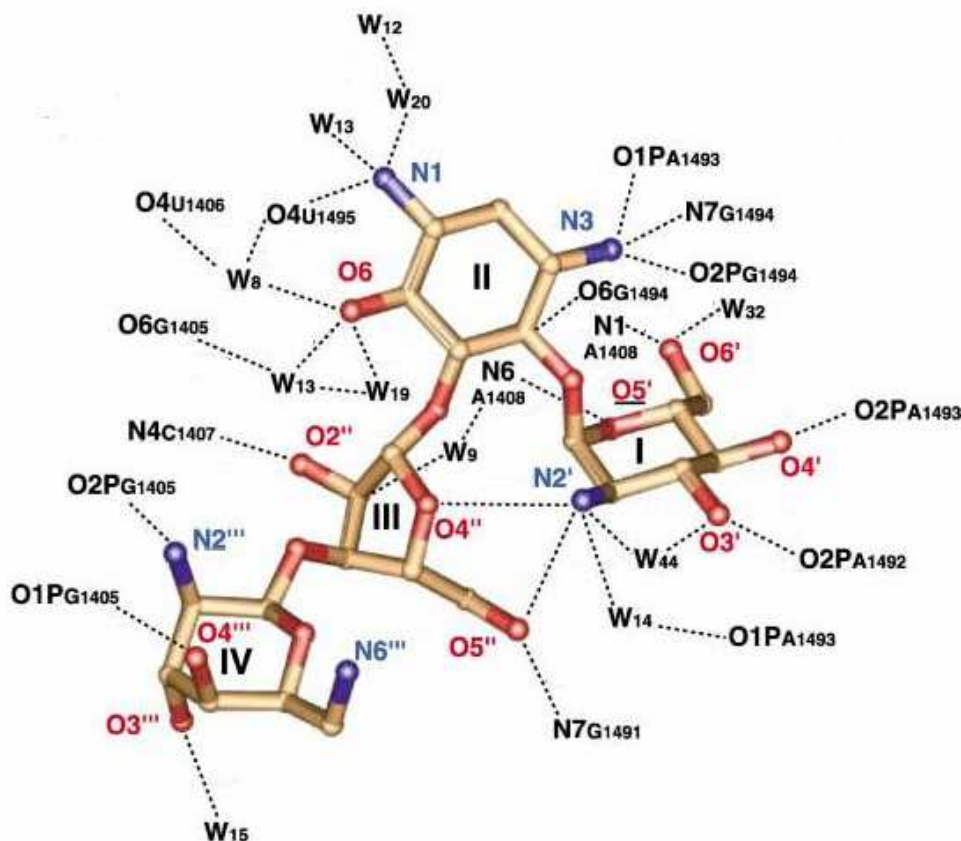


Abb. 3.5: Struktur von Paromomycin im Komplex mit einer von Westhof et al. synthetisierten Modell-RNA (siehe auch Abb. 3.4). Die Daten wurden entnommen aus Lit<sup>79</sup>.

- W steht für das Sauerstoffatom eines Wassermoleküls.
- H-Brückenbindungen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.
- Die Nummerierung der Nucleotide orientiert sich an der Nummerierung des A-Orts von *E. coli* (siehe auch Abb. 3.4).

Es ist weiterhin zu erkennen, dass die Bindung der Aminoglycoside an rRNA durch ein dichtes Geflecht von Wasserstoffbrückenbindungen geprägt ist. Es sind vor allem die Ammoniumgruppen der Neaminuntereinheit, die solche Wasserstoffbrücken mit räumlich nahestehenden Sauerstoffen von Wassermolekülen oder Zuckern ausbilden. Dies verdeutlicht wie wichtig die Anwesenheit von exakt positionierten Aminogruppen bei den Aminoglycosiden für deren Bindung an RNA ist.

Ebenfalls eine Rolle spielen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Unterseiten der Zuckerreste und den Nucleotidbasen.

Durch die von Westhof et al. gelösten Strukturen konnte die zuvor beschriebene zentrale Rolle der Bindung der Aminoglycoside an die Adenosine A1408, A1492 und A1493 untermauert werden. Sie sind nach Ausbildung des Komplexes fixiert, sodass das Ribosom seine Konformation bei der Verknüpfung der Aminosäuren nicht mehr in der nötigen Weise ändern kann.

Neben Untersuchungen an Kristallstrukturen wurden mit Hilfe der NMR-Spektroskopie Untersuchungen zur Komplexbildung von Paromomycin und Gentamicin und einer Modell-rRNA der A-Bindungstasche in Lösung durchgeführt.<sup>85-88</sup> Ein Vergleich von Strukturen in Lösung und im Kristall zeigt, dass die wesentlichen Wechselwirkungen zwischen Aminoglycosiden und rRNA gleich sind. Geringe Unterschiede im Vergleich zur Kristallstruktur konnten lediglich in der Anordnung der Adenosinreste A 1492 und A 1493 und im Fall von Paromomycin in der Position von Ring IV und den Nucleotiden U1406 und C1407 festgestellt werden.

Aminoglycoside vermögen es nicht nur durch Bindung an ribosomale RNA in biologische Prozesse einzugreifen. Sie sind in der Lage eine ganze Reihe weiterer Prozesse *in vivo* zu beeinflussen. So beeinflussen sie beispielsweise die Wechselwirkung zwischen dem HIV-1 Rev Protein und seinem RNA-Target dem Rev-Response-Element<sup>89</sup> oder auch das Spleißen der selbstspleißenden Gruppe-I-Introns.<sup>90,91</sup> Zudem wurden in der Literatur Wechselwirkungen mit dem Hairpin-<sup>92</sup> und dem Hammerheadribozym,<sup>93,94</sup> sowie dem Hepatitis Delta Virus beschrieben.<sup>95,96</sup>

### 3.1.2 Resistenzen gegen Aminoglycoside

Resistenzen gegen Aminoglycoside können im Wesentlichen durch drei unterschiedliche Modifikationen begründet sein:

- Modifikationen des Wirkorts, also des Ribosoms oder im speziellen der 16S rRNA
- Enzymatische Modifikationen des Aminoglycosids
- Modifikationen innerhalb des Bakteriums, die zu einer verminderten Aufnahme des Aminoglycosids führen

#### I. Modifikationen des Wirkorts

Zu den wichtigsten Modifikationen, welche zu einer Verminderung der Wirksamkeit von Aminoglycosiden führen können, zählt die Methylierung der 16S rRNA. Viele Aminoglycosid-produzierende Organismen schützen sich selbst gegen Aminoglycoside, indem sie rRNA-Methylasen exprimieren, die in der Lage sind die 16S rRNA an Positionen zu modifizieren, die für eine Bindung des Aminoglycosids wichtig sind.<sup>72,97</sup> So führt eine Methylierung an N1 des Adenosinrests 1492 zu einer hohen Resistenz gegen Kanamycin, Tobramycin, Sisomycin und Apramycin.<sup>97,98</sup> Eine enzymatische Modifikation von N7 des Guanosinrests 1405 führt zur Resistenz gegenüber allen 4,6-disubstituierten Desoxystraptaminen.<sup>97,99</sup>

Eine weitere Möglichkeit zur Verminderung der Wirksamkeit von Aminoglycosiden kann in einer Mutation des Ribosoms begründet sein. Da Ribosomen archaische, hochkonservierte Strukturen sind, deren Form und Aufbau essentiell für die Proteinbiosynthese ist, wird eine Mutation des Ribosoms jedoch im Regelfall zu keiner lebensfähigen Spezies führen. Dieser Fall ist daher auch selten anzutreffen und momentan nur für Streptomycin bei der Anwendung gegen *M. tuberculosis* klinisch relevant.<sup>72</sup>

#### II. Enzymatische Modifikationen des Aminoglycosids

Enzyme, die zu einer Resistenz gegenüber Aminoglycosiden führen können, gehören im Wesentlichen den Klassen der Aminoglycosid-Adenylyltransferasen, Aminoglycosid-Phosphotransferasen oder Aminoglycosid-Acetyltransferasen an. Die Aminoglycosid-Adenylyltransferasen sind eine kleine Gruppe von Enzymen, von denen bislang nur etwa ein Dutzend entdeckt wurde. Sie katalysieren die Reaktion zwischen Mg-ATP und Aminoglycosiden, wodurch ein O-adenyliertes Aminoglycosid und ein Mg-Pyrophosphat-Chelat entstehen (siehe Abb. 3.6).<sup>72</sup>

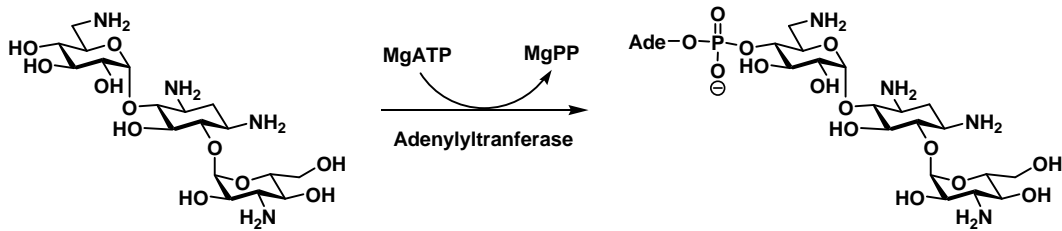


Abb. 3.6: Modifikation eines Aminoglycosids durch eine Adenylyltransferase gezeigt am Beispiel der MgATP-abhängigen 4'-O-Adenylylierung von Kanamycin A.

Aminoglycosid-Phosphotransferasen bilden hingegen eine sehr große Gruppe Aminoglycosid-modifizierender Enzyme. Sie katalysieren die regioselektive Übertragung der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe eines ATP-Moleküls auf eine Hydroxylgruppe eines Aminoglycosids (siehe Abb. 3.7). Diese einfache Modifikation ist bei einer Vielzahl von Resistenzen von Enterokokken und Staphylokokken beobachtet worden. In der Regel wird lediglich eine OH-Gruppe des Aminoglycosids spezifisch phosphoryliert. Im hier gezeigten Beispiel ist dies die 3'-OH-Gruppe von Kanamycin A. Diese Modifikation führt zur Resistenz von Bakterien, welche die entsprechende Phosphotransferase exprimieren. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass diese Bakterien jedoch nicht resistent gegen Aminoglycoside ohne 3'-OH-Gruppe waren. Es zeigte sich im Gegenteil, dass Aminoglycoside ohne 3'-OH-Gruppe inhibitorisch auf die entsprechende Phosphotransferase wirken, da das Enzym eine Bindungsaffinität zu den Aminoglycosiden im mikromolaren Bereich aufweist und die Übertragung der Phosphorylgruppe in diesem Fall nicht katalysieren kann.

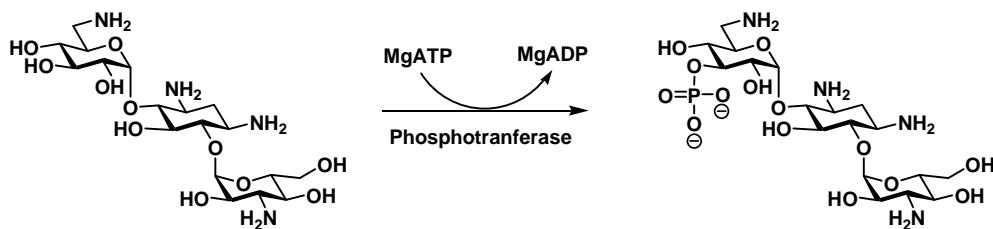


Abb. 3.7: Modifikation eines Aminoglycosids durch eine Phosphotransferase gezeigt am Beispiel der MgATP-abhängigen 3'-O-Phosphorylierung von Kanamycin A.

Während die beiden zuvor erwähnten Enzymklassen die Modifikation von Hydroxylgruppen katalysieren, katalysieren die Aminoglycosid-Acetyltransferasen die spezifische, Acetyl-CoA-abhängige Acetylierung der Aminogruppen eines Aminoglycosids. Diese N-Acetyltransferasen bilden die grösste Klasse Aminoglycosid-modifizierender Enzyme. Ein Beispiel für die Modifikation eines Aminoglycosids durch eine Aminoglycosid-Acetyltransferase ist in Abbildung 3.8 gezeigt.

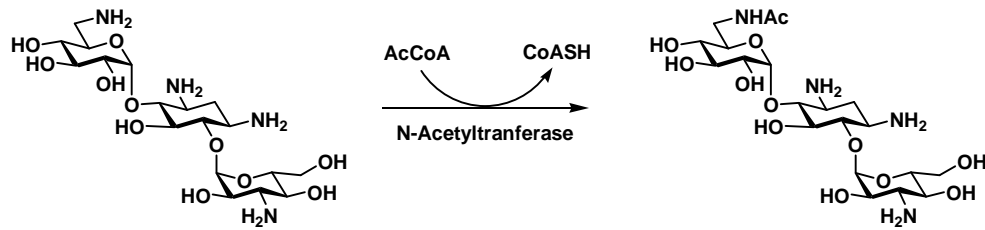


Abb. 3.8: Modifikation eines Aminoglycosids durch eine N-Acetyltransferase gezeigt am Beispiel der AcCoA-abhängigen 6'-N-Acetylierung von Kanamycin A.

Weitere Einzelheiten und Beispiele über enzymatische Modifikationen die zu Aminoglycosidresistenzen führen, können einem Übersichtsartikel von Magnet et al. entnommen werden.<sup>72</sup>

### III. Modifikationen innerhalb des Bakteriums, die zu einer verminderten Aufnahme des Aminoglycosids führen

Eine verminderte Aufnahme der Aminoglycoside oder die Aktivierung eines intrazellulären Mechanismus der zu einem schnellen Ausschleusen der Aminoglycoside aus der Zelle beiträgt haben ebenfalls großen Einfluss auf ihre Wirksamkeit. Obwohl der genaue Mechanismus der Aufnahme von Aminoglycosiden in die Zelle weiterhin nicht geklärt ist, wird die Annahme eines dreistufigen Prozesses allgemein akzeptiert.<sup>100,101</sup>

Im ersten Schritt adsorbiert das kationisch vorliegende Aminoglycosid an die Zelloberfläche, indem elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Lipopolysacchariden der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien ausgebildet werden.<sup>72</sup> Aus diesem Grund konnte bei Bakterien mit geringer negativer Ladung der Lipopolysaccharide auf der Zelloberfläche eine schwache Resistenz gegenüber einigen Aminoglycosiden festgestellt werden.<sup>102</sup>

Das gemeinsame Charakteristikum des zweiten und des dritten Schritts besteht in einer Abhängigkeit vom Transmembranpotential, welches durch die Atmungskette in der Zelle hervorgerufen wird. Daher wird bei Bakterien, deren Atmungskette durch Mutationen modifiziert wurde, eine verminderte Aufnahme von Aminoglycosiden beobachtet. Ebenso zeigen Bakterien mit funktionellen Mutationen in der ATP-Synthase eine verminderte Aminoglycosidaufnahme. Anaerobe Bakterien sind demzufolge intrinsisch resistent gegen Aminoglycoside.<sup>100,103,104</sup>

Eine weitere interessante Möglichkeit die Aufnahme von Aminoglycosiden zu verringern liegt bei mucoiden Bakterien vor. Sie produzieren ein extrazelluläres Alginat, das nicht nur die Phagozytose durch Monozyten stört, sondern aufgrund seiner viskosen, polyanionischen Struktur als eine Art ionische Falle für die polykationisch vorliegenden Aminoglycoside wirkt.<sup>105</sup>

## 4 **Resisting Resistance - Aminoglycosidmimetika**

Die Entwicklung von Aminoglycosidmimetika ist aus unterschiedlichen Gründen sowohl für die klinische Anwendung, als auch für die Forschung interessant. Aminoglycoside gehören zu den wirksamsten aller bekannten Antibiotika und werden häufig als sogenannte *second-line Antibiotika* (auch Reserve- oder Notfallantibiotika) verschrieben. Aminoglycoside die sich heutzutage im klinisch-therapeutischen Einsatz befinden haben jedoch den Nachteil, dass sie bei lang andauernder Behandlung eine hohe Nephrotoxizität und neuromuskuläre Blockaden zur Folge haben können.<sup>67,106,107</sup> Bei hoher Dosierung wirken sie zudem ototoxisch und bewirken einen partiellen oder völligen, irreversiblen Hörverlust.<sup>108</sup> Die Entwicklung von Aminoglycosidmimetika die ein ähnliches Wirkspektrum wie die natürlich vorkommenden Aminoglycoside zeigen, jedoch ein geringeres Potential für gefährliche Nebenwirkungen haben, wäre daher für die klinische Anwendung äußerst interessant. Zudem könnten sie als sogenannte *third-line Antibiotika* gegen resistente Keime Verwendung finden, die mit derzeit verfügbaren Antibiotika nicht oder kaum noch behandelbar sind.

Da Aminoglycoside in der Lage sind, an RNA Moleküle zu binden und so in vielfältiger Weise in RNA-gesteuerte Prozesse von Eukaryoten, Prokaryoten und auch Viren eingreifen können, bieten ihre Mimetika ein hervorragendes Experimentierfeld, um neue RNA-Motive aufzuspüren, die sich durch RNA-Liganden beeinflussen lassen. Darüber hinaus können durch die Entwicklung neuer Aminoglycosidmimetika bislang unbekannte Leitstrukturen für die Bindung an RNA entwickelt und identifiziert werden.

Das Ziel der Entwicklung von Aminoglycosidmimetika sollte die Herstellung kleiner Moleküle, mit möglichst einfacher Struktur sein, die einfach zu synthetisieren sind und ihre natürlichen Vorbilder in den Punkten RNA-Affinität, Selektivität, antibiotische Wirksamkeit und Resistenz gegenüber modifizierenden Einflüssen übertreffen.

Mikroorganismen haben, wie in Kapitel 3.1.2 gezeigt, Strategien und Abwehrmechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, eine Behandlung mit Aminoglycosiden erfolgreich zu überstehen. Ähnlich wie bei der Entwicklung von  $\beta$ -Lactamase Inhibitoren für  $\beta$ -Lactam Antibiotika wird auch bei den Aminoglycosiden versucht Inhibitoren gegen Aminoglycosid-modifizierende Enzyme zu entwickeln. Diese können in einer Kombinationstherapie zusammen mit Aminoglycosiden verabreicht werden und steigern so deren Wirksamkeit. Idealerweise können Aminoglycoside selbst derart modifiziert werden, dass sie nicht oder nur mäßig von Enzymen verändert werden, aber gleichzeitig ihre antibakterielle Wirkung behalten. Ein Beispiel für einen erfolgreichen Ansatz zur Herstellung *resistenter*

Aminoglycoside ist das in Abbildung 4.1 a) gezeigte verbrückte Neamin Dimer, das mit einem MIC-Wert von 6.25  $\mu\text{M}$  sehr gute antibakterielle Eigenschaften zeigt und gleichzeitig ein sehr schlechtes Substrat für unterschiedliche Acetyltransferasen darstellt.<sup>109</sup>

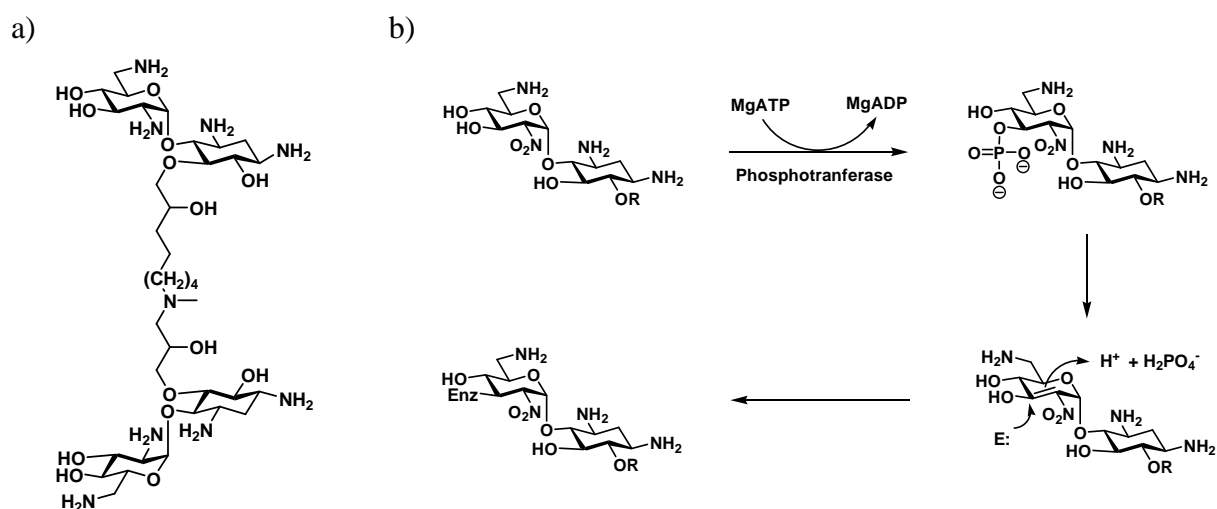


Abb. 4.1: a) Ein verbrücktes Neamin-Dimer, welches schlecht durch Acetyltransferasen modifiziert werden kann und gleichzeitig seine antibakterielle Wirkung behält. b) Von Mobashery et al. postulierter Mechanismus der Reaktion von 2-Nitrokanamycin mit einer Phosphotransferase.<sup>110</sup>

In der Gruppe von S. Mobashery wurde eine Reihe von Aminoglycosidanaloga synthetisiert und untersucht, welche in der Lage sind die Aktivität bestimmter Phosphotransferasen (im gezeigten Fall APH(3')) zu vermindern.<sup>110</sup> Unter anderem wurden 2'-Nitrokanamycine dargestellt, für deren inhibierende Wirkung der in Abbildung 4.1 b) dargestellte Mechanismus postuliert wurde: Nach Phosphorylierung durch das Enzym wird aufgrund der zusätzlichen elektronenziehenden Wirkung der Nitrogruppe der  $\text{pK}_\text{S}$ -Wert des 2'-Protons derart vermindert, dass eine Eliminierung des Protons unter gleichzeitiger Abspaltung des Phosphatrestes ermöglicht wird. Das entstehende vinyloge Zwischenprodukt ist ein Michael-Akzeptor, der durch eine nucleophile Quelle innerhalb des Enzyms angegriffen werden kann. Die Reaktion führt zur Bindung des Enzyms an das Aminoglycosid und somit letztlich zur Inhibition des Enzyms.

Das ebenfalls in der Gruppe von S. Mobashery synthetisierte Aminoglycosidanalogen 4',4'-Difluorkanamycin A führte bei Versuchen mit der Phosphotransferase APH(3') zu einer um einen Faktor von etwa  $10^3$  verminderten Wechselzahl des Enzyms. Grund hierfür sind die Fluoratome, die durch ihren Elektronenzug die Nucleophilie der benachbarten 3'-OH-Gruppe stark herabsetzen.<sup>111</sup> Das 4',4'-Difluorkanamycin A zeigte bei biologischen Tests mit APH(3') exprimierenden Bakterienstämmen dieselbe antibiotische Wirkung wie bei Tests mit

Bakterienstämmen des Wild-Typs. Ein Beweis dafür, dass dieses Analogon aufgrund der Modifikation durch die beiden Fluoratome *resistent* gegen die Phosphotransferase wird.

Diese, sowie zahlreiche weitere Beispiele zeigen, dass bereits geringe Veränderungen an Aminoglycosidderivaten ausreichen können, um gezielt gegen bekannte Abwehrmechanismen von Bakterien vorzugehen und verbesserte Wirkstoffe herzustellen. Modifizierte Aminoglycoside können entweder allein oder in Kombination mit bekannten Aminoglycosiden eingesetzt werden, um eine höhere Wirksamkeit gegenüber bakteriellen Infektionen zu gewährleisten.

In der Literatur wurde neben den hier angeführten Beispielen eine Vielzahl weiterer Ansätze zur Entwicklung von wirksamen Aminoglycosidmimetika beschrieben, bei denen oftmals durch lediglich geringe Modifikationen eine Verbesserung in der Bekämpfung Aminoglycosid-resistenter Bakterien erzielt werden konnte. Eine Übersicht über diese Ansätze und Strategien zur Synthese von Aminoglycosidmimetika geben Artikel von Silva,<sup>67</sup> Kotra,<sup>70</sup> Magnet,<sup>72</sup> Haddad,<sup>112</sup> sowie Sears und Wong.<sup>113,114</sup>

Im nachfolgenden Kapitel über *Zuckerdiaminosäuren als Bausteine für die Entwicklung neuer Aminoglycosidmimetika* soll ein Einblick in die zentralen Ideen und Fragestellungen bezüglich der Entwicklung neuer Aminoglycosidmimetika in dieser Doktorarbeit gegeben werden.

#### **4.1 Zuckerdiaminosäuren als Bausteine für die Entwicklung neuer Aminoglycosidmimetika**

Im Fall der Aminoglycoside sind die Kohlenhydratbausteine *O*-glycosidisch miteinander verknüpft. Diese Art der Verknüpfung ist bei einem rein synthetischen Ansatz zur Entwicklung neuer RNA-Liganden von Nachteil. Zwar existiert eine Reihe von etablierten Methoden für die Synthese von *O*-Glycosiden,<sup>11</sup> jedoch gelingt deren Synthese nicht immer mit den gewünschten Ausbeuten und Stereoselektivitäten. Aus diesem Grund werden modifizierte Aminoglycoside sehr häufig aus biosynthetisch gewonnenen Aminoglycosiden dargestellt.

Im Gegensatz zur *O*-glycosidischen Verknüpfung stellen Stereoselektivitäten und Ausbeuten bei der chemischen Verknüpfung einzelner Bausteine durch eine Peptidbindung für gewöhnlich kein Problem dar.<sup>12</sup> Unterschiedliche Arbeiten in den letzten Jahren zeigen, dass auch Carboxyl- und Aminogruppen-tragende Kohlenhydratbausteine, so genannte Zuckerdiaminosäuren, auf diese Art mit hohen Ausbeuten verknüpft werden können.<sup>13-17</sup> Beispiele dafür sind die in Abbildung 4.2 gezeigten Oligomere: ein Mimetikum des

Phytoalexinheptaglycosids, das durch den Einbau glycosylierter Zuckeraminosäuren synthetisiert wurde<sup>115</sup> und von Ménand et al. synthetisierte zyklische Oligomere.<sup>116</sup>

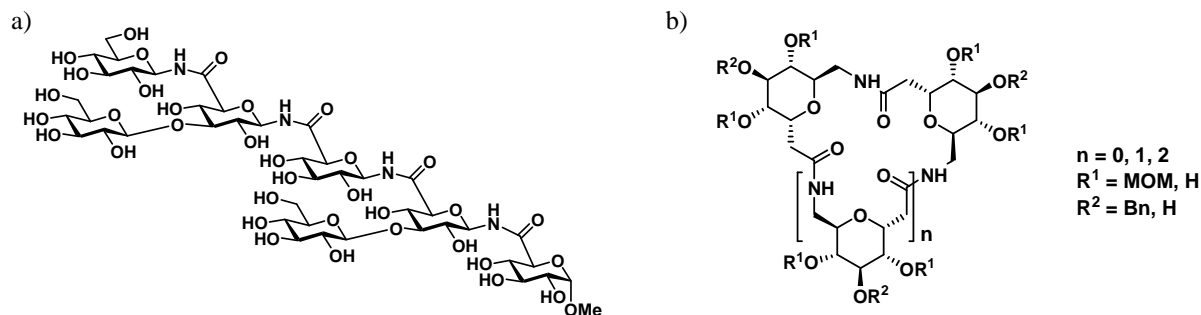
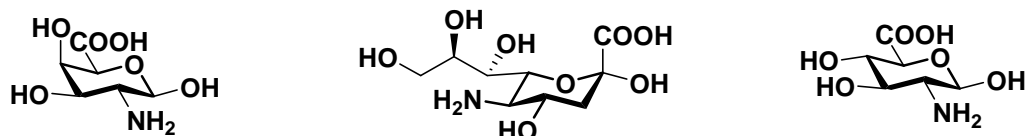


Abb. 4.2: Zwei Beispiele für Zuckeraminosäureoligomere. a) Zuckeraminosäuremimetikum des Phytoalexinheptaglycosids. b) Von Ménand et al. synthetisierte zyklische Zuckeraminosäureoligomere.

Der Begriff Zuckeraminosäure ist in der Literatur nicht eindeutig definiert und wird in einigen Publikationen beispielsweise auch für glycosylierte Aminosäuren verwendet.<sup>117,118</sup> In der hier vorliegenden Arbeit wird der Begriff Zuckeraminosäuren nur für Moleküle benutzt, bei denen eine Amino- und eine Carboxylgruppe entweder direkt oder über eine Kohlenstoffkette an ein Zuckergrundgerüst gebunden sind. Diese Definition ist im Einklang mit den meisten in der Literatur beschriebenen Zuckeraminosäuren.

Es sind in der Zwischenzeit zahlreiche Wege für die Gewinnung unterschiedlicher, synthetisch erzeugter Zuckeraminosäuren beschrieben worden.<sup>119</sup> Einen Versuch eine Übersicht über alle bislang publizierten Zuckeraminosäurestrukturen zu geben, haben Risseeuw et al. mit einem „*compendium of sugar amino acids*“ unternommen, das permanent erweitert und in regelmäßigen Abständen auf den neuesten Stand gebracht werden soll.<sup>119</sup> Die Synthese der Zuckeraminosäuren gehen meist von einfachen und günstigen Zuckern wie Glucose oder Galactose aus. Die Einführung der Aminogruppen geschieht dabei in der Regel durch Substitution guter Abgangsgruppen mit Stickstoff-Nucleophilen, wie sie durch Verwendung metallischer Azid- oder Phthalimidsalze erzeugt werden können. Die Carboxylgruppen werden hingegen oftmals durch CO<sub>2</sub>-Addition an ein Glycosylanion, durch Einführen hydrolysierbarer Cyanide oder auch durch selektive Oxidation einer –CH<sub>2</sub>-OH-Gruppe erzeugt.

Neben den synthetischen Zuckeraminosäuren sind auch natürlich vorkommende Zuckeraminosäuren bekannt. Sie sind unter anderem als Gerüstelemente - beispielsweise in Zellwänden – zu finden oder auch an Zell-Zell-Erkennungsprozessen beteiligt. Abbildung 4.3 zeigt exemplarisch drei in der Natur vorkommende Zuckeraminosäuren, die vor allem als N- und O-Acylderivate zu finden sind.



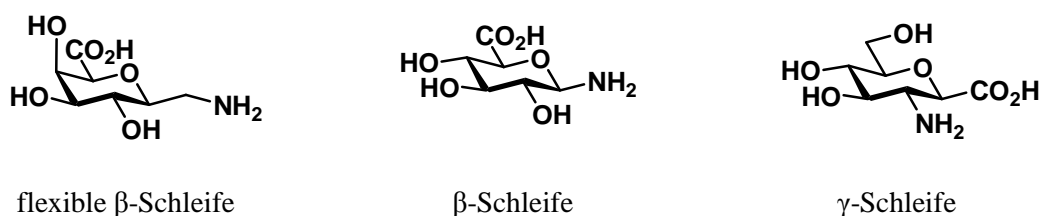
2-Amino-2-desoxy-galacturonsäure

Neuraminsäure

2-Amino-2-desoxy-glucuronsäure

Abb. 4.3: Einige Beispiele für natürlich vorkommende Zuckeraminosäuren.

Neben der Möglichkeit Verknüpfungen einzelner Bausteine stereoselektiv und mit hohen Ausbeuten durchführen zu können, haben Zuckeraminosäuren auch einen wichtigen strukturellen Vorteil, der durch ihr Kohlenhydratgrundgerüst entsteht. Es sind mehrere definierte Stereozentren vorgefertigt im Molekül vorhanden, die nicht durch aufwendige stereoselektive Synthesen erzeugt werden müssen. Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von H. Kessler zeigen außerdem, dass durch Zuckeraminosäuren Sekundärstrukturen in Molekülen induziert werden können. Kessler und seinen Mitarbeitern gelang es durch den gezielten Einbau von Zuckeraminosäuren in Peptide bestimmte Sekundärstrukturelemente zu erzeugen. Durch diesen Ansatz konnte ein Bausatz von Zuckeraminosäuren als Dipeptidisostere für die gezielte Induktion von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Schleifen in Peptiden entwickelt werden.<sup>17,120</sup> Einige dieser Sekundärstruktur-induzierenden Zuckeraminosäuren sind in Abbildung 4.4 dargestellt.



flexible  $\beta$ -Schleife

$\beta$ -Schleife

$\gamma$ -Schleife

Abb. 4.4: Beispiele für Sekundärstruktur-induzierende Zuckeraminosäuren. Unterhalb der Moleküle sind jeweils die Sekundärstrukturelemente genannt, die durch sie induziert werden können.

Die genannten Beispiele zeigen, dass Zuckeraminosäuren eine interessante Alternative für eine Vielzahl von Anwendungen darstellen können.

Zentrale Idee des hier vorliegenden Projekts ist die Synthese neuartiger Zuckerdiaminosäuren, - Kohlenhydrate mit zwei Aminogruppen und einer Carboxylgruppe - welche im Sinne einer Peptidkupplung mit etablierten Methoden verknüpft werden können und durch die Anwesenheit zweier geeignet geschützter Aminosäuren die Möglichkeit bieten neben linearen, auch verzweigte Oligomere zu synthetisieren. Dieses Konzept führt schon mit wenigen unterschiedlichen Zuckerdiaminosäurebausteinen zu einer Vielzahl an möglichen neuen Aminoglycosidmimetika und damit auch zu einer Vielzahl potentieller RNA-Liganden. Dies ist am Beispiel einer Zuckerdiaminosäure mit Allofuranosegrundgerüst in Abbildung 4.5

gezeigt. Mit nur einer Zuckerdiaminosäure können bereits fünf verschiedene Trimere und 14 verschiedene Tetramere synthetisiert werden. Unter Verwendung von nur sechs Zuckerdiaminosäuren wären dementsprechend 1080 trimere und bereits 15552 tetramere Pseudooligosaccharide herstellbar.

Um definierte Verknüpfungsmuster bei der Synthese von Oligomeren zu erhalten, müssen die verschiedenen funktionellen Gruppen vor der Synthese unterschiedlich und nach Möglichkeit orthogonal geschützt werden. Dies gilt insbesondere für die beiden Aminogruppen der monomeren Baueinheiten, von denen jeweils nur eine für die gezielte Verknüpfung zur Verfügung gestellt werden darf.

Da auch Zuckerdiaminosäuren potentiell in der Lage sein sollten Sekundärstrukturelemente zu induzieren, bietet sich theoretisch eine interessante Möglichkeit mit Zuckerdiaminosäureoligomeren räumliche Anordnungen zu designen, die eine spezifische Bindung mit definierten RNA-Targets eingehen können.

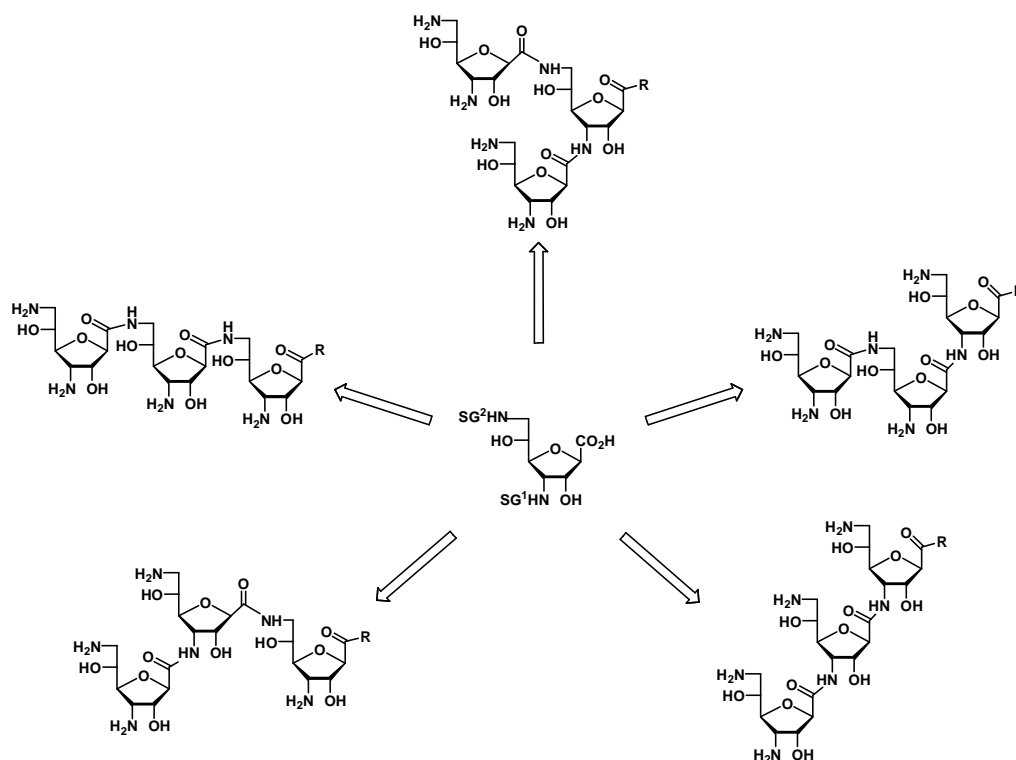


Abb. 4.5: Fünf mögliche Trimere ausgehend von einer Zuckerdiaminosäure mit D-Allofuranosekonfiguration. SG<sup>1</sup> und SG<sup>2</sup> sind orthogonale Schutzgruppen (z. B. Fmoc, Boc und N<sub>3</sub>).

Erste Zuckerdiaminosäuren mit einem Glucose-, bzw. Ribosegrundgerüst wurden parallel zu den Synthesen in dieser Doktorarbeit von F. Sicherl<sup>15,121</sup> und F. John<sup>122</sup> in der Arbeitsgruppe Wittmann an der Universität Konstanz synthetisiert und erfolgreich zu einer kleinen Bibliothek von Oligomeren verknüpft. Die Oligomere wurden unter anderem in einem Bindungstest an mRNA-Transkripten von *Trypanosoma brucei*, dem Erreger der

Schlafkrankheit, an der TU Darmstadt getestet.<sup>121,122</sup> Das Ergebnis der vorliegenden biologischen Untersuchungen zeigte, dass die Oligomere sowohl bei einem Fluoreszenzverdrängungsassay, als auch bei einem RNA-Deletions-Assay mit einer sehr unterschiedlichen Affinität an die zur Verfügung gestellten RNA-Targets banden.<sup>121,122</sup> Die  $IC_{50}$ -Werte lagen dabei für den Fluoreszenzverdrängungsassay zwischen  $0.75 \mu\text{M}$  und  $> 100 \mu\text{M}$  und für den RNA-Deletions-Assay zwischen  $63 \mu\text{M}$  und  $> 1700 \mu\text{M}$ . Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass der unspezifische Charakter der Bindung von Zuckerdiaminosäureoligomeren an die RNA-Targets gering ist. Die synthetisierten Oligomere mit den niedrigsten  $IC_{50}$ -Werten aus den Arbeiten von Sicherl und John sind in Abb. 4.6 gezeigt.

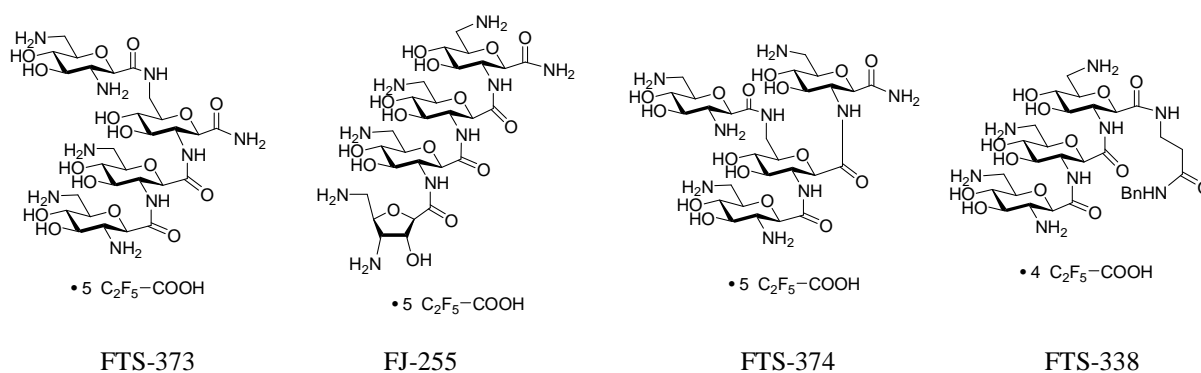


Abb. 4.6: Zuckerdiaminosäureoligomere aus den Doktorarbeiten von F. John und F. Sicherl. Die Verbindungen liegen als Pentafluorpropionsalze vor, da bei ihrer chromatographischen Aufreinigung Pentafluorpropionsäure als Kontaktionenpaarreagenz verwendet wurde. Die zugehörigen  $IC_{50}$ -Werte sind Tabelle 4.1 zu entnehmen.

Tab. 4.1:  $IC_{50}$ -Werte der in Abb. 4.5 gezeigten Zuckerdiaminosäureoligomere in Fluoreszenzverdrängungs- und RNA-Deletions-Assays.<sup>15,121,122</sup>

Verbindung	Fluoreszenzverdrängung ( $IC_{50}$ -Werte)	RNA-Deletion ( $IC_{50}$ -Werte)
Neomycin	$0.08 \mu\text{M}$	$9 \mu\text{M}$
Hygromycin	$> 5 \mu\text{M}$	$8 \text{ mM}$
FTS-373	$0.82 \mu\text{M}$	$155 \mu\text{M}$
FJ-255	$0.77 \mu\text{M}$	$63 \mu\text{M}$
FTS-374	$1.15 \mu\text{M}$	$> 1700 \mu\text{M}$
FTS-338	$0.75 \mu\text{M}$	$425 \mu\text{M}$

Bei den Strukturen der in Abbildung 4.6 dargestellten wirksamen Oligomere fällt auf, dass alle eine gemeinsame Substruktur bestehend aus drei (2→1)-amidverknüpften Glucoseeinheiten beinhalten. Diese stellt eine mögliche Leitstruktur für die Synthese von wirksamen, an bestimmte RNA-Targets bindenden Zuckerdiaminosäureoligomeren dar und könnte daher als Templat für die gezielte Entwicklung weiterer Zuckerdiaminosäureoligomere mit guten RNA-Bindungseigenschaften verwendet werden.

# *Aufgabenstellung*

## 5 Aufgabenstellung

Das Potential von Zuckeraminosäuren, mit etablierten Methoden auf effiziente Weise Oligomere synthetisieren und gleichzeitig funktionelle Gruppen durch ihr Kohlenhydratgrundgerüst definiert positionieren zu können, ist die Basis des in dieser Arbeit verfolgten Ansatzes zur Synthese neuer RNA-Liganden. Der Aufbau multimerer, amidverknüpfter Aminoglycosidmimetika erfordert monomere Baueinheiten, die über mindestens zwei Aminogruppen verfügen, da eine bereits für die Verknüpfung der Amidbindung zur Verfügung gestellt werden muss. Um definierte Verknüpfungsmuster erhalten zu können müssen diese Aminogruppen orthogonal geschützt vorliegen. Dabei erlaubt es beispielsweise die Schutzgruppenkombination Fmoc/Boc/N<sub>3</sub> neben linearen, auch verzweigte Oligomere zu synthetisieren (siehe auch Abbildung 4.5).

Analog zu den natürlichen Aminoglycosiden sollen Zuckerdiaminosäureoligomere aus drei bis fünf monomeren Baueinheiten aufgebaut sein. Die anomeren Sauerstoffe sind bei den Aminoglycosiden im Gegensatz zu den Ringsauerstoffen nicht an Bindungen von bekannten Aminoglycosid-RNA-Komplexen beteiligt (siehe auch Kapitel 3.1.1). Daher ist durch den Ersatz dieser Sauerstoffe durch eine Amidgruppe kein zwingend nachteiliger Einfluss auf die Bindung von Zuckerdiaminosäureoligomeren an RNA zu erwarten. Eine Reihe von Zuckerdiaminosäuren, als mögliche Zielstrukturen für die Synthese von monomeren Baueinheiten, ist in Abbildung 5.1 gezeigt.

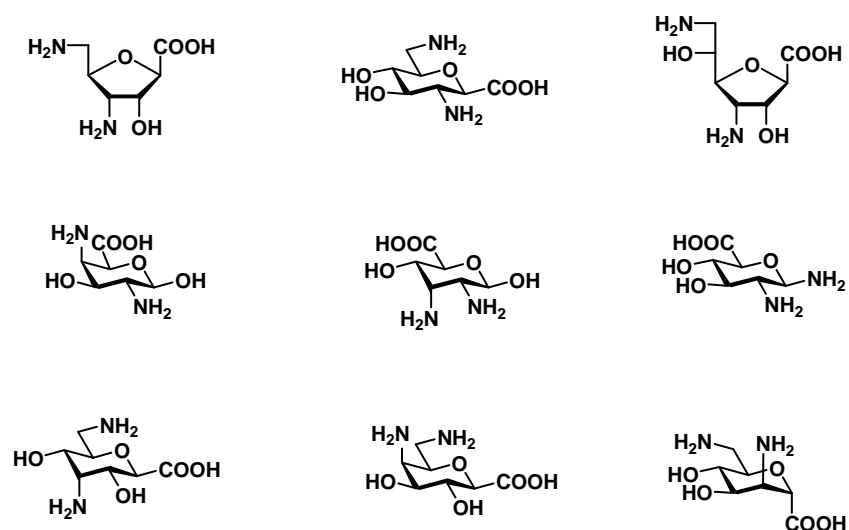


Abb. 5.1: Einige denkbare Zuckerdiaminosäuren zum Aufbau von Zuckerdiaminosäureoligomeren.

In den parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Synthesen von F. Sicherl<sup>121</sup> und F. John<sup>122</sup> wurde eine Zuckerdiaminosäure mit Glucohexose-, bzw. Ribofuranosekonfiguration

synthetisiert. Diese beiden Grundgerüste sind ebenfalls in natürlichen Aminoglycosiden zu finden (siehe hierzu unter anderem Abb. 3.2 und Abb. 3.3). In der hier vorliegenden Arbeit sollte nun erstmals eine Zuckerdiaminosäure mit einer Stereochemie synthetisiert werden, welche in den natürlichen Aminoglycosiden nicht vorhanden ist.

Die Wahl fiel hierbei auf die Allofuranose, die eine große strukturelle Ähnlichkeit zur Ribofuranose aufweist und dadurch interessante Vergleiche von Oligomeren mit Ribose- und Alloose-haltigen Monomeren gestatten sollte. Die Synthese von Zuckerdiaminosäuren mit Allfuranosekonfiguration ist aus synthetischer Sicht eine größere Herausforderung als die Synthese vergleichbarer Ribofuranosemoleküle, da zum einen im Vergleich zur Ribose nur wenige literaturbekannte Synthesen beschrieben wurden und da Alloose zum anderen durch ihre zusätzliche OH-Gruppe potentiell größere Anforderungen an eine geeignete Schutzgruppenstrategie stellt. Die drei zu synthetisierenden monomeren Bausteine sind in Abbildung 5.2. dargestellt.

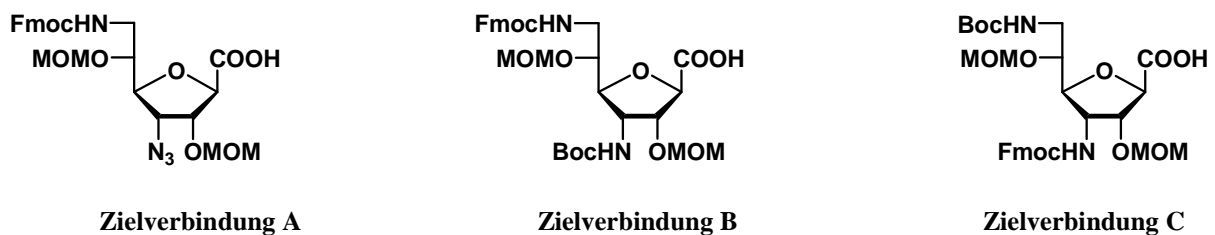


Abb. 5.2: Zielstrukturen der Zuckerdiaminosäurebausteinen mit Allofuranosekonfiguration.

Zusätzlich zur Synthese der in Abbildung 5.2 gezeigten Alloosebausteinen sollte nach Möglichkeit ein gangbarer Syntheseweg für Zuckerdiaminosäuren mit Mannohexosekonfiguration skizziert und entwickelt werden. Ein Weg zur Synthese eines vierten Bausteins (neben einem Glucose-, einem Ribose- und einem Alloosebausteinen) bietet die Möglichkeit eine noch größere Zahl an Oligomeren zu synthetisieren und damit auch die Möglichkeit weitere interessante Strukturen für die Bindung an unterschiedliche RNA-Targets zu finden.

Die Allofuranosezuckerdiaminosäurebausteine sollten nach Beendigung der Synthese sowohl in Lösung, als auch an der festen Phase zu einer kleinen Bibliothek von Oligomeren miteinander verknüpft werden. Zusätzlich sollten sie mit einigen monomeren Glucozuckerdiaminosäurebausteinen von F. Sicherl<sup>121</sup> verknüpft werden.

Während dieser Arbeit wurden bereits biologische Untersuchungen mit Zuckerdiaminosäureoligomeren - bestehend aus Ribose- und Glucosebausteinen - durchgeführt, die einige interessante Ergebnisse erbrachten. Es konnte eine mögliche

Leitstruktur für die Synthese von wirksamen, an bestimmte RNA-Targets bindenden Oligomeren identifiziert werden (siehe Abb. 4.6 in Kapitel 4.1). Daher sollten unter anderem Oligomere synthetisiert werden, welche diese Leitstruktur - bestehend aus drei (2→1)-amidverknüpften Glucoseeinheiten - beinhalten.

Ein weiteres Ziel der Synthese der Zuckerdiaminosäureoligomere sollte das Finden einer zweiten Leitstruktur sein, die es gestattet, gezielt weitere wirksame Oligomere zu synthetisieren. Eine zweite Leitstruktur würde für die Zukunft auch eine Möglichkeit eröffnen durch spektroskopische Verfahren räumliche Anforderungen für eine starke Wechselwirkung zwischen Oligomer und dem jeweiligen RNA-Target zu studieren.

Interessant für das Verständnis der Wirkung von Zuckerdiaminosäureoligomeren ist auch die Untersuchung der Bedeutung von freien Aminogruppen für die Bindung der Oligomere an zur Verfügung gestellte RNA-Targets - und damit die Untersuchung der Bedeutung des Prinzips der elektrostatischen Komplementarität für diese Art von Oligomeren. Es sollte nach Möglichkeit an einem Beispiel nachgewiesen werden, dass die Aminogruppen von entscheidender Bedeutung für die Bindung sind. Zu diesem Zweck bietet sich der Ersatz einer Aminogruppe, die an der Bindung an das Target beteiligt ist, durch eine Azidgruppe an. Dieser Austausch sollte zu einer Verminderung der Affinität des betroffenen Oligomers und damit zu höheren  $IC_{50}$ -Werten führen.

*Synthese von  
Zuckerdiaminosäure-  
bausteinen*

## 6 Synthese von Zuckerdiaminosäurebausteinen der D-Allose

### 6.1 Synthesestrategien zur Darstellung von Allofuranosederivaten

Die Synthese komplexer chiraler Moleküle stellt auch mit modernen Methoden eine der größten Herausforderungen in der Chemie unserer Zeit dar. Der *chiral pool*, also das Vorkommen großer Mengen chiraler und stereochemisch reiner Moleküle in der Natur, ist daher für viele synthetische Problemstellungen eine interessante Alternative. Die Zielstrukturen dieser Arbeit lassen sich stereochemisch vom Aufbau der D-Allose ableiten. Allose spielt in biologischen Prozessen nur eine untergeordnete Rolle und ihre Verfügbarkeit innerhalb des *chiral pool* ist stark eingeschränkt.<sup>123-125</sup> Dennoch lässt sich die Konfiguration der D-Allose in wenigen Schritten ausgehend von D-Glucose erzeugen.<sup>120,126-130</sup> Da Glucose in großen Mengen verfügbar und zusätzlich sehr billig ist, stellt sie einen idealen Grundbaustein zur Synthese von Verbindungen mit Allokongfiguration dar.

In Abbildung 6.1 sind die schon in der Aufgabenstellung erwähnten Zielstrukturen der monomeren Zuckerdiaminosäurebausteine mit Allokongfiguration gezeigt. Das Schutzgruppendesign wurde dabei derart gewählt, dass sie sich im Rahmen einer Festphasensynthese entsprechend der Fmoc-Strategie verwenden lassen. Die Azidgruppe ist keine Schutzgruppe im klassischen Sinn. Sie stellt eine maskierte Aminofunktionalität dar, da sie durch Reduktion in ein Amin überführt werden kann.

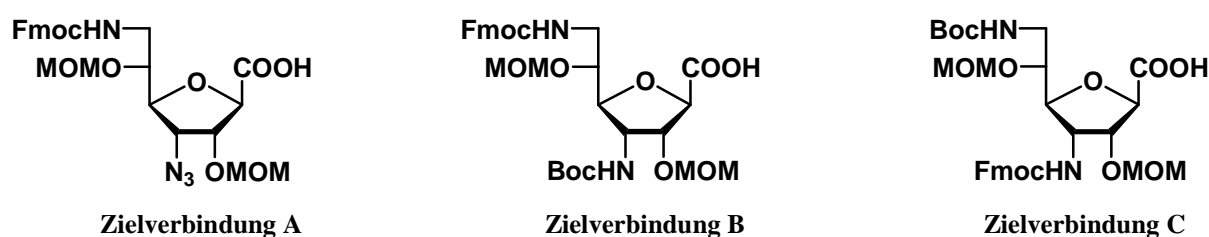


Abb. 6.1: Zielstrukturen der Zuckerdiaminosäurebausteinen mit Allofuranosekonfiguration.

In Abbildung 6.2 sind drei Methoden zur Erzeugung einer Allo- aus einer Glucokongfiguration gezeigt. Die ersten beiden Methoden nutzen eine stereoselektive Reduktion zur Inversion der Konfiguration an C-3. Zunächst wird die Hydroxygruppe von Verbindung **1** durch Oxidation in eine 3-Keto-Verbindung überführt. Diese kann im Anschluss zu einem Alkohol mit Allokongfiguration reduziert werden.<sup>127-129</sup> Die Reduktion ist stereoselektiv, da die Unterseite des Zuckers durch die 1,2-*O*-Isopropylidenschutzgruppe abgeschirmt wird und das Reduktionsmittel nur von der Oberseite angreifen kann. Eine von A. Neef und mir während ihrer Bachelorarbeit in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode

erlaubt die Umkehr des Stereozentrums bei gleichzeitiger Einführung einer geschützten Aminofunktionalität mit sehr guten Ausbeuten.<sup>126</sup> Die Stereoselektivität dieser reduktiven Aminierung beruht ebenfalls auf der Tatsache, dass die Unterseite des Fünfrings schwer zugänglich ist. Die Aminierung gelang mit einer hervorragenden maximalen Ausbeute von 85 %. Diese Methode übertrifft die bislang bekannten Verfahren zur Erzeugung von 3-Aminoallosederivaten sowohl in bezug auf die Ausbeute, als auch auf die Kosten für die zur Herstellung verwendeten Edukte, deutlich. Die Methode stand jedoch erst gegen Ende dieser Doktorarbeit zur Verfügung und fand daher bei der Synthese der Allosebausteine keine Verwendung. Die dritte gezeigte Methode wurde von T. Netscher entwickelt und zeigt die Anwendung einer  $S_N2$ -Reaktion zur Konfigurationsumkehr.<sup>130</sup> Durch Substitution unterschiedlicher Sulfonsäureester mit  $\text{NaN}_3$  gelang Netscher die Synthese von 3-Azido-3-desoxy-allosederivaten nach einem  $S_N2$ -Mechanismus. Andere Arbeitsgruppen beschrieben eine geringfügige Verbesserung der Ausbeute durch den Einsatz von Triflat als Abgangsgruppe.<sup>131-133</sup> Kessler et al. beschrieben eine Verbesserung dieser Methode durch Zusatz katalytischer Mengen an Tetrabutylammoniumchlorid. Hierbei wurde ein Ausbeuteanstieg auf 70 % berichtet.<sup>120</sup> Trotz mehrfacher Wiederholung konnte diese Ausbeute jedoch weder in dieser noch in anderen Arbeiten nachvollzogen werden.<sup>122,134</sup>

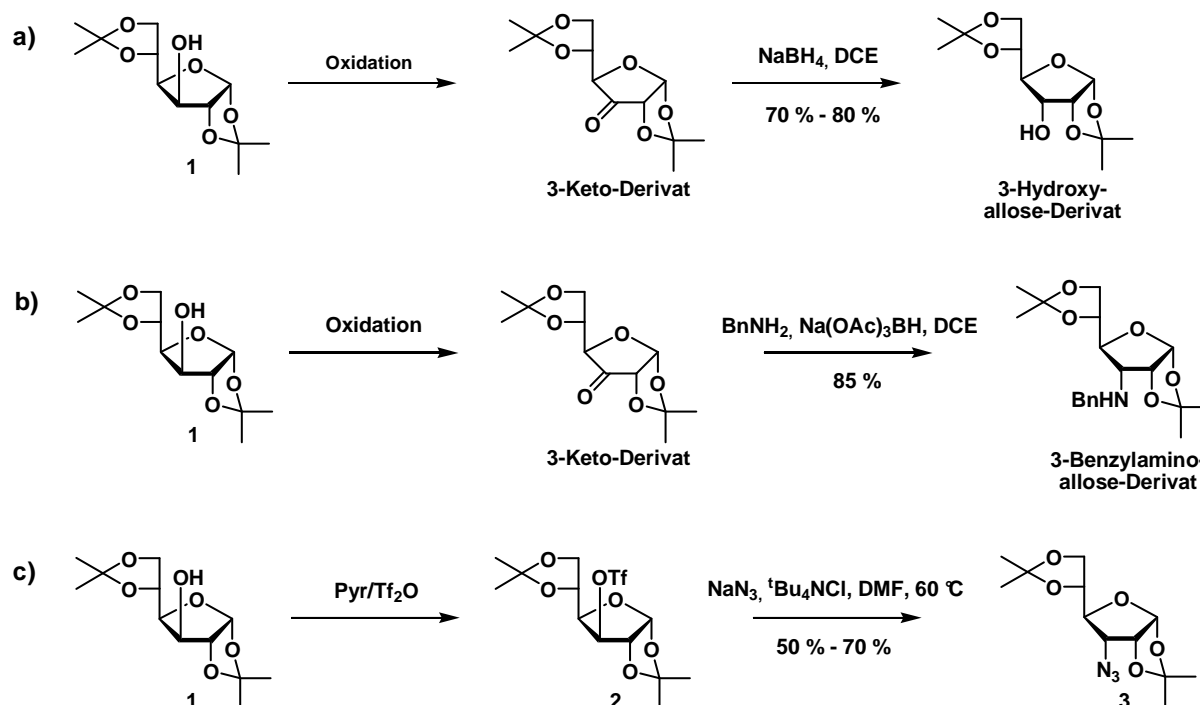


Abb. 6.2: Methoden zur Erzeugung einer Allo- aus einer Glucokonfiguration durch a) stereoselektive Reduktion eines Alkohols, b) stereoselektive reduktive Aminierung, c) Inversion der Konfiguration an C-3 nach einem  $S_N2$ -Mechanismus.

## 6.2 Synthese von Zuckerdiaminosäuren der D-Allofuranose

### 6.2.1 Erzeugung der Allofuranosekonfiguration ausgehend von Glucose

Ausgangspunkt der Synthesen der Allofuranosebausteine war D-Glucose, durch die ein einfacher Zugang zu Allose- und ebenfalls zu 3-Desoxy-3-aminoallosederivaten möglich ist (siehe Kapitel 6.1).

Aus D-Glucose konnte nach einer Vorschrift von Glen et al.<sup>135</sup> Diacetonglucose **1** synthetisiert werden. Verbindung **1** wurde anschließend nach einer Vorschrift von Gruner et al.<sup>120</sup> in 2 Stufen über das Triflat **2** zum Azid **3** umgesetzt. Da Substitution und Eliminierung bei dieser Umsetzung als Konkurrenzreaktionen auftreten, entstand zusätzlich zur gewünschten Azidoverbindung das Eliminierungsprodukt **4** mit einer Ausbeute von 47 % (siehe Abbildung 6.3). Die in der Literatur<sup>120</sup> angegebene Ausbeute von 70 % für die Einführung der Azidgruppe konnte trotz mehrfacher Durchführung nicht nachvollzogen werden. Die Synthese von Verbindung **3** gelang mit einer maximalen Ausbeute von 52 % und lag damit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Quellen.<sup>122,134</sup>

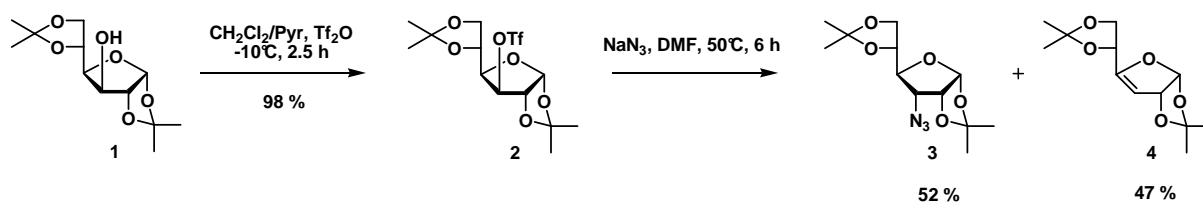


Abb. 6.3: Synthese von 3-Azido-3-desoxy-1,2:5,6-di-O-isopropyl- $\alpha$ -D-allofuranose **3**.

Im nächsten Schritt sollten die Isopropylidenschutzgruppen unter Erhalt der Furanoseform abgespalten werden. Da die gleichzeitige Entschützung beider Isopropylidenschutzgruppen in wässrig-saurem Medium zur Bildung der Allopyranose geführt hätte, wurde nach einem Weg gesucht, die Schutzgruppen zu entfernen und gleichzeitig die anomere Hydroxylgruppe zu blockieren. Als geeignete Reaktionsbedingung hierfür erwies sich die Entschützung mit trockener methanolischer HCl-Lösung. Hierbei werden acetalische Schutzgruppen abgespalten und simultan ein Methylglycosid erzeugt, wodurch ein Wechsel von der Furanose- zur Pyranoseform verhindert wird.<sup>131</sup> Die Entschützung zu Verbindung **5** gelang auf diesem Weg mit einer Ausbeute von 56 %. Als Nebenprodukt entstand das 5,6-O-isopropyliden-geschützte Allosederivat **6** (siehe Abbildung 6.4). Nach ca. 48 h blieb das Verhältnis der Verbindungen **5** und **6** konstant. Verbindung **5** und Verbindung **6** stehen im Gleichgewicht, da bei der Abspaltung der Isopropylschutzgruppen Propanondimethylacetal gebildet wird, welches unter sauren, wasserfreien Bedingungen mit den freien Hydroxylgruppen in 5- und 6-Position erneut ein Isopropylidenacetal bilden kann.

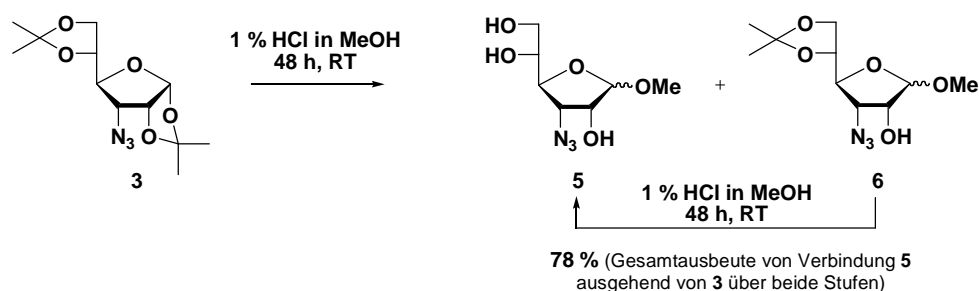


Abb. 6.4: Saure Entschützung der Isopropylidenschutzgruppen und simultane Erzeugung eines Methylglycosids.

Die Reaktion musste durch Zugabe von Triethylamin abgebrochen werden, da bei direktem Einengen der Reaktionslösung Spuren der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Allopyranose durch das Aufkonzentrieren der gelösten Salzsäure entstanden, die sich säulenchromatographisch nicht von den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Allofuranoseformen (**5**) trennen ließen. Durch Umsatz des Nebenprodukts **6** mit weiterer methanolischer HCl-Lösung wurde eine gute Gesamtausbeute von Verbindung **5** von 78 % erreicht.

Ausgehend von Verbindung **5** wurden im Anschluss drei unterschiedliche Wege zur Einführung einer zweiten Aminofunktionalität und eines C-Glycosids getestet. Die drei unterschiedlichen Strategien werden nachfolgend in den Kapiteln 6.2.2, 6.2.3 und 6.2.4 beschrieben.

### 6.2.2 Variante A: Erzeugung eines C-Glycosids und anschließende Einführung der zweiten Aminogruppe

Die Möglichkeiten zur Erzeugung eines C-Glycosids sind vielfältig<sup>136</sup> und die Wahl einer geeigneten C-Glycosylierungsmethode ist oft nicht trivial, da Substituenteneinflüsse und stereoelektronische Effekte beachtet werden müssen, die für jeden Zucker unterschiedlich sind und oft einen nicht vorhersagbaren Einfluss auf den Reaktionsverlauf haben.<sup>137,138</sup>

Bei vielen C-Glycosylierungen entstehen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomerengemische der entsprechenden Zucker, da die eintretende Gruppe von der Ober- oder der Unterseite des Kohlenhydratrings angreifen kann. Da ein Anomerengemisch zu Problemen bei der Charakterisierung und der Aufreinigung der Produkte führen kann und meist nur eine der beiden Formen erwünscht ist, wurde nach einer Möglichkeit gesucht selektiv ein C-Glycosid der Allose mit  $\beta$ -Konfiguration zu erzeugen. Eine einfache, effektive Methode zur stereoselektiven Erzeugung von Glycosiden ist die Einführung von Schutzgruppen mit Nachbargruppenaktivität an C-2. Sie schirmen eine Seite des Kohlenhydratrings ab und ermöglichen so oftmals einen

stereoselektiven Zugang zu 1,2-trans konfigurierten Produkten. Da Acetyl- und Benzoylschutzgruppen einen Nachbargruppeneffekt zeigen und somit für eine stereoselektive Synthese geeignet sind, sollten die Hydroxylgruppen an C-2, C-5 und C-6 mit einer dieser beiden Gruppen geschützt werden.

Nach Schützen der Hydroxyfunktionalitäten sollte das Methylglycosid **I** im Säuren zum anomeren Acetat **J** umgesetzt werden. Aus diesem Acetat sollte anschließend mit Lewissäure und Trimethylsilylcyanid das anomere Cyanid **K** synthetisiert werden (siehe Abbildung 6.5).

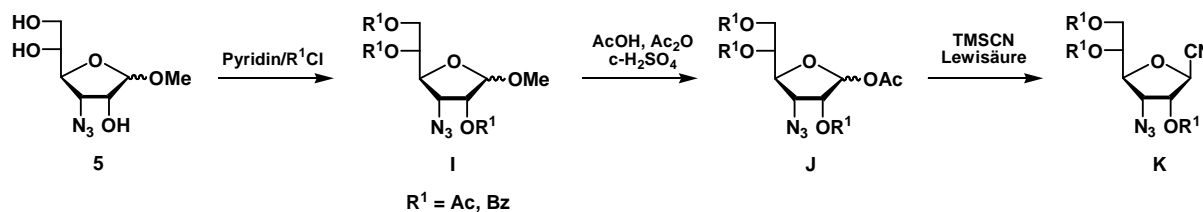


Abb. 6.5: Geplante Synthese des anomeren Cyanids **K**.

In Fällen in denen eine Schutzgruppe mit Nachbargruppeneffekt an C-2 vorhanden ist, kann bei Einführung einer Cyanogruppe am anomeren Zentrum unter lewissauren Bedingungen die Bildung eines Cyanoethylidens als Konkurrenzreaktion auftreten (siehe Abbildung 6.6).<sup>137,139-</sup>

<sup>143</sup> Es ist bekannt, dass die Bildung von Cyanoethylidenen oft unterdrückt werden kann, indem die Hydroxylgruppe an C-2 durch eine Benzoylgruppe geschützt wird.<sup>131,144</sup> Aus diesem Grund wurde entschieden, Benzoylschutzgruppen zu verwenden. Zusätzlich bieten Benzoyl- gegenüber Acetylschutzgruppen den Vorteil, dass sie schwerer durch Cyanidionen abspaltbar und daher unter den Bedingungen der C-Glycosylierung mit Trimethylsilylcyanid und Lewissäure stabiler sind.<sup>145</sup>

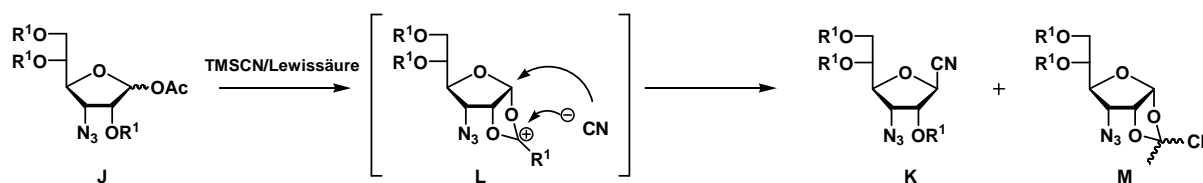
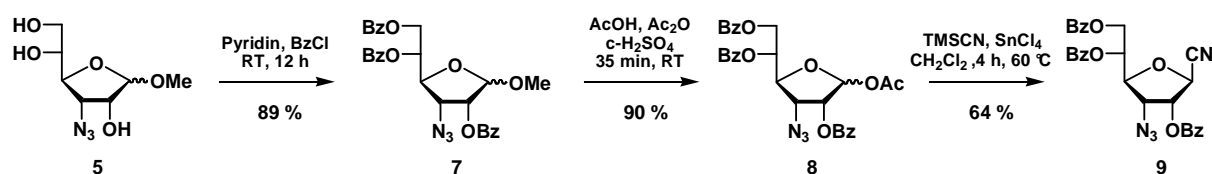


Abb. 6.6: C-Glycosylierung und Cyanoethylidenbildung als Konkurrenzreaktionen.

Die Einführung der Benzoylschutzgruppen in Verbindung **5** und die anschließende Acetolyse unter Beibehaltung der Furanoseform gelangen mit sehr guten Ausbeuten von 89 % bzw. 90 %. Die Einführung des anomeren Cyanids **9** erfolgte ausgehend vom anomeren Acetat **8** mit einer für diese Art der C-Glycosylierung guten Ausbeute von 64 % (siehe Abbildung 6.7).


 Abb. 6.7: Synthese des anomeren Cyanids **9** in drei Stufen ausgehend von Verbindung **5**.

Im Anschluss sollten die Benzoylschutzgruppen selektiv unter milden nucleophilen Bedingungen entschützt werden. Zunächst wurden Versuche im Mikromaßstab (1 - 2 mg Edukt) im schwach basischen Milieu mit katalytischen Mengen Natriummethanolat in Methanol durchgeführt. Die Retentionszeiten der Produkte (DC), sowie die massenspektroskopische Analyse der neu entstehenden Verbindungen wiesen darauf hin, dass ein nucleophiler Angriff des Methoxids bevorzugt an der Cyanidgruppe und nicht an den Benzoylschutzgruppen stattfand, wodurch sich ein Methylester bildete. Folglich konnten die Benzoylschutzgruppen unter Verwendung von Natriummethanolat nicht selektiv entschützt werden. Aus diesem Grund wurde nach einer Methode gesucht, mit der sich Acylschutzgruppen unter neutralen Bedingungen abspalten lassen. Herzig et al. zeigten, dass dies mit KCN in methanolischer Lösung möglich ist.<sup>145</sup>

Es zeigte sich bei Versuchen zur Entschützung der Benzoylschutzgruppen mit KCN, dass selbst unter diesen neutralen Bedingungen das gewünschte Cyanid **11** nur als Nebenprodukt erhalten werden konnte; als bevorzugte Reaktion wurde abermals die Bildung eines Methylesters beobachtet (siehe Verbindung **10** in Abbildung 6.8). In Fällen, in denen kein frisch getrocknetes Methanol verwendet wurde, konnte ebenfalls die Entstehung des Amids **12** als Nebenprodukt beobachtet werden. Die Ausbeute des Amids schwankte und hing vermutlich von der Menge des Wassers in der Reaktionslösung ab.

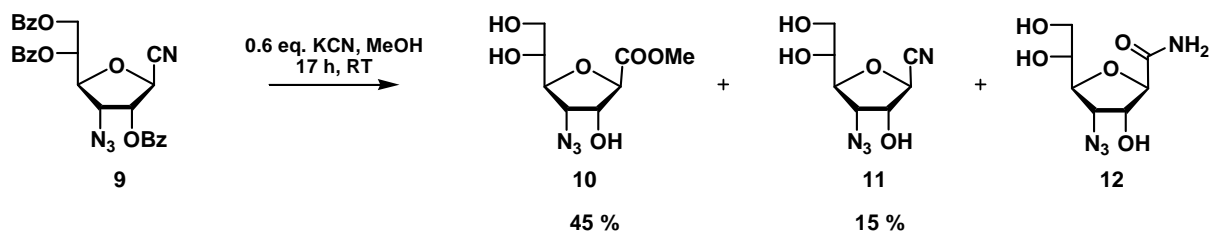


Abb. 6.8: Versuche zur selektiven Entschützung von Benzoylschutzgruppen mit KCN in MeOH.

Nachdem diese beiden Ansätze zur selektiven Entschützung der Benzoylschutzgruppen unbefriedigend verliefen, wurde versucht eine selektive Entschützung der Benzoylschutzgruppe an C-6 durch ein sterisch anspruchsvolles Nucleophil zu erreichen.

Die Wahl fiel auf ein Phenylnucleophil, das in Form einer Grignardverbindung leicht erzeugt werden kann. Bei der Reaktion von Verbindung **9** mit PhMgBr zeigte sich jedoch, dass auch dieses Nucleophil bevorzugt am Cyanid angriff. Es wurde, wie in Abbildung 6.9 gezeigt, das Keton **13** mit einer Ausbeute von 53 % erhalten.

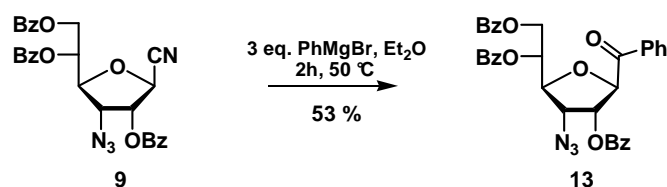


Abb. 6.9: Versuche zur selektiven Entschützung von Verbindung **9** mit PhMgBr.

Der Grund für die überaus hohe Reaktivität des anomeren Cyanids gegenüber Nucleophilen resultiert wahrscheinlich aus dem Elektronenzug des Ringsauerstoffatoms, wodurch der Cyanid-Kohlenstoff besonders elektronenarm ist und somit leicht durch Nucleophile aller Art angegriffen werden kann.

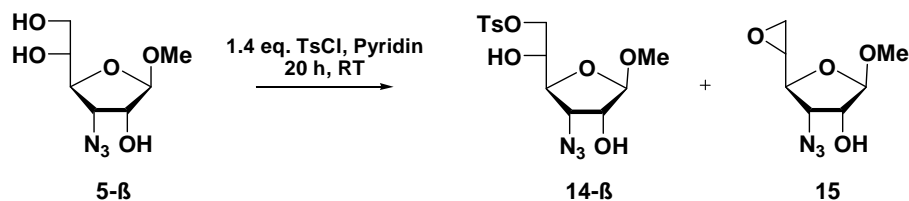
Da eine selektive Entschützung der Benzoylschutzgruppen bei keinem der durchgeführten Ansätze befriedigend gelang, wurde der in diesem Abschnitt beschriebene Syntheseweg an dieser Stelle abgebrochen und die Synthese nachfolgend nach den in Abschnitt 6.2.3 und 6.2.4 beschriebenen Strategien fortgeführt.

### 6.2.3 Variante B: Einführung der zweiten Aminogruppe und anschließende Erzeugung des C-Glycosids ohne Schutz der freien Hydroxygruppen

Bei Variante B wurde zunächst versucht, die primäre Hydroxylgruppe in Verbindung **5** selektiv in eine gute Abgangsgruppe zu überführen und anschließend im Sinne einer nucleophilen Substitution mit einem *N*-Nucleophil zu verdrängen.

Als Abgangsgruppe wurde ein Tosylat gewählt, da es sich leicht und selektiv bei Raumtemperatur erzeugen lässt und im Vergleich zu anderen Abgangsgruppen wie beispielsweise Triflaten verhältnismäßig stabile Verbindungen bildet, die auch für die Säulenchromatographie geeignet sind.

Neben der erwarteten Tosylatbildung wurden bei der dünnschichtchromatographischen Kontrolle der Reaktion weitere Produkte detektiert. Um eine einfachere Charakterisierung der entstehenden Nebenprodukte zu ermöglichen, wurden die Versuche zur Tosylierung nach diesem ersten Befund mit der reinen  $\beta$ -Form von Verbindung **5** durchgeführt. Es zeigte sich, dass aus dem gewünschten Tosylat **14** das Epoxid **15** durch eine intramolekulare Substitution gebildet wurde (siehe Abbildung 610). Die Strukturen von Verbindung **14** und **15** wurden durch  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren gesichert.


 Abb. 6.10: Bildung eines Epoxids bei der Tosylierung von Verbindung **5-β**.

Die Auswertung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von Verbindung **15** zeigte, dass die Signale von H-6, H-6' und C-6 stark hochfeldverschoben waren, was typisch für diese Art eines Epoxids zwischen C-5 und C-6 ist. Zum Vergleich der chemischen Verschiebungen sind die Daten für C-6, H-6 und H-6' der Verbindungen **5-β**, **14-β** und **15** in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

 Tab. 6.1: Vergleich von charakteristischen chemischen Verschiebungen in den H-NMR-Spektren der Verbindungen **5**, **14** und **15**.

Verbindung	H-6 (ppm)	H-6' (ppm)	C-6 (ppm)
<b>5-β</b>	3.75	3.58	64.82
<b>14-β</b> (Tosylat)	4.26	4.07	73.95
<b>15</b> (Epoxid)	2.91	2.69	46.29

Da sich ein Epoxid aufgrund der hohen Ringspannung ebenso wie ein Tosylat durch einen nucleophilen Angriff substituieren lässt, wurde nicht versucht, die Reaktion an dieser Stelle zu optimieren. Stattdessen wurde nach einem möglichst einfachen Ansatz gesucht, die zweite Aminofunktionalität an C-6 derart einzuführen, dass Tosylat und Epoxid gemeinsam im Sinne einer nucleophilen Substitution in das gewünschte Produkt überführt werden konnten.

Trotz der potentiellen Möglichkeit Tosylat und Epoxid gleichzeitig zum gewünschten Produkt umzusetzen, sollte die Bildung des Epoxids möglichst zurückgedrängt werden, da es sowohl an C-5 als auch an C-6 von einem Nucleophil geöffnet werden kann und die Öffnung des Dreirings an C-5 zu einem unerwünschten Nebenprodukt führen würde. Außerdem war nicht bekannt, ob sich das Epoxid nicht lediglich unter drastischen Bedingungen (hoher Überschuss an Nucleophil und hohe Temperaturen) öffnen lassen würde und ob unter solchen Bedingungen nicht auch die Cyanogruppe eine Reaktion mit dem Nucleophil eingehen konnte (vergleiche Bildung von Verbindung **10** in Kapitel 6.2.2).

Als *N*-Nucleophil für die Substitution wurde Phthalimid gewählt, welches in Form von Kaliumphthalimid kommerziell erhältlich ist und das Epoxid aufgrund seines sterischen Anspruchs bevorzugt an C-6 öffnen sollte.

Bei einigen Ansätzen im Mikromaßstab (ca. 5 mg Edukt) wurde zunächst nach Bedingungen gesucht, unter denen die Bildung des Epoxids möglichst minimal war. Zu diesem Zweck wurde nach Beendigung der jeweiligen Reaktion eine Dünnschichtchromatographie

durchgeführt und die mit Schwefelsäure entwickelten DC-Platten visuell beurteilt. Eine Beurteilung mittels HPLC war nicht möglich, da das Epoxid nicht UV-aktiv ist und somit nicht mit dem zur Verfügung stehenden Detektor nachgewiesen werden konnte. Es zeigte sich, dass mit 1.4 eq. Tosylchlorid bei einer Reaktionszeit von 20 h die Epoxidbildung am geringsten war. Wurde für die Reaktion frisch über KOH getrocknetes Pyridin eingesetzt entstand in allen Fällen überwiegend das Epoxid. Es ist wahrscheinlich, dass bei der Pyridindestillation Spuren von Kaliumhydroxid verschleppt wurden, die zu einer schnellen Epoxidbildung führten.

Die auf diesem Weg erzeugte Mischung aus Epoxid **15** und Tosylat **14** wurde zur Entfernung des überschüssigen Tosylchlorids wässrig aufgearbeitet und nach Trocknen der Rohprodukte ohne säulenchromatographische Reinigung bei unterschiedlichen Temperaturen mit Kaliumphthalimid in DMF umgesetzt (siehe Tabelle 6.2).

Bei Reaktionstemperaturen von 80 – 100 °C und Reaktionszeiten von mehr als einer Stunde konnte per DC eine vermehrte unerwünschte intramolekulare Epoxidbildung nachgewiesen werden. Daher wurde nach anfänglichen Versuchen, bei denen der Zucker zusammen mit Kaliumphthalimid vorgelegt und anschließend auf die gewünschte Reaktionstemperatur erhitzt wurde (in Tab 6.2 als „normale“ Methode gekennzeichnet) nach einer Methode gesucht mit der die Epoxidbildung weiter zurückgedrängt werden konnte.

Dazu wurde bei weiteren Versuchen Kaliumphthalimid bei der gewünschten Reaktionstemperatur in DMF vorgelegt und Verbindung **9** als Lösung in DMF innerhalb von 90 Minuten langsam zugegeben. Durch langsames Zutropfen sollte eine möglichst schnelle Substitution des Tosylats erreicht und auf diesem Weg die Bildung des Epoxids verhindert werden. Dieses Vorgehen ist in Tab. 6.2 als „inverse“ Methode gekennzeichnet. Es zeigte sich, dass mit dieser inversen Methode eine bessere Ausbeute erzielt werden konnte.

Die Ausbeute konnte nachfolgend durch Erhöhung der Löslichkeit des Kaliumphthalimids mit Kronenether (18-K-6) weiter gesteigert werden. Bei Zugabe von einem Äquivalent Kronenether, einer Temperatur von 100 °C und einer Reaktionszeit von 6 h wurde mit 67 % die maximale Ausbeute für Verbindung **16** auf diesem Weg erzielt (siehe Abbildung 6.11).

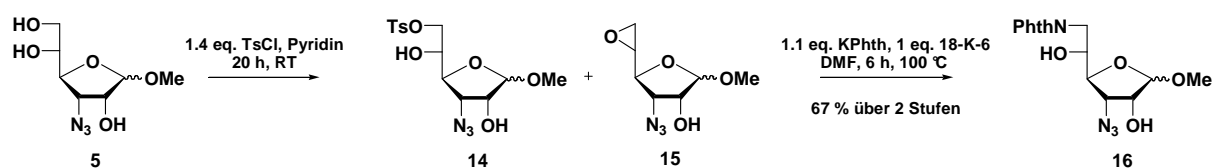


Abb. 6.11: Zweistufige Synthese des Phthalimids **16** ausgehend von Verbindung **5**.

Bei allen Versuchen zeigten sich Probleme mit der Aufreinigung von Verbindung **16**. Es entstand ein Nebenprodukt, das sich lediglich per HPLC vollständig von der gewünschten Verbindung abtrennen ließ. Dieses wurde nicht vollständig charakterisiert; prinzipiell scheint aber die 5-Position von Verbindung **15** ein möglicher Angriffspunkt für das Phthalimid zu sein, was zur Ausbildung eines säulenchromatographisch schwer abtrennbaren Nebenprodukts führen würde. Eine Übersicht über Versuche zur Einführung des Phthalimids gibt Tabelle 6.2.

 Tab. 6.2 Versuche zur Einführung einer Phthalimidgruppe bei Verbindung **5**.

m ( <b>5</b> )	Stufe 1	KPhth (bezogen auf <b>5</b> )	18-K-6 (bezogen auf KPhth)	Methode KPhth Einführung	Aufarbeitung	t (h)	T (°C)	Ausbeute <b>16</b>
107 mg	1.4 eq. TsCl, Pyridin, 20 h, RT	1.15 eq.	---	normal	CHCl <sub>3</sub>	6	50	---
277 mg	1.4 eq. TsCl, Pyridin, 20 h, RT	1.00 eq.	---	normal	EE	24	100	27 %
296 mg	1.4 eq. TsCl, Pyridin, 20 h, RT	1.60 eq.	---	normal	Et <sub>2</sub> O	16→2.5	70→80	11 %
101 mg	1.4 eq. TsCl, Pyridin, 20 h, RT	1.10 eq.	---	invers	EE	24	100	42 %
219 mg	1.4 eq. TsCl, Pyridin, 20 h, RT	1.10 eq.	0.23 eq.	invers	CHCl <sub>3</sub>	5	100	49 %
101 mg	1.4 eq. TsCl, Pyridin, 20 h, RT	1.10 eq.	0.99 eq.	invers	EE	6	100	<b>67 %</b>
333 mg	1.4 eq. TsCl, Pyridin, 20 h, RT	1.10 eq.	1.10 eq.	invers	EE	30	80	47 %
333 mg	1.4 eq. TsCl, Pyridin, 20 h, RT	1.10 eq.	1.10 eq.	invers	EE	30	90	46 %
333 mg	1.4 eq. TsCl, Pyridin, 20 h, RT	1.10 eq.	1.10 eq.	invers	EE	6	100	65 %
333 mg	1.4 eq. TsCl, Pyridin, 20 h, RT	2.00 eq.	1.10 eq.	invers	EE	6	80	46 %
333 mg	1.4 eq. TsCl, Pyridin, 20 h, RT	2.00 eq.	1.10 eq.	invers	EE	6	90	42 %
333 mg	1.4 eq. TsCl, Pyridin, 20 h, RT	2.00 eq.	1.10 eq.	invers	EE	6	100	43 %

#### Erläuterungen zur Tabelle:

- Bei der 2-stufigen Reaktion wurde die Bildung des tosylierten Zuckers und des Epoxids als Reaktion mit etwa konstanter Ausbeute betrachtet, da die Reaktionsbedingungen bei dieser ersten Teilreaktion konstant gehalten wurden.
- Die angegebenen Äquivalente an Kaliumphthalimid und Kronenether beziehen sich auf die eingewogene Masse des Edukts **5** und nicht auf die des tosylierten Zuckers oder des Epoxids.
- Unter Aufarbeitung wird das organische Lösemittel genannt, welches zum Ausschütteln gegen Wasser benutzt nach Beendigung des ersten Teilschritts der Reaktion verwendet wurde.

Im Anschluss an die erfolgreiche Einführung der zweiten Aminofunktionalität auf dem hier beschriebenen Weg gelang die Darstellung von Verbindung **17** durch Benzoylierung der freien Hydroxylgruppen mit einer guten Ausbeute von 84 % (siehe Abbildung 6.12).

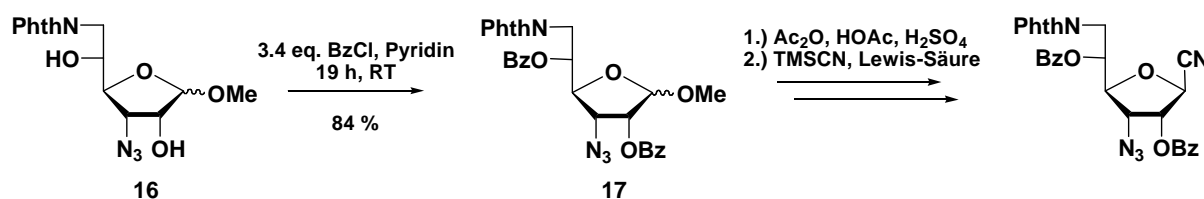


Abb. 6.12: Einführung von Benzoylschutzgruppen in Verbindung **16** und Reaktionsschema zur anschließenden Darstellung eines C-Glycosids.

Mit Verbindung **17** stand nun ein Baustein zur Verfügung, der nach Acetylyse des Methylglycosids leicht in ein C-Glycosid überführt werden konnte. Aufgrund der zuvor erwähnten Problematik bei der Aufarbeitung von Verbindung **16** wurde jedoch nach einer weiteren, verbesserten Variante für die Herstellung von Verbindung **17** gesucht. Diese wird nachfolgend in Kapitel 6.2.4 beschrieben.

#### 6.2.4 Variante C: Einführung der zweiten Aminogruppe mit vorherigem Schutz der freien Hydroxylgruppen und anschließende Erzeugung des C-Glycosids

Mit dem in Abschnitt 6.2.3. beschriebenen Ansatz war prinzipiell ein Zugang zur gewünschten Verbindung **17** gefunden worden. Da bei diesem Syntheseweg jedoch Probleme bei der säulenchromatographischen Aufreinigung auftraten, wurde nach einem Weg gesucht die Hydroxylgruppe an C-5 vor der Einführung des Stickstoffs an C-6 mit einer Benzoylgruppe zu schützen, so dass keine unerwünschte Epoxidbildung mehr auftreten konnte. Der zu diesem Zweck geplante Syntheseweg ist in Abbildung 6.13 dargestellt.

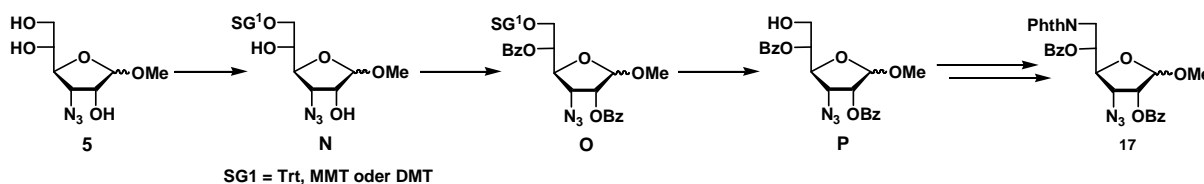


Abb. 6.13: Geplanter Syntheseweg zur verbesserten Darstellung von Verbindung **17**.

Aufgrund der höheren Reaktivität des primären Alkohols an C-6 ist eine direkte Blockierung der sekundären Hydroxylgruppe an C-5 mit einer Benzoylschutzgruppe nicht möglich. Daher musste vor Einführung der Benzoylschutzgruppe die primäre Hydroxylgruppe selektiv geschützt werden. Die in Abbildung 6.14 als SG<sup>1</sup> bezeichnete Schutzgruppe musste daher in der Lage sein, selektiv mit einem primären Alkohol zu reagieren und sollte gleichzeitig orthogonal zu den nachfolgend einzuführenden Benzoylschutzgruppen und der Azidgruppe sein, um in einem Folgeschritt selektiv abgespalten werden zu können. Des Weiteren war

darauf zu achten, dass SG<sup>1</sup> - falls sauer abspaltbar - unter milden Bedingungen entfernt werden konnte, da durch die Verwendung von Benzoylschutzgruppen in stark saurem Milieu ein Acylshift wahrscheinlich wäre.

Schutzgruppen, die diese Kriterien erfüllen, sind Tritylschutzgruppen [Trityl (Trt), 4-Monomethoxytrityl (MMT) und 4,4'-Dimethoxytrityl (DMT)]. Sie können aufgrund ihres sterischen Anspruchs meist selektiv mit primären Alkoholen zur Reaktion gebracht werden, lassen sich unter milden basischen Bedingungen einführen und unter vergleichsweise milden sauren Bedingungen abspalten, da sie stabile, triphenylische Kationen bilden können.

Aufgrund der Möglichkeit eines Acylshifts bei einer Abspaltreaktion im Säuren fiel die Wahl der Schutzgruppe auf DMT, da sich DMT dank zweier para-methoxysubstituierter Phenylringe unter milderer Bedingungen als die Trityl- und die MMT-Schutzgruppe abspalten lässt.<sup>146</sup>

Da sich die DMT-Schutzgruppe unter gleichen Bedingungen in ein Molekül einführen lässt wie eine Benzoylschutzgruppe, bestand zudem die Möglichkeit beide Funktionalitäten in einer sequentiellen Eintopfreaktion einzuführen.

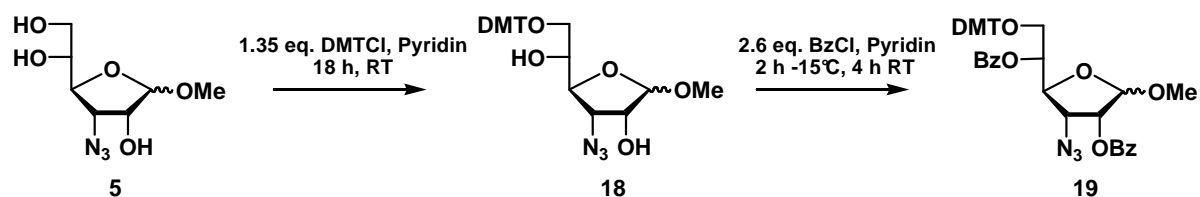


Abb. 6.14: Synthese von Verbindung **19** durch Einführung von DMT- und Benzoylschutzgruppen in einer sequentiellen Eintopfreaktion.

Die Einführung der DMT-Gruppe gelang, wie in Abbildung 6.14 gezeigt, unter milden Bedingungen mit 1.35 eq. DMT-chlorid in Pyridin bei Raumtemperatur. Die Bildung von Verbindung **18** konnte per MALDI-MS durch Entnahme einer Probe aus der Reaktionsmischung nachgewiesen werden, wobei trotz des DMT-chlorid Überschusses weder in den MALDI-Spektren noch auf den Dünnschichtchromatogrammen ein Hinweis auf die Bildung von mehrfach DMT-substituierten Produkten gefunden wurde. Nach 18 h war praktisch kein Edukt mehr detektierbar, woraufhin die Reaktionsmischung gekühlt und mit 2.6 eq. BzCl versetzt wurde. Sechs Stunden nach der Zugabe ließ sich Verbindung **18** bei der dünnschichtchromatographischen Kontrolle nicht mehr detektieren. Verbindung **19** konnte wie zuvor Verbindung **18** maldispektroskopisch durch Entnahme einer Probe aus der Reaktionslösung nachgewiesen werden. Zusätzlich zu Verbindung **19** wurden geringe Mengen von Verbindung **7** detektiert, ein Hinweis darauf, dass eine kleine Menge von Verbindung **5** bei der im ersten Schritt durchgeführten Umsetzung nicht mit DMT-chlorid zur

Reaktion gebracht werden konnten. Für eine grobe Aufreinigung von Verbindung **19** wurde die Reaktionslösung bis zur Trockne eingengt und anschließend mit Chloroform und Wasser ausgeschüttelt, um Reste an Pyridin und die bei der Reaktion entstehenden Pyridiniumsalze vor der sauren Abspaltung abzutrennen.

Auf eine Bestimmung der Ausbeute und auf eine detaillierte Charakterisierung der Zwischenstufen **18** und **19** wurde verzichtet, da die nachfolgende saure Entschützung ohne vorherige säulenchromatographische Aufreinigung und Isolierung dieser Zwischenprodukte durchgeführt werden sollte.

Für die Entschützung der DMT-Gruppe wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen getestet. Entschützungsversuche mit 60 % iger wässriger Essigsäure zeigten, dass Verbindung **19** aufgrund ihrer geringen Polarität in polaren Lösmitteln kaum in Lösung gebracht werden konnte. Selbst nach zehn Tagen bei Raumtemperatur war das Edukt aufgrund der schlechten Löslichkeit nicht vollständig verbraucht. Nach Abbruch und Aufreinigung wurde neben der gewünschten Verbindung **20** auch Verbindung **21** mit einer Ausbeute von 14 % erhalten. Auch Versuche die Löslichkeit durch eine Reaktion im Ultraschallbad zu erhöhen scheiterten. Da ein Acylshift und somit die Bildung des Nebenprodukts **21** durch lange Reaktionszeiten begünstigt wird, wurde nachfolgend nach Möglichkeiten gesucht, die DMT-Schutzgruppe in einem weniger polaren Lösemittel abzuspalten, um die Löslichkeit und somit die Reaktivität des Edukts **19** zu erhöhen.

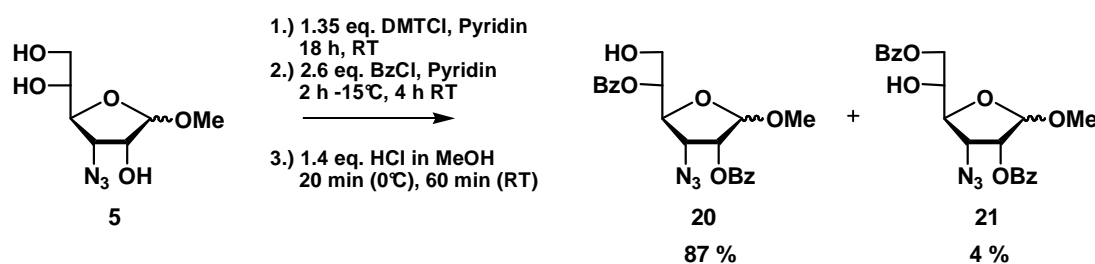


Abb. 6.15: Synthese von Verbindung **20** in drei Stufen aus Verbindung **5**.

Als geeignete Variante erwies sich die Verwendung von methanolischer HCl-Lösung, die durch Zugabe von Acetylchlorid zu einer Lösung von Verbindung **19** in trockenem Methanol erzeugt wurde.

Durch Verwendung der methanolischen HCl-Lösung konnte Verbindung **19** mit einer hervorragenden Ausbeute von 87 % über 3 Stufen (ausgehend von Verbindung **5**) in Verbindung **20** überführt werden (siehe Abbildung 6.15). Eine Zusammenfassung der durchgeführten Versuche zur DMT-Abspaltung gibt Tabelle 6.3.

Tab. 6.3: Versuche zur Synthese von Verbindung **19** durch Einführung von DMT- und Benzoylschutzgruppen in einer sequentiellen Eintopfreaktion.

DMT-Abspaltung	Reaktionszeit DMT-Abspaltung	Verbindung <b>20</b> (Ausbeute bezogen auf Edukt <b>5</b> )	Verbindung <b>21</b> (Ausbeute bezogen auf Edukt <b>5</b> )
HOAc (60 %), RT	10 d (RT)	70 %	14 %
4.5 eq. HCl in MeOH	15 min (RT)	84 %	---
2.5 eq. HCl in MeOH	10 min (-8° C), 20 min (RT)	85 %	---
1.4 eq. HCl in MeOH	20 min (0° C), 60 min (RT)	87 %	4 %

Bei der Synthese von Verbindung **20** im Multigrammaßstab (47.2 g Edukt **5**) sank die Ausbeute von 87 % auf 67 %. Probleme bei der Synthese in dieser Größenordnung bereitete unter anderem die Löslichkeit des Edukts. Während im kleinen Maßstab (1 g des Edukts **5**) keine Löslichkeitsprobleme im Verlauf der dreistufigen Synthese zu beobachten waren, löste sich das Zwischenprodukt **19** bei einem großen Ansatz erst nach längerer Behandlung im Ultraschallbad. Der Grund dafür dürfte die geringere Oberfläche des Zwischenprodukts bei einem großen Ansatz sein (weniger Angriffsfläche für das Lösemittel). Der 1 g Ansatz wurde in einem 250 ml Kolben durchgeführt. Für vergleichbare Reaktionsbedingungen, hätte ein Kolben mit einem Volumen von etwa 25 l benutzt werden müssen, der jedoch nicht zur Verfügung stand. Stattdessen wurde ein 4 l Kolben verwendet. Des Weiteren dauerte die Neutralisation der HCl-sauren Methanollösung mit Et<sub>3</sub>N beim Ansatz im Multigrammaßstab länger, da die Wärmeentwicklung bedeutend größer war und die vollständige Kühlung der Reaktionsmischung bei einem Reaktionsvolumen von 4 l ebenfalls mehr Zeit benötigte, als bei einem Volumen von lediglich 60 Millilitern. So war es nicht überraschend, dass aufgrund der längeren Lösungs-, Abkühl- und Neutralisationszeiten mehr des unerwünschten Nebenprodukts **21** entstand als bei Ansätzen in kleinerem Maßstab. Verbindung **21** konnte jedoch in einem Folgeschritt unter Verwendung von NaOMe in Methanol wieder in das Edukt **5** überführt und so zur erneuten Synthese von Verbindung **20** verwendet werden.

Mit Verbindung **20** lag nun ein Molekül vor, welches durch die Benzoylschutzgruppe an C-5 keine unerwünschte intramolekulare Epoxidbildung bei der nachfolgenden Tosylierung mehr eingehen konnte (zur Epoxidbildung siehe Abschnitt 6.2.3).

Die nachfolgende Tosylierung von Verbindung **20** mit Tosylchlorid in Pyridin (siehe Abbildung 6.16) gelang entsprechend, ohne dass die Bildung eines Epoxids bei der Reaktion beobachtet werden konnte, mit einer sehr guten Ausbeute von 87 % nach säulenchromatographischer Aufreinigung. Die gute Ausbeute ließ sich auch im Multigrammmaßstab reproduzieren.

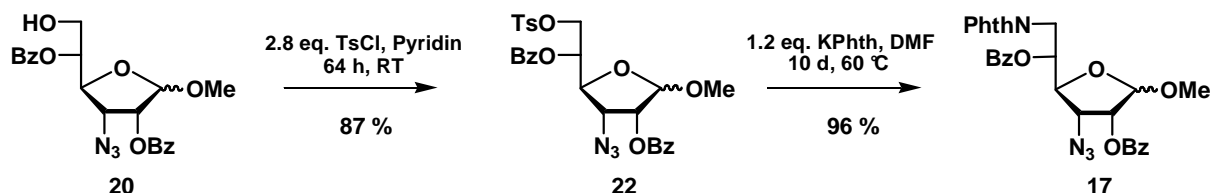


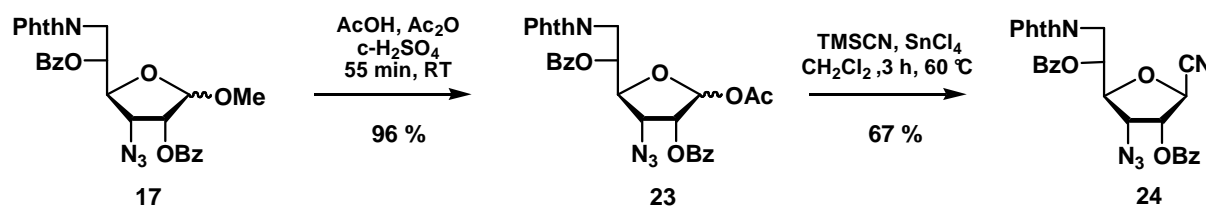
Abb. 6.16: Synthese von Verbindung **17** aus Verbindung **20** in zwei Stufen.

Die Substitution des Tosylats **22** mit Kaliumphthalimid gelang im nächsten Schritt mit einer exzellenten Ausbeute von 96 %. Aufgrund der geringen Löslichkeit des Kaliumphthalimids in DMF wurde das Ende der Reaktion jedoch erst nach 10 Tagen beobachtet. Der Reaktionsverlauf wurde einmal täglich durch Vergleich der Peakflächen in den HPLC-Chromatogrammen einer Probe der Reaktionsmischung verfolgt. Es wurden keine Versuche unternommen die Reaktionszeit durch eine verbesserte Löslichkeit des Kaliumphthalimid mit Kronenether (18-K-6) zu verkürzen, da die Ausbeute hervorragend war und sich auch im Multigrammmaßstab (30 g Edukt **22**) reproduzieren ließ.

Verbindung **17** konnte letztlich mit diesem etwas längeren Reaktionsweg mit einer sehr guten Ausbeute von 72 % über 5 Stufen aus Verbindung **5** erzeugt werden.

Da Verbindung **17** die beiden gewünschten Aminofunktionalitäten in Form eines Phthalimids, bzw. einer Azidgruppe enthielt, musste in den nächsten Reaktionsschritten lediglich noch ein anomeres C-Glycosid erzeugt werden, um alle für die Zielstrukturen notwendigen Funktionalitäten im Molekül zu haben. Das C-Glycosid sollte analog zur Darstellung von Verbindung **9** aus Verbindung **7** (siehe Abschnitt 6.2.2) durch Acetolyse des Methylglycosids und anschließende Einführung eines Nitrils mit TMScyanid und Zinntetrachlorid synthetisiert werden.

Die zunächst durchgeführte Acetolyse gelang mit einer sehr guten Ausbeute von 96 % (siehe Abbildung 6.17). Das so erzeugte anomere Acetat **23** konnte im Anschluss mit einer guten Ausbeute von 67 % in das Schlüsselintermediat **24** überführt werden, wobei aufgrund des Nachbargruppeneffekts der Benzoylschutzgruppe an C-2 lediglich das  $\beta$ -Anomer erhalten wurde. Beide Reaktionen wurden auch im Multigrammmaßstab durchgeführt, wobei letztlich 40 g von Verbindung **24** hergestellt werden konnten.


 Abb. 6.17: Synthese von Verbindung **24** in zwei Stufen aus Verbindung **17**.

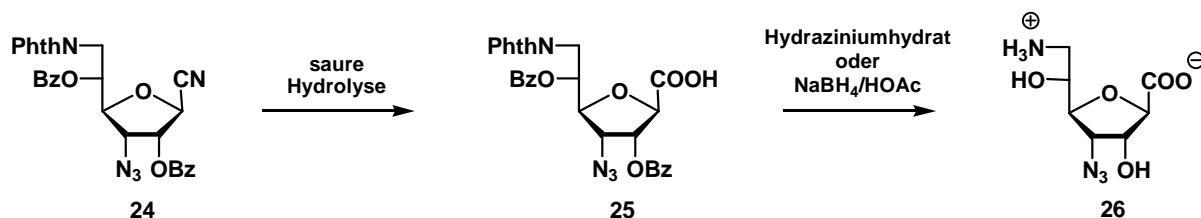
Dank der zweimal verbesserten Schutzgruppenstrategie wurde ein Zugang zu Verbindung **24** gefunden, der mit hervorragenden Ausbeuten möglich war und auch im Multigrammaßstab umgesetzt werden konnte. Ausgehend von der literaturbekannten 3-Azidoalloseverbindung **3** gelang die Synthese von Verbindung **24** in acht Stufen mit einer sehr guten durchschnittlichen Ausbeute von 90 % pro Stufe.

Mit Verbindung **24** lag nun ein Zucker vor, bei dem alle benötigten Funktionalitäten für die Darstellung einer Zuckerdiaminosäure enthalten waren. Zur Synthese der Zielstrukturen mussten die Funktionalitäten nun noch entschützt und anschließend neu geschützt werden, um Bausteine zu erhalten, die für Standardpeptidkopplungsreaktionen nach der Fmoc-Strategie geeignet sind.

Diese Modifikationen des Zuckers werden in den nächsten Kapiteln beschrieben.

### 6.2.5 Umsatz von Schlüsselverbindung **24** zur freien Zuckerdiaminosäure **26**

Um ausgehend von Verbindung **24** eine freie Zuckerdiaminosäure zu erzeugen, mussten in den folgenden Schritten die Nitrilfunktion zur Carbonsäure, sowie das Phthalimid zum freien Amin umgesetzt werden. Bei der basischen Entschützung eines Phthalimids war zu erwarten, dass die Benzoylschutzgruppen aufgrund ihrer höheren Labilität gegenüber Nucleophilen ebenfalls abgespaltet werden (siehe Abbildung 6.18).


 Abb. 6.18: Geplante Synthese der freien Zuckerdiaminosäure **26** aus Verbindung **24**.

Zur Hydrolyse von Nitrilen stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Neben der basischen Hydrolyse ist auch eine Hydrolyse in wässrig-saurem Medium, z.B. mit Salzsäure möglich. Die Hydrolyse mit Salzsäure hat den Vorteil, dass sich Salzsäure im Gegensatz zu

Hydroxy- und anderen nucleophilen Basen in vielen organischen Lösemitteln in ausreichender Konzentration löst. Aufgrund der unpolaren Struktur von Verbindung **24** wurde daher die saure Hydrolyse des Nitrils bevorzugt.

Die Abspaltung von Phthaloylschutzgruppen findet in der Regel unter stark basischen Reaktionsbedingungen statt.<sup>147-150</sup> Zumeist wird Hydrazin verwendet, das als Abspaltprodukt ein schwerlösliches Phthalazin bildet. Eine Ausnahme bildet eine von *Ganem et al.*<sup>151</sup> entwickelte Methode, bei der unter wesentlich milderen Bedingungen zunächst eine der beiden Carbonylfunktionen der Phthaloylgruppe unter Verwendung von  $\text{NaBH}_4$  zum Alkohol reduziert wird (siehe Abbildung 6.19). In einem zweiten Reaktionsschritt wird der gebildete Alkohol in essigsaurer Lösung bei  $80\text{ }^\circ\text{C}$  unter Bildung eines Lactons abgespalten und man erhält die freie Aminogruppe.

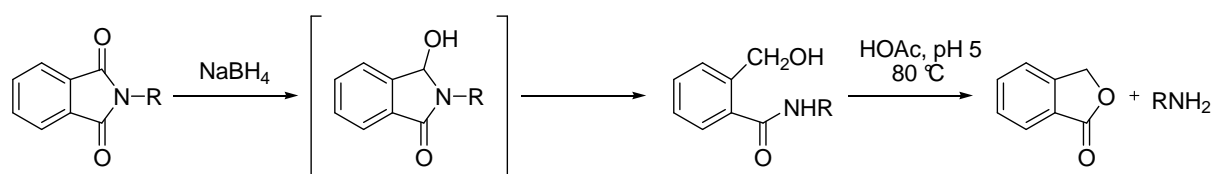


Abb. 6.19: Mechanismus der Phthaloylabspaltung nach einer Methode von *Ganem et al.*<sup>151</sup>

### a. Saure Hydrolyse

Die saure Hydrolyse des Nitrils wurde in einer 4 molaren HCl-Lösung mit unterschiedlichen Verhältnissen von Dioxan und Wasser durchgeführt, wobei mit einem Volumenverhältnis Dioxan/Wasser von 7:3 bei einer Temperatur von  $60\text{ }^\circ\text{C}$  eine sehr gute Ausbeute von 91 % erzielt werden konnte. Eine Zusammenfassung der durchgeführten Versuche zeigt Tabelle 6.4.

Tab. 6.4: Versuche zur Darstellung von Verbindung **25** durch saure Hydrolyse des Schlüsselintermediats **24**.

$\text{H}_2\text{O}/\text{Dioxan}$ (V/V)	HCl-Konzentration	Temperatur	Reaktionszeit	Ausbeute Verbindung <b>25</b>
10:1	4 M	RT	96 h	40 % (56 % Edukt)
10:1	4 M	$60\text{ }^\circ\text{C}$	21 h	80 %
7:3	4 M	$60\text{ }^\circ\text{C}$	21 h	91 %

### b. Abspaltung der Phthaloylschutzgruppe

Ausgehend von der Phthalimid-geschützten Carbonsäure **25** musste nun das freie Amin **26** synthetisiert werden. Die ersten Versuche zur Abspaltung der Phthaloylschutzgruppe wurden unter den Bedingungen der Abspaltmethode von *Ganem et al.*<sup>151</sup> durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Benzoylschutzgruppen unter diesen Bedingungen ebenfalls abgespalten wurden, so dass Verbindung **26** ohne weitere Behandlung mit Base aus Verbindung **25** erhalten wurde.

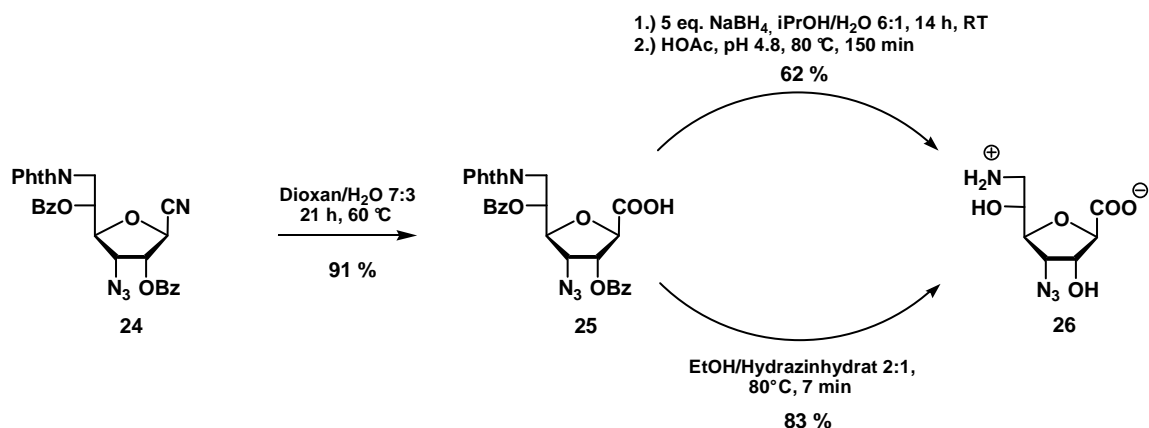


Abb. 6.20: Darstellung der freien Zuckerdiaminosäure **26** aus Schlüsselintermediat **24**.

Bei anschließenden Versuchen das Produkt zu isolieren konnte mit gängigen Aufarbeitungsmethoden (RP-Säulenchromatographie, Ausschütteln, Umkristallisation) leider keine vollständige Trennung des entstehenden Zuckers von dem als Nebenprodukt anfallenden Natriumacetat erreicht werden. Eine Bestimmung der Ausbeute war daher nur durch Auswertung der Integrale von NaOAc und Verbindung **26** im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum möglich, wobei auf diese Weise eine Ausbeute von 62 % für die Abspaltung ermittelt werden konnte (siehe Abbildung 6.20).

Eine bessere Reinheit der freien Zuckerdiaminosäure konnte durch Versuche zur Entschützung des Phthalimids mittels Hydrazinolyse erzielt werden (siehe Abbildung 6.20). Diese wurde bei 80 °C in einer 2:1 Mischung von Hydrazinhydrat und Ethanol durchgeführt. Dünnschichtchromatographische Kontrolle zeigte die vollständige Entschützung von Verbindung **25** bereits nach 8 Minuten an. Direkte RP-säulenchromatographische Trennung der Zuckerdiaminosäure **26** von dem als Nebenprodukt entstehenden Phthalazin schlug fehl, da selbst mit reinem Wasser als Elutionsmittel keine ausreichende Trennung erzielt werden konnte.

Die entstehende Zuckerdiaminosäure ist, im Gegensatz zu dem als Nebenprodukt entstehenden Phthalazin, gut in Wasser löslich. Dies wurde für eine grobe Aufreinigung vor der RP-Säule genutzt. Nach Einengen der Reaktionslösung zur Trockne konnte durch Lösen des Rohprodukts in Wasser und anschließendes Zentrifugieren (8500 U/min, 4 °C, 20 min) ein Großteil des Phthalazins abgetrennt werden, da es sich als reinweißes Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens abschied. Die verbleibenden Verunreinigungen wurden mit einer RP-Säule (C-18 funktionalisiertes Kieselgel) und Wasser als Elutionsmittel abgetrennt, so dass keine Verunreinigungen mehr im NMR-Spektrum zu erkennen waren.

Eine Übersicht über die durchgeführten Versuche zur Phthaloylentschützung zeigt Tabelle 6.5.

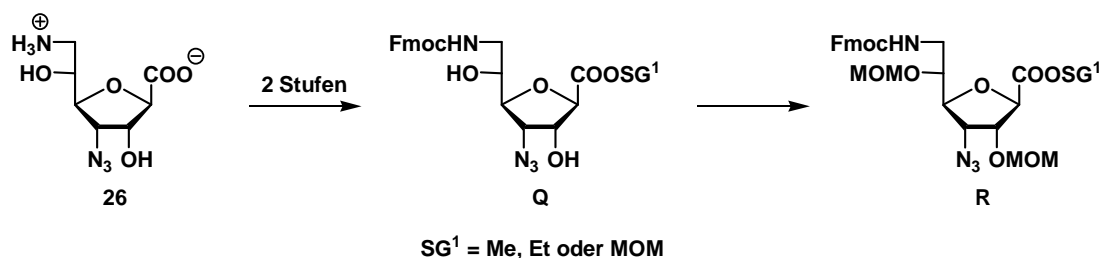
Tab. 6.5: Versuche zur Entschützung von Verbindung **25**.

Reaktionsbedingungen	Ausbeute	Aufarbeitung	Reinheit
a) RT, H <sub>2</sub> O/i-PrOH 6:1, 21 h	62 %	RP-Säule	< 50 %
b) 80 °C, HOAc (pH 4.8), 2.5 h			
80 °C, Hydrazinhydrat/EtOH 1:2 15 min	> 70 %	H <sub>2</sub> O, Zentrifuge (4 °C, 8500 U/min, 20 min), RP-Säule	> 95 %
80 °C, Hydrazinhydrat/EtOH 1:2 8 min	83 %	H <sub>2</sub> O, Zentrifuge (4 °C, 8500 U/min, 20 min), RP-Säule	> 95 %

Da die Füllmittel für RP-Säulenchromatographie sehr teuer sind eignete sich diese Aufarbeitungsmethode nur für Synthesen im kleinen Maßstab. Für größere Ansätze wurde eine kurze Normalphasensäule zur Aufarbeitung gewählt (5 – 6 cm Höhe) und das Produkt mit Acetonitril → Acetonitril/H<sub>2</sub>O 3:1 eluiert. Es zeigte sich, dass das so gewonnene Rohprodukt für die weitere Umsetzung geeignet war.

### 6.2.6 Synthese der orthogonal geschützten, peptidkupplungstauglichen Zuckerdiaminosäuren aus der freien Zuckeraminosäure **26**

Mit Verbindung **26** stand eine Zuckeraminosäure zur Verfügung, die mit Standardmethoden aus der Chemie der Aminosäuren und Peptide in die gewünschten, orthogonal geschützten Zuckerdiaminosäuren überführt werden sollte. Der geplante Syntheseweg für die Einführung der dazu notwendigen Schutzgruppen ist in den Abbildungen 6.21 und 6.22 skizziert.


 Abb. 6.21: Geplante Synthese des Intermediats R aus der freien Zuckeraminosäure **26**.

Die ungeschützte Aminofunktionalität der Zuckeraminosäure **26** sollte zunächst durch eine Fmoc-Gruppe geschützt werden. Nach Einführung der Fmoc-Gruppe, mussten nun nur noch die beiden OH-Gruppen mit MOM-Schutzgruppen blockiert werden, um Zielverbindung A zu erzeugen (siehe Syntheschema Abbildung 6.22). Versuche aus der Doktorarbeit von F. Sicherl<sup>121</sup> zeigten jedoch, dass die Einführung der MOM-Schutzgruppen immer eine

gleichzeitige Veresterung der Carbonsäurefunktion zur Folge hatte. Sicherl beschrieb zudem, dass sich dieser Ester im Anschluss nicht ohne eine gleichzeitige Abspaltung der Fmoc-Gruppe verseifen ließ. Daher wurde vor der Einführung der MOM-Schutzgruppen die Erzeugung eines Esters erwogen, der unter milden basischen Bedingungen in Anwesenheit einer Fmoc-Schutzgruppe eventuell verseift werden konnte. Hierbei wurden Methyl- und Ethylester favorisiert, da sie sich im Vergleich zu anderen Carbonsäureestern schon bei verhältnismäßig niedrigen pH-Werten hydrolysieren lassen.<sup>152</sup>

Anschließend sollten die MOM-Schutzgruppen mit Phosphorpentoxid und Formaldehyddimethylacetal eingeführt werden. Diese Variante bietet sich als gute Alternative für die Verwendung der extrem giftigen MOM-Halogenide an.

Nach erfolgreicher Einführung der Methoxymethylschutzgruppen sollte auf zwei unterschiedlichen Wegen weiter verfahren werden. Zum einen sollte eine selektive Entschützung des Esters und zum anderen eine gleichzeitige Entschützung von Ester und Fmoc-Schutzgruppe entweder durch unterschiedliche starke Basen oder unterschiedliche Konzentrationen an Base erreicht werden. Dies eröffnet die Möglichkeit alle gewünschten Zielverbindungen (**A**, **B** und **C**) ausgehend von Intermediat **R** zu erzeugen (siehe Abbildung 6.22).

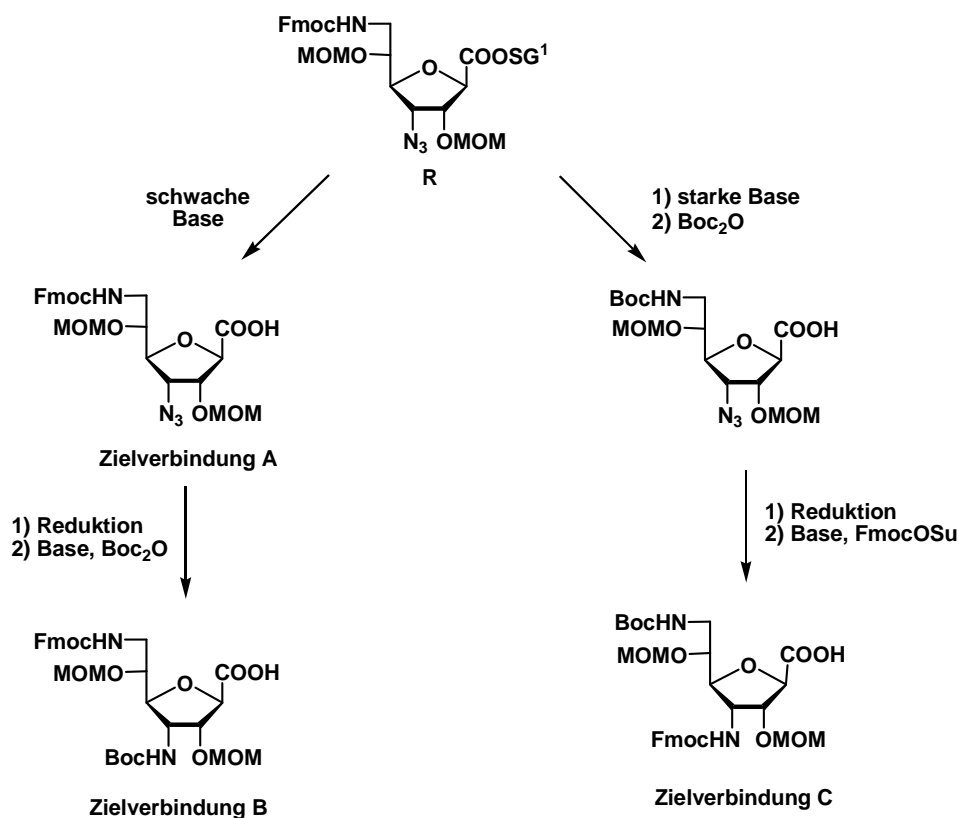


Abb. 6.22: Schema für die geplante Synthese der Zielverbindungen **A**, **B** und **C** ausgehend von Intermediat **R**.

### a. Einführung der Fmoc-Schutzgruppe

Nach dem in Abbildung 6.23 skizzierten Syntheseweg ließ sich Verbindung **26** mit FmocOSu in einer 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Lösung in Wasser/Aceton 1:1 mit einer sehr guten Ausbeute von 90 % zu Verbindung **27** umsetzen (siehe Abb. 6.24). Verbindung **27** formte bei der Aufarbeitung eine zähe, gummiartige Masse, die in allen getesteten Lösemitteln schlecht löslich war und nur schwer getrocknet werden konnte, da die Restlösemittel in der gummiartigen Masse eingeschlossen blieben. Beim Anlegen eines Vakuums zur Entfernung der Restlösemittel kam es – abhängig vom Lösemittel - entweder zu starker Schaumbildung oder zu einer plötzlichen Verbreitung des Produkts im Spritzschutz. Ein Umkristallisieren der Substanz war nicht möglich, da sich bei Zugabe unterschiedlicher Lösemittel und Lösemittelgemische jeweils ein zäher Schleim bildete, der kaum noch aus den Reaktionsgefäßen zu entfernen war. Eine Kristallisation des Produkts war in keinem Fall zu erkennen. Eine grobe Reinigung durch Ausschütteln war aufgrund der Schwerlöslichkeit des Produkts ebenfalls nicht möglich. Eine geringe Löslichkeit der Substanz konnte in einigen Acetonitril/Wasser-Gemischen beobachtet werden; daher wurde die Reaktionsmischung nach beendeter Reaktion, Einstellen des pH-Werts auf 4 mit 1 M HCl und vorsichtigem Einrotieren, in großen Mengen Acetonitril/Wasser 3:1 aufgenommen, direkt auf Kieselgel aufgezogen und per Säulenchromatographie über eine kurze Kieselgelsäule (Höhe ca. 5 cm) gereinigt, wobei die unpolaren Anteile der Reaktionsmischung zunächst mit reinem Acetonitril eluiert wurden. Das Produkt wurde letztlich mit Wasser/Acetonitril 1:10 von der Säule gewaschen. Aufgrund der Schwerlöslichkeit kristallisierte ein Teil des Produkts fortlaufend am Hahn der Säule aus. Aus diesem Grund musste der Hahn nach jeder aufgefangenen Fraktion mit Wasser/Acetonitril 1:3 gut gespült werden. Beim Anlegen von Vakuum zur Entfernung der Restlösemittel aus dem gesäulten Produkt kam es erneut zu starker Schaumbildung. Daher war es nötig den Druck bei der Trocknung der Substanz in sehr kleinen Schritten zu erniedrigen (ab 300 mbar ca. 1 mbar/Minute). Nach der Trocknung lag die Substanz als feinverteilter, weißer Feststoff vor, der bei erneuter Zugabe von Lösemitteln eine Suspension ergab und sich unter kräftigem Rühren, bzw. durch Zentrifugieren erneut in eine zähe, gummiartige Masse verwandelte. Grund für dieses ungewöhnliche Verhalten von Verbindung **27** dürfte ihr amphiphiler Charakter sein. Mit einer Fmoc-Schutzgruppe auf der einen Seite und einer Carbonsäurefunktion auf der anderen Seite stehen hier eine sehr polare und eine sehr unpolare Gruppe in räumlicher Nähe. Dies könnte beispielsweise die Bildung von Micellen bei der Zugabe von Lösemitteln bewirken. Die Schwerlöslichkeit solcher Substanzen wurde bereits in meiner Diplomarbeit an einer ähnlichen Verbindung beobachtet.<sup>153</sup>

**b. Veresterung der Carbonsäurefunktion und Einführung der MOM-Schutzgruppen**

Nachdem die Fmoc-Gruppe mit guter Ausbeute eingeführt werden konnte, sollte im nächsten Schritt die Carbonsäurefunktion mit einem geeigneten Alkohol verestert werden. Dies sollte zum einen die Löslichkeit und damit die Handhabbarkeit und Reaktivität des Zuckers verbessern und zum anderen die Bildung eines MOM-Esters bei der nachfolgend geplanten Einführung von Methoxymethylschutzgruppen verhindern (siehe Abb. 6.21).

Für diese Veresterung wurden drei unterschiedliche Bedingungen getestet. Zunächst wurden Carbodiimide eingesetzt, die bei der Herstellung von Estern – oftmals in Kombination mit DMAP als Acyltransferreagenz – breiten Einsatz finden (Steglich-Veresterung).<sup>154</sup> Ein allgemeiner Mechanismus zur Esterbildung mit Carbodiimiden und DMAP ist in Abbildung 6.23 gezeigt. Der Zusatz von DMAP führt zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit und damit zur Minimierung der literaturbekannten 1,3-Umlagerung des Intermediats (*O*-Isoacylharnstoff) zum unreaktiven *N*-Acylharnstoff.

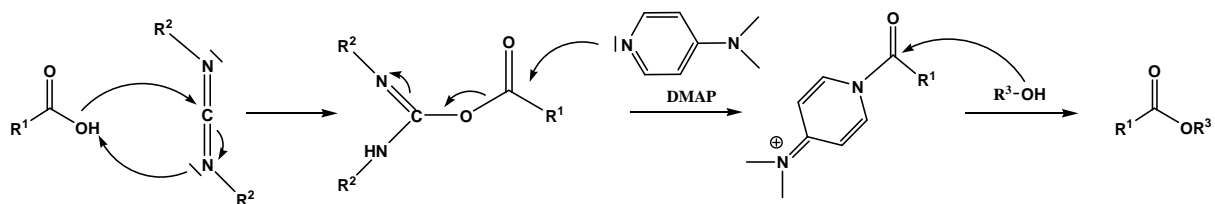


Abb. 6.23: Mechanismus der Veresterung mit Carbodiimiden und DMAP (Steglich-Veresterung).

Erste Versuche unter Verwendung von DCC ergaben das gewünschte Produkt mit einer Ausbeute von 50 %. Es zeigte sich, dass die zuvor beschriebene Schwerlöslichkeit des Edukts unproblematisch war, da sich nach Suspension des Edukts in Methanol, Zugabe des Carbodiimids und DMAP ein langsamer Umsatz des Edukts beobachten ließ, der nach etwa 12 h beendet war. Der als Nebenprodukt entstehende *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff (DCU) ließ sich nach beendeter Reaktion durch einfaches Filtrieren der Reaktionsmischung entfernen, jedoch wurden bei der dünnschichtchromatographischen Reaktionskontrolle mehrere Nebenprodukte detektiert, die nicht näher untersucht wurden.

Aufgrund der geringen Ausbeute wurden im Anschluss Versuche zur Bildung des Esters unter Verwendung von DIC durchgeführt. Mit diesem Kupplungsreagenz ließ sich die Ausbeute auf 65 % steigern, hier gelang jedoch die vollständige Abtrennung des bei der Reaktion entstehenden DIU weder durch Säulenchromatographie, noch durch Umkristallisierungsversuche aus EE/Hexan-Gemischen. Die Ausbeute wurde daher durch einen Vergleich der Peakflächen des anomeren Protons von Verbindung **28** und der

Methylsignale des *N,N'*-Diisopropylharnstoff (DIU) im H-NMR Spektrum nach der Säulenchromatographie bestimmt.

Aufgrund der eher unbefriedigenden Ergebnisse der Veresterungsversuche mit DIC und DCC wurde ein dritter Ansatz durchgeführt, beim dem die Erzeugung des Esters klassisch, unter Verwendung von Alkohol und Säure durchgeführt werden sollte. Erste Versuche unter Verwendung von Methanol mit saurem Ionentauscher zeigten nur einen sehr schwachen Produktpot. Um den Ionentauscher nicht zu zermahlen wurde die Reaktion mit einem Schüttler durchgeführt, der eine konstante Durchmischung gewährleistete. Es zeigte sich, dass die Reaktion bereits nach kurzer Zeit zum Erliegen kam und sich im Gleichgewicht zwischen Säure und Esterbildung befand, wobei das Gleichgewicht sehr weit auf der Seite des Edukts lag. Eine Verbesserung ergab sich durch Zugabe von wasserfreiem Natriumsulfat als Wasserfänger. Durch den Entzug des Wassers aus der Reaktionslösung gelang es das Edukt vollständig in das Produkt zu überführen. Die Synthese des Methylesters gelang auf diese Weise mit einer Ausbeute von 70 % bei einer Reaktionszeit von 24 h. Diese Reaktion wurde bei der Synthese des Methylesters im größeren Maßstab der Synthese mit DIC vorgezogen, da bei vergleichbarer Ausbeute eine größere Reinheit des Produkts erzielt werden konnte. Eine Zusammenfassung der Veresterungsversuche zeigt Tabelle 6.6.

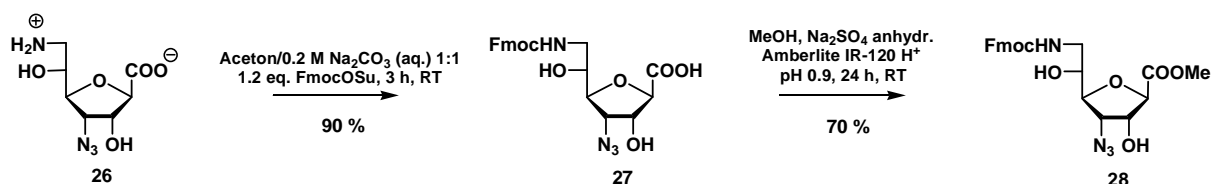


Abb. 6.24: Darstellung des Methylesters **28** ausgehend von der freien Zuckeramino­säure **26**.

Tab. 6.6: Versuche zur Veresterung von Verbindung **27**.

Veresterungsmethode	Ausbeute	Reaktionszeit	Temperatur
DCC (1.4 eq.), DMAP (1.1 eq.), MeOH	50 %	12 h	RT
DIC (1.3 eq.), DMAP (0.7 eq.), MeOH	65 %	12 h	RT
Ionentauscher (pH 0.9), MeOH, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anhydr.	70 %	24 h	RT

Im nächsten Schritt wurden die MOM-Schutzgruppen mit Formaldehyddimethylacetal und Phosphor­pentoxid eingeführt (siehe auch Abb. 6.21). Es wurde absolutiertes THF als Cosolvens verwendet, da das Edukt in reinem Formaldehyddimethylacetal nicht lösbar war.

Da es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, wurden große Überschüsse des Acetals (300 eq.) verwendet.

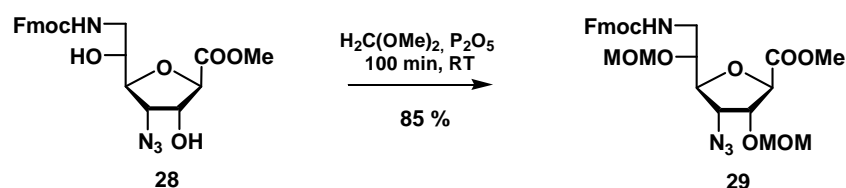


Abb. 6.25: Einführung von MOM-Schutzgruppen zur Synthese von Verbindung **29**

Phosphorpentoxid diente zur Bereitstellung katalytischer Mengen an Säure. Auf diese Weise gelang die Einführung der MOM-Schutzgruppen mit einer sehr guten Ausbeute von 85 % (siehe Abbildung 6.25).

### c. Selektive Verseifung des Methylester unter Beibehaltung der Fmoc-Schutzgruppe zur Synthese von Zielverbindung A

Zur Synthese der ersten Zielverbindung musste nun der Methylester unter milden basischen Bedingungen selektiv zur Carbonsäure verseift werden. Es konnte kein Hinweis auf eine vergleichbare Reaktion in der Literatur gefunden werden, in der eine selektive Verseifung eines Esters in Anwesenheit einer Fmoc-Schutzgruppe beschrieben wird. Das Finden geeigneter Verseifungsbedingungen war von besonderem Interesse, da die Ergebnisse prinzipiell auch auf Aminosäuren aller Art übertragbar sein sollten und somit ein universeller Einsatz in der Chemie der Amino- und Zuckerdiaminosäuren denkbar ist.

Es wurden unterschiedliche Konzentrationen der schwachen Base Natriumcarbonat in Wasser/Aceton-Gemischen getestet, wobei die selektive Verseifung mit einer 1:1 Mischung aus Aceton und einer 1 molaren wässrigen Natriumcarbonat-Lösung bei Raumtemperatur gelang. Unter diesen Bedingungen wurden lediglich Spuren eines UV-aktiven Nebenprodukts detektiert, was auf eine äußerst geringe Abspaltung der Fmoc-Gruppe hinwies. Da sich die Synthese zu diesem Zeitpunkt bereits in einem späten Stadium befand und sich die Fmoc-Schutzgruppe unter den gewählten schwach basischen Reaktionsbedingungen auch in Moleküle einführen lässt (siehe Kapitel 6.2.6 a)) wurden bei Ansätzen > 1 Gramm zusätzlich 0.1 eq. FmocOSu zugesetzt, um Spuren eines eventuell entstehenden freien Amins erneut mit Fmoc zu schützen. Letztlich gelang die selektive Verseifung unter diesen Bedingungen nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer sehr guten Ausbeute von 80 % (siehe Abbildung 6.26).

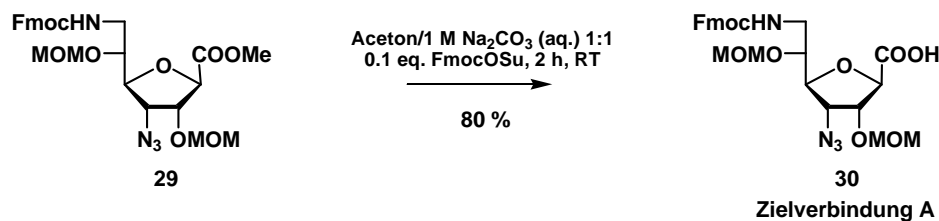


Abb. 6.26: Selektive Verseifung des Methylesters zur Synthese von Verbindung **30** (Zielverbindung A)

Da die selektive Verseifung eines Esters in Anwesenheit einer Fmoc-Schutzgruppe noch nicht in der Literatur beschrieben wurde, stellen diese Reaktionsbedingungen eine äußerst interessante Neuerung dar. Die Reaktion sollte in Zukunft systematisch auf ihre Übertragbarkeit auf Amino- und Zuckerdiaminosäuren aller Art untersucht werden.

#### d. Selektive Reduktion des Azids und Einführung einer Boc-Schutzgruppe zur Synthese von Zielverbindung B

Ausgehend von Zielverbindung **A** sollte nun Zielverbindung **B** durch Reduktion des Azids und anschließende Einführung einer Boc-Schutzgruppe synthetisiert werden. Zur Reduktion der Azidgruppe sollte eine Staudinger-Reduktion mit Trimethylphosphin durchgeführt werden. Die Einführung der BOC-Schutzgruppe sollte simultan zur Reduktion durch Verwendung von BocON erfolgen. Dazu wurde Verbindung **30** zunächst in THF gelöst, mit 1.6 eq. BocON versetzt und auf  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Im Anschluss wurden 1.1 eq. einer 1 molaren  $\text{PMe}_3$ -Lösung zugegeben und 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde anschließend auf Kiesegel aufgezogen und mehrfach mit Toluol coevaporiert. Auf diese Weise gelang nach säulenchromatographischer Aufreinigung die Synthese von Verbindung **31** in zwei Stufen ausgehend von **30** mit einer Ausbeute von 42 % (siehe Abbildung 6.27).

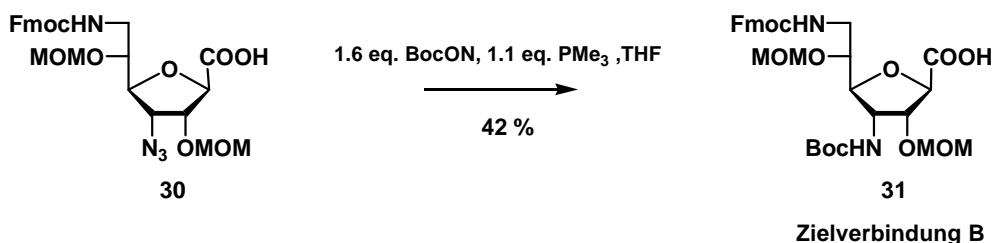


Abb. 6.27: Reduktion des Azids und Einführung einer Boc-Schutzgruppe zur Synthese von Verbindung **31** (Zielverbindung B).

Da die Fmoc-Schutzgruppe ebenfalls durch nucleophile Reagenzien abgespalten werden kann, war es nicht überraschend, dass neben der gewünschten Azid-Reduktion auch eine teilweise Entschützung der Fmoc-Gruppe beobachtet wurde und die Ausbeute daher vergleichsweise niedrig ausfiel.

### e. Synthese von Zielverbindung C ausgehend von Verbindung 29

In Kapitel 6.2.6 Abschnitt c) wurde die selektive Verseifung des Methylesters von Verbindung **29** beschrieben. Für die Synthese von Zielverbindung **C** war es nun jedoch notwendig den Methylester und Fmoc-Schutzgruppe in einem Zug abzuspalten (siehe Abb. 6.22) und anschließend eine Boc-Schutzgruppe einzuführen. Da sich Boc-Schutzgruppen unter basischen Bedingungen mit  $\text{Boc}_2\text{O}$  einführen lassen,<sup>126</sup> wurde versucht die Verseifung des Esters, die Entschützung der Fmoc-Gruppe und das erneute Schützen des freien Amins mit einer Boc-Schutzgruppe im Sinne einer sequentiellen Eintopfsynthese durchzuführen. Die Verseifung des Esters und die gleichzeitige Entschützung des Amins gelangen mit einer 11:2 Mischung aus Methanol und einer 2 molaren wässrigen Natriumcarbonatlösung. Nach 30 Stunden bei Raumtemperatur ließ sich bei der dünnschichtchromatographischen Kontrolle kein Hinweis mehr auf einen Fmoc-geschützten Zucker erkennen. Da bei der vorhergehenden Synthese von Verbindung **30** bereits gezeigt werden konnte, dass der Methylester in Natriumcarbonat-basischer Lösung labiler als die Fmoc-Schutzgruppe ist, bedeutete dies, dass nach 30 Stunden die freie Zuckerdiaminosäure vorlag. Diese konnte nun durch Zugabe einer 0.4 molaren methanolischen  $\text{Boc}_2\text{O}$ -Lösung (1.5 eq.  $\text{Boc}_2\text{O}$  bezogen auf **29**) direkt und ohne vorherige Aufarbeitung in die gewünschte Boc-geschützte Verbindung **32** überführt werden (siehe Abbildung 6.28). Die Synthese von Verbindung **32** aus Verbindung **29** gelang auf diesem Weg mit einer hervorragenden Ausbeute von 91 %.

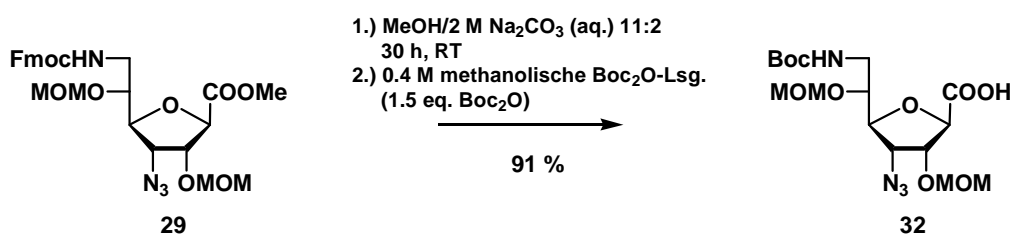


Abb. 6.28: Synthese von Verbindung **32** im Sinne einer sequentiellen Eintopfreaktion aus Verbindung **29**.

Durch Reduktion des Azids und anschließendes Schützen des Stickstoffs an C-3 mit einer Fmoc-Schutzgruppe sollte nun ausgehend von Verbindung **32** Zielverbindung **C** dargestellt werden. Die Reduktion des Azids gelang mit Pd/C und Wasserstoff in Methanol bei Raumtemperatur. Da keine Bildung von Nebenprodukten beobachtet wurde, wurde die Reaktionslösung zur Aufreinigung über Kieselgur abfiltriert und einrotiert. Die anschließende Einführung der Fmoc-Schutzgruppe gelang analog zur Synthese von Verbindung **27** mit Natriumcarbonat in einer 1:1 Mischung aus Aceton und Wasser. Auf diese Weise ließ sich Verbindung **33** in zwei Schritten mit einer sehr guten Ausbeute von 78 % ausgehend von Verbindung **32** synthetisieren (siehe Abbildung 6.29).

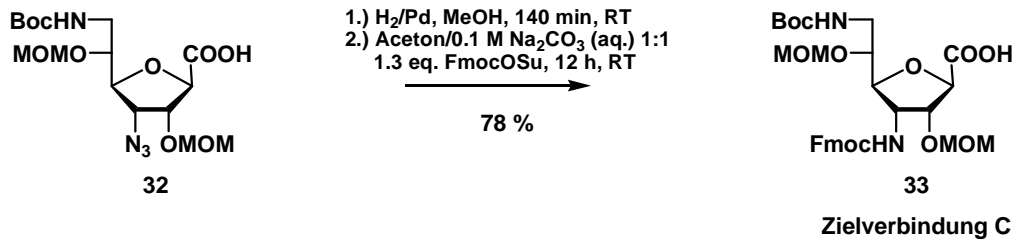


Abb. 6.29: Synthese von Verbindung **33** (Zielverbindung C) in zwei Schritten aus Verbindung **32**.

Nach der erfolgreichen Synthese von Zielverbindung C waren alle drei Zielverbindungen erfolgreich synthetisiert worden und konnten nun für die Synthese Allose-haltiger Zuckerdiaminosäureoligomere eingesetzt werden. Die Synthese der Oligomere wird nachfolgend in Kapitel 8 beschrieben.

### 6.3 Bildung von Zuckertetrazolen bei Versuchen zur Synthese von Zuckerdiaminosäuren mit D-Allopyranosekonfiguration

Parallel zur Synthese von Zuckerdiaminosäurebausteinen mit D-Allofuranosekonfiguration sollten Versuche zur Synthese von Zuckerdiaminosäurebausteinen mit D-Allopyranosekonfiguration durchgeführt werden. F. Sicherl führte während seiner Doktorarbeit in unserer Arbeitsgruppe zum gleichen Zeitpunkt Arbeiten zur Synthese von D-Glucopyranosezuckerdiaminosäuren durch.<sup>121</sup> Die Synthese weiterer pyranoider Zuckerdiaminosäurebausteine hätte bei der Untersuchung von Zuckerdiaminosäureoligomeren als RNA-Liganden interessante Vergleiche ermöglicht.

Versuche zur Synthese von Zuckerdiaminosäuren mit Allopyranosekonfiguration gingen von Verbindung **3** aus, durch die nach Absapfung der beiden Isopropylidenschutzgruppen ein einfacher Zugang zur 3-Azido-3-desoxyallopyranose möglich war (siehe Abbildung 6.30).

Durch Umsatz von Verbindung **3** mit 60%iger Ameisensäure ließ sich aus der Allofuranose-, die Allopyranosekonfiguration erzeugen. Nach vollständigem Umsatz des Edukts wurde ein formyliertes Nebenprodukt nachgewiesen, das säulenchromatographisch vom komplett entschützten Hauptprodukt **34** abgetrennt und anschließend mit NaOMe in Methanol ebenfalls in die gewünschte Verbindung **34** überführt werden konnte. Die Bildung des formylierten Nebenprodukts ließ sich durch Verwendung einer 2 molaren HCl-Lösung zur Entschützung der Isopropylidenschutzgruppen verhindern, jedoch war in diesem Fall die Ausbeute etwas geringer. Acetylierung des vollständig entschützten Produkts mit Pyridin und Essigsäureanhydrid lieferte Verbindung **35** praktisch ausschließlich in der  $\beta$ -Pyranoseform. Es konnten nur geringe Mengen der  $\alpha$ -Pyranose, bzw. der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Furanoseformen im NMR detektiert werden. Die Dominanz der  $\beta$ -Pyranoseform ist wohl vor allem auf die axiale Stellung der Azidgruppe an C-3 zurückzuführen. Die Bildung der  $\alpha$ -Pyranoseform wird vermutlich durch 1,3-diaxiale Wechselwirkung mit dem Azid stark zurückgedrängt. Die Furanoseform ist aufgrund von drei äquatorialen Substituenten in der Hexoseform (ohne das anomere Zentrum in der  $\beta$ -Form) wie auch bei anderen Zuckern (z.B. Mannose, Galactose) naturgemäß weniger stark populiert.

Das peracetylierte Produkt **35** konnte auf dem oben beschriebenen Weg mit einer sehr guten Ausbeute von 91 % über 3 Stufen dargestellt werden.

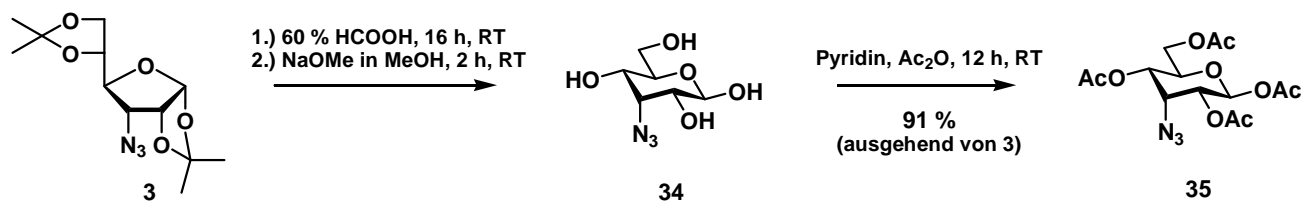


Abb. 6.30: Synthese von 3-Azido-3-desoxy-1,2,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-allopyranose **35**.

Im nächsten Schritt sollte das anomere Acetat **35** mit Lewissäure und Trimethylsilylcyanid in ein anomeres Cyanid überführt werden. Bei diesem Versuch wurde eine Verbindung erhalten, die bei der MALDI-spektroskopischen Analyse die korrekte monoisotopische Masse zeigte. Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren der Verbindung waren jedoch nicht mit den Erwartungen für das erwartete Cyanid in Einklang zu bringen. So fehlte im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des Produkts beispielsweise das typische Signal für ein Cyanid im Bereich um 115 ppm. Stattdessen wurde ein  $^{13}\text{C}$ -Signal mit einer chemischen Verschiebung von 155.2 ppm detektiert. Auch Variationen von Lewis-Säure und Lösemittel führten jeweils zum selben Produkt und nicht zum gewünschten anomeren Cyanid. Für einen vollständigen Umsatz des Edukts waren jeweils äquimolare Mengen an Lewis-Säure notwendig.

Die Auswertung des  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY Spektrums der unbekanntem Verbindung zeigte, dass H-3 ein ungewöhnlich tieffeldverschobenes Signal im Vergleich zum Edukt **35** erzeugte und die Auswertung des  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Experiments ergab ungewöhnliche Kopplungen zwischen H-3 und anderen Atomen, die nicht auf Anhib erklärt werden konnten. Da die Aufnahme eines IR-Spektrums zudem keinen Hinweis auf die Anwesenheit einer Azidgruppe im Molekül ergab (das typische Azidsignal zwischen 2100 und 2130  $\text{cm}^{-1}$  fehlte) war offensichtlich, dass eine bedeutsame Strukturveränderung an C-3 stattgefunden haben musste. Eine weitergehende Untersuchung der Reaktion zeigte, dass als Intermediat zunächst das *exo*-Cyanoethyliden **36** gebildet wurde. Nach der Bildung des Cyanoethylidens wurde das, bis zu diesem Zeitpunkt nicht identifizierte Produkt, durch einen intramolekularen, Lewis-Säure katalysierten Folgeschritt gebildet. Nach eingehender Auswertung aller ermittelten experimentellen und spektroskopischen Daten wurde Zuckertetrazol **37** (siehe Abbildung 6.31) als Struktur des unbekanntem Produkts ermittelt. Mit dieser Struktur konnten alle vorhandenen spektroskopischen Daten erklärt werden.

Die Bildung von Cyanoethylidenen ist eine bekannte Nebenreaktion bei C-Glycosylierungen dieser Art und wurde vielfach in der Literatur beschrieben.<sup>155-157</sup> Inter- oder intramolekulare Cycloadditionsreaktionen von Cyanoethylidenen wie hier beobachtet, wurden vor Entdeckung dieser Reaktion jedoch in der Literatur nicht erwähnt.

Die Bildung eines Tetrazols aus einem organischen Nitril und einem Cyanid unter diesen recht milden Reaktionsbedingungen mit einer Ausbeute von 65 % war überraschend, da diese Reaktion normalerweise sehr hohe Temperaturen benötigt<sup>158-162</sup> und bis auf wenige Ausnahmen<sup>163</sup> mit unbefriedigenden Ausbeuten verläuft. Die Reaktion ist interessant, da Tetrazole eine immer populärer werdende bioorthogonale Funktionalität sind. Tetrazole dienen als Bioisostere von Carbonsäuren,<sup>164,165</sup> als Vorläufer stickstoffhaltiger Heterozyklen und als lipophile Spacer in pharmazeutischen Wirkstoffen. In den letzten Jahren wurde ihr Gebrauch als  $\beta$ -Secretase-Inhibitoren,<sup>166,167</sup> Kv1.5 Blocker<sup>168</sup> und als Carboxylat-Bioisostere von Gabapentin und Pregabalin beschrieben.<sup>169,170</sup> Song et al. beschrieben außerdem kürzlich die Verwendung von Tetrazolen zur selektiven Modifikation von Proteinen in biologischen Systemen.<sup>171</sup>

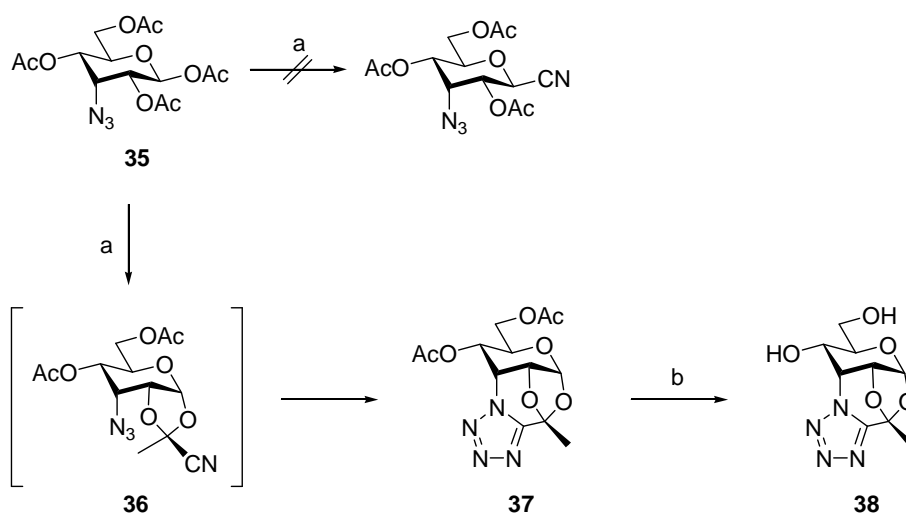


Abb. 6.31: Synthese des Zuckertetrazols **37**. Reaktionsbedingungen und Ausbeuten: (a) 5 eq. TMS-CN, 1.2 eq.  $SnCl_4$ ,  $CH_2Cl_2$ , 60 °C, 65 %; (b) NaOMe, MeOH, 14 h, RT, 84 %.

Um die hier gefundene Reaktion besser untersuchen und verstehen zu können, wurde versucht, das *exo*-Cyanoethyliden-Intermediat **36** in ausreichender Menge für weitere Untersuchungen zu gewinnen. Es zeigte sich, dass dies unter Verwendung katalytischer Mengen an Lewis-Säure möglich war. Verbindung **35** wurde mit 5 eq. Trimethylsilylcyanid und 0.2 eq. Zinntetrachlorid bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht, wobei sich das Cyanoethyliden **36** mit einer Ausbeute von 22 % darstellen ließ. Daneben konnte Verbindung **37** mit einer Ausbeute von 9 % isoliert und 65 % des Edukts zurück gewonnen werden. In Fällen, in denen mehr als ein Äquivalent Lewis-Säure eingesetzt wurde, konnte lediglich Tetrazol **37** als einziges Reaktionsprodukt isoliert werden. Eine Übersicht über einige der durchgeführten Reaktionen zeigt Tabelle 6.7.

Tab. 6.7: Ergebnisse der Reaktionen von Verbindung **35** mit unterschiedlichen Lewis-Säuren.

Lösemittel	Lewis Säure	T (°C)	Reaktionszeit	Ausbeute <b>36</b>	Ausbeute <b>37</b>	Edukt <b>35</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.4 eq. SnCl <sub>4</sub>	60	5 h	14 %	8 %	52 %
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.2 eq. SnCl <sub>4</sub>	60	2 h	---	65 %	---
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.2 eq. SnCl <sub>4</sub>	20	18 h	22 %	9 %	65 %
H <sub>3</sub> CNO <sub>2</sub>	0.9 eq. BF <sub>3</sub> •OEt <sub>2</sub>	20	90 min	8 %	60 %	---
H <sub>3</sub> CNO <sub>2</sub>	1.2 eq. BF <sub>3</sub> •OEt <sub>2</sub>	60	20min	---	35 %	---

Die vollständige Aufklärung der Struktur der Reaktionsprodukte erfolgte durch Auswertung unterschiedlicher NMR- und IR-Experimente. Nachfolgend werden nochmals einige entscheidende Beobachtungen aus den spektroskopischen Untersuchungen von Verbindung **36** und **37** aufgeführt:

- Cyanoethyliden **36** zeigte ein typisches Cyanidsignal im <sup>13</sup>C NMR-Spektrum bei 116.4 ppm.
- In der Nähe der Resonanz des anomeren C-Atoms von Verbindung **36** bei 98.48 ppm wurde ein weiteres Signal bei 99.08 ppm detektiert. Dies ist typisch für ein Cyanoethyliden.
- Bei Aufnahme eines NOESY-Spektrums von Verbindung **36** mit einer Mischzeit von 300 ms wurde ein NOE zwischen der Methylgruppe des Dioxolans und H-5 detektiert. Dieses Signal kann nur bei der *exo*-Form auftreten, da die Methylgruppe im Fall der *endo*-Form vom pyranoiden Zuckerring wegzeigt.
- Bei Verbindung **37** fehlte ein Signal zwischen 110 und 120 ppm im <sup>13</sup>C-Spektrum, womit das Vorhandensein einer Cyanogruppe im Molekül widerlegt werden konnte.
- Im IR-Spektrum von Verbindung **37** fehlte die typische Schwingungsbande für Azide zwischen 2100 und 2130 cm<sup>-1</sup>, womit gezeigt werden konnte, dass die Azidgruppe bei der Reaktion verändert wurde.
- Die Resonanz von H-3 verschob sich von 3.50 ppm im Cyanoethyliden **36** auf 5.59 ppm im Tetrazol **37**. Ein Hinweis darauf, dass an diesem Zentrum die elektronische Struktur des Moleküls bei der Reaktion besonders stark verändert wurde.
- Verbindung **37** zeigte eine <sup>13</sup>C-Resonanz bei 155.20 ppm. Eine Literaturrecherche ergab, dass diese <sup>13</sup>C-Resonanz in einem typischen Bereich für Tetrazole liegt.<sup>172,173</sup>
- Im <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HMBC-Spektrum wurde ein starkes Signal zwischen Tetrazol-Kohlenstoff und H-3 aufgrund einer <sup>3</sup>J<sub>C,H</sub>-Kopplung beobachtet. Dieses Signal musste aufgrund der

zunächst postulierten Struktur von Verbindung **37** im Spektrum vorhanden sein. Alle anderen Signale des HMBC Spektrums, sowie die Masse aus MALDI-Messungen waren ebenfalls im Einklang mit der angegebenen Struktur von Verbindung **37**.

Abbildung 6.32 fasst die charakteristischen NMR-Daten des Cyanoethylidens **36** und des Tetrazols **37** auf einen Blick zusammen.

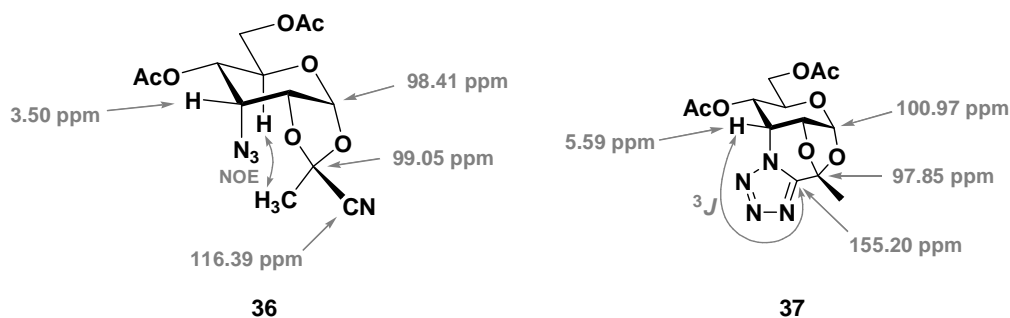


Abb. 6.32: Vergleich charakteristischer NMR-Daten von Cyanoethyliden **36** und Tetrazol **37**. Der NOE zwischen H-5 und der Methylgruppe des Dioxolans weist auf die *exo*-Konfiguration von Verbindung **36** hin. Die  $^3J_{C,H}$ -Kopplung aus dem  $^1H$ ,  $^{13}C$ -HMBC-NMR Spektrum ist charakteristisch für das Tetrazol **37**.

Nachdem die Struktur der Produkte gesichert war, wurde der Mechanismus der Reaktion genauer untersucht. Hierzu wurden Reaktionen des isolierten Intermediats **36** mit Trimethylsilylcyanid und Lewis-Säure durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei der Reaktion als einziges Produkt das Tetrazol **37** gebildet wurde. Anschließend wurde Verbindung **36** nur mit Lewis-Säure ohne eine exogene Cyanidquelle zur Reaktion gebracht, wobei erneut Tetrazol **37** als einziges Produkt isoliert werden konnte. In beiden Fällen lag die Ausbeute der Reaktion bei etwa 70 %. Die Zugabe von TMSCN hatte lediglich einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit, nicht jedoch auf die Ausbeute oder die Produktbildung an und für sich.

Kotchetkov et al. verwendeten Cyanoethylidenverbindungen für *O*-Glycosylierungsreaktionen und zeigten, dass die C-C-Bindung zwischen Dioxolan-Kohlenstoff und dem Kohlenstoff der Cyanogruppe relativ schwach ist und durch katalytische Mengen an Lewis-Säure aufgebrochen werden kann.<sup>140,142,143</sup> Dies erklärt, warum das Cyanoethyliden **36** unter den verwendeten sauren Reaktionsbedingungen zur weiterreagieren kann. Myers et al. zeigten zudem, dass Cyanoethylidenverbindungen von Mannose, Glucose und Galactose ohne eine exogene Cyanidquelle in anomere Cyanide überführt werden können, dass also die Cyanogruppe des Cyanoethylidens nach Aktivierung für Folgereaktionen zur Verfügung steht.<sup>155</sup> Ein Phänomen, das auch bei der hier beschriebenen Reaktion auftritt.

Aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Reaktionen, sowie den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von Cyanoethylidenverbindungen wurde folgender Mechanismus für die Reaktion postuliert (siehe Abbildung 6.33):

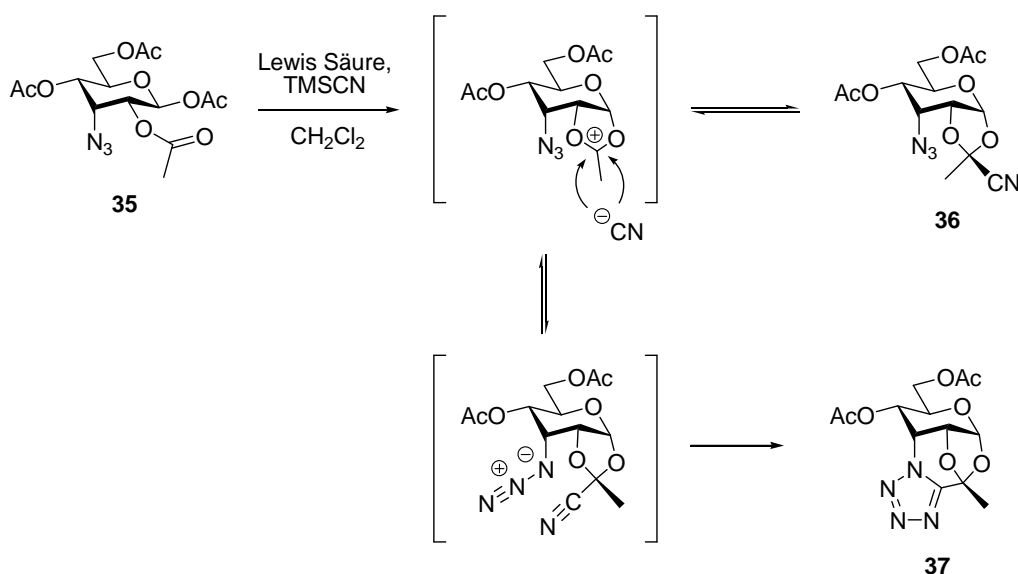


Abb. 6.33: Postulierter Mechanismus für die Bildung von Cyanoethyliden **36** und Tetrazol **37**.

Ausgehend von Verbindung **35** führt die Nachbargruppenaktivität der Acetylgruppe an C-2 zur Bildung eines Acetoxoniumions, das durch ein Cyanid entweder von der *endo*- oder der *exo*-Seite aus angegriffen werden kann. Die Bildung des *exo*-Isomers sollte kinetisch begünstigt sein, da das Cyanidion in diesem Fall von der sterisch weniger gehinderten Seite aus angreifen kann. Die bevorzugte Bildung der *exo*-Form wurde in der Literatur mehrfach beschrieben<sup>139,140,142,143</sup> und ist ebenfalls im Einklang mit der Bildung des begünstigten *exo*-Isomers bei *ortho*-Estern.<sup>174</sup> Unter den sauren Reaktionsbedingungen ist der Angriff des Cyanids reversibel. Dies ermöglicht die Bildung des *endo*-Isomers, welches aufgrund der sehr günstigen räumlichen Anordnung zwischen Cyanid- und Azidgruppe schnell und irreversibel zum Tetrazol **37** weiterreagiert. Die schnelle intramolekulare Bildung des Tetrazols erklärt, warum das *endo*-Isomer bei keinem der Versuche isoliert werden konnte.

Da Benzoylschutzgruppen eine geringere Nachbargruppenaktivität als Acetylschutzgruppen zeigen, wurde nachfolgend versucht, die Bildung des Cyanoethylidens durch Einführen einer Benzoylschutzgruppe an C-2 zurückzudrängen und so die Bildung des gewünschten anomeren Cyanids zu ermöglichen. Dazu wurde die Azidoallose **34** zunächst mit Benzoylchlorid in Pyridin perbenzoyliert (siehe Abbildung 6.34). Dies gelang mit einer guten Ausbeute von 77 %. Versuche die perbenzoylierte Verbindung **39** direkt mit

Trimethylsilylcyanid und Zinntetrachlorid in ein Cyanid zu überführen, scheiterten. Offensichtlich war die Benzoylgruppe eine zu schlechte Abgangsgruppe, um unter diesen Bedingungen reagieren zu können. Bei diesen Versuchen konnte das Ausgangsmaterial vollständig zurück gewonnen werden.

Anschließend wurde Verbindung **39** bei 50 °C mit Hydraziniumacetat (**40**) anomer debenzoyliert. Die Reaktion des anomer entschützten Bausteins **41** mit Pyridin und Essigsäureanhydrid ergab, wie in Abbildung 6.34 gezeigt, das anomere Acetat **42** mit einer Ausbeute von 41 % über diese beiden Stufen.

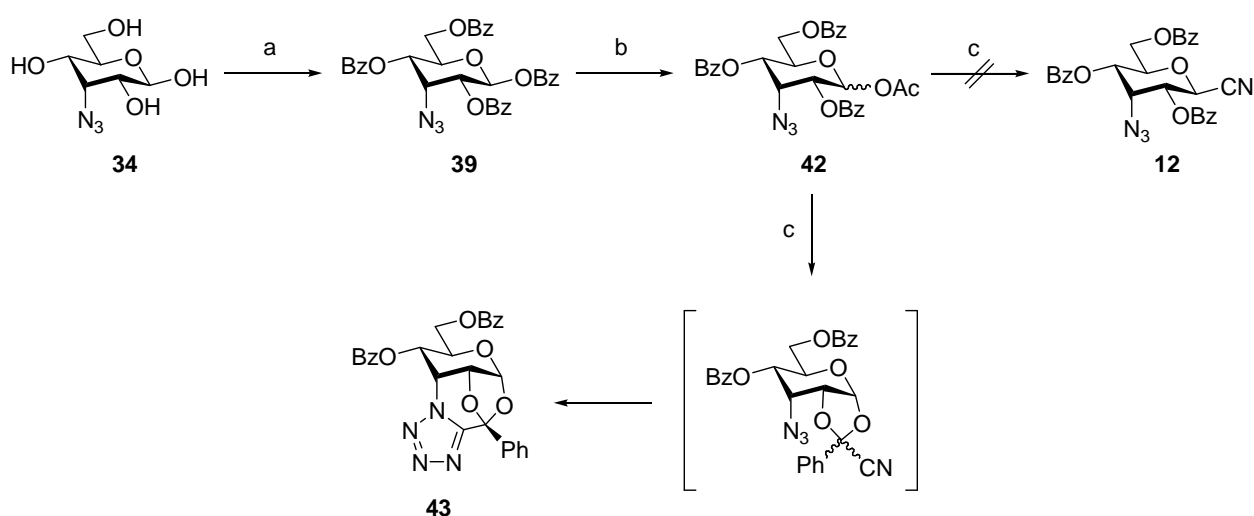


Abb. 6.34: Synthese des Zuckertetrazols **43**. Reaktionsbedingungen und Ausbeuten: (a) BzCl, Pyr, 24 h, 77 %, RT; (b) i) H<sub>2</sub>N-NH<sub>2</sub> • HOAc, DMF, 50 °C, 3 h, ii) Ac<sub>2</sub>O, Pyr, 12 h, RT, 41 % (2 Stufen); (c) 10 eq. TMSCN, 1.6 eq. BF<sub>3</sub> • OEt<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>CNO<sub>2</sub>, RT, 50 %.

Das anomere Acetat **42** wurde nun mit Zinntetrachlorid und Trimethylsilylcyanid in Nitromethan umgesetzt, wobei Tetrazol **43** mit einer Ausbeute von 50 % erhalten wurde. Wurde Dichlormethan anstelle von Nitromethan als Lösemittel verwendet, sank die Ausbeute auf 12 %. In beiden Fällen wurde neben der Produktbildung eine starke Zersetzung des Zuckers beobachtet, was die geringen Ausbeuten erklärt. Die höhere Ausbeute mit Nitromethan ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das intermediär entstehende Acetoxoniumion durch das polare Nitromethan besser stabilisiert werden kann als durch das vergleichsweise unpolare Dichlormethan. Scheinbar ist trotz der geringeren Nachbargruppenaktivität von Benzoyl- im Vergleich zu Acetylschutzgruppen die Bildung eines Cyanoethylidens begünstigt gegenüber einem Angriff des Cyanids am anomeren Zentrum. Eine Reaktion gemäß dem in Abbildung 6.34 formulierten Mechanismus führte daher vom Cyanoethyliden erneut zum Tetrazol.

Da selbst mit einer Benzoylgruppe an C-2 die Bildung eines Tetrazols beobachtet wurde, sollte nun untersucht werden, ob die 3-Azidoallose nur in der Pyranoseform als Templat für die intramolekulare Cycloaddition fungieren konnte oder ob die Bildung eines Tetrazols auch mit den korrespondierenden anomer acetylierten Furanosen möglich war.

Dazu wurde Verbindung **5** mit Pyridin und Essigsäureanhydrid zunächst acetyliert. Nach anschließender Acetylyse des Methylglycosids konnte die peracetylierte 3-Azidoallofuranose **45** mit einer Ausbeute von 83 % ausgehend von **5** dargestellt werden (siehe Abbildung 6.35). Reaktion von **45** mit fünf Äquivalenten Trimethylsilylcyanid und 1.1 Äquivalenten Zinntetrachlorid in Dichlormethan bei 60 °C führte zur Bildung einer Mischung des Zuckertetrazols **47** (52 %) und des anomeren Cyanids **48** (27 %). Im Fall von Verbindung **45** konnte also neben dem Tetrazol auch das Cyanid mit einem Verhältnis von etwa 2:1 synthetisiert werden.

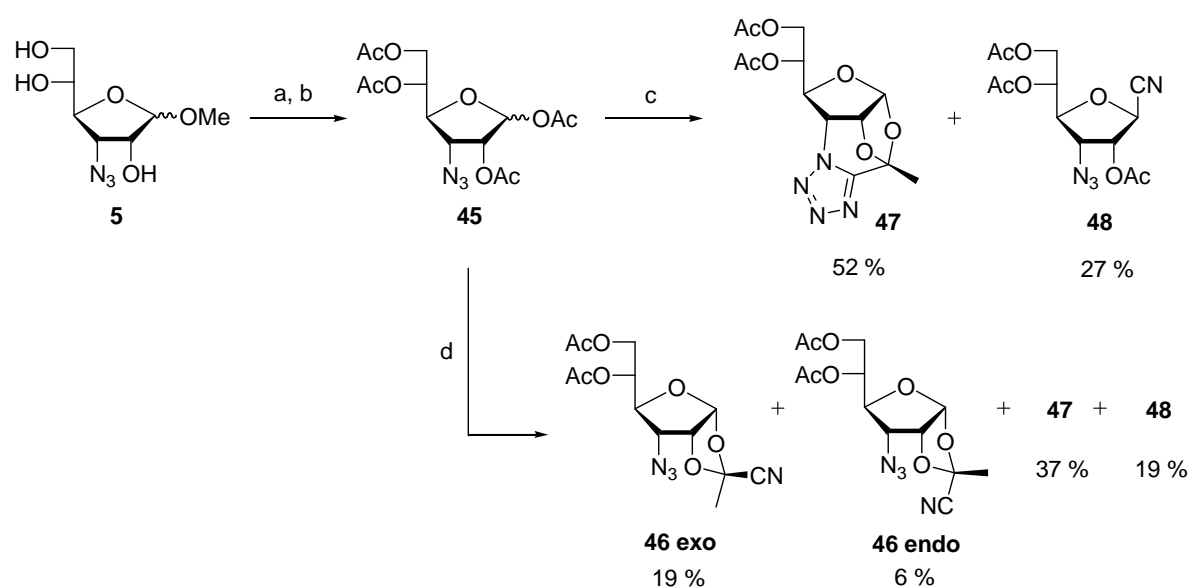


Abb. 6.35: Synthese des Zuckertetrazols **47**. Reaktionsbedingungen und Ausbeuten: (a) Ac<sub>2</sub>O, Pyr, 12 h, RT; (b) 75 eq. HOAc, 12 eq. Ac<sub>2</sub>O, 6 eq. conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30 min, RT, 83 % (2 Stufen); (c) 5 eq. TMSCN, 1.1 eq. SnCl<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 60 °C; (d) 5 eq. TMSCN, 0.5 eq. SnCl<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT.

Eine NMR-spektroskopische Untersuchung der Reaktion in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zeigte, dass während der Reaktion zwei Intermediate gebildet wurden. Aufgrund des postulierten Mechanismus für die Tetrazolbildung musste zumindest eines der beiden Intermediate eine Cyanoethylenverbindung sein. Um die Intermediate der Reaktion in ausreichender Menge zu erzeugen, war es notwendig, Verbindung **45** mit weniger als einem Äquivalent Lewis-Säure umzusetzen. **45** wurde daher mit 0.5 eq. Zinntetrachlorid und 5 eq. Trimethylsilylcyanid bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Unter diesen Bedingungen

war es möglich, beide Intermediate zu synthetisieren und im Anschluss mittels HPLC-Chromatographie von einander zu trennen. Die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie ergab, dass es sich bei den Intermediaten um die erwarteten *exo*- und das *endo*-Cyanoethylidene handelte, die in einem Verhältnis von etwa 3:1 bei der Reaktion gebildet wurden. Der Nachweis der beiden konfigurationsisomeren Cyanoethylidene war ein zusätzlicher Hinweis, dass die Reaktion gemäß dem in Abbildung 6.33 dargestellten Mechanismus verläuft. Da in diesem Fall auch das *endo*-Isomer isoliert werden konnte, lässt sich schließen, dass die räumliche Orientierung von Cyanid und Azid bei der Allofuranose ungünstiger ist als im Fall der Pyranoseform und die Cycloaddition zum Tetrazol vergleichsweise langsamer verläuft.

Aus vorhergehenden Versuchen war bereits bekannt, dass eine Verringerung der Nachbargruppenaktivität durch die Einführung einer Benzoylschutzgruppe an C-2 die Bildung des Tetrazols im Fall der Allofuranose komplett zu unterdrücken vermochte. Bei der Reaktion von Verbindung **8** mit Trimethylsilylcyanid und Zinntetrachlorid wurde ausschließlich das anomere Cyanid **9** und kein Zuckertetrazol gebildet (siehe Abbildung 6.36). Die Bildung des Cyanids als Hauptprodukt war in diesem Fall zu erwarten gewesen, da das anomere Cyanid bereits bei der peracetylierten 3-Azidoallofuranose in einem Verhältnis von 2:1 zum Tetrazol gebildet wurde.

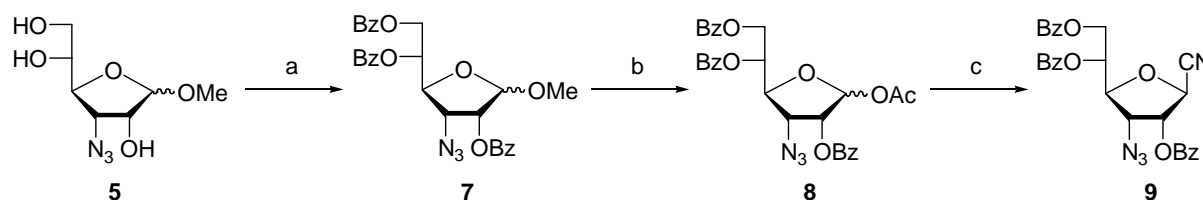


Abb. 6.36: Synthese des anomeren Cyanids **9**. (a) BzCl, Pyr, 24 h, RT, 89 %; (b) 70 eq. HOAc, 10 eq. Ac<sub>2</sub>O, 5 eq. conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 36 min, RT, 90 %; (c) 5 eq. TMSCN, 1.1 eq. SnCl<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4 h, 60 °C, 65 %.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den Versuchen, ein anomeres Cyanid der 3-Azidoallose aus 1-*O*-Acetyl-3-azido-3-desoxyallose-Derivaten zu erzeugen, eine unerwartete, interessante Reaktion beobachtet und aufgeklärt werden konnte. Über die Bildung eines Cyanoethylidens als Zwischenstufe führte die Reaktion durch eine intramolekulare [2+3]-Cycloaddition zwischen Cyanid- und Azidgruppe des Cyanoethylidens in der *endo*-Konfiguration zur Bildung von verbrückten, tetracyclischen Zuckertetrazolen. Die Effizienz der intramolekularen Cycloaddition hing von der räumlichen Anordnung von Cyanid und Azid und damit auch von der Struktur des Zuckerrings ab.

Die effektivste Cycloaddition wurde bei Versuchen mit der peracetylierten 3-Azidoalloyranose **35** beobachtet. Hier schien die räumliche Anordnung dieser beiden Funktionalitäten im Vergleich zu den anderen getesteten anomer acetylierten Verbindungen ideal für die Bildung eines Tetrazols zu sein.

Kohlenhydrate sind interessante Gerüstsubstanzen für die exakte räumliche Positionierung von Pharmacophoren.<sup>175</sup> Die Ergebnisse der hier untersuchten Reaktionen verdeutlichen die Fähigkeit von Kohlenhydraten, auch als Gerüstsubstanzen für die exakte Positionierung funktioneller Gruppen zu dienen und damit eine spezifische chemische Reaktion zu ermöglichen.

Es ist wahrscheinlich, dass pyranoide Zucker die an C-2 und C-3 über eine identische Stereochemie wie Allose verfügen – beispielsweise die Gulopyranose - ebenfalls als Gerüstsubstanzen für die gleiche Reaktion dienen können.

## 7 Synthese von Zuckerdiaminosäurebausteinen der D-Mannose

Kohlenhydratbausteine mit D-Mannokonfiguration sind Bestandteil einiger bedeutender Antibiotika und Antimycotika, darunter Sibiromycin, Nystatin, Myomycin B, Pimaricin, Rimocidin oder auch Perimycin A. Sie tragen in den genannten Verbindungen entscheidend zur Bindung der zellulären Targets und damit zur Wirkung der Substanzen bei. In antibiotisch wirksamen, natürlichen Aminoglycosiden wurden Aminozucker mit Mannokonfiguration bisher jedoch nicht entdeckt. Da in der Natur noch keine vergleichbaren Strukturen gefunden wurden, ist es unwahrscheinlich, dass Mikroorganismen mit intrinsischer Resistenz gegen Oligosaccharide existieren, bei denen Mannosebausteine entscheidend zur Bindung beitragen. Zuckerdiaminosäurebausteine mit D-Mannokonfiguration könnten daher als monomere Einheiten zur Synthese neuer, interessanter RNA-Liganden dienen, die durch bestehende Abwehrmechanismen nicht erkannt werden. In einem zusätzlichen Teil dieser Arbeit sollte daher ein geeigneter Weg zur Synthese von Zuckerdiaminosäurebausteinen mit D-Mannokonfiguration skizziert werden.

### 7.1 Retrosynthetische Betrachtung

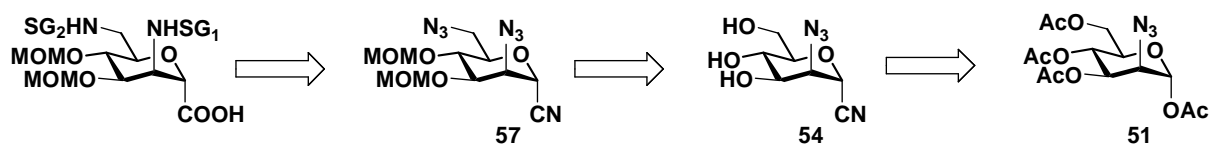


Abb. 7.1: Retrosynthetische Betrachtung der Synthese von Zuckerdiaminosäurebausteinen der D-Mannose.

Ausgehend von Verbindung **51**, die nach einer Vorschrift von Paulsen et al. aus 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-glucal synthetisiert werden kann,<sup>176</sup> sollte durch *C*-Glycosylierung mit Trimethylsilylcyanid und Lewis-Säure und anschließender Deacetylierung mit katalytischen Mengen Natriummethanolat das anomere Cyanid **54** dargestellt werden.

Ausgehend von diesem anomeren Cyanid kann die Synthese eines 2,6-Mannosediazids durch regioselektive Tosylierung der Hydroxylgruppe an C-6 und anschließende nucleophile Substitution des Tosylats mit einer Azidquelle erfolgen. Als Azidquellen bieten sich Natriumazid oder ein TBAF/TMS-N<sub>3</sub> System an, wie es von Soli und DeShong beschrieben wurde.<sup>177,178</sup> Die freien Hydroxylgruppen sollten dann durch Reaktion mit Formaldehyddimethylacetal unter Säurekatalyse mit MOM-Schutzgruppen blockiert werden, um anschließend das Diazid **57** zu erhalten.

Nach basischer Verseifung der Cyanogruppe in Verbindung **57** könnten durch gleichzeitige Reduktion beider Azidgruppen und anschließende selektive 6-*N*-Derivatisierung analog einer von Gao et al.<sup>179</sup> entwickelten Methode die Zielverbindungen synthetisiert werden. Eine zweite Möglichkeit zur Synthese der Zielverbindungen aus Diazid **57** besteht in der selektiven Reduktion einer Azidgruppe und anschließendem Schützen der freien Aminogruppe. Nyffeler et al. zeigten an unterschiedlichen Kohlenhydratderivaten, dass eine regioselektive Reduktion von Aziden bei Zuckern möglich ist.<sup>180</sup>

## 7.2 Versuche zur Synthese von Zuckerdiaminosäurebausteinen mit D-Mannokonfiguration

### 7.2.1 Erzeugung der Mannokonfiguration durch Azidonitrierung von 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-glucal

Ausgehend von 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-glucal **49** gelang die Synthese der peracetylierten 2-Azidomannose **51** nach einer Vorschrift von Paulsen et al.<sup>176</sup> mit einer Ausbeute von 25 %. Die Umsetzung von **49** mit Natriumazid und Cerammoniumnitrat verläuft nach einem radikalischen Mechanismus über die Nitrosoverbindung **50** als Intermediat. Diese sogenannte Azidonitrierung wurde erstmal von Lemieux beschrieben, wobei<sup>181</sup> die  $\alpha$ -Mannoform dabei eigentlich nur als Nebenprodukt auftritt. Als Hauptprodukte werden die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Glucoform erhalten. Paulsen et al. stellten fest, dass durch sorgfältige Wahl des Lösemittelgemisches das Verhältnis von Manno- und Glucoform bei der Azidonitrierung zu Gunsten der Bildung der Mannoform verschoben werden kann. Da eine säulenchromatographische Trennung der entstehenden Nitroverbindungen nicht möglich ist, wurden die entstehenden Isomere erst nach Umsatz zu den anomeren Acetaten getrennt.<sup>176</sup> Paulsen et al. beschrieben eine Ausbeute von 44 % für Verbindung **51** ausgehend von **49** und ein Verhältnis der Isomeren von  $\alpha$ -Manno: $\alpha/\beta$ -Gluco von etwa 2.5:1. Dies konnte in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden. Bei Versuchen während dieser Arbeit betrug das Verhältnis von  $\alpha$ -Manno: $\alpha/\beta$ -Gluco jeweils 1:1 und Verbindung **51** wurde mit einer Gesamtausbeute von 25 % ausgehend von Glucal **49** gewonnen.

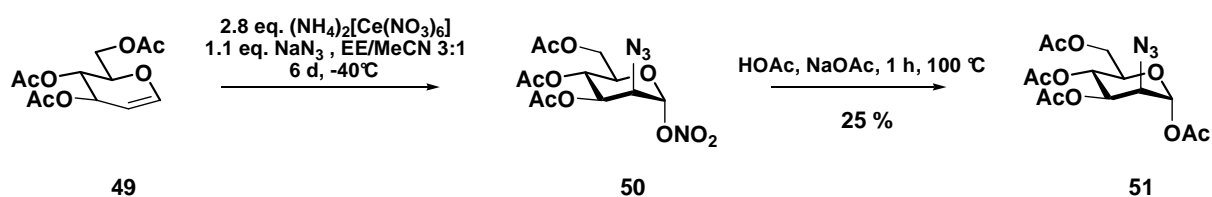


Abb. 7.2: Synthese der 2-Azidomannoseverbindung **51** durch Azidonitrierung und anschließende Acetylierung.

Diese geringe Ausbeute stellte in diesem frühen Stadium der Synthese kein Problem dar, da Glucal **49**, sowie alle weiteren verwendeten Chemikalien kommerziell erhältlich und zudem billig waren.

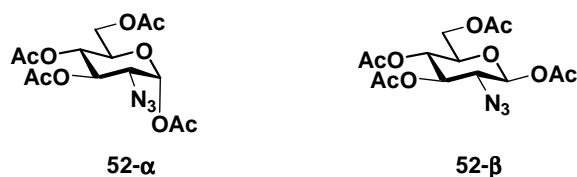


Abb. 7.3: Nebenprodukte bei der Synthese der 2-Azidomannoseverbindung **51** durch Azidonitrierung.

### 7.2.2 Erzeugung eines C-Glycosids aus Acetat **51** und anschließende Deacetylierung

Zur Erzeugung eines C-Glycosid sollte das anomere Acetat **51** mit Trimethylsilylcyanid und Zinntetrachlorid als Lewis-Säure in frisch destilliertem Dichlormethan umgesetzt werden, da mit diesem System bereits bei der Herstellung von Zuckerdiaminosäurebausteinen mit D-Allokonfiguration gute Erfahrungen gemacht wurden (siehe Kapitel 6). Im Fall der hier vorliegenden anomeren acetylierten Mannose konnte das gewünschte anomere Cyanid unter diesen Bedingungen nur mit einer maximalen Ausbeute von 30 % synthetisiert werden. Bei der Reaktion in Dichlormethan entstand sehr rasch ein feinkörniger, schwarzer Niederschlag, was auf eine Zersetzung des Edukts hinwies und die geringe Ausbeute der Reaktion erklärte.

Die Umsetzung von Verbindung **51** zu Verbindung **53** musste gemäß einem  $S_N1$ -artigen Mechanismus verlaufen sein, da die Konfiguration am anomeren Zentrum erhalten blieb und kein Hinweis auf die Erzeugung einer  $\beta$ -Verbindung gefunden werden konnte. Die Verwendung von Dichlormethan ist für diesen Reaktionstyp ungünstig, da das Kation im Übergangszustand durch ein unpolares Lösemittel nur unzureichend stabilisiert werden kann.<sup>182</sup> Daher wurde nach einem polaren, organischen Lösemittel gesucht, das für die Stabilisierung des Übergangszustands besser geeignet ist. Zunächst wurden DMF und DMSO als Lösemittel getestet, in denen jedoch bei Verwendung von 5 eq. Trimethylsilylcyanid und 1.1 eq. Zinntetrachlorid auch nach fünf Tagen bei 60 °C keine Reaktion beobachtet werden konnte. Vermutlich wechselwirkte die Lewis-Säure mit den elektronenreichen Sauerstoffatomen des DMF bzw. des DMSO, wodurch sie nicht zur Aktivierung des anomeren Acetats zur Verfügung stand und die gewünschte Reaktion nicht stattfinden konnte. Bei Verwendung von THF konnte unter identischen Bedingungen nach 24 Stunden die Bildung von geringen Mengen eines Polymers beobachtet werden. Vermutlich wurde durch die Verwendung von Zinntetrachlorid in einer Konzentration von 0.07 M eine saure Öffnung des THF mit anschließender Polymerisation von THF ermöglicht. Die

dünnschichtchromatographische Kontrolle der Reaktionslösung ergab keinen Hinweis auf die Bildung des gewünschten Produkts.

In frisch destilliertem Nitromethan hingegen konnte mit 5 eq. Trimethylsilylcyanid und 1.1 eq. Zinntetrachlorid schon nach 30 Minuten praktisch kein Edukt mehr detektiert werden. Die Reaktionslösung färbte sich im Gegensatz zu den Versuchen in Dichlormethan lediglich dunkelorange, was auf eine wesentlich geringere Zersetzung des Edukts schließen ließ. Ein Abbruch der Reaktion durch Zugabe einer konzentrierten Natriumhydrogencarbonat-Lösung nach 50 Minuten und anschließende Aufarbeitung ergaben das gewünschte anomere Cyanid in der  $\alpha$ -Form mit einer sehr guten Ausbeute von 84 %.

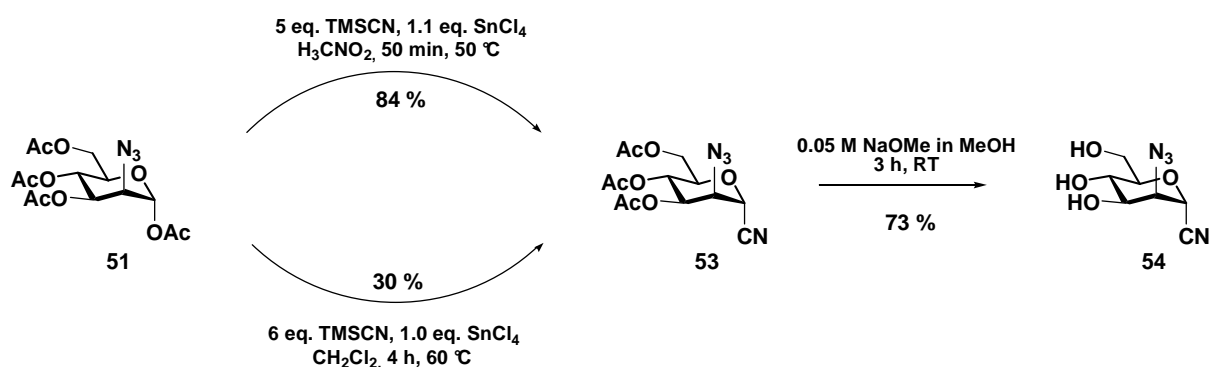


Abb. 7.4: Synthese des anomeren Cyanids **53** aus Verbindung **51** und anschließende Deacetylierung.

Der Grund für die deutlich bessere Ausbeute dürfte die höhere Polarität von Nitromethan im Vergleich zu Dichlormethan sein, durch die der polare kationische Übergangszustand der S<sub>N</sub>1-Reaktion besser stabilisiert werden kann und die Zersetzung des Edukts verhindert wird. Eine Übersicht über die durchgeführten Versuche zur Herstellung des anomeren Cyanids **53** gibt Tabelle 7.1.

Tab. 7.1: Ergebnisse der C-Glycosylierung von Verbindung **51** mit TMSCN und SnCl<sub>4</sub> unter Verwendung unterschiedlicher Lösemittel.

Lösemittel	Lewis Säure	TMSCN	T (°C)	Reaktionszeit	Ausbeute <b>53</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.8 eq. SnCl <sub>4</sub>	5 eq.	60	4 h 30 min	28 %
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.0 eq. SnCl <sub>4</sub>	6 eq.	60	4 h	30 %
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.0 eq. SnCl <sub>4</sub>	12 eq.	60	15 h	30 %
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.2 eq. SnCl <sub>4</sub>	12 eq.	60	6 h	29 %
DMF	1.1 eq. SnCl <sub>4</sub>	5 eq.	20	3 h	keine Reaktion
DMF	1.1 eq. SnCl <sub>4</sub>	5 eq.	60	5 d	keine Reaktion
DMSO	1.1 eq. SnCl <sub>4</sub>	5 eq.	60	5 d	keine Reaktion
THF	1.1 eq. SnCl <sub>4</sub>	5 eq.	50	24 h	es entstehen geringe Mengen eines Polymers (vermutlich Poly-THF)
H <sub>3</sub> CNO <sub>2</sub>	1.1 eq. SnCl <sub>4</sub>	5 eq.	50	50 min	84 %

Nachdem die Einführung des Cyanids unter Verwendung von Nitromethan als Lösemittel mit einer sehr guten Ausbeute gelang, wurde in Zusammenarbeit mit A. Neef während ihrer Bachelorarbeit versucht, Verbindung **53** unter den gleichen Bedingungen direkt aus der Nitrosoverbindung **50** zu synthetisieren<sup>126</sup> und so zu überprüfen, ob die Nitrosogruppe unter Lewis-sauren Bedingungen ebenfalls als Abgangsgruppe zur Synthese eines Cyanids geeignet war. Da sich die Nitrosoverbindung mit Mannokonfiguration nicht von den beiden anomeren Formen mit Glucokonfiguration trennen ließ (siehe Kapitel 7.2.1), wurde die C-Glycosylierung direkt nach der Azidonitrierung mit dem Gemisch aller drei Isomere durchgeführt. Das gewünschte Mannosecyanid **53** ließ sich säulenchromatographisch sehr gut von den weiteren Reaktionsprodukten trennen und konnte mit einer Ausbeute von 21 % ausgehend von Glucal **49** isoliert werden. Die Gesamtausbeute für das anomere Cyanid **53** ausgehend von Tri-*O*-acetyl-D-glucal blieb somit bei beiden Reaktionswegen konstant. Diese Variante stellte dennoch eine Verbesserung dar, da die Synthese auf diese Weise um einen Schritt verkürzt werden konnte.

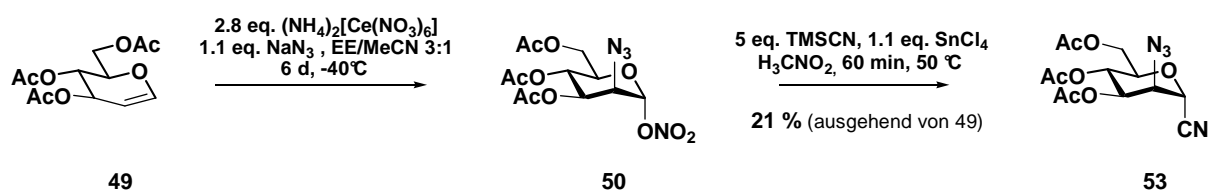


Abb. 7.5: Darstellung des anomeren Cyanids **53** aus Nitroverbindung **50**.

Die anschließende Deacetylierung von Verbindung **53** gelang unter Verwendung einer 0.05 molaren Natriummethanolat-Lösung in Methanol mit einer Ausbeute von 73 % (siehe Abbildung 7.4).

### 7.2.3 Selektive Einführung eines zweiten Azids an C-6

Die Einführung einer zweiten Aminofunktionalität sollte durch Einführen einer guten Abgangsgruppe und anschließende Substitution mit einer nucleophilen Azidquelle erfolgen. Als gute Abgangsgruppe wurde ein Tosylat gewählt, das sich unter Verwendung von 1.4 eq. Tosylchlorid in Pyridin mit einer sehr guten Ausbeute von 91 % selektiv an C-6 einführen ließ. Nach der erfolgreichen Einführung der Tosylgruppe wurde die Weiterentwicklung des Synthesewegs für Zuckerdiaminosäurebausteine mit D-Mannokonfiguration in Zusammenarbeit mit Mirko Zierke durchgeführt. Eine ausführliche Diskussion ist in seiner

Bachelorarbeit zu finden.<sup>183</sup> Daher soll hier nur eine Zusammenfassung der weiteren Reaktionen gegeben werden.

Die Einführung der Azidogruppe gelang ausgehend von Tosylat **55** unter Verwendung von  $\text{NaN}_3$  in DMF mit einer Ausbeute von 58 %. Neben Natriumazid wurde auch ein von Soli und DeShong entwickeltes TBAF/TMS- $\text{N}_3$ -System getestet.<sup>177,178</sup> Bei diesen Versuchen lag die Ausbeute jedoch bei maximal 28 %. Eine Übersicht über die durchgeführten Versuche zur Azideinführung gibt Tabelle 7.2.

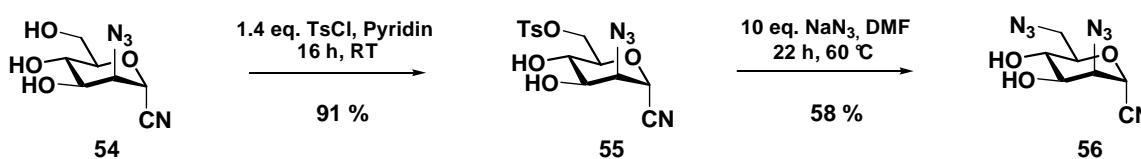


Abb. 7.6: Darstellung des Diazidozuckers **56** ausgehend von Verbindung **54**.

Aufgrund der begrenzten Zeit für die Entwicklung des Synthesewegs wurde auf eine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen verzichtet.

Tab. 7.2: Versuche zur Azideinführung an C-6 durch Substitution des Tosylats **55** mit unterschiedlichen Azidquellen.

Azidquelle	Lösemittel	$T$ (°C)	Reaktionszeit	Ausbeute <b>56</b>
1.4 eq. TMS- $\text{N}_3$ /TBAF	MeCN	80	23 h	27 %
1.4 eq. TMS- $\text{N}_3$ /TBAF	MeCN	60	23 h	28 %
1.4 eq. TMS- $\text{N}_3$ /TBAF	MeCN	60	144 h	21 %
10 eq. $\text{NaN}_3$	DMF	60	22 h	58 %

#### 7.2.4 Einführung von MOM-Schutzgruppen und Versuche zur anschließenden basischen Hydrolyse des Cyanids

Nach der erfolgreichen Einführungen der zweiten Azidogruppe waren alle benötigten Funktionalitäten im Molekül vorhanden. Um kupplungstaugliche Bausteine zu erhalten, sollten die freien Hydroxylgruppen nun mit MOM-Gruppen geschützt und anschließend die Azide reduziert und die entstehenden Amine orthogonal mit Boc, bzw. Fmoc-Schutzgruppen blockiert werden. Die Einführung der MOM-Schutzgruppen gelang unter Verwendung von Formaldehyddimethylacetal und Phosphorpentoxid mit einer guten Ausbeute von 78 % (siehe Abbildung 7.7). Es wurde absolutiertes 1,2-Dichlorethan als Cosolvens verwendet, da das Edukt in reinem Formaldehyddimethylacetal nicht gelöst werden konnte. Da es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, wurden große Überschüsse des Acetals (200 eq.) verwendet. Phosphorpentoxid diente zur Bereitstellung katalytischer Mengen an Säure.

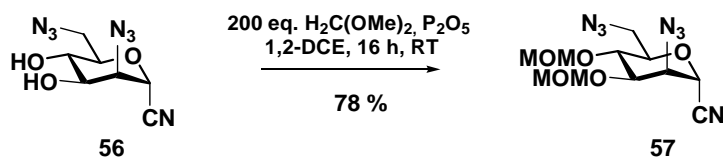


Abb. 7.7: Synthese von Verbindung **57** ausgehend von Diazid **56** durch Einführung von MOM-Schutzgruppen.

Im Anschluss sollte das Cyanid basisch zur freien Carbonsäure hydrolysiert werden. Dazu wurde in Anlehnung an eine Methode von Wong et al.<sup>184</sup> Ba(OH)<sub>2</sub> in wässriger Lösung verwendet. Da das unpolare Edukt in Wasser sehr schlecht löslich war, musste die Reaktion unter Rückfluss durchgeführt werden. Sehr überraschend entstand unter diesen Bedingungen das Eliminierungsprodukt **58**. Neben der gewünschten Verseifung des Cyanids wurde eine Doppelbindung durch Eliminierung des Azids an C-2 gebildet. Da es sich um eine Eliminierung im basischen Milieu handelt und die Abgangsgruppe nicht antiperiplanar zum aciden Proton stand, musste die Eliminierung nach einem E1cB-Mechanismus verlaufen sein, wie sie beispielsweise auch bei der Abspaltung von Fmoc-Schutzgruppen beobachtet wird.

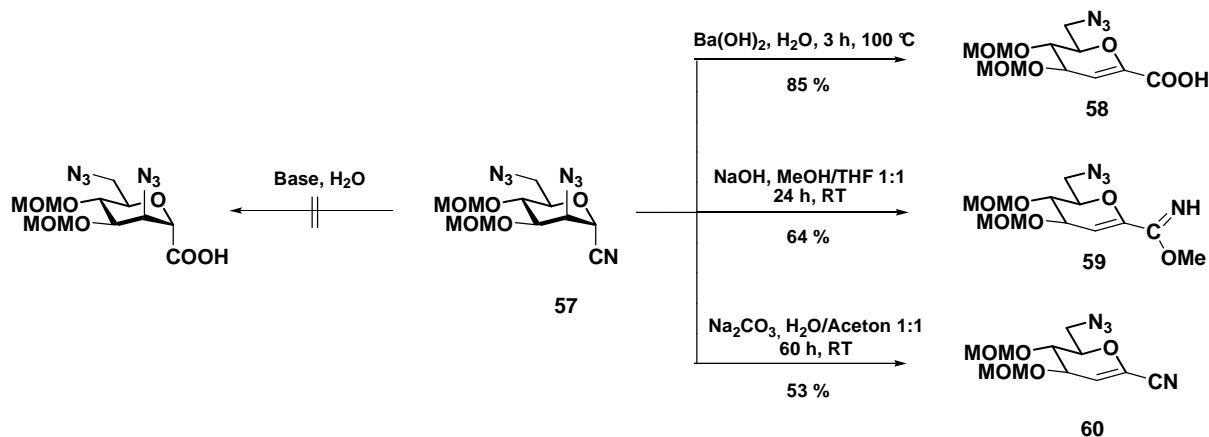


Abb. 7.8: Versuche zur basischen Verseifung der Cyanogruppe in Verbindung **57**.

Bei Anwendung milderer Reaktionsbedingungen, bzw. unter Verwendung schwächerer Basen, bildeten sich ebenfalls Eliminierungsprodukte (siehe Abbildung 7.8). Durch die Reaktion von Verbindung **57** mit Natriumcarbonat in einer Wasser/Aceton-Mischung konnte gezeigt werden, dass unter basischen Bedingungen die Eliminierung des Azids bei Verbindung **57** auch ohne eine Hydrolyse der Cyanogruppe möglich war und folglich die Hydrolyse des Cyanids im Basischen nicht ohne eine gleichzeitige Eliminierung stattfinden konnte.

Aus Zeitgründen wurde die Synthese ab diesem Schritt nicht weitergeführt. Der eingeschlagene Syntheseweg scheint aber äußerst viel versprechend zu sein. Die Erzeugung

des C-Glycosids und die Einführung der beiden Aminofunktionalitäten in Form zweier Azidogruppen gelangen in nur fünf Reaktionsschritten ausgehend von günstigem, kommerziell erhältlichem Tri-*O*-Acetyl-D-glucal. Die Synthese konnte bis zu diesem Punkt mit einer sehr einfachen Schutzgruppenstrategie durchgeführt werden. Eine mögliche Weiterführung der Synthese unter Umgehung der Eliminierungsreaktion wird in Kapitel 11 „Zusammenfassung und Ausblick“ gezeigt.

# *Zuckerdiaminosäure- oligomere*

## 8 Synthese von Zuckerdiaminosäureoligomeren

Nachdem die in Kapitel 6.2 beschriebene Synthese der Allofuranosezuckerdiaminosäuren **30**, **31** und **33** erfolgreich abgeschlossen werden konnte, sollten die Bausteine an fester Phase und in Lösung miteinander verknüpft werden. Dank der mithilfe von O. Tšubrik und I. Zemtskov war es möglich auch Oligomere zu synthetisieren, welche die in der Doktorarbeit von F. Sicherl synthetisierten Glucopyranosezuckerdiaminosäurebausteine enthielten.<sup>121</sup> Kleine Mengen dieser Bausteine wurden von Tšubrik und Zemskov erneut synthetisiert und netterweise für einige Kupplungsreaktionen zur Verfügung gestellt.

Die Kupplungsreaktionen sollten nach der Fmoc-Strategie durchgeführt werden, wie sie in der nachfolgenden Abbildung am Beispiel des Zuckerdiaminosäurebausteins **33** skizziert ist.

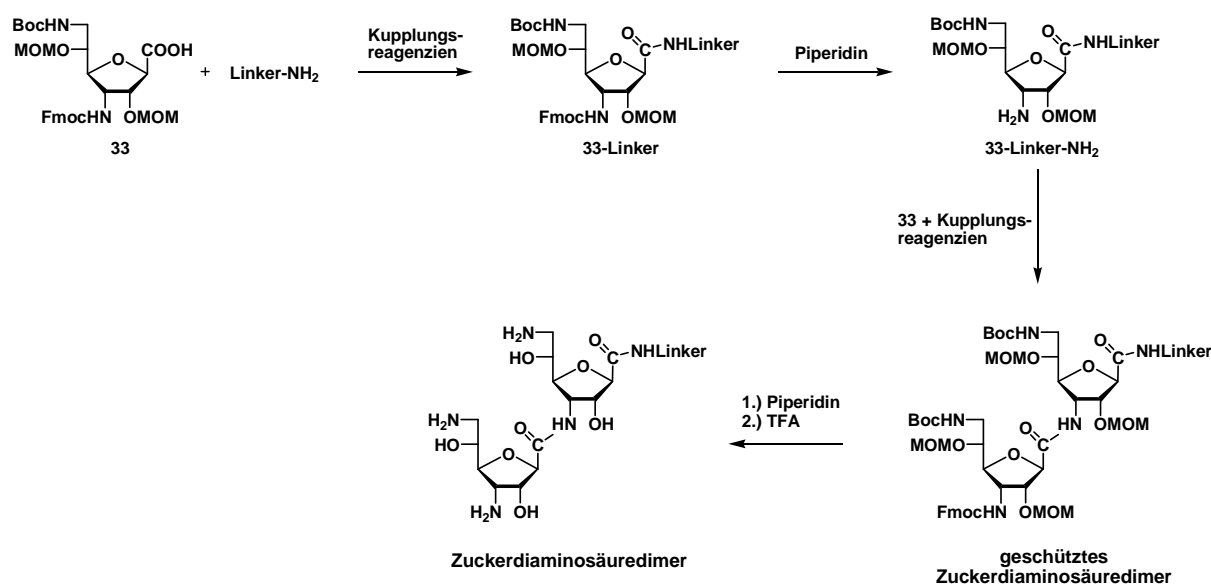


Abb. 8.1: Kupplung von Zuckerdiaminosäurebausteinen nach der Fmoc-Strategie am Beispiel von Verbindung **33**.

Mithilfe von Verbindung **30**, die durch ihr N<sub>3</sub>/Boc-Schutzgruppensdesign eine Sonderstellung unter den drei dargestellten Allofuranosezuckerdiaminosäurebausteinen einnimmt ist es möglich neben linearen, auch verzweigte Oligomere darzustellen.

Eines der Hauptziele der Oligomersynthesen sollte das Finden von Zuckerdiaminosäureoligomeren sein, die eine möglichst hohe Affinität an ausgewählte RNA-Sequenzen und somit niedrige IC<sub>50</sub>-Werte in den zugehörigen RNA-Bindungsexperimenten zeigen. Oligomere die in den Doktorarbeiten von F. Sicherl und F. John eine starke Bindung an die zur Verfügung gestellte RNA zeigten, hatten bis auf eine Ausnahme eine gemeinsame Struktur, die aus drei (2→1)-amidverknüpften Glucoseinheiten bestand und nachfolgend als Glucoseleitstruktur bezeichnet wird (siehe Abbildung 8.2). Diese

Leitstruktur sollte für die gezielte Synthese einiger weiterer Oligomere herangezogen werden. Daneben war das Finden einer weiteren Leitstruktur von großer Bedeutung, da diese für künftige Arbeiten Vergleiche über Art und räumlichen Aufbau aktiver Oligomere gestatten könnte.

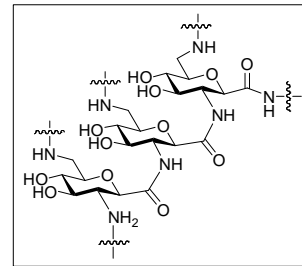


Abbildung 8.2: Glucoseleitstruktur.

Ein weiteres Ziel der Oligomersynthese sollte der Nachweis sein, dass das Prinzip der elektrostatischen Komplementarität auch für die Bindung von Zuckerdiaminosäureoligomeren an RNA von entscheidender Bedeutung ist (siehe hierzu auch Kapitel 3). Um die Relevanz der freien Aminogruppen für die Bindung der Zuckerdiaminosäureoligomere zu bestätigen, sollte mindestens ein identisch verknüpftes Oligomerenpaar synthetisiert werden, das sich lediglich durch den Austausch einer Aminogruppe gegen eine Azidgruppe unterscheidet. Die Azidverbindung sollte gemäß den Erwartungen eine deutlich schwächere Bindung an RNA zeigen.

## 8.1 Synthese von Zuckerdiaminosäureoligomeren an fester Phase

### 8.1.1 Wahl eines geeigneten polymeren Trägermaterials

Zur Synthese von Oligomeren an fester Phase musste zunächst ein geeignetes Trägermaterial für die Kupplungsreaktionen gewählt werden. Es steht eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen, polymeren Trägermaterialien zur Verfügung unter denen die am häufigsten verwendeten Materialien Polystyrolharze, Tentagel und CPG (*controlled pore glass*) sind. Die Wahl des geeigneten Trägermaterials ist vor allem von zwei Faktoren abhängig: der Stabilität des Materials gegenüber den anzuwendenden Reaktionsbedingungen und der Fähigkeit des Polymers in den zu verwendenden Lösemitteln zu quellen, um eine effiziente Kupplung der Bausteine an das Trägermaterial zu ermöglichen. Ein geeignetes Material für Synthesen nach der Fmoc-Strategie ist Polystyrol (gewöhnlich mit 1 – 2 % Divinylbenzol zur Vernetzung versetzt),<sup>185</sup> da es unter den Bedingungen für Peptidsynthesen stabil ist und in den üblicherweise verwendeten Lösemitteln DMF, NMP und Dichlormethan gute Quelleigenschaften besitzt.

Neben der Art des Trägermaterials ist bei einer Festphasensynthese auf die Ankergruppe, über welche die Bausteine mit dem Harz verbunden werden sollen, zu achten. Die Ankergruppe am Polystyrolharz sollte in diesem Fall so gewählt werden, dass sie zum einen unter den basischen Bedingungen der Fmoc-Strategie stabil sein würde und zum anderen eine

Abspaltung des synthetisierten Oligomers vom Harz im letzten Reaktionsschritt gemeinsam mit der Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen erlaubt (siehe hierzu auch Abb. 8.1). Zwei mögliche Ankergruppen die diese Eigenschaften erfüllen und an Polystyrolharzen erhältlich sind, sind die in Abbildung 8.3 gezeigten Ankergruppen des Rink-Amid- und des Sieber-Amid-Harzes. Sowohl die Boc- und MOM-Schutzgruppen der synthetisierten Oligomere, als auch die Ankergruppen lassen sich unter trifluoressigsäuren Bedingungen entfernen.

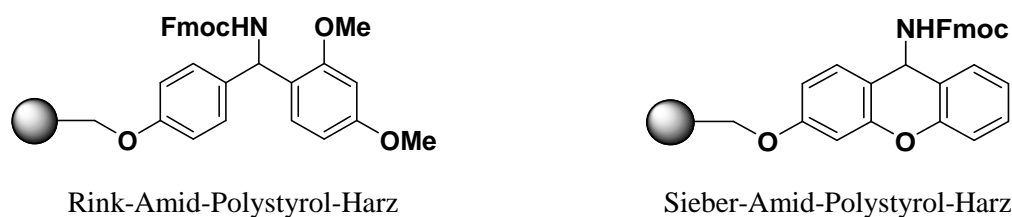


Abb. 8.3: Polystyrolharze mit Rink-Amid- und mit Sieber-Amid-Ankergruppe als mögliche Trägermaterialien für Oligomersynthesen an fester Phase.

Bei Versuchen zur Verwendung dieser beiden Harze in der Doktorarbeit von F. Sicherl<sup>121</sup> zeigte sich, dass Zuckerdiaminosäurebausteine mit Glucopyranosekonfiguration mit größerer Effizienz an das Rink-Amid-Polystyrolharz als an das Sieber-Amid-Polystyrolharz gebunden werden konnten. Daher wurde entschieden, das Rink-Amid-Harz für die Kupplungsversuche der Zuckerdiaminosäurebausteine mit Allofuranosekonfiguration zu verwenden.

### 8.1.2 Wahl der Kupplungsreagenzien

Die Kupplungsreaktionen von Zuckerdiaminosäuren wurden in der AG Wittmann bislang mit den Systemen HOBt/HBTU und HOAt/HATU erfolgreich durchgeführt. Für die Kupplung steht eine Vielzahl weiterer Reagenzien zur Verfügung, deren Eignung von Fall zu Fall unterschiedlich sein kann. Auf die Vielzahl der Möglichkeiten zur chemischen Knüpfung von Peptidbindungen soll hier nicht im Einzelnen eingegangen werden; eine Übersicht über die in Peptidsynthesen verwendeten Reagenzien kann jedoch Büchern von J. Jones<sup>186</sup> und N. L. Benoiton<sup>187</sup> entnommen werden.

Für die Kupplungen in dieser Arbeit sollte das System HOAt/HATU verwendet werden, zum einen weil mit diesem System bereits gute Erfahrungen innerhalb der Arbeitsgruppe gemacht wurden, zum anderen weil das System HATU/HOAt reaktiver ist als das vergleichbare System HOBt/HBTU und dadurch eine effizientere Verknüpfung der wertvollen monomeren Einheiten erhofft wurde. Die erhöhte Reaktivität von HATU im Vergleich zu HBTU kann

durch einen Protonentransfer auf den Pyridinring während der HATU-vermittelten Kupplungsreaktion begründet werden.

Die Verwendung von HATU als Kupplungsreagenz wurde auch in Publikationen anderer Arbeitsgruppen zur Synthese von einfachen Zuckerdiaminosäureoligomeren beschrieben.<sup>120</sup>

### 8.1.3 Bestimmung der Beladungsdichte und Beladung des Rink-Amid-Harzes mit Allofuranose- und Glucopyranosezuckerdiaminosäurebausteinen

Zunächst wurde die Beladungsdichte des Rink-Amid-Harzes bestimmt, indem eine definierte Menge des Harzes (10.0 mg) mit einem Milliliter einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF zwei Stunden lang geschüttelt wurde. Als Abspaltprodukt dieser Reaktion entsteht ein Dibenzofulven-Piperidin-Addukt dessen Konzentration in der Abspalllösung sich mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnen lässt. Über die Konzentration des Addukts in der Abspalllösung kann auf die Mole an abgespaltenen Fmoc-Gruppen und somit auf die Beladungsdichte des Harzes zurückgerechnet werden.

Zur Berechnung Beladungsdichte wurde der literaturbekannte Extinktionskoeffizient des Dibenzofulven-Piperidin-Addukts bei 301 nm verwendet.<sup>188</sup> Auf diese Weise konnte eine Beladungsdichte von 0.61 mmol/g für das verwendete Harz ermittelt werden.

Nach Bestimmung der Beladungsdichte sollten zunächst Kupplungsversuche mit den von O. Tšubrik und I. Zemskov nachsynthetisierten Glucosebausteinen **61** und **62** durchgeführt werden.

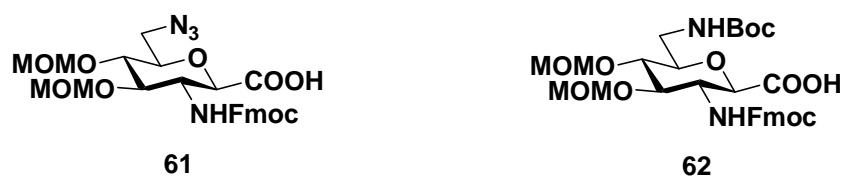


Abb. 8.4: Zuckerdiaminosäurebausteine aus der Doktorarbeit von F. Sicherl. Diese wurden von O. Tšubrik und I. Zemskov nachsynthetisiert und für einige Kupplungsversuche zur Verfügung gestellt.

Für den ersten Versuch wurde die Kupplung von Verbindung **61** an das Rink-Amid-Harz mit dem System HOAt/HATU/DIPEA getestet. Dazu wurde das von Fmoc befreite Harz (50 mg) in einer Plastikspritze mit eingesetzter Fritte 30 Minuten in DMF gequollen, das DMF abgesaugt und das Harz anschließend mit einer Lösung aus zwei Äquivalenten des Bausteins **61**, zwei Äquivalenten HOAt und zwei Äquivalenten HATU in 1.5 ml NMP versetzt. Nach Zugabe von 5 eq. DIPEA wurde die Reaktionsmischung 48 Stunden auf einem Schüttler durchmischt. Die DMF-Lösung wurde abgesaugt und das Harz mithilfe des Kaiser-Tests<sup>189</sup> auf freie Aminogruppen untersucht. Beim Kaiser-Test wird zur Anfärbung Ninhydrin

verwendet, das mit primären Aminen unter Desaminierung einen blauen Farbstoff (Ruhemann's Purpur) bildet. Die Harzkugeln zeigten keine Blaufärbung, was auf eine vollständige Kupplung von Verbindung **61** an das Harz hinwies. Um die Beladung des Harzes mit **61** zu bestimmen und das Ergebnis der Bestimmung der Beladungsdichte des freien Harzes zu verifizieren wurde nach zehnmalem Waschen der Harzkugeln mit DMF ein Teil des Harzes mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF versetzt und anschließend – nach einer angemessenen Verdünnung der Abspaltlösung - die Absorption bei 301 nm gemessen. Es ergab sich eine Beladung des Harzes von 0.58 mmol/g. Diese Beladung stimmt in guter Näherung mit der bestimmten Beladungsdichte des freien Harzes von 0.61 mmol/g überein. Das gleiche Experiment wurde parallel von O. Tšubrik unter Verwendung von DMF als Lösemittel mit Baustein **62** durchgeführt. Bei diesem Experiment ergab sich eine Beladung von 0.59 mmol/g.

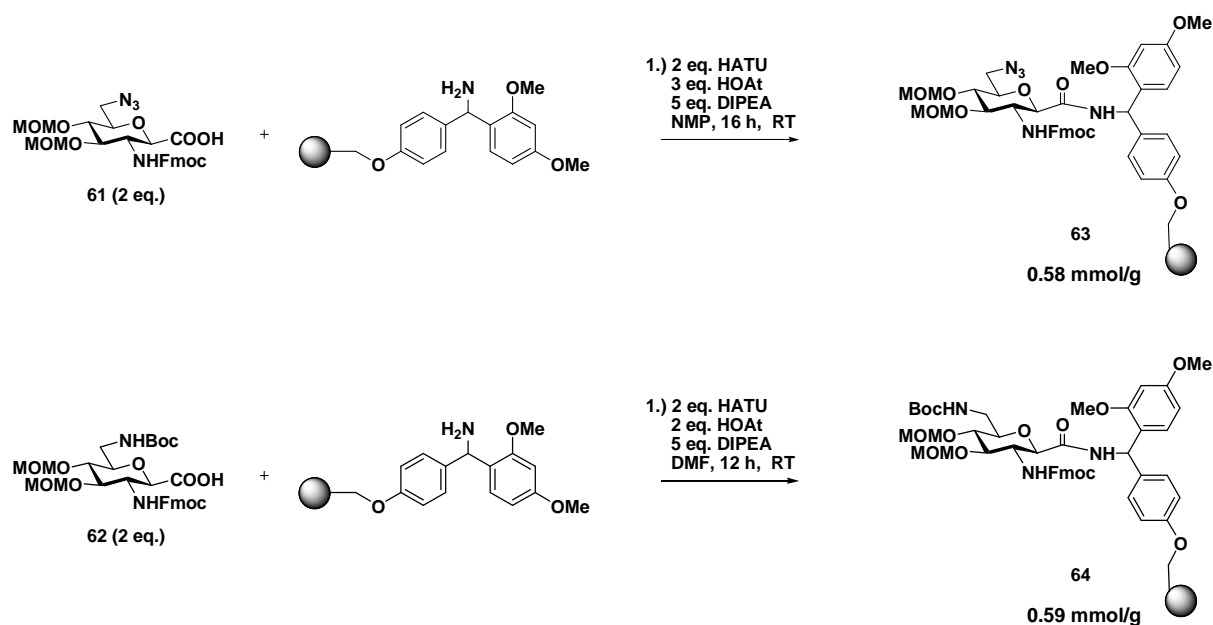
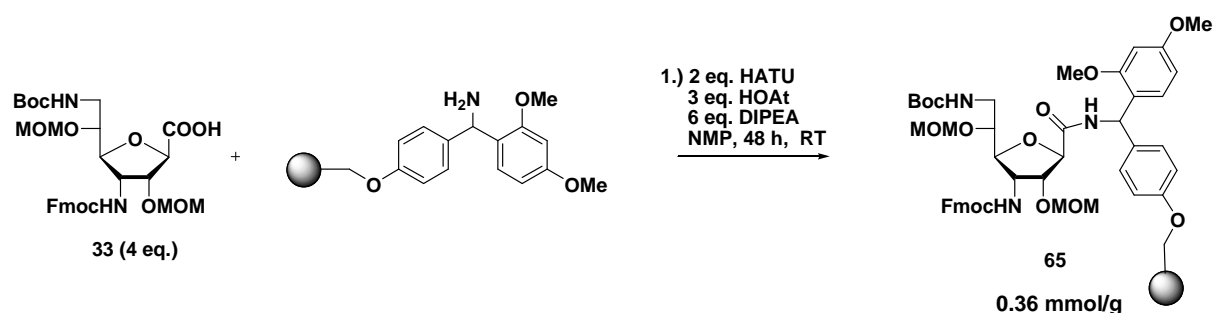


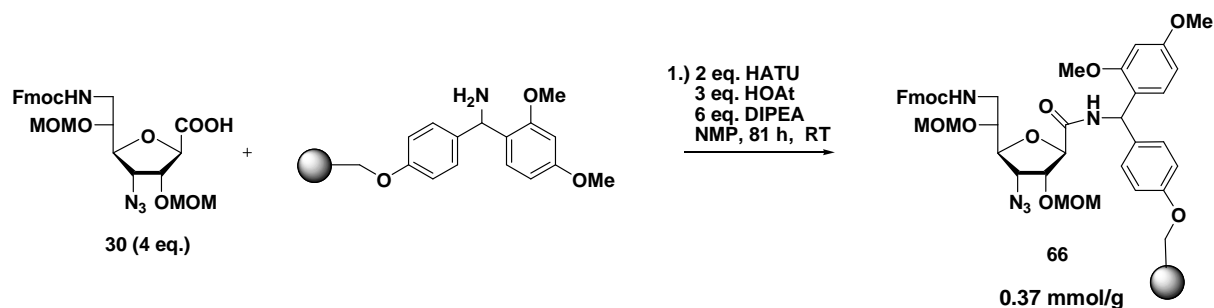
Abb. 8.5: Kupplung der Zuckerdiaminosäurebausteine **61** und **62** an das Rink-Amid Harz mit anschließender Bestimmung der Beladungsdichte.

Nachdem diese ersten Kupplungsversuche erfolgreich verliefen, sollte die Kupplung eines Alloosebausteins mit dem System HOAt/HATU/DIPEA getestet werden. Dazu wurde das von Fmoc befreite Harz (50 mg) in einer Plastikspritze mit eingesetzter Fritte 30 Minuten in DMF gequollen. Das DMF wurde abgesaugt und das Harz anschließend mit einer Lösung aus zwei Äquivalenten des Bausteins **33**, zwei Äquivalenten HOAt und zwei Äquivalenten HATU in 1.5 ml NMP versetzt. Nach Zugabe von 5 eq. DIPEA wurde die Reaktionsmischung 24 Stunden auf einem Schüttler durchmischt. Die NMP-Lösung wurde abgesaugt und das Harz mithilfe des Kaiser-Tests<sup>189</sup> auf freie Aminogruppen untersucht. Die Harzkugeln zeigten im

Gegensatz zu den Kupplungsversuchen mit den Glucosebausteinen eine intensive Blaufärbung, was auf eine unvollständige Reaktion von Verbindung **33** mit dem Harz hinwies. Um die Beladung des Harzes mit **33** zu bestimmen wurde nach zehnmaligem Waschen der Harzkugeln mit DMF ein Teil des Harzes mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF versetzt und anschließend – nach einer angemessenen Verdünnung der Abspaltlösung - die Absorption bei 301 nm gemessen. Es ergab sich eine Beladung des Harzes von 0.33 mmol/g. Eine Wiederholung des Versuches unter exakt denselben Bedingungen zeigte, dass bereits nach drei Stunden eine Beladung von 0.29 mmol/g erreicht wurde. Durch Erhöhung der Menge an Baustein **33** und Verlängerung der Reaktionszeit konnte lediglich eine geringfügige Verbesserung der Beladungsdichte auf 0.36 mmol/g, jedoch keine vollständige Beladung des Harzes erzielt werden (siehe Tabelle 8.1).


 Abb. 8.6: Kupplung von Baustein **33** an das Rink-Amid-Harz.

Der Versuch wurde ebenfalls mit Zuckerdiaminosäurebaustein **30** durchgeführt, wobei nach einer Reaktionszeit von drei Stunden lediglich eine Beladungsdichte von 0.21 mmol/g erreicht wurde. Nach einer Reaktionszeit von 81 Stunden stieg die Beladungsdichte auf 0.37 mmol/g und lag damit im Bereich der Beladung des Harzes mit Baustein **33**. Durch eine weitere Verlängerung der Reaktionszeit ließ sich keine merkliche Verbesserung der Beladungsdichte mehr feststellen.


 Abb. 8.7: Kupplung von Baustein **30** an das Rink-Amid-Harz.

Die Kupplungsversuche der beiden Alloosebausteine **30** und **33** mit dem freien Harz weisen daraufhin, dass bei etwa 60 % der maximalen Beladung eine Art Sättigungspunkt erreicht wurde und keine zusätzlichen Gruppen mehr vom Harz aufgenommen werden konnten.

Die Beobachtung, dass die Allofuranosebausteine schlecht an das Rink-Amid-Harz koppeln ist im Einklang mit Kupplungsversuchen von Ribofuranosezuckerdiaminosäurebausteinen aus der Doktorarbeit von F. John in unserer Arbeitsgruppe.<sup>122</sup> F. John beobachtete bei Zuckerdiaminosäurebausteinen mit Ribofuranosekonfiguration ebenfalls keine vollständige Beladung des Rink-Amid-Harzes. Er erzielte in seiner Arbeit Beladungsdichten zwischen 0.31 und 0.37 mmol/g für die Ribosebausteine; diese Werte stimmen mit den Beladungsdichten der Alloosebausteine in guter Näherung überein.

Die mäßige Beladung des Harzes stellte kein Problem für die prinzipielle Durchführbarkeit der Oligomersynthesen an der festen Phase dar, da verbleibende freie Aminogruppen mithilfe einer 10%igen Ac<sub>2</sub>O-Lösung in DMF gecappt und somit für weitere Kupplungen inaktiviert werden konnten.

Tab. 8.1: Kupplungen unterschiedlicher Zuckerdiaminosäurebausteine an ein Rink-Amid-Harz. Die angegebenen Äquivalente beziehen sich auf die Beladungsdichte des freien Rink-Amid-Harzes von 0.61 mmol/g. Die Reagenzien wurden bei den Reaktionen pro 50 mg Harz (Trockenmasse) in insgesamt 1.5 ml NMP gelöst.

Zuckerdiamino-säurebaustein	HATU	HOAt	DIPEA	<i>t</i> (in h)	Beladungsdichte des freien Harzes	Beladungsdichte nach Kupplung
<b>33</b> (2 eq.)	2 eq.	2 eq.	5 eq.	3 h	0.61 mmol/g	0.29 mmol/g
<b>33</b> (2 eq.)	2 eq.	2 eq.	5 eq.	24 h	0.61 mmol/g	0.33 mmol/g
<b>33</b> (2 eq.)	2 eq.	3 eq.	6 eq.	20 h	0.61 mmol/g	0.32 mmol/g
<b>33</b> (4 eq.)	2 eq.	3 eq.	6 eq.	48 h	0.61 mmol/g	0.36 mmol/g
<b>30</b> (2 eq.)	2 eq.	3 eq.	6 eq.	9 h	0.61 mmol/g	0.21 mmol/g
<b>30</b> (4 eq.)	2 eq.	3 eq.	6 eq.	81 h	0.61 mmol/g	0.37 mmol/g
<b>61</b> (2 eq.)	2 eq.	3 eq.	5 eq.	16 h	0.61 mmol/g	0.58 mmol/g
<b>62</b> (2 eq.)	2 eq.	2 eq.	5 eq.	16 h	0.61 mmol/g	0.59 mmol/g
Fmoc-Ala-OH	2eq.	3 eq.	5 eq.	16 h	0.61 mmol/g	0.59 mmol/g

Ein Grund für die unterschiedliche Fähigkeit von Allofuranose- und Glucopyranosebausteinen an das Harz zu binden, könnte in ihrer unterschiedlichen räumlichen Anordnung, also in ihrer Konfiguration bestehen. Während Glucopyranosen für gewöhnlich als Sessel mit einer <sup>4</sup>C<sub>1</sub>-Konfiguration vorliegen, ist eine Vorhersage der Konfiguration von Fünfringzuckern nicht trivial, da Fünfringe mehrere Konfigurationen mit sehr ähnlichen energetischen Lagen einnehmen können.<sup>190,191</sup> Welche Konfiguration im Einzelfall bevorzugt wird, ist aufgrund des geringen Energieunterschieds der einzelnen Konfigurationen stark von der Art und dem sterischen Anspruch der Substituenten an den einzelnen Zentren des Fünfrings abhängig. Die

stabilsten räumlichen Anordnungen für Fünfringe sind der Halbsessel und der so genannte *envelope* (Briefumschlag).<sup>190,191</sup> Zieht man in Betracht, dass für eine gute Erreichbarkeit der freien Aminogruppen an den Ankergruppen des Harzes die Größe der Poren innerhalb des polymeren Trägers eine Rolle spielt, so leuchtet ein, dass durch ungünstige Molekülgeometrien, welche ein Eindringen in einige der Poren erschweren oder verhindern, keine vollständige Beladung des Harzes erreicht werden kann.

Gemäß dieser Hypothese wäre die Verwendung von Harzen mit möglichst großen Poren eine Möglichkeit das Problem der schlechten ersten Kupplung an das Rink-Amid-Harz zu umgehen. So könnte auch bei einer ungünstigen Molekülgeometrie die Wahrscheinlichkeit einer Kupplung erhöht werden. Da die Kupplung mit dem Rink-Amid-Harz aber prinzipiell funktionierte, wurden keine weiteren Versuche unternommen ein Harz zu finden, das eine größere Beladung ermöglicht hätte. Dennoch wäre es aufgrund der überaus aufwendigen Synthese für Allofuranosezuckerdiaminosäuren wünschenswert in der Zukunft einen polymeren Träger zur Verfügung zu haben, der eine bessere Kupplung der Furanosebausteine gestattet, um so die Substanzmengen und Überschüsse für die Kupplungsreaktionen an der festen Phase zu minimieren. Eine Alternative wären CPG Trägermaterialien, die mit Porengrößen von 1 nm bis 1000 nm erhältlich sind und vielfach Anwendung in der Synthese von RNA- und DNA-Oligomeren an fester Phase finden.<sup>185</sup> Zwar haben sie eine geringere Beladungsdichte als die meisten Polystyrolharze, ihre Porengrößen sind jedoch wohl definiert und die Erreichbarkeit ihrer funktionellen Gruppen hängt nicht von den Quelleigenschaften des Polymers in unterschiedlichen Lösemitteln ab.<sup>185</sup>

### **8.1.4 Verknüpfung von Zuckerdiaminosäurebausteinen zu Oligomeren an der festen Phase**

Versuche zur Synthese von Oligomeren an der festen Phase wurden zunächst mit weiteren Glucopyranosebausteinen in Zusammenarbeit mit O. Tšubrik und I. Zemtskov unternommen. Zunächst sollte dabei das Tetramer **69** (siehe Abbildung 8.9) dargestellt werden, welches bereits zuvor in der Doktorarbeit von F. Sicherl synthetisiert wurde. Tetramer **69** war das einzige Oligomer mit Glucoseleitstruktur, das in den RNA-Bindungsstudien keine guten Bindungseigenschaften zeigte. Es sollte durch die nochmalige Synthese des Moleküls festgestellt werden, ob bei der ursprünglichen Messung der IC<sub>50</sub>-Werte des Moleküls eventuell ein Fehler bei der Durchführung vorlag (bezüglich Durchführung, Auswertung, Vergleich und Beurteilung der Ergebnisse der RNA-Bindungstests siehe Kapitel 10).

Für die Synthese des Oligomers wurde, analog der Vorgehensweise bei der Beladung der Harze, der polymere Träger zunächst in DMF gequollen und anschließend mit je zwei Äquivalenten der Zuckerdiaminosäure **62**, zwei Äquivalenten HATU, zwei Äquivalenten HOAt und 5 Äquivalenten DIPEA in DMF zur Reaktion gebracht. Die Kupplungen waren jeweils vollständig, was durch den nach jedem Kupplungsschritt durchgeführten Kaiser-Test gezeigt werden konnte. Nach der dritten Kupplung wurde das Harz gesplittet und zur einen Hälfte mit Baustein **62** und zur anderen Hälfte mit Baustein **61** versetzt. Dadurch ließen sich die in Abbildung 8.8 gezeigten Intermediate **67** und **68** synthetisieren, die nachfolgend sauer entschützt und von der festen Phase abgespalten werden sollten.

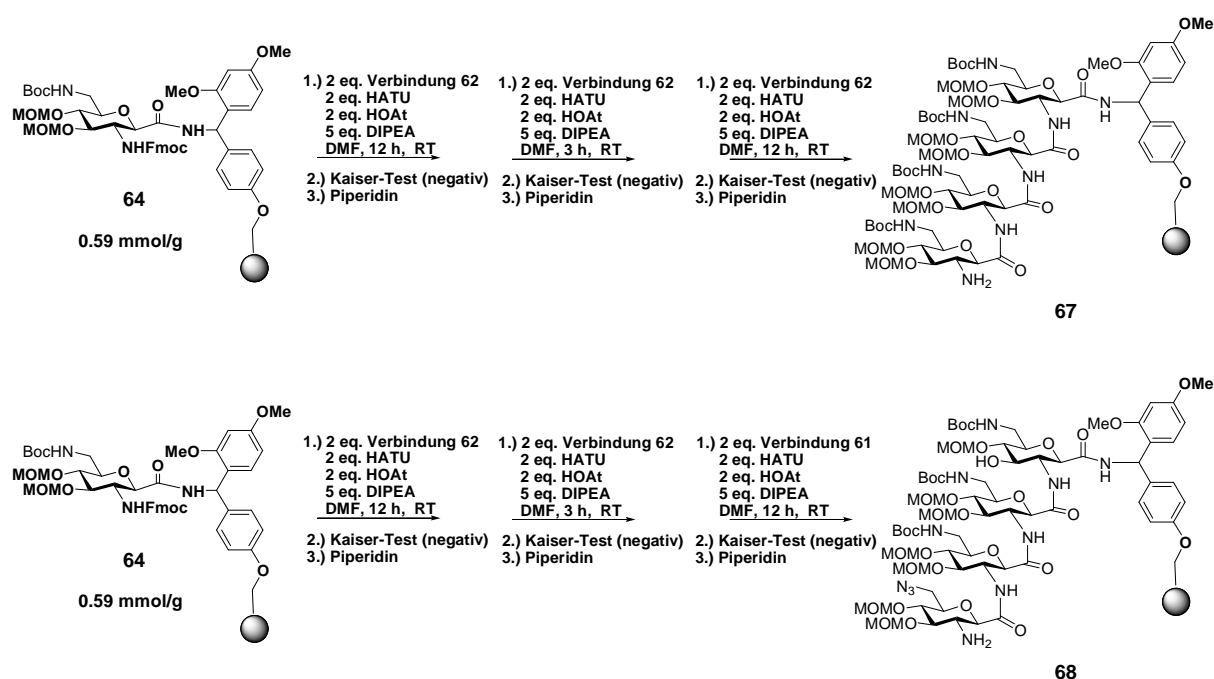


Abb. 8.8: Synthese der tetrameren Intermediate **67** und **68** an der festen Phase.

Die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen und die Abspaltung des Oligomers vom Harz sollten in einem Schritt stattfinden. Dazu wurde eine Lösung von TFA, Wasser und TIS (Triisopropylsilan) mit einem Mischverhältnis von 90:7:3 hergestellt und zum Harz gegeben. TIS wurde verwendet, um langlebige, reaktive Kationen bei der Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen abzufangen.

Das Harz wurde drei Stunden mit der TFA-Lösung auf einem Schüttler behandelt, die TFA-Lösung nachfolgend im Stickstoffstrom ausgetrieben und das Harz anschließend nochmals eine Stunde mit frischer TFA-Lösung behandelt. Nach Ablauf einer Stunde wurde die TFA erneut im Stickstoffstrom ausgetrieben und der ölige Rückstand in 0.13%iger PFPA-Lösung (Pentafluorpropionsäurelösung) aufgenommen. Das Harz und andere unlösliche Bestandteile wurden per Filtration mit einem Spritzenfilter abgetrennt. Die so entstandene klare Lösung

konnte anschließend direkt per HPLC aufgereinigt werden. PFPA diene als Kontaktionenpaarreagenz, das mit den freien Aminogruppen der Oligomere wechselwirkt und so eine Verlängerung der Retentionszeit und eine Aufreinigung der Zuckerdiaminosäureoligomere per HPLC ermöglicht. Für die Reinigung des Oligomers wurde eine Vydac Proteine&Peptide Säule mit einem Acetonitril/0.13 % PFPA Laufmittelgemisch und einem Gradienten von 5-40% Acetonitril in 30 Minuten durchgeführt. Diese Methode war der Methode, die in den Doktorarbeiten von Franklin John und Frank Sicherl verwendet wurde, bezüglich der Spezifität überlegen (siehe hierzu Chromatogramme in den Abbildungen 8.13 und 8.14). Ein Vergleich der Abbildungen 8.13 (HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts von **69**) und 8.14 (HPLC-Chromatogramm des per HPLC nach der Methode von Sicherl und John vorgereinigten Tetramers **69**) verdeutlicht dies.

Das Produkt wurde bei einer Retentionszeit von 16.0 Minuten eluiert. Die vereinigten Produktfraktionen wurden anschließend lyophilisiert, wobei die Tetramere jeweils als voluminöses reinweisses Lyophilisat erhalten wurden. Auf diese Weise konnten die Tetramere **69**, bzw. **70** mit Ausbeuten von 9 %, bzw. 15 % ausgehend vom beladenen Harz **64** (jeweils berechnet auf das Pentafluoropropionsäuresalz) isoliert werden. Da PFPA als Kontaktionenpaarreagenz für die chromatographische Aufreinigung verwendet wurde, war davon auszugehen, dass die Oligomere als PFPA-Salze vorlagen - eine Annahme, die durch das Auftreten von PFPA-Signalen in den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren aller Oligomere bestätigt wurde.

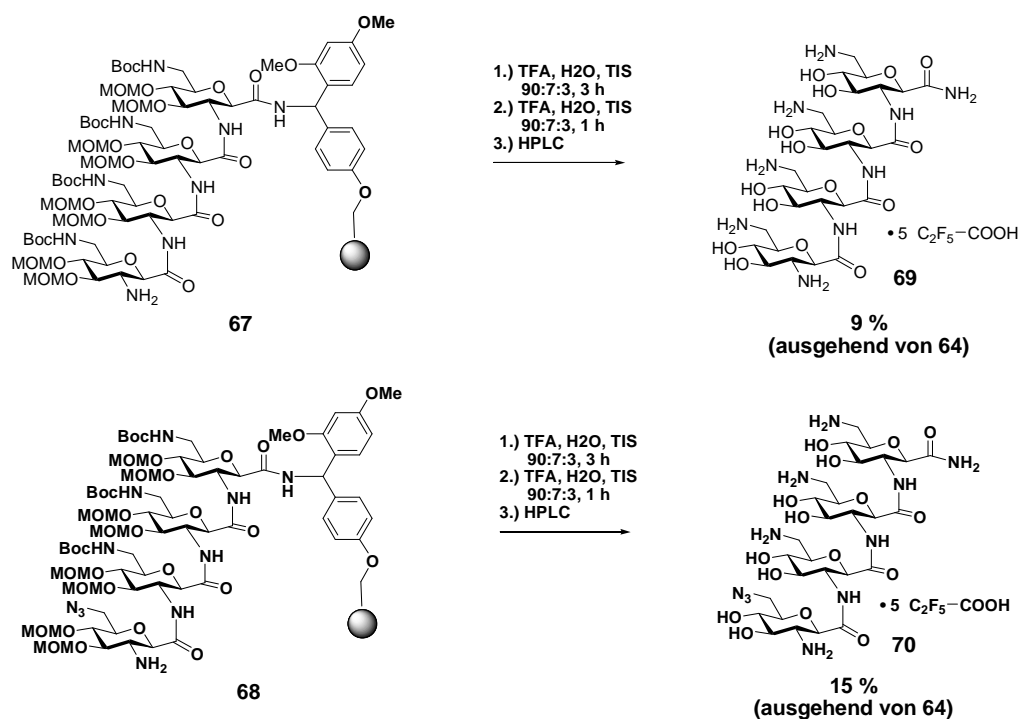


Abb. 8.9: Synthese der freien Tetramere **69** und **70** durch Entfernen der säurelabilen Schutzgruppen und Abspaltung vom Harz mit TFA.

Beide Oligomere konnten ohne nachweisbare Verunreinigungen isoliert werden, wie am Beispiel des HPLC-Chromatogramms des zuvor bereits per HPLC gereinigten Tetramers **69** in Abbildung 8.10 zu erkennen ist. Bei den Peaks im vorderen Bereich des Chromatogramms handelt es sich um Artefakte aus der HPLC-Methode, die ebenfalls bei Blindwertmessungen zu sehen waren. Ebenfalls in Abbildung 8.10 ist das zugehörige hochaufgelöste ESI-Spektrum von Verbindung **69** zu sehen. Die gefundene Masse des  $H^+$ -Peaks stimmt mit einem Wert von 770.3504 sehr gut mit der theoretischen monoisotopischen Massen von 770.3527 überein.

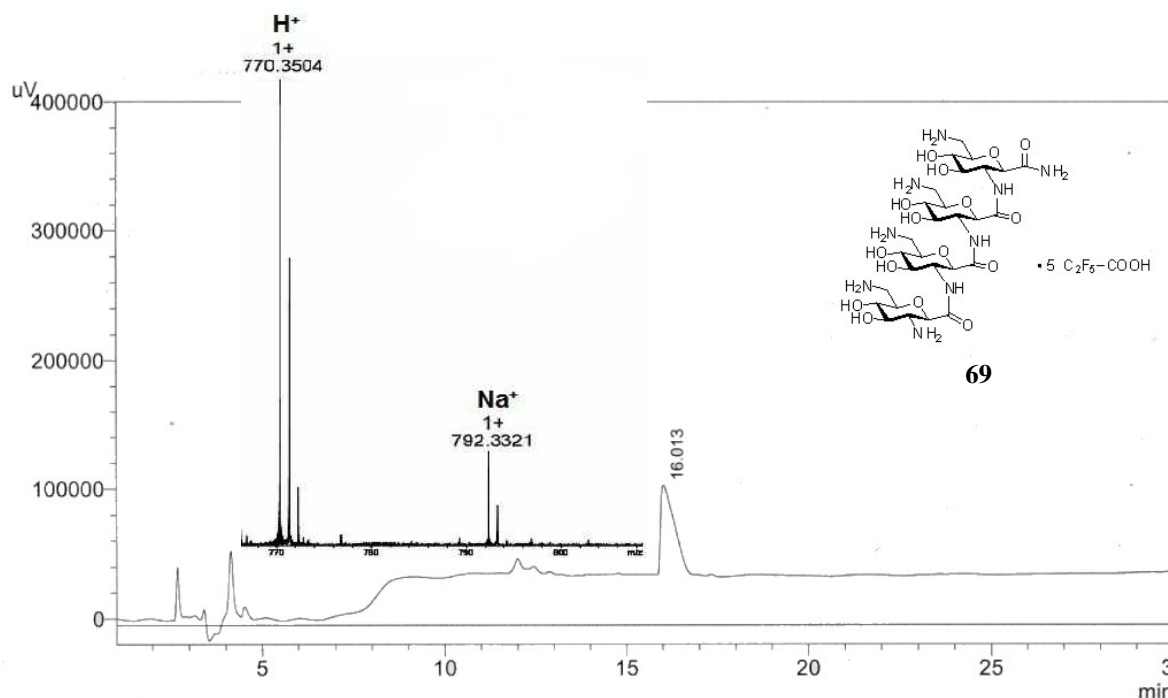


Abb. 8.10: HPLC-Chromatogramm des vorgereinigten Tetramers **69** und das hochaufgelöste ESI-Spektrum des Hauptpeaks. Säule: Vydac Proteine&Peptide (4 mm x 250 mm); Laufmittelgemisch: Acetonitril/0.13 % PFPA; Gradient: Acetonitril 5-40% in 30 Minuten; Detektionswellenlänge: 220 nm; Fluss: 1.0 ml/min.

Nachdem die Synthese von rein Glucose-haltigen Zuckerdiaminosäureoligomeren erfolgreich an der festen Phase durchgeführt werden konnte, sollte als nächstes ein gemischtes Zuckerdiaminosäureoligomer aus Alloose- und Glucosebausteinen synthetisiert werden. Dazu wurde der in Abbildung 8.11 gezeigte Glucosebaustein **71** (3 eq.) mit HATU (3 eq.), HOAt (4.5 eq.) und DIPEA (6 eq.) dreimal an das beladene Harz **65** gekuppelt (siehe Abbildung 8.12). Einige Restbestände von Verbindung **71** waren noch aus der Doktorarbeit von F. Sicherl vorhanden und konnten für die Synthese verwendet werden. Die Kupplungen waren den Erwartungen entsprechend vollständig und wurden mithilfe eines TNBS-Tests überprüft. Nach saurer Abspaltung mit TFA/H<sub>2</sub>O/TIS 90:7:3 und anschließender zweimaliger Reinigung per HPLC konnte das

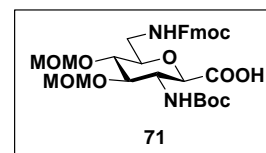


Abb. 8.11: Glucosebaustein **71**.

gewünschte Tetramer **72** mit einer Ausbeute von 8 % (berechnet auf die Molmasse des PFPA-Salzes) isoliert werden.

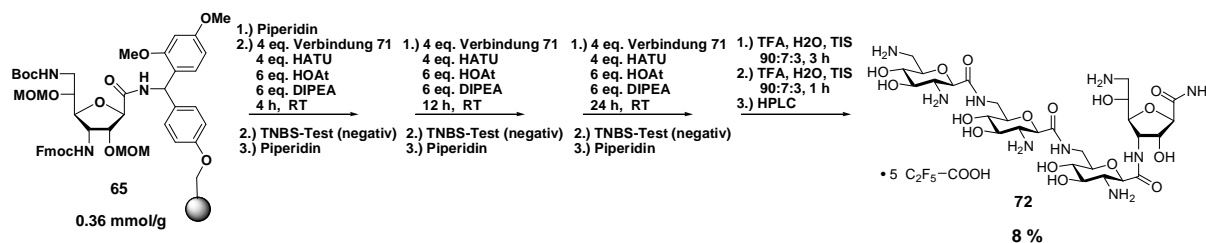


Abb. 8.12: Synthese des gemischten Tetramers **72**.

Das Produkt wurde nach der Abspaltung vom Harz zunächst mit einer HPLC-Methode aus der Doktorarbeit von F. Sicherl unter Verwendung einer Nucleosil C-18 Säule (4 mm x 250 mm) mit einem Gradienten von 1-50 % Acetonitril in 30 Minuten (Laufmittelgemisch: Acetonitril/0.13 % aq. PFPA) gereinigt, wobei sich der Produktpeak als Schulter des größten Peaks im HPLC-Chromatogramm zeigte und mit dieser HPLC-Methode nicht sauber abgetrennt werden konnte (siehe Abbildung 8.13).

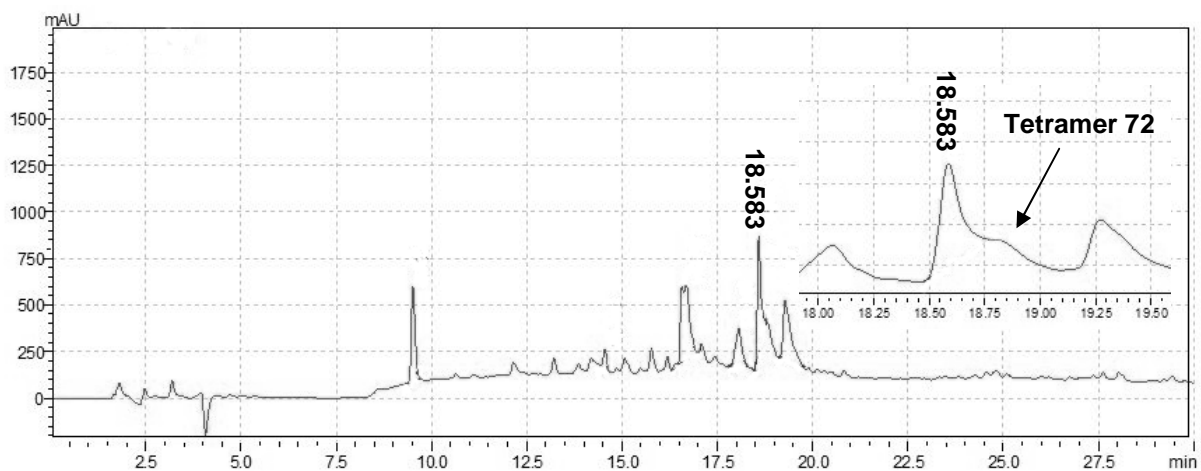


Abb. 8.13: HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts von Tetramer **72**. Säule: Knauer Nucleosil (4 mm x 250 mm); Laufmittelgemisch: Acetonitril/0.13 % PFPA; Gradient: Acetonitril 5-40% in 30 Minuten; Detektionswellenlänge: 220 nm; Fluss: 1.0 ml/min.

Tetramer **72** konnte erst nach einer zweiten Aufreinigung per HPLC in Reinform erhalten werden. Dabei wurde anstelle der Nucleosil C18-Säule eine Vydac Proteine & Peptide-Säule verwendet und mit einem Gradienten von 5-40 % Acetonitril in 30 Minuten, anstelle des zuvor verwendeten Gradienten von 1- 50 % in 30 Minuten gearbeitet (siehe Abbildung 8.14). Diese Methode zeigte eine höhere Spezifität und konnte den Rest des früher eluierenden Hauptprodukts mit klarer Basislinientrennung separieren. Auch ein geringfügig später eluierendes Nebenprodukt, welches mit der zuvor angewandten Methode nicht vom Produktpeak abgetrennt wurde, ließ sich mit der neuen Methode separieren.

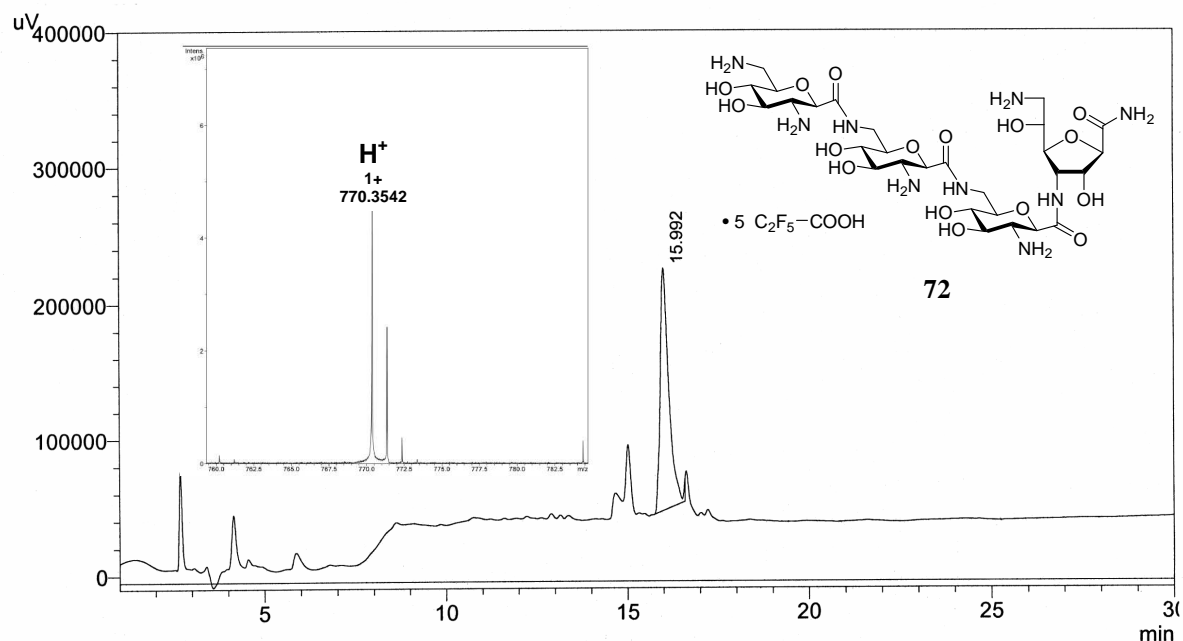


Abb. 8.14: HPLC-Chromatogramm des per HPLC vorgereinigten Tetramers **72** (Bedingungen der ersten Aufreinigung siehe Abbildung 8.13) und das hochaufgelöste ESI-Spektrum des Hauptpeaks. Säule: Vydac Proteine&Peptide (4 mm x 250 mm); Laufmittelgemisch: Acetonitril/0.13 % PFPA; Gradient: Acetonitril 5-40% in 30 Minuten; Detektionswellenlänge: 220 nm; Fluss: 1.0 ml/min.

Nachdem die Synthese und Isolierung, von rein Glucose-haltigen Zuckerdiaminosäureoligomeren und eines gemischten Zuckerdiaminosäureoligomers aus einer Allose- und drei Glucoseeinheiten erfolgreich durchgeführt wurden, sollte mit den nächsten Experimenten ein Oligomer synthetisiert werden, welches vollständig aus Allosezuckerdiaminosäuren aufgebaut war. Zu diesem Zweck wurde das zuvor mit **33** beladene und anschließend von Fmoc befreite Rink-Amid-Harz **65** in DMF gequollen und anschließend mit 4 eq. HATU, 6 eq. HOAt, 6 eq. DIPEA (6 eq.) und 2 eq. **33** in NMP versetzt und auf einem Schüttler zur Reaktion gebracht (siehe Abbildung 8.15). Nach 16 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen und ein Kaiser-Test durchgeführt. Nach Erhitzen der Ninhydrinlösung zeigte sich eine deutliche Blaufärbung. Bei einem parallel durchgeführten Ansatz unter Verwendung von 4 eq. **33** unter ansonsten gleichen Bedingungen wurde nach 48 Stunden ein Kaiser-Test durchgeführt, welcher nur mehr eine sehr schwache Blaufärbung zeigte. Die Reaktion wurde durch Abfiltrieren und Waschen der Harzkugeln abgebrochen. Eventuell noch vorhandene freie Aminogruppen wurden mit 10%iger Ac<sub>2</sub>O-Lösung in DMF gecappt und dadurch inaktiviert. Das Dimer wurde nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe mit 20%iger Piperidin-Lösung in DMF erneut mit HATU (4 eq.), HOAt (6 eq.), DIPEA (6 eq.) und 4 eq. **33** versetzt und 48 h geschüttelt. Der anschließend durchgeführte Kaisertest war erneut schwach positiv und die Reaktion wurde daraufhin erneut durch Abfiltrieren des Harzes abgebrochen.

Das so synthetisierte Trimer konnte nun - nach Entfernen der Fmoc-Gruppe mit 20 %iger Piperidin-Lösung - im TFA-Sauren vollständig entschützt und vom Harz abgespaltet werden. Die saure Abspaltung wurde wie bei den zuvor synthetisierten Oligomeren mit einer TFA, Wasser und TIS (Triisopropylsilan) Mischung in einem Verhältnis von 90:7:3 durchgeführt. Das Harz wurde zunächst drei Stunden und anschließend noch einmal eine Stunde mit der TFA-Lösung behandelt.

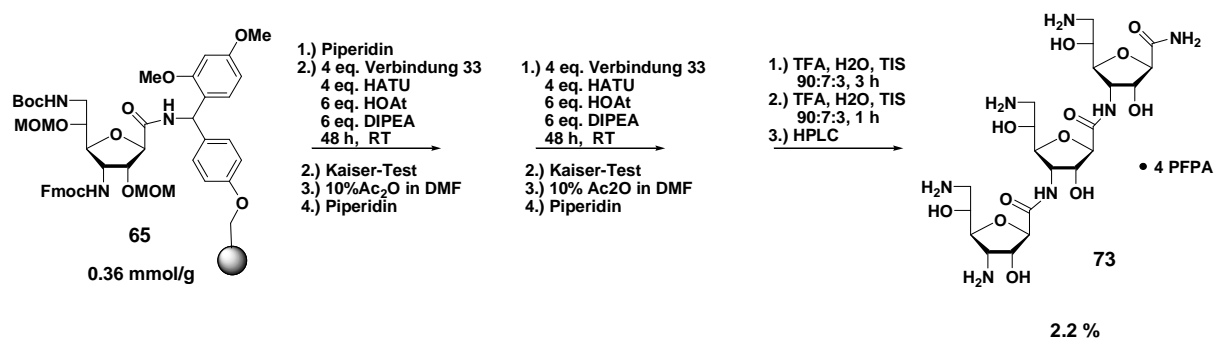


Abb. 8.15: Synthese des Trimers **73** durch zweifache Kupplung von Baustein **33** an das Harz **65** mit anschließender Abspaltung und Aufreinigung.

Nach Austreiben der TFA im Stickstoffstrom wurde der ölige Rückstand in 0.13%iger wässriger PFPA aufgenommen, durch Filtration vom Harz befreit und anschließend per HPLC gereinigt. Das Chromatogramm zeigte eine Vielzahl kleiner, ineinander übergehender Produktpeaks (siehe Abbildung 8.16) unter denen das gewünschte Produkt per ESI-MS bei einer Retentionszeit von ca. 16 Minuten detektiert werden konnte.

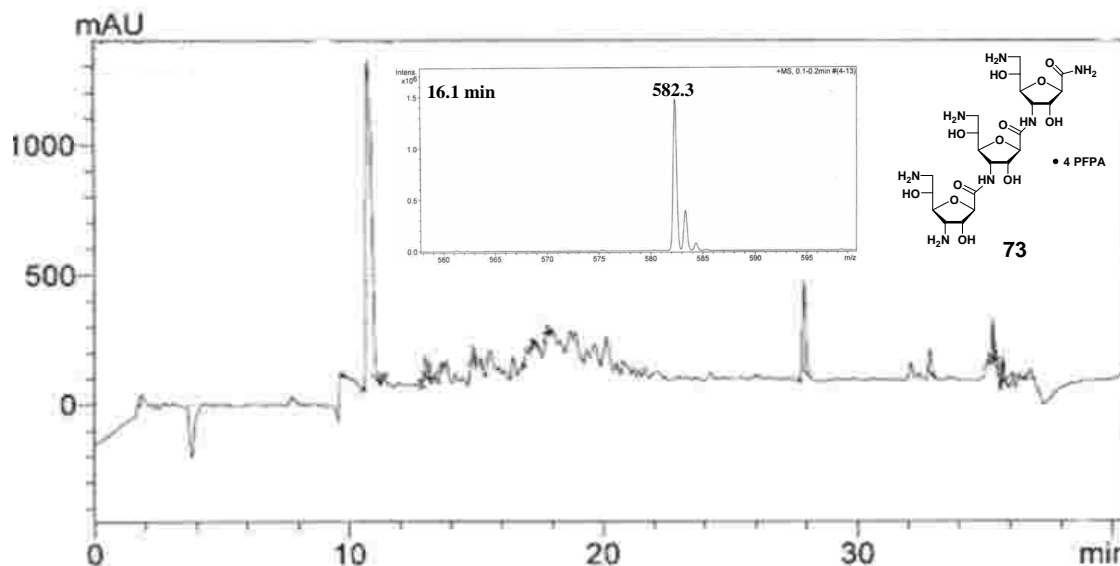


Abb. 8.16: HPLC-Chromatogramm und zugehöriges ESI-Spektrum des Trimers **73** nach zweimaliger Behandlung (3 Std. + 1 Std.) mit einer Abspatlösung aus TFA/H<sub>2</sub>O/TIS 90:7:3.

Es bedurfte in diesem Fall einer zweiten Aufreinigung per HPLC, um das Trimer in sauberer Form zu erhalten. Die Ausbeute des Trimers war mit 0.5 mg (< 3 %) äußerst gering, gemäß

der Vielzahl an Peaks im HPLC-Chromatogramm und der notwendigen zweiten HPLC-Aufreinigung jedoch nicht überraschend.

Eine nähere Betrachtung der Nebenproduktpeaks zeigte, dass neben dem gewünschten Produkt, etliche Produkte mit Molekulargewichten von  $M+n\cdot 44$  ( $M$  = Masse des gewünschten Oligomers) detektiert werden konnten, die alle bei relativen Retentionszeiten  $> 1.0$  eluiert wurden. Eine Auflistung der detektierten Massen und ihrer Retentionszeiten zeigt Tabelle 8.2. Die genaue Retentionszeit der Peaks der Nebenprodukte konnte aufgrund der Komplexität des Chromatogramms nicht ermittelt werden. Daher werden in Tabelle 8.2 Zeiträume für die Retentionszeiten angegeben, in denen die Massen der jeweiligen Nebenprodukte per ESI-MS detektiert werden konnten.

Tab. 8.2: Retentionszeiten und Massen einiger Nebenprodukte bei Entschützung und Abspaltung des Trimers **73** von der festen Phase.

Produkt	Retentionszeit	Masse
<b>Trimer 73</b>	16 Minuten	582.3 Da
<b>Nebenprodukt 1</b>	17-18 Minuten	626.4 Da (Trimer + 44 Da)
<b>Nebenprodukt 2</b>	19-21 Minuten	670.5 Da (Trimer + 88 Da)
<b>Nebenprodukt 3</b>	22-23 Minuten	714.5 Da (Trimer + 132 Da)
<b>Nebenprodukt 4</b>	24 Minuten	758.6 Da (Trimer + 176 Da)

Die zusätzlichen Molekülmassen von  $M+n\cdot 44$  Dalton sind wahrscheinlich Carbaminsäurehaltigen Nebenprodukten zuzuordnen, die bei Abspaltung der Boc-Schutzgruppen entstehen können. Prinzipiell sind zwei Wege denkbar, durch die Carbaminsäuren bei der Behandlung des Harzes mit der Abspaltlösung entstehen. Entweder während der Abspaltung einer Boc-Schutzgruppe, bei der die tert.-Butylgruppe nicht konzertiert mit der Abspaltung von  $\text{CO}_2$  stattfindet oder durch Reaktion der freien Aminogruppen mit  $\text{CO}_2$ . Da Carbaminsäuren unter den verwendeten stark sauren Bedingungen nur bedingt stabil sind, sollten sie bei entsprechend langer Behandlung mit einer TFA-Lösung dennoch in das gewünschte, vollständig entschützte Oligomer überführbar sein. Diese These wurde durch spätere Synthesen von Allosehaltigen-Oligomeren in Lösung bestätigt (siehe Kapitel 8.2), bei denen das Verhalten der Nebenproduktpeaks mit zunehmender Reaktionszeit beobachtet wurde. Es konnte mithilfe von MALDI-Spektren gezeigt werden, dass sich die Nebenprodukte mit Molekülmassen von  $M+n\cdot 44$  bei längeren Reaktionszeiten (bis zu 48 Stunden) nach und nach abbauen ließen.

Die Synthese weiterer Oligomere an der festen Phase wurde an dieser Stelle eingestellt, da die Synthese nach der Fmoc-Strategie zwar möglich, aber nur unter hohem Verbrauch der aufwendig synthetisierten monomeren Zuckerdiaminosäuren durchführbar war.

Es sollte nachfolgend eine Synthesemöglichkeit von Oligomeren in Lösung mit wesentlich geringeren Überschüssen der Zuckerdiaminosäurebausteine entwickelt und gleichzeitig die problematische finale TFA-saure Entschützung der Allose-haltigen Oligomere näher untersucht werden.

## 8.2 Synthese von Zuckerdiaminosäureoligomeren in Lösung

### 8.2.1 Wahl und Verknüpfung einer geeigneten Gruppe zur Maskierung der freien Carbonsäure

Für die Synthese der Zuckerdiaminosäureoligomere in Lösung musste zunächst eine geeignete Gruppe zur Maskierung der freien Säure der monomeren Baueinheiten gewählt werden. Dabei wurden Ester oder Amide in Betracht gezogen, wobei den Amidgruppen aufgrund ihrer grösseren Stabilität bei der weiteren Planung der Vorzug gegeben wurde. Voulourmis et al. untersuchten den Einfluss unterschiedlicher Gruppen an 2,5-Didesoxystreptaminderivaten auf die Inhibition der Transkription in *E. coli* und *Staphylococcus aureus*.<sup>192</sup> Dabei zeigte sich im Fall der untersuchten amidischen Gruppen, dass durch die Erzeugung eines 2-Phenylethylamids die niedrigsten IC<sub>50</sub>- und MIC-Werte (*minimum inhibitory concentration*) erzielt werden konnten. Ausgehend von diesen Resultaten wurde entschieden 2-Phenylethylamin zur Maskierung der Säurefunktion zu verwenden. Dessen Eignung für die Kupplung an die freie Carboxylgruppe sollte zunächst an Allosebaustein **33** getestet werden. Zur Verknüpfung mit Baustein **33** wurde die geschützte Zuckerdiaminosäure mit HOAt (2 eq.) und HATU (1.5 eq.) vorgelegt und die Feststoffmischung anschließend mit 0.6 ml einer 0.16 molaren Lösung von 2-Phenylethylamin (entsprechend 1.5 eq. des Amins) in NMP/DMF 1:1 gelöst. Nach Zugabe von 4 eq. DIPEA wurde 4 h gerührt und die Reaktionsmischung nach 4 h per ESI-MS und DC untersucht. Da nach dieser Reaktionszeit weder mittels DC, noch mittels ESI-MS Reste des Edukts detektiert werden konnten, wurde die Reaktion durch Extraktion der Reaktionsmischung mit Chloroform und Wasser abgebrochen und das Produkt anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt. Das gewünschte Produkt konnte bei dieser Reaktion mit einer sehr guten Ausbeute von 92 % isoliert werden.

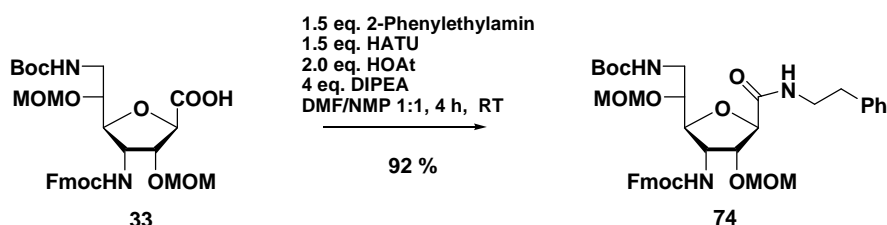


Abb. 8.17: Verknüpfung des 2-Phenylethylaminlinkers mit Verbindung **33**.

Die Reaktion wurde ebenfalls unter gleichen Bedingungen mit einem der Glucosebausteine von F. Sicherl getestet. Leider war zu diesem Zeitpunkt nur noch Material vorhanden, welches bereits 18 Monate gelagert wurde. Es zeigte sich, dass das Edukt **61** mit dem zuvor für Baustein **33** verwendeten Protokoll nicht zur Gänze umgesetzt werden konnte. Der Grund

hierfür war in den  $^1\text{H-NMR}$  und ESI-Spektren des Startmaterials zu erkennen. Neben Verbindung **62** mit zwei MOM-Schutzgruppen wurde in den ESI-Spektren eine Masse detektiert, die auf eine Verunreinigung mit nur einer MOM-Schutzgruppe hinwies. Auch das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum zeigte einen Signalsatz, der auf zumindest eine Verunreinigung durch einen Glucosebaustein mit nur einer MOM-Schutzgruppe hinwies. Gestützt wurden diese Beobachtungen auch durch spätere Oligomersynthesen bei denen nach Kupplung von Baustein **62** neben der Masse des gewünschten Produkts ebenfalls die Masse des Produkts abzüglich der Masse einer MOM-Schutzgruppe beobachtet wurde.

Da das Material vor seiner Benutzung längere Zeit bei Raumtemperatur lagerte ( $> 12$  Monate), könnte eine der MOM-Schutzgruppen durch Spuren an sauren Verunreinigungen im Laufe der Zeit partiell abgespalten worden sein. Die so entstehende freie OH-Gruppe senkt zum einen die Reaktivität des Zuckers unter den Bedingungen der Kupplungsreaktion und könnte zum anderen zu unerwünschten Nebenreaktionen geführt und so den vollständigen Umsatz des Startmaterials beeinträchtigt haben. Zum anderen könnten Abspaltprodukte der MOM-Gruppen zu Nebenreaktionen geführt haben. Anhand dieser Beobachtungen wäre es folglich ratsam die MOM-geschützten Zuckerdiaminosäuren bei möglichst tiefen Temperaturen einzulagern ( $< -20^\circ\text{C}$ ).

Die säulenchromatographische Aufreinigung von Verbindung **61** war schwierig, da die Verbindung aufgrund ihrer freien Carboxylgruppe ein ausgeprägtes Tailing zeigte und über sehr viele Fraktionen hinweg von der Säule eluiert werden musste. Eine Zugabe von Säure zur Verbesserung der Laufeigenschaften war nicht möglich, da dies erneut zu einer partiellen Abspaltung der MOM-Schutzgruppen geführt hätte. Aufgrund des starken Tailings konnte nur eine geringe Menge an sauberem Edukt durch Säulenchromatographie gewonnen werden ( $< 50$  mg). Mit diesem gereinigten Startmaterial ließ sich ein vollständiger Umsatz erreichen und das gewünschte Produkt mit einer Ausbeute von 94 % isolieren.

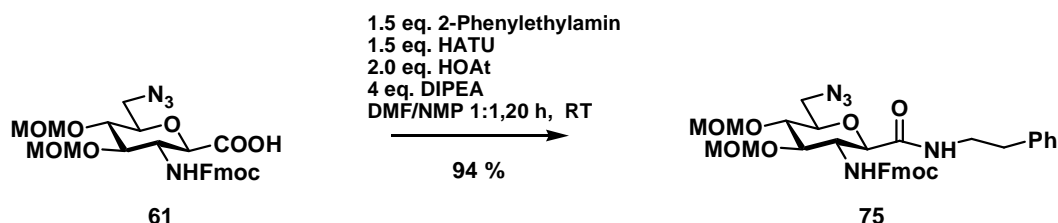


Abb. 8.18: Verknüpfung des 2-Phenylethylaminlinkers mit Verbindung **61**.

Die Ergebnisse der beiden ersten Kupplungsversuche zeigten, dass der 2-Phenylethylaminlinker mit der gewählten Strategie erfolgreich und mit sehr guten Ausbeuten mit den geschützten Zuckerdiaminosäurebausteinen verknüpft werden kann.

## 8.2.2 Synthese des ersten Zuckerdiaminosäure-Trimers in Lösung

### 8.2.2.1 Kupplung des Zuckerdiaminosäurebausteins 33 an Verbindung 74

Ein erster Versuch zur Kupplung weiterer Zuckerdiaminosäuren sollte mit Verbindung **74** und Zuckerdiaminosäure **33** erfolgen. Nachfolgend sollte durch weitere Kupplungsschritte mit derselben Zuckerdiaminosäure ein erstes Trimer in Lösung synthetisiert werden.

Um weitere Zuckerdiaminosäuren an den Linkerbaustein **74** zu koppeln, musste zunächst die Fmoc-Schutzgruppe mit einer geeigneten Base entfernt werden. Dies gelang unter Verwendung einer 20%igen Piperidinlösung in DMF bei Raumtemperatur.<sup>193</sup> Nach 60 Minuten wurde die Reaktion per DC und ESI-MS auf Vollständigkeit überprüft. Weder im DC, noch im ESI-Spektrum der Reaktionsmischung konnten Spuren des Edukts detektiert werden, woraufhin die Reaktionsmischung durch fünfmaliges Coevaporieren mit Toluol (40 °C, 60 mbar) und zweimaliges Coevaporieren mit Chloroform von Piperidin und DMF befreit wurde. Um den Arbeitsaufwand für Reinigungsschritte bei der Synthese zu minimieren wurde versucht das rohe freie Amin **75** nach dem Coevaporieren ohne weitere Aufreinigung mit Zuckerdiaminosäurebaustein **33** zu koppeln. Hierzu wurden 1.2 eq. des Zuckerdiaminosäurebausteins **33** mit einem Äquivalent des rohen Amins **75**, 2.4 Äquivalenten HOAt und 1.8 Äquivalenten HATU in DMF/NMP 1:1 gelöst, anschließend wurden 5.4 Äquivalente DIPEA zugegeben und über Nacht gerührt. Die nachfolgende säulenchromatographische Aufreinigung ergab das Dimer **76** mit einer sehr guten Ausbeute von 88 % über zwei Stufen.

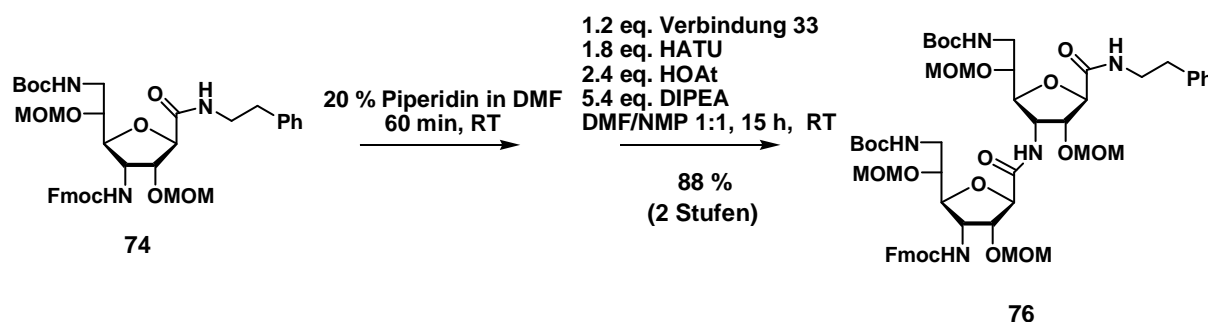


Abb. 8.19: Synthese des vollständig geschützten Dimers **76**.

Das <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Dimer **76** zeigte alle erwarteten Signale; eine vollständige Zuordnung aller Signale war jedoch aufgrund der breiten Signalsätze nicht möglich (siehe Abb. 8.20). Dieses Problem wird bei Verbindungen mit mehreren Carbamatschutzgruppen auch in der Literatur beschrieben.<sup>194</sup> Grund hierfür ist der partielle Doppelbindungscharakter der CO-NH-Bindung von Carbamatschutzgruppen, welcher zu breiten Signalsätzen führen kann, die eine vernünftige Auswertung der Spektren erschweren oder unmöglich machen. Als

zusätzliche Sicherung der Identität wurde in diesem Fall ein hochaufgelöstes ESI-Spektrum aufgenommen, das die erwartete Masse des Dimers zeigte.

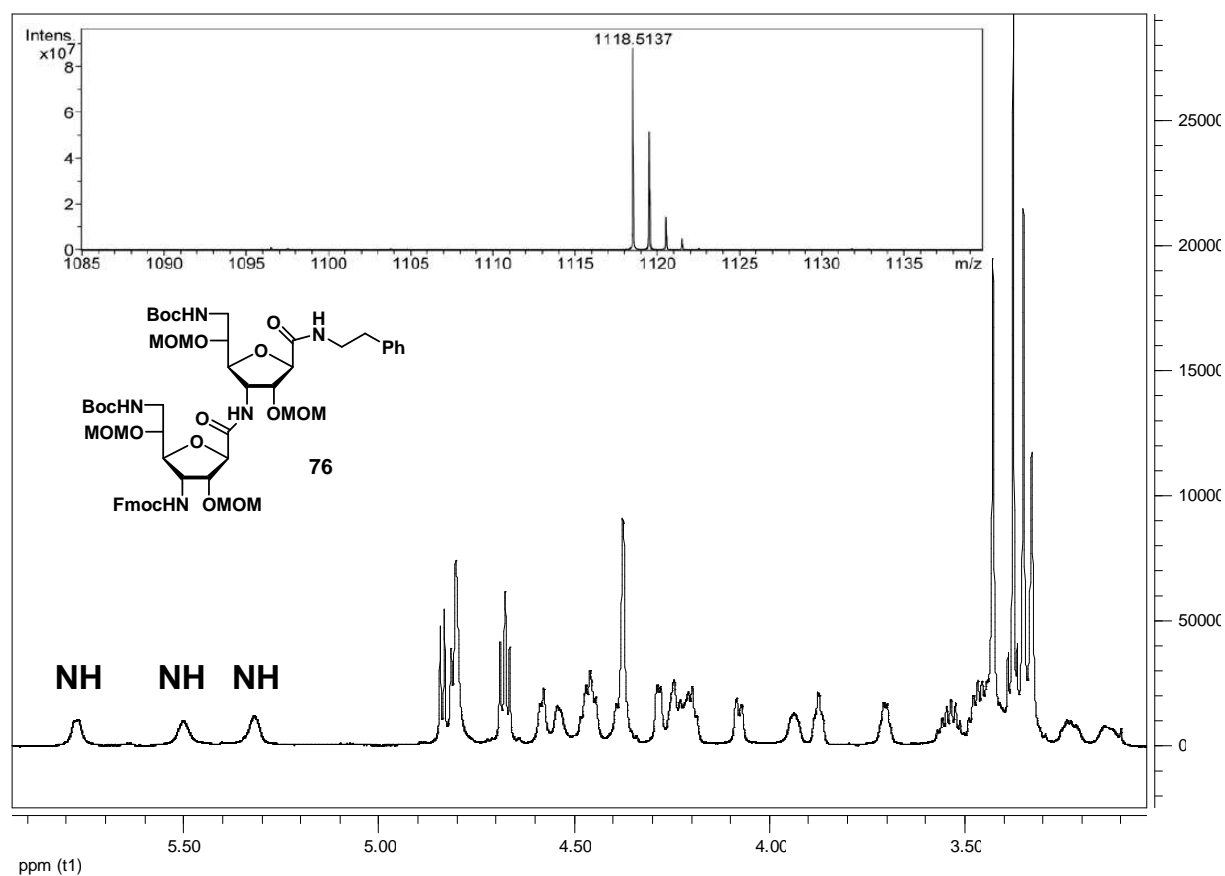


Abb. 8.20: Hochaufgelöstes ESI-Spektrum und Ausschnitt aus dem <sup>1</sup>H-NMR des geschützten Dimers **76**. Das Spektrum zeigt alle erwarteten Signale, die jedoch aufgrund ihrer Breite teilweise nicht eindeutig auswertbar sind. Die drei NH-Protonen der Carbamatschutzgruppen sind deutlich zu erkennen und wurden hervorgehoben.

Die nun folgende Kupplung des dritten Bausteins an das Dimer **76** zur Synthese des Trimers **77** wurde analog zur Synthese des Dimers durchgeführt. Das geschützte Trimer **77** konnte auf diesem Weg mit einer sehr guten Ausbeute von 89 % nach säulenchromatographischer Aufarbeitung isoliert werden. Die Identität des Trimers wurde abermals durch Aufnahme eines ESI-Spektrums gesichert.

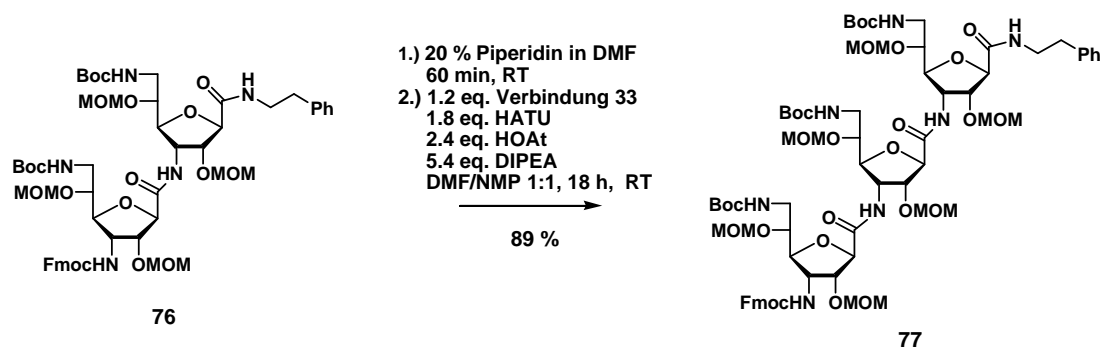


Abb. 8.21: Synthese des vollständig geschützten Trimers **77**.

Die Ergebnisse dieser ersten Kupplungsversuche in Lösung zeigten, dass die Zuckerdiaminosäurebausteine mit der gewählten Strategie erfolgreich und mit sehr guten Ausbeuten verknüpft werden konnten.

### 8.2.2.2 Versuche zur vollständigen Entschützung des Trimers **77** in Lösung

In der Doktorarbeit von F. Sicherl wurden einige Testsysteme für die saure Entschützung von Glucosezuckerdiaminosäureoligomeren in Lösung getestet. Dabei wurden die besten Ergebnisse mit 0.3 M methanolischer HCl-Lösung bei 50 °C erzielt. Die Ausbeuten der Entschützung lagen dabei zwischen 46 % und 91 %. Auf die Verwendung dieser Methode wurde bewusst verzichtet, da eine Vergleichbarkeit mit den Entschützungsreaktionen an der festen Phase gewünscht war. Daher wurde Trimer **77** im Anschluss an die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin, mit einer TFA/Wassermischung (Mischverhältnis 93:7) behandelt, um die säurelabilen MOM- und Boc-Schutzgruppen abzuspalten.

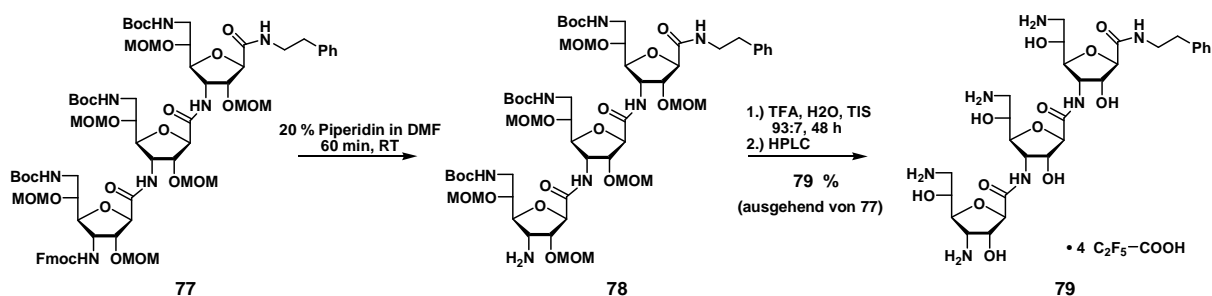


Abb. 8.22: Finale Entschützung des Trimers **77**.

Aus den zuvor durchgeführten Synthesen an der festen Phase war bekannt, dass eine Reihe von Nebenprodukten mit Massen von  $M+n \cdot 44$  Dalton bei der Abspaltung entstehen konnten, bei denen es sich wahrscheinlich um Carbaminsäurederivate der gewünschten vollständig entschützten Oligomere handelt. Diese können bei der Abspaltung der Boc-Schutzgruppen als Zwischenprodukt oder durch Reaktion der freien Amine mit  $\text{CO}_2$  entstehen. Da diese Carbaminsäurederivate in stark saurer Lösung wie in Kapitel 8.1.4 bereits erwähnt nur bedingt stabil sind, wurde die Reaktion über einen Zeitraum von 48 Stunden per ESI-MS verfolgt, um einen evtl. Abbau der Nebenprodukte verfolgen zu können.

Bei der Reaktion des freien Amins **78** mit der TFA/Wasser-Mischung, wurden nach 3, 6, 20, sowie nach 48 Stunden ESI-Spektren direkt aus der Reaktionslösung aufgenommen. Wie erwartet zeigten die ESI-Spektren nach 3 Stunden und nach 6 Stunden neben der gewünschten Produktmasse auch Produkte mit Massen von  $M+n \cdot 44$  Dalton (siehe Abb. 8.23). Nach 20 Stunden konnten praktisch keine Signale dieser Nebenprodukte mehr detektiert werden. Auf

diese Weise ließ sich, dass im Falle Alloose-haltiger Zuckerdiaminosäureoligomere ungewöhnlich lange Reaktionszeiten für die Entschützung unter TFA-sauren Bedingungen notwendig sind, und dass die unerwünschten Nebenprodukte mit Massen von  $M+n \cdot 44$  Dalton im Lauf der Reaktion sukzessive abgebaut werden; ein Hinweis darauf, dass es sich tatsächlich um die postulierten Carbaminsäurederivate handelt.

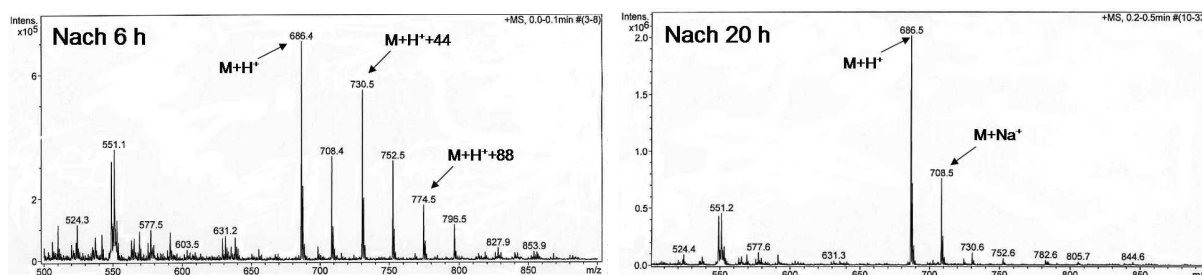


Abb. 8.23: ESI-Spektren der Entschützung von Oligomer **78** in TFA-saurer Lösung nach einer Reaktionszeit von 6 Stunden bzw. 20 Stunden.

Nach 48 Stunden wurde die TFA-Lösung im Stickstoffstrom ausgetrieben und der ölige Rückstand in 0.13 %iger wässriger PFPA aufgenommen und per HPLC gereinigt.

Die Entschützung des Trimers **77** gelang mit einer sehr guten Ausbeute von 79 %. Trimer **79** konnte demzufolge in sieben Reaktionsschritten mit einer hervorragenden Gesamtausbeute von 62 % ausgehend von Zuckeraminosäure **33** synthetisiert werden. Dies entspricht einer durchschnittlichen Ausbeute von über 93 % für jeden einzelnen Reaktionsschritt. Die Struktur von Verbindung **79** wurde nachfolgend durch die Aufnahme unterschiedlicher NMR-Spektren und durch ein hochaufgelöstes Massenspektrum gesichert. Eine ausführliche Beschreibung der Strukturaufklärung dieses Trimers findet sich in Kapitel 9.

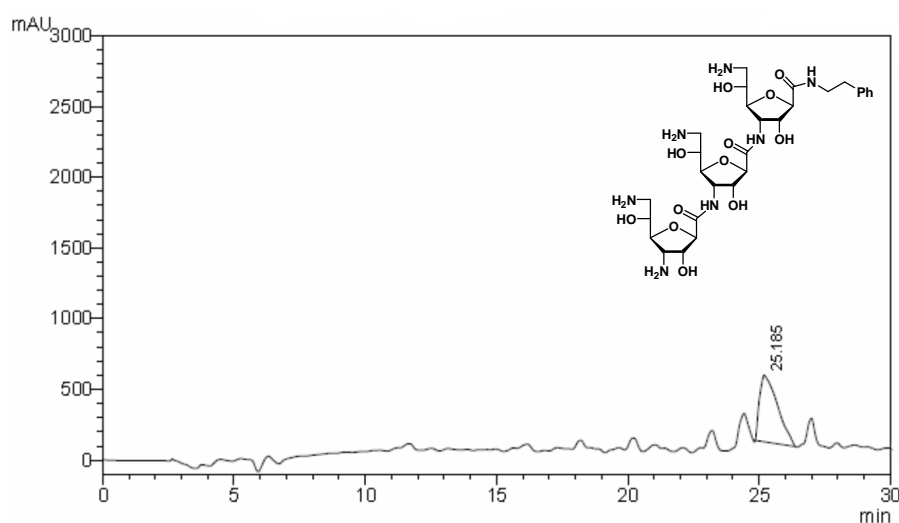


Abb. 8.24: HPLC-Chromatogramm des Trimers **79**. Das Trimer wurde bei 25.2 min detektiert. Säule: Knauer C-18 Eurosphere (16 mm x 250 mm); Laufmittelmischung: Acetonitril/0.13 % PFPA; Gradient: Acetonitril 1-50% in 30 Minuten; Detektionswellenlänge: 220 nm; Fluss: 9.7 ml/min.

### 8.2.3 Synthese weiterer Zuckerdiaminosäureoligomere in Lösung

Ausgehend vom geschützten Trimer **77** sollten nun unterschiedliche Tetramere unter Verwendung der gleichen Kupplungs- und Entschützungsstrategien synthetisiert werden, welche zur Synthese des Trimers **79** erfolgreich angewandt worden waren.

Zunächst sollte ein weiterer Allosebaustein an das Trimer gekuppelt werden. Die Reaktion war im Gegensatz zu den Synthesen des korrespondierenden Di-, bzw. Trimers nach 18 h nicht vollständig. Es wurden ESI-Spektren aus der Reaktionslösung aufgenommen, in denen geringe Mengen des Edukts detektiert werden konnten. Das die Kupplung des vierten Bausteins etwas schlechter funktionierte, als die vorherigen Kupplungen kann ein Hinweis auf die Bildung einer bevorzugten räumlichen Anordnung des Trimers sein, durch welche die freie Aminogruppe schlechter erreichbar und die Kupplung somit erschwert wird. Die Ausbildung von solchen bevorzugten Anordnungen wurde für Zuckerdiaminosäuren auch in der Literatur beschrieben.<sup>17,120</sup>

Trotz der unvollständigen Kupplung konnte nach anschließender Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und der säurelabilen Schutzgruppen das Tetramer mit einer guten Ausbeute von 42 % ausgehend von **77** isoliert werden.

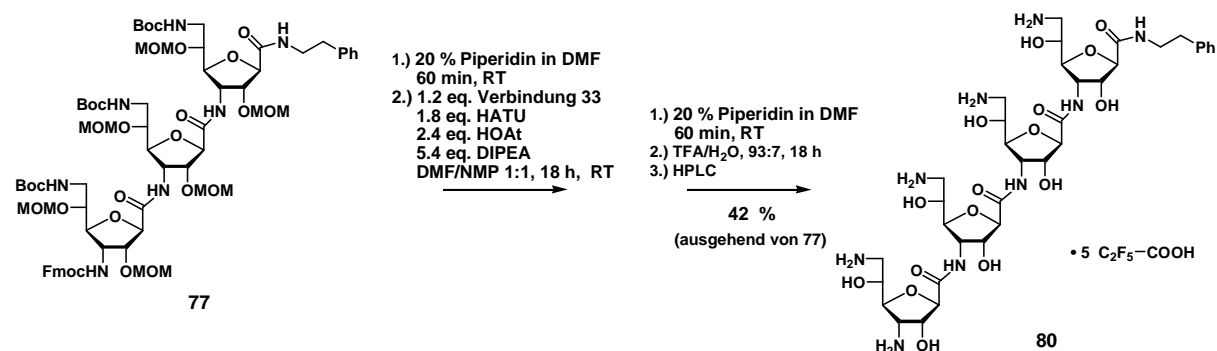


Abb. 8.25: Synthese des vollständig entschützten Tetramers **80** aus Trimer **77**.

Die Gesamtausbeute des Tetramers **80** betrug 34 % ausgehend von Zuckerdiaminosäure **33**. Dies entspricht einer sehr guten durchschnittlichen Ausbeute von 88 % für jeden einzelnen Reaktionsschritt.

Abbildung 8.26 zeigt das HPLC-Chromatogramm, sowie das ESI-Spektrum von Verbindung **80** nach der finalen Entschätzung. Der Produktpeak wird im Vergleich zu den an der festen Phase synthetisierten Oligomeren bei einer relativen Retentionszeit von etwa 1.4 detektiert. Diese Verschiebung war aufgrund der, durch die Verwendung des 2-Phenylethylaminlinkers etwas verminderten Polarität der in Lösung synthetisierten Oligomere, zu erwarten und wurde auch bei allen weiteren in Lösung synthetisierten Oligomeren beobachtet.

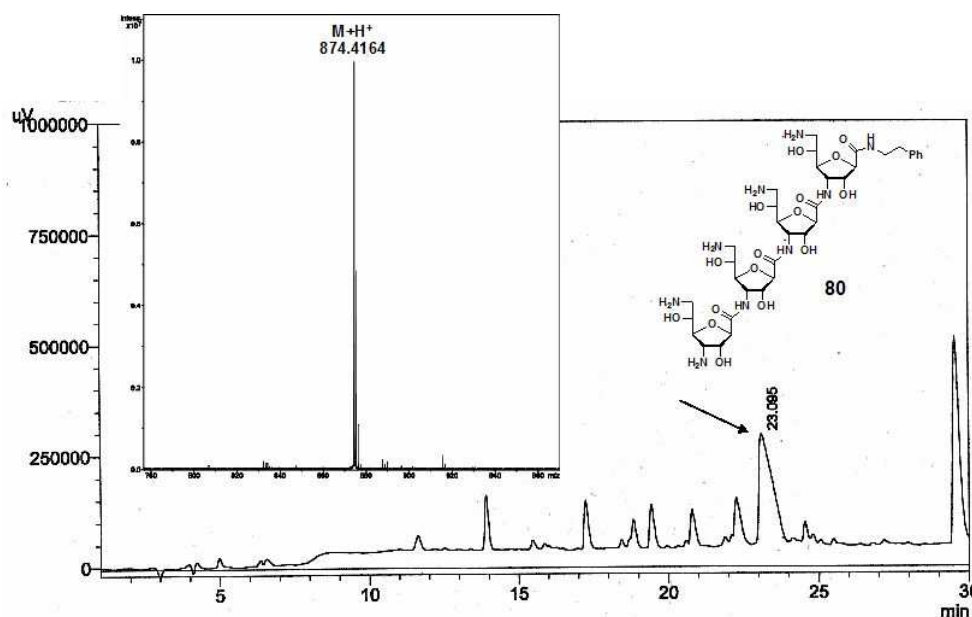


Abb. 8.26: HPLC-Chromatogramm des Tetramers **80** und das hochaufgelöste ESI-Spektrum des Hauptpeaks bei einer Retentionszeit von 23.1 min. Säule: Vydac Proteine&Peptide (4 mm x 250 mm); Laufmittelgemisch: Acetonitril/0.13 % PFPA; Gradient: Acetonitril 5-40% in 30 Minuten; Detektionswellenlänge: 220 nm; Fluss: 1.0 ml/min.

Im nächsten Experiment sollte ein Glucosezuckerdiaminosäurebaustein als vierter Baustein an das Trimer **77** gekuppelt werden. Aufgrund der unvollständigen Kupplung bei der Synthese von Tetramer **80** wurden für diese Kupplung 1.5 eq. der monomeren Zuckerdiaminosäure anstatt der sonst verwendeten 1.2 eq. eingesetzt. Die Reaktionszeit wurde von 18 Stunden auf 72 Stunden erhöht. In diesem Fall konnte in den ESI-Spektren kein Edukt mehr detektiert werden, es ließ sich jedoch eine partielle Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe unter diesen Bedingungen erkennen. Da im nächsten Schritt die Fmoc-Gruppe ohnehin entfernt werden sollte, war diese Nebenreaktion nicht relevant. Es konnten auch keine Hinweise in den ESI-Spektren gefunden werden, dass durch die partielle Entschützung ein Pentamer gebildet worden wäre. Die Synthese des Tetramers **81** gelang nach der finalen Entschützung der säurelabilen Schutzgruppen und HPLC-Reinigung mit einer Ausbeute von 38 % ausgehend von Trimer **77**.

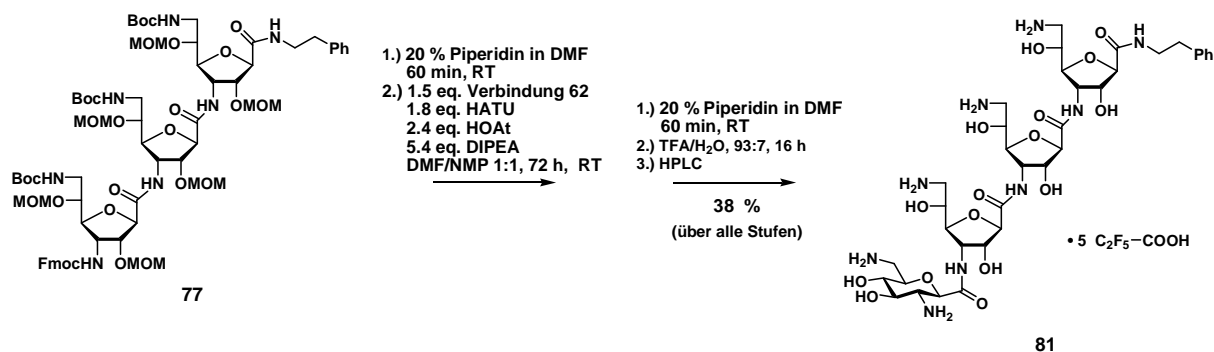


Abb. 8.27: Synthese des vollständig entschützten Tetramers **81** aus Trimer **77**.

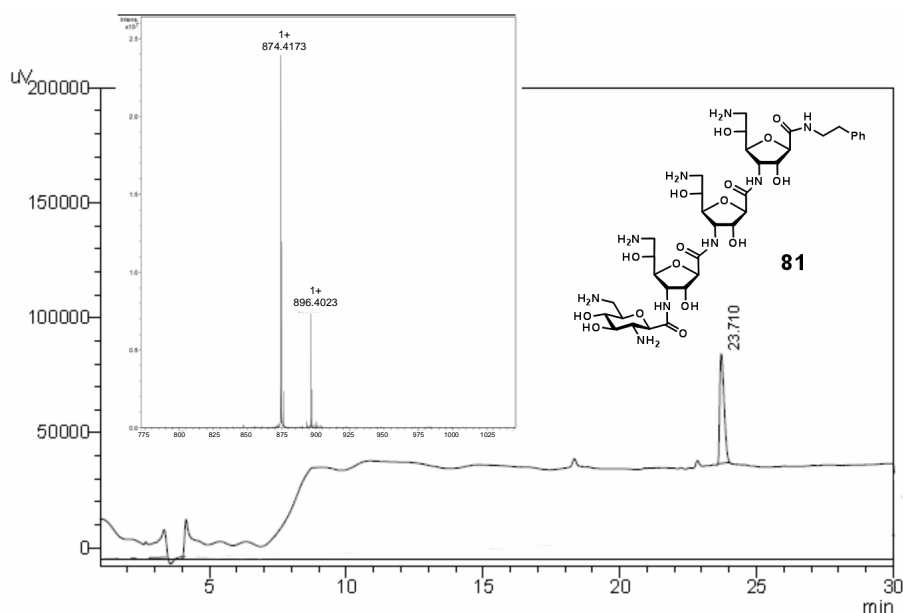


Abb. 8.28: HPLC-Chromatogramm des bereits per HPLC gereinigten Tetramers **81** und das hochaufgelöste ESI-Spektrum des Produktpeaks bei einer Retentionszeit von 23.7 min. Säule: Vydac Proteine&Peptide (4 mm x 250 mm); Laufmittelgemisch: Acetonitril/0.13 % PFPA; Gradient: Acetonitril 5-40% in 30 Minuten; Detektionswellenlänge: 220 nm; Fluss: 1.0 ml/min.

Tetramer **81** zeigte im Gegensatz zu Trimer **79** bei den RNA-Bindungstests einen sehr niedrigen  $IC_{50}$ -Wert von 11  $\mu$ M (siehe hierzu Diskussion der Ergebnisse der RNA-Bindungsstudien in Kapitel 10). Daher musste die Kupplung des Glucosebauteins einen wesentlichen Anteil an den verbesserten Bindungseigenschaften haben. Um den Einfluss der freien Aminogruppen von Zuckerdiaminosäureoligomeren auf die Bindung an RNA näher zu untersuchen, bot es sich daher an eine der Aminogruppen des Glucoserests durch eine Azidgruppe zu ersetzen. Dieser Austausch hätte theoretisch eine deutliche Verminderung des  $IC_{50}$ -Werts zur Folge haben müssen (siehe hierzu ebenfalls Diskussion in Kapitel 10).

Um den gewünschten Austausch der Aminogruppe gegen ein Azid zu verwirklichen, wurde Glucosebaustein **61** an Trimer **77** gekuppelt. Nach Kupplung, vollständiger Entschützung und Aufreinigung per HPLC wurde Tetramer **82** mit einer Ausbeute von 28 % ausgehend von Trimer **77** erhalten.

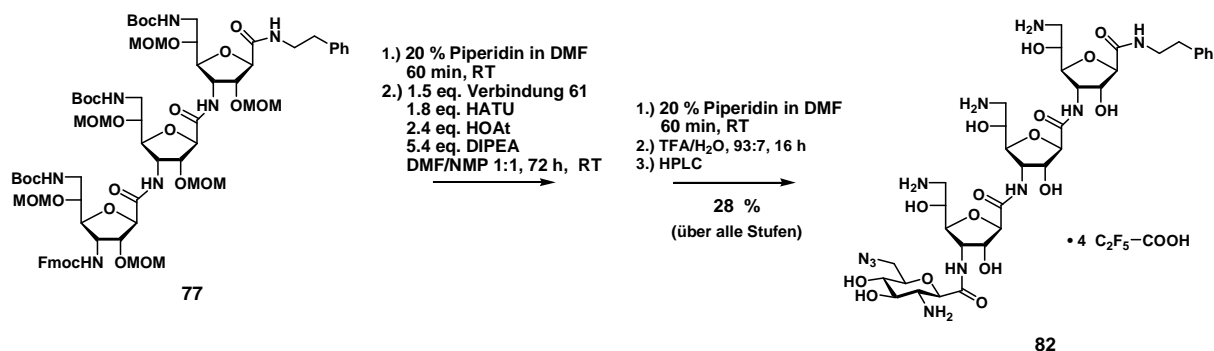


Abb. 8.29: Synthese des vollständig entschützten Tetramers **82** aus Trimer **77**.

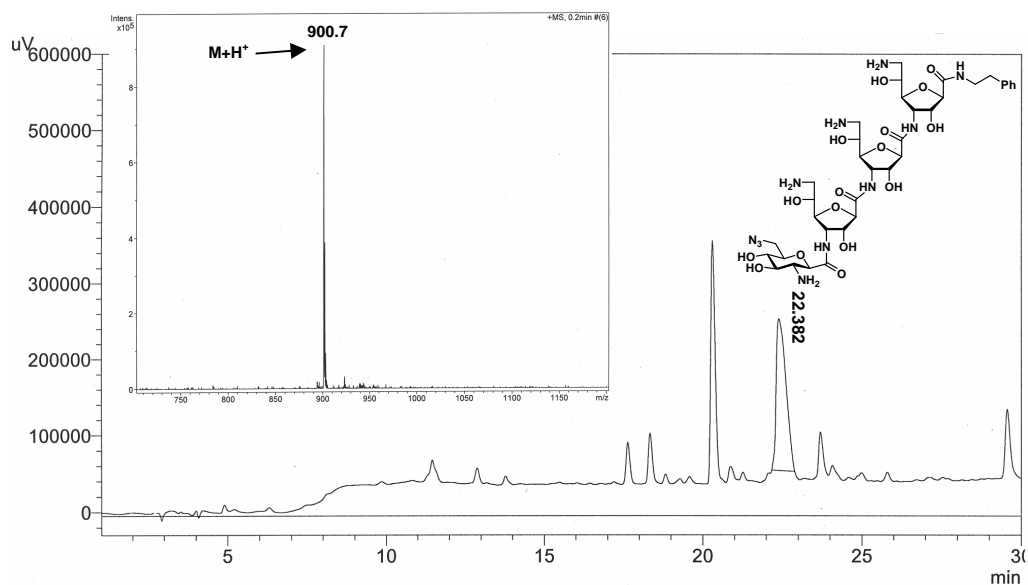


Abb. 8.30: HPLC-Chromatogramm des Tetramers **82** und das ESI-MS-Spektrum des Hauptpeaks bei einer Retentionszeit von 22.4 min. Säule: Vydac Proteine&Peptide (4 mm x 250 mm); Laufmittelgemisch: Acetonitril/0.13 % PFFA; Gradient: Acetonitril 5-40% in 30 Minuten; Detektionswellenlänge: 220 nm; Fluss: 1ml/min.

Nachdem die Oligomersynthesen mit Allose-haltigen Zuckerdiaminosäurebausteinen in Lösung mit guten bis sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden konnten, sollte beim letzten zu synthetisierenden Oligomer noch einmal die Glucoseleitstruktur aus der Doktorarbeit von F. Sicherl als Leitmotiv herangezogen werden. Diese wurde bei den vorherigen Versuchen nur an der festen Phase synthetisiert. Dazu sollte Glucosebaustein **61** dreimal an den Alloosebaustein **74** gekuppelt werden. Das so entstehende Tetramer sollte nach Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen hydriert werden, um die Azidgruppen in Aminogruppen zu überführen. Dieser Reaktionsweg stellte einen Versuch dar, Glucosebaustein **62** bei der Synthese geradkettiger Oligomereinheiten durch den leichter zu synthetisierenden Glucosebaustein **61** zu ersetzen.

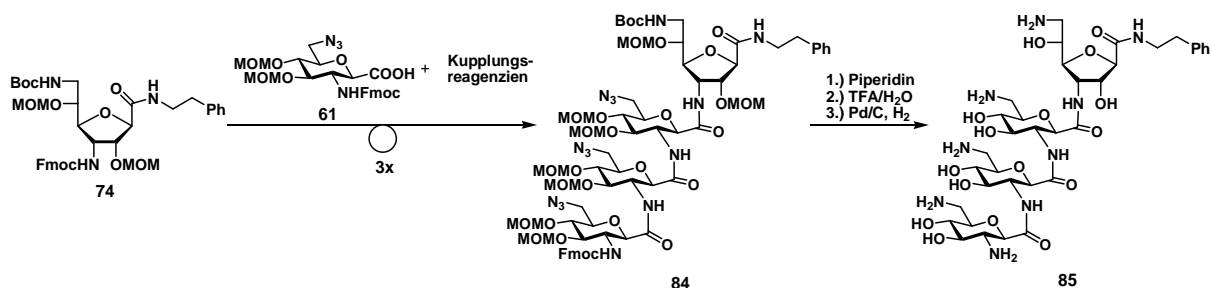


Abb. 8.31: Geplanter Syntheseweg zur Synthese des Oligomers **85**.

Die erste Kupplung von Baustein **61** an **74** war unter Verwendung von 1.5 eq. **61** nach einer Reaktionszeit von 12 h beinahe vollständig. Bei der zweiten und der dritten Kupplung konnte

jedoch auch nach mehr als 24 Stunden unter ansonst gleich bleibenden Bedingungen noch sehr viel Edukt bei der Reaktionskontrolle mittels ESI-MS detektiert werden. Wie bereits in Kapitel 8.2.1 erwähnt, stand Verbindung **61** nur in verunreinigter Form zur Verfügung. Die Auswertung von ESI- und NMR-Spektren der Verbindung wies daraufhin, dass neben der doppelt MOM-geschützten Verbindung **61** zumindest ein Nebenprodukt mit nur einer MOM-Schutzgruppe vorhanden war. Dieser Sachverhalt wurde während der Synthese des Tetramers auch bei der Auswertung von ESI-Spektren der Zwischenstufen deutlich. Gezeigt ist dies am Beispiel des ESI-Spektrums von Trimer **83**. Das Spektrum zeigte neben dem gewünschten Produktpeak auch Peaks mit Massen von M-44 und M-88.

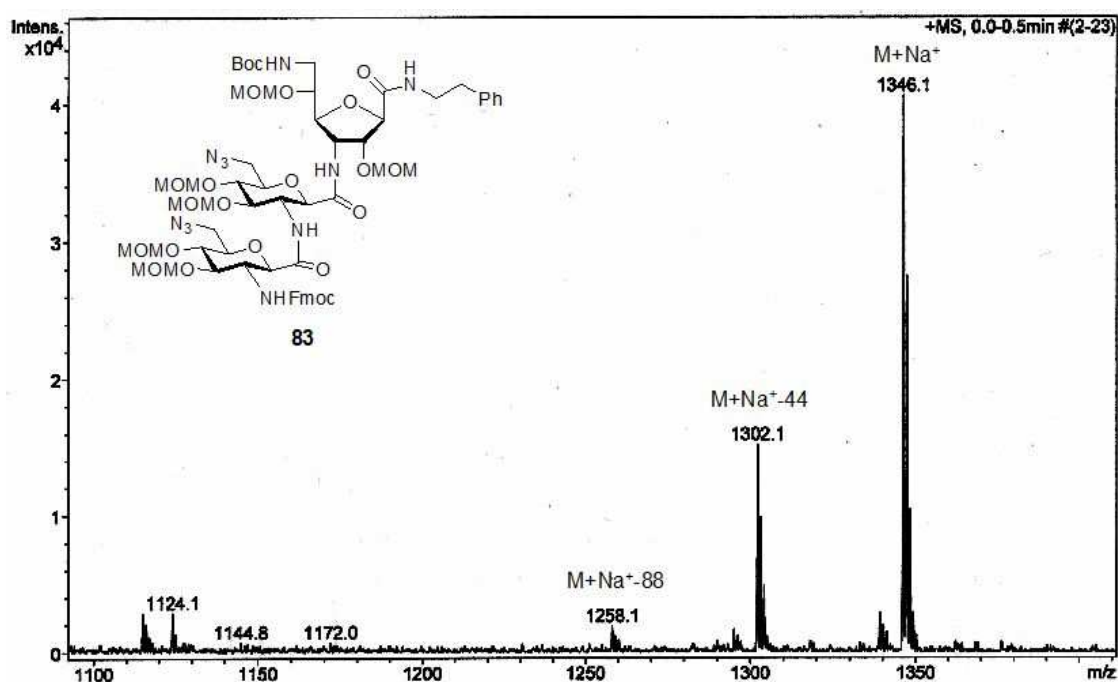
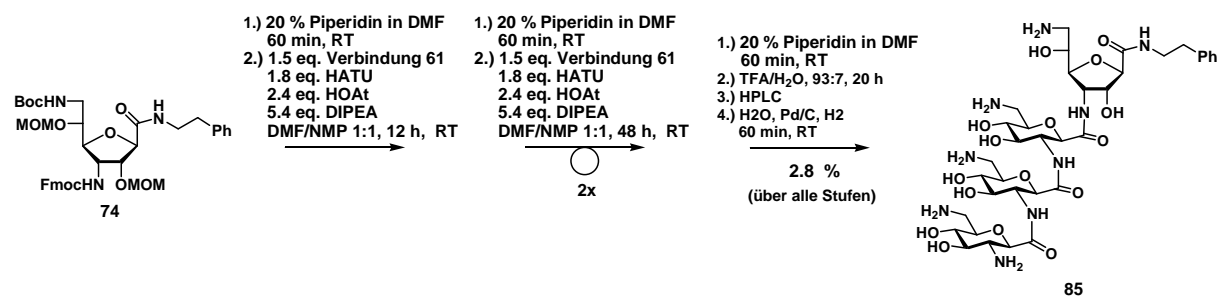


Abb. 8.32: ESI-MS-Spektrum des Oligomers **83** nach säulenchromatographischer Aufreinigung. Deutlich zu erkennen sind die Massen zweier Nebenprodukte mit Massen von M-44 und M-88.

Dass die Kupplungen in diesem Fall nicht vollständig waren, kann zum einen durch eine verminderte Reaktivität der nur mit einer MOM-Schutzgruppe geschützten Verunreinigungen in Glucosebaustein **61** erklärt werden, da die MOM-Schutzgruppen die Reaktivität der Zuckerdiaminosäurebausteine unter den Bedingungen der Kupplungsreaktionen erhöhen. Zum anderen können hier auch sterische Effekte eine Rolle spielen, da die für die Kupplung essentielle freie Aminogruppe mit zunehmender Kettenlänge der Oligomere durch Ausbildung bevorzugter räumlicher Anordnungen gegebenenfalls schlechter erreichbar ist. Eine verminderte Effizienz der Kupplungsreaktion bei zunehmender Kettenlänge wurde während dieser Arbeit auch bei der Synthese anderer Tetramere in Lösung beobachtet.


 Abb. 8.33: Synthèse des vollständig entschützten Tetramers **85** aus **74**.

Nach Beendigung der Kupplungen wurde das vollständig geschützte Tetramer **84** (siehe Abbildung 8.31) säulenchromatographisch gereinigt und im Anschluss zunächst mit Piperidin und anschließend zur Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen mit einer TFA/H<sub>2</sub>O-Mischung (Mischverhältnis 93:7) behandelt. Der nach Austreiben der TFA im Stickstoffstrom verbliebene Rückstand wurde per HPLC aufgereinigt, wobei Tetramer **85** Oligomer mit einer Gesamtausbeute von lediglich 2.8 % isoliert werden konnte (siehe Abbildung 8.3). Die Ausbeute war in diesem Fall deutlich niedriger als die Ausbeuten der übrigen in Lösung synthetisierten Oligomere. Dies ist höchstwahrscheinlich auf den in verunreinigter Form verwendeten Glucosezuckerdiaminosäurebaustein **61** zurückzuführen, mit dem lediglich der erste Kupplungsschritt praktisch vollständig gelang.

Um die Azide im letzten Reaktionsschritt in Aminogruppen zu überführen, wurde das nach der Behandlung mit TFA erhaltene Intermediat mit 10 % Palladium auf Aktivkohle versetzt und 60 Minuten unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Hydrierung gelang mit einer Ausbeute von 90 %. Es konnte somit gezeigt werden, dass bei der Synthèse geradkettiger Oligomereinheiten anstelle des Glucosebausteins **62** auch der mit weniger Aufwand synthetisierbare azidhaltige Glucosebaustein **61** verwendet werden kann. Die im Vergleich zu den übrigen Oligomersynthesen in Lösung mäßigen Ausbeuten sind in diesem Fall höchstwahrscheinlich nicht auf die Synthèsestrategie, sondern auf die Verwendung von unreinem Edukt zurückzuführen.

Die gezeigte Strategie sollte ebenfalls auf die Synthèse geradkettiger Oligomereinheiten aus Zuckerdiaminosäuren anderer Kohlenhydrate übertragbar sein.

## 9 Strukturaufklärung der Oligomere durch NMR-Spektroskopie

Die Zuordnung von  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Signalen in den Zuckerdiaminosäureoligomeren ist schwierig, da aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der sich wiederholenden Zuckereinheiten die Anregungsfrequenzen vieler Atome eine ähnliche oder identische chemische Verschiebung zeigen. Dies führt zu Signalüberlagerungen und mitunter zu sehr komplexen Spektren. Trotzdem ist eine Strukturaufklärung mithilfe homo- und heteronuklearer, zweidimensionaler Techniken (HSQC, NOESY, ROESY, TOCSY und  $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY) möglich.

Die in dieser Arbeit synthetisierten, HPLC-gereinigten Oligomere wurden zur Charakterisierung per NMR in  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst. Auf eine exakte Einstellung des pH-Werts wurde verzichtet, da der pH-Wert bei allen Oligomeren nach Lösen in  $\text{D}_2\text{O}$  auch ohne Verwendung eines Puffers in einem sehr engen Bereich zwischen 1.3 und 1.7 lag. Alle  $^1\text{H}$ -Spektren wurden auf das undeuterierte Lösemittel Signal bei 4.79 ppm referenziert. Durch eine Aufnahme der Spektren in  $\text{H}_2\text{O}$  wären zusätzliche Informationen über die leicht austauschbaren amidischen NH-Protonen verfügbar gewesen. Da aber ohnehin sehr komplexe Spektren zu erwarten waren, wurde zur Verinfachung der Interpretation der Spektren bewusst auf eine Aufnahme in  $\text{H}_2\text{O}$  verzichtet. Die Zuordnung aller Signale soll nachfolgend exemplarisch am Beispiel des Trimers **79** gezeigt werden.

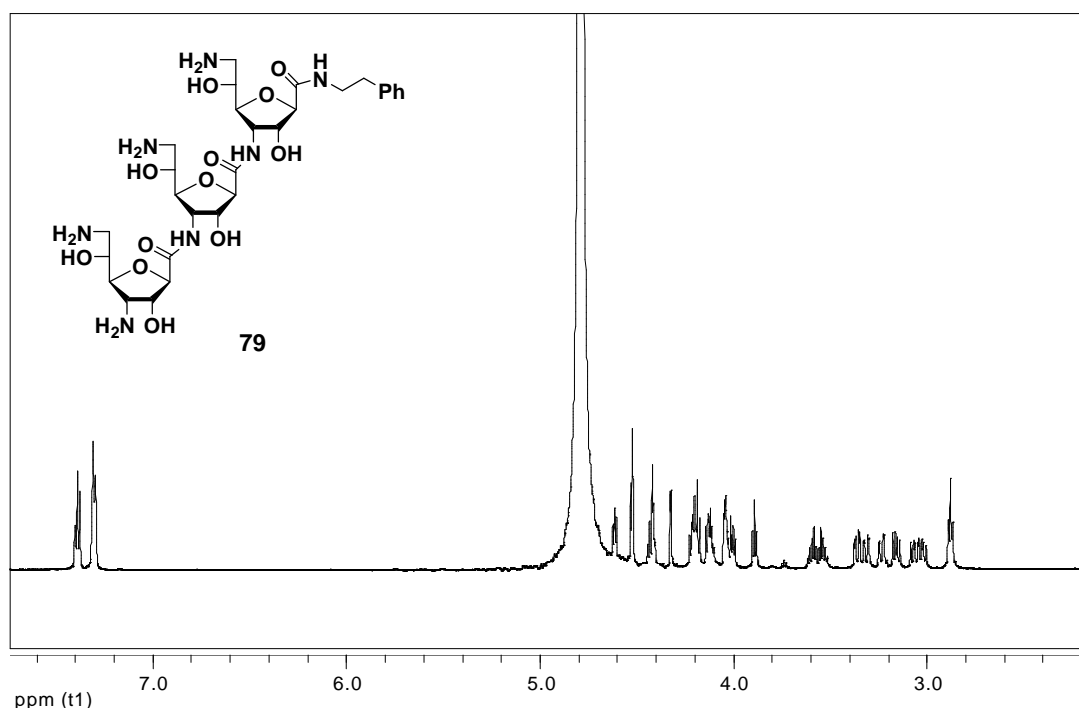


Abb. 9.1:  $^1\text{H}$ -Spektrum des Trimers **79**. pH-Wert 1.3; 600 MHz in  $\text{D}_2\text{O}$ .

$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektrum von Oligomer **79** zeigen jeweils nur einen Signalsatz. Während jedoch die Signale des  $^{13}\text{C}$ -Spektrums gut aufgelöst sind, liegen im Fall des  $^1\text{H}$ -Spektrums wie erwartet überlagerte Signalsätze vor, die sich nicht ohne die Hilfe zweidimensionaler Techniken vollständig auswerten lassen. Gut zu sehen sind die aromatischen Signale der  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ -Gruppe in einem Bereich von 7.29 – 7.40 ppm. Die übrigen Signale sind mithilfe des eindimensionalen Spektrums nicht eindeutig zuzuordnen.

Das in Abbildung 9.2 gezeigte  $^{13}\text{C}$ -Spektrum zeigt Pentafluorpropionsäuresignale, da das Oligomer durch die HPLC-Aufreinigung als Pentafluorpropionat vorlag. Das Carbonylsignal der Pentafluorpropionsäure bei 163.40 ppm wurde als interne Referenz zur Referenzierung der  $^{13}\text{C}$ -Spektrn herangezogen, da durch die Verwendung von reinem  $\text{D}_2\text{O}$  kein geeignetes Lösemittelsignal zur Referenzierung zur Verfügung stand. Neben dem Carbonylsignal waren weitere Multipletts der Pentafluorpropionsäure im Bereich zwischen 100 und 120 ppm zu erkennen. Die Multipletts entstehen im Fall der Pentafluorpropionsäure durch Kopplungen der Fluoratome mit den Kohlenstoffatomen.

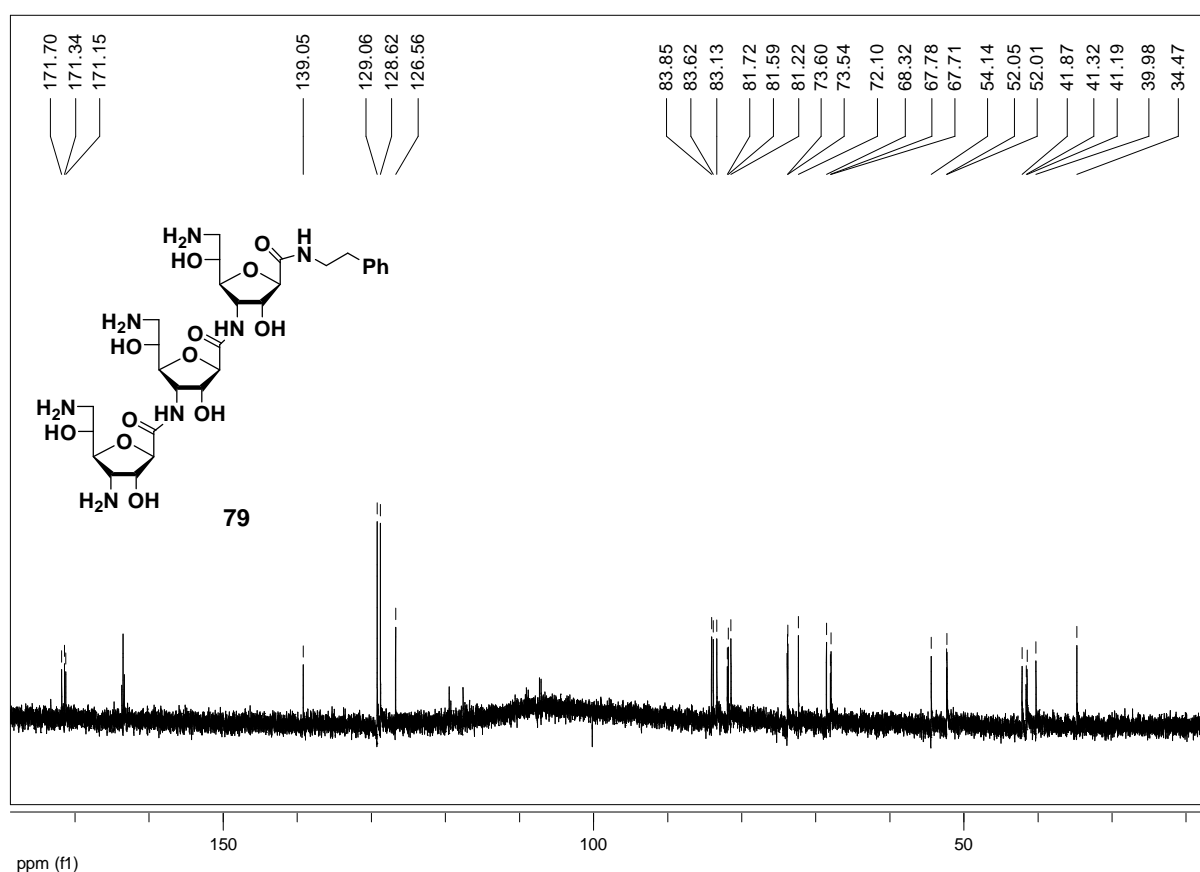


Abb. 9.2:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum des Trimers **79**. pH-Wert 1.3; 150 MHz in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Sehr gut sind im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum die drei Carbonylsignale der Amidbindungen im Bereich zwischen 171 und 172 ppm, sowie die vier erwarteten Aromatensignale bei 126.6, 128.6,

129.1 und 139.0 ppm zu erkennen. Eine eindeutige Zuordnung der Signale der Zuckerringe ist hier ohne die Zuhilfenahme zweidimensionaler Aufnahmetechniken jedoch nicht möglich. Die exakte Zuordnung der Signale von Trimer **79** mithilfe zweidimensionaler Spektren (COSY, TOCSY und HSQC) wird nachfolgend beschrieben.

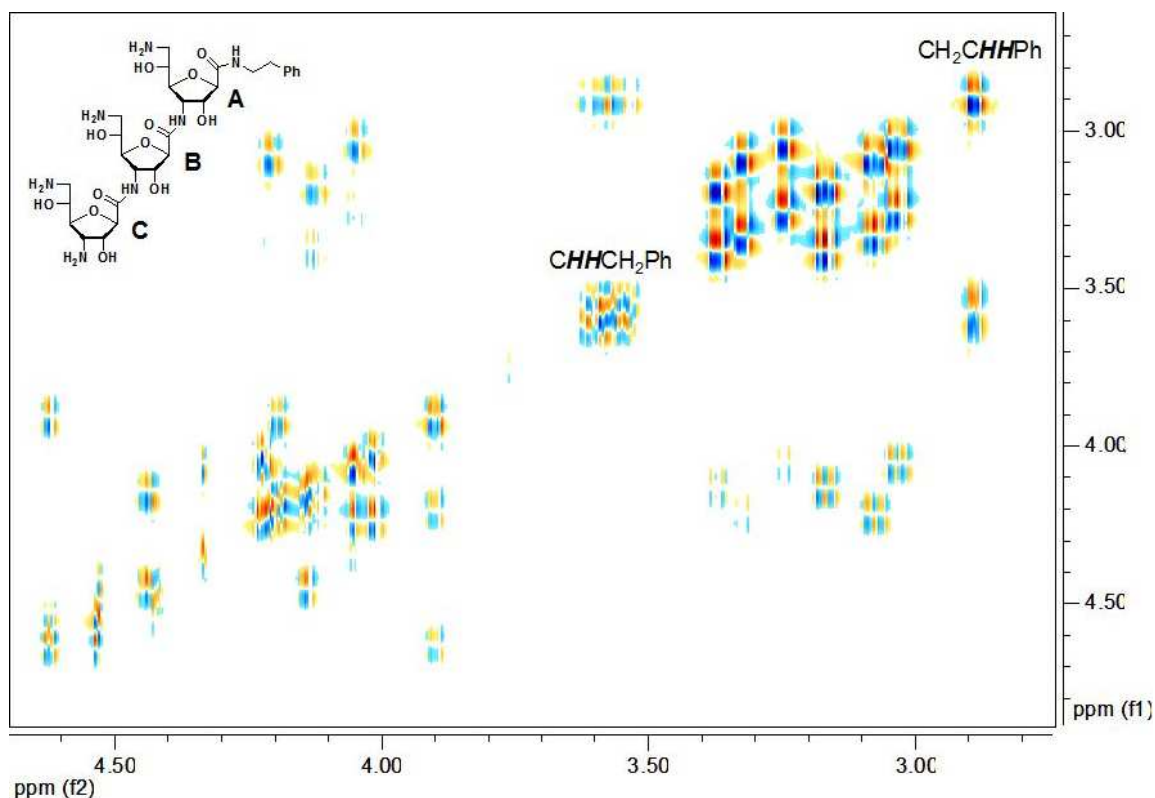


Abb. 9.3:  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY Spektrum des Trimers **79**. pH-Wert 1.3; 150 MHz in  $\text{D}_2\text{O}$ .

$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektren zeigen - wie in Abbildung 9.3 zu sehen - auf ihrer Hauptdiagonale die Signale von Wasserstoffatomen wie sie auch im eindimensionalen  $^1\text{H}$ -Spektrum abgebildet werden. Zusätzlich sind Kreuzrelationen zwischen H-Atomen im Abstand bis zu drei Bindungen sichtbar. Anhand der Kreuzsignale lassen sich daher Wasserstoffatome zuordnen, die an ein benachbartes Kohlenstoffatom gebunden sind. Durch die Aufnahme von COSY-Spektren lassen sich bei den Zuckerdiaminosäureoligomeren theoretisch Sätze von Wasserstoffatomen zuordnen, die sich am gleichen Zuckerring befinden. Allerdings kann durch das COSY-Spektrum keine Aussage darüber getroffen werden, an welcher der Zuckereinheiten die betreffenden Wasserstoffatome lokalisiert sind. Dazu wäre beispielsweise die Messung eines HMBC-Spektrums in Wasser notwendig, in welchem Kopplungen über die amidischen NH-Gruppen hinweg zum jeweils benachbarten Zuckerring hätten beobachtet werden können. Das in Abbildung 9.3 abgebildete COSY-Spektrum zeigt gut erkennbar das  $\text{CH}_2\text{CH}_2$  Spinsystem der Ankergruppe an Ring A. Jedoch waren im Fall von Verbindung **79**

allein mit Hilfe des COSY-Spektrums nur sehr wenige eindeutige Zuordnungen von Protonen möglich, da sich zu viele Signale in sehr engen Bereichen überlagerten.

Aus diesem Grund wurde zusätzlich ein TOCSY-Spektrum aufgenommen, um mehr Informationen über die Spinsysteme innerhalb des Trimers zu erhalten. Durch das TOCSY-Experiment werden wie bei einem COSY-Experiment Spektren erzeugt, die symmetrisch bezüglich ihrer Hauptdiagonalen sind. Das TOCSY-Experiment ist vor allem bei der Strukturaufklärung hochmolekularer Substanzen mit räumlich begrenzten Spinsystemen, wie etwa Polysacchariden oder Peptiden nützlich, da es zusätzlich zu den im COSY detektierten Signalen auch Korrelationen zwischen einem „Startkern“ und sämtlichen indirekt über mehrere Kopplungen mit ihm verbundenen Kernen (Spinsystem) zeigt. Auf diese Weise kann eine eindeutige Aussage getroffen werden, welche Protonen am gleichen Zuckerring lokalisiert sind.

Die Zuordnung eines kompletten Spinsystems wird anhand des in Abbildung 9.4 dargestellten TOCSY-Spektrums gezeigt. Als Startkern für die Betrachtung wurde ein Proton mit einer Verschiebung von 3.89 ppm herangezogen, das im  $^1\text{H}$ -Spektrum ein gut separiertes Triplett zeigte und sich daher gut als Ausgangspunkt eignete.

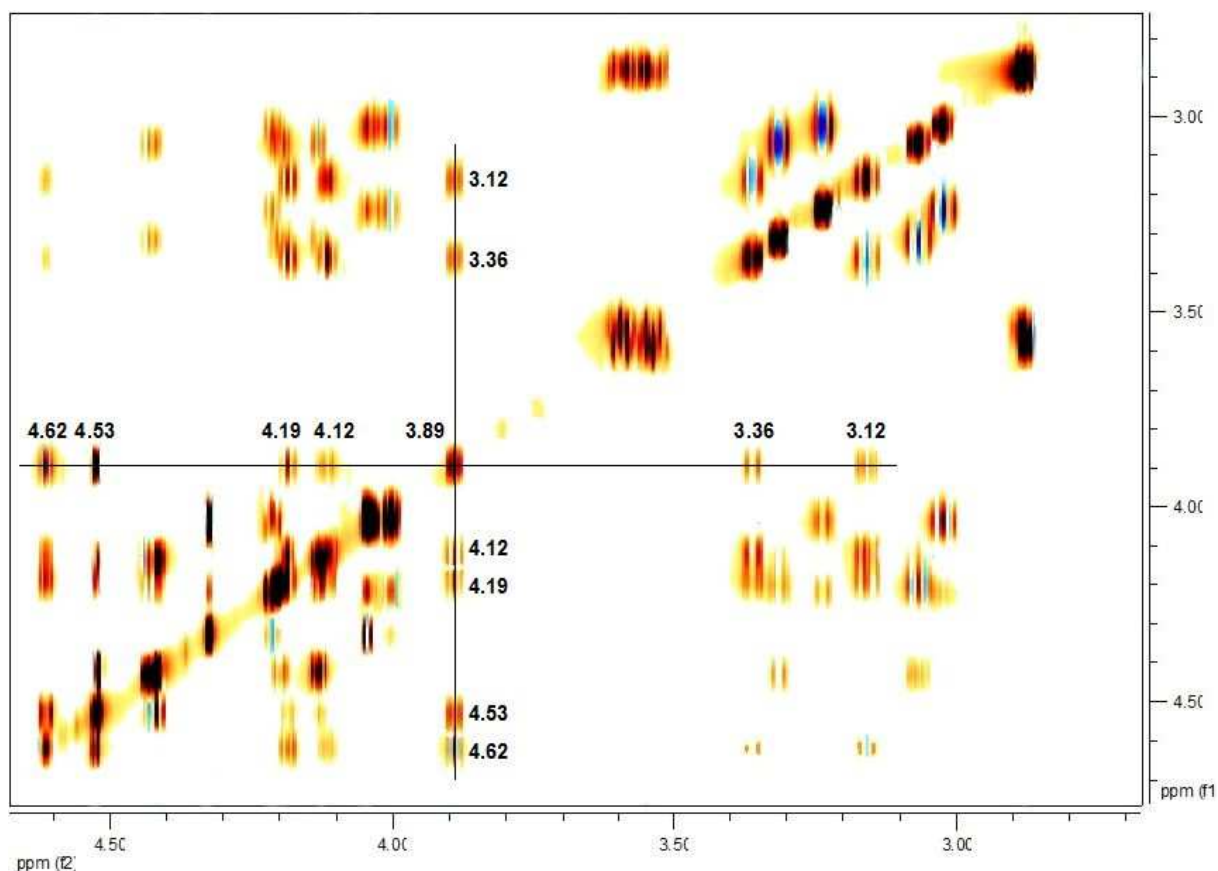


Abb. 9.4: TOCSY-Spektrum des Trimers **79**. pH-Wert 1.3 in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Mithilfe des TOCSY Spektrums konnten wie erwartet drei zusammengehörige Spinsysteme für die Furanoseringe identifiziert werden. Durch die Information welche Signale zu Protonen am gleichen Allosering gehören, konnten nun im COSY-Spektrum die Protonen ihren Positionen zugeordnet werden. Dies wird nachfolgend an dem bereits in Abbildung 9.3 gezeigten COSY-Spektrum verdeutlicht. Zur besseren Übersicht wurden auch hier lediglich die Signale eines Rings in der Abbildung zugeordnet. Als Startpunkt für die Zuordnung diente das Proton H-1, das leicht zu identifizieren ist, da es als einziges Proton nur einen Kopplungspartner hat und somit auch nur ein Kreuzsignal zeigt. Ausgehend von H-1 konnten die chemischen Verschiebungen der Protonen H-2, H-3 und H-4 leicht über die zugehörigen Kreuzrelationen identifiziert werden. Die chemische Verschiebungen von H-5, H-6 und H-6' konnten hingegen nur mithilfe der zusätzlichen Informationen des TOCSY-Spektrums eindeutig bestimmt werden, da aufgrund von Überlagerungen verschiedener Signale das H-4/H-5 Kreuzsignal im COSY-Spektrum nicht eindeutig erkennbar ist.

Im Fall der Protonen H-4 und H-5 wurden lediglich die Kreuzsignale H-3/H-4, bzw. H-5/H-6 und H-5/H-6' in Abbildung 9.5 markiert, da die Signale auf der Hauptdiagonalen nicht klar separiert vorliegen.

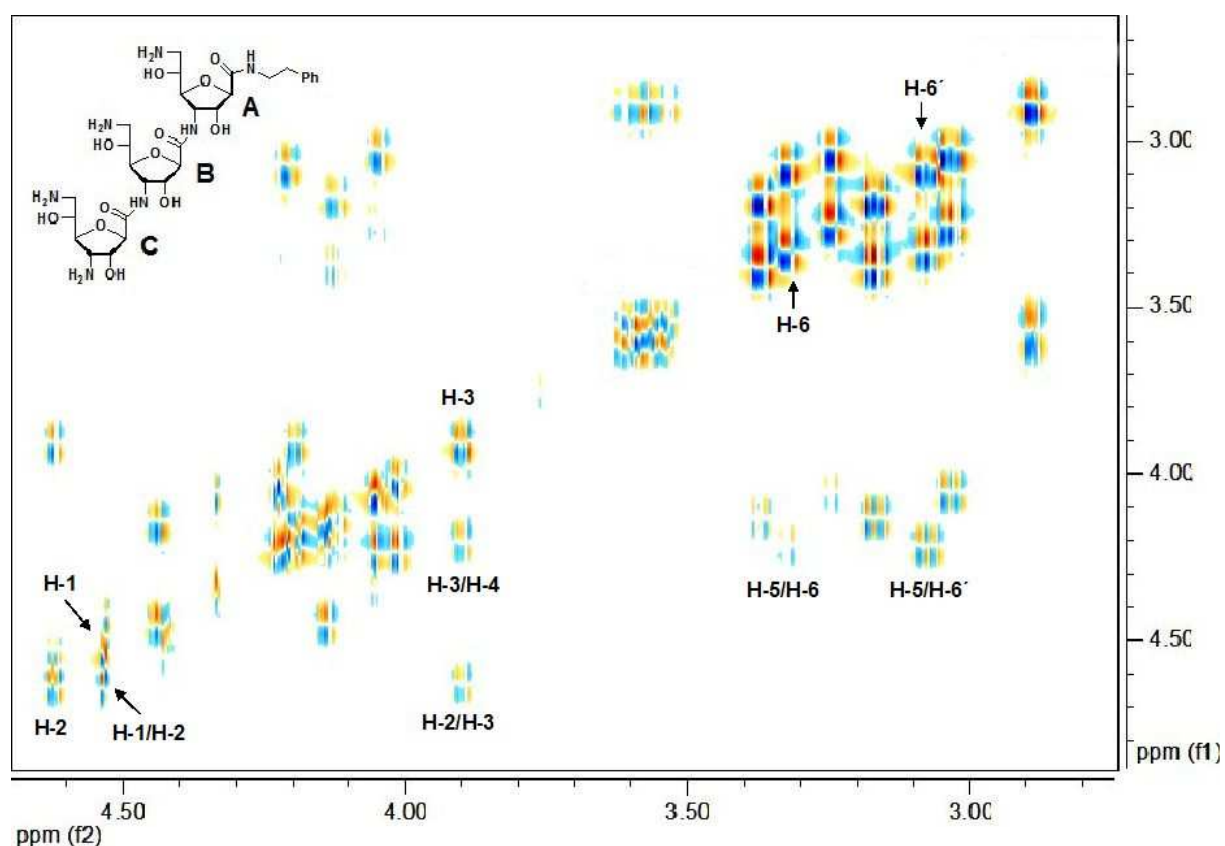


Abb. 9.5:  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY Spektrum des Trimers **79** mit vollständiger Zuordnung der Protonen eines Furanoserings. pH-Wert 1.3 in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Auf gleiche Weise ließen sich auch die Signale der übrigen Ringe des Trimers zuordnen. Eine eindeutige Aussage zu welchem der drei Ringe die Signalsätze gehören, war aber wie bereits erläutert nicht möglich.

Um nachfolgend die Signale aus dem  $^{13}\text{C}$ -Spektrum zuordnen zu können, wurde ein HSQC-Experiment durchgeführt. In HSQC-Spektren sind Kreuzrelationen zwischen Kohlenstoff und den direkt an sie gebundenen Wasserstoffen ( $^1\text{J}$ -Kopplungen) sichtbar. Abb. 9.6 zeigt, dass die Signale des Trimers **79** im HSQC-Spektrum sehr gut separiert waren und mit Hilfe der Daten aus dem COSY- und dem TOCSY-Spektrum zugeordnet werden konnten. Das HSQC-Spektrum zeigt zudem, dass die Kohlenstoffatome an gleichen relativen Positionen sehr ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen. Auf die Abbildung der phenylischen Signale wurde in Abbildung 9.6 zur besseren Übersichtlichkeit verzichtet.

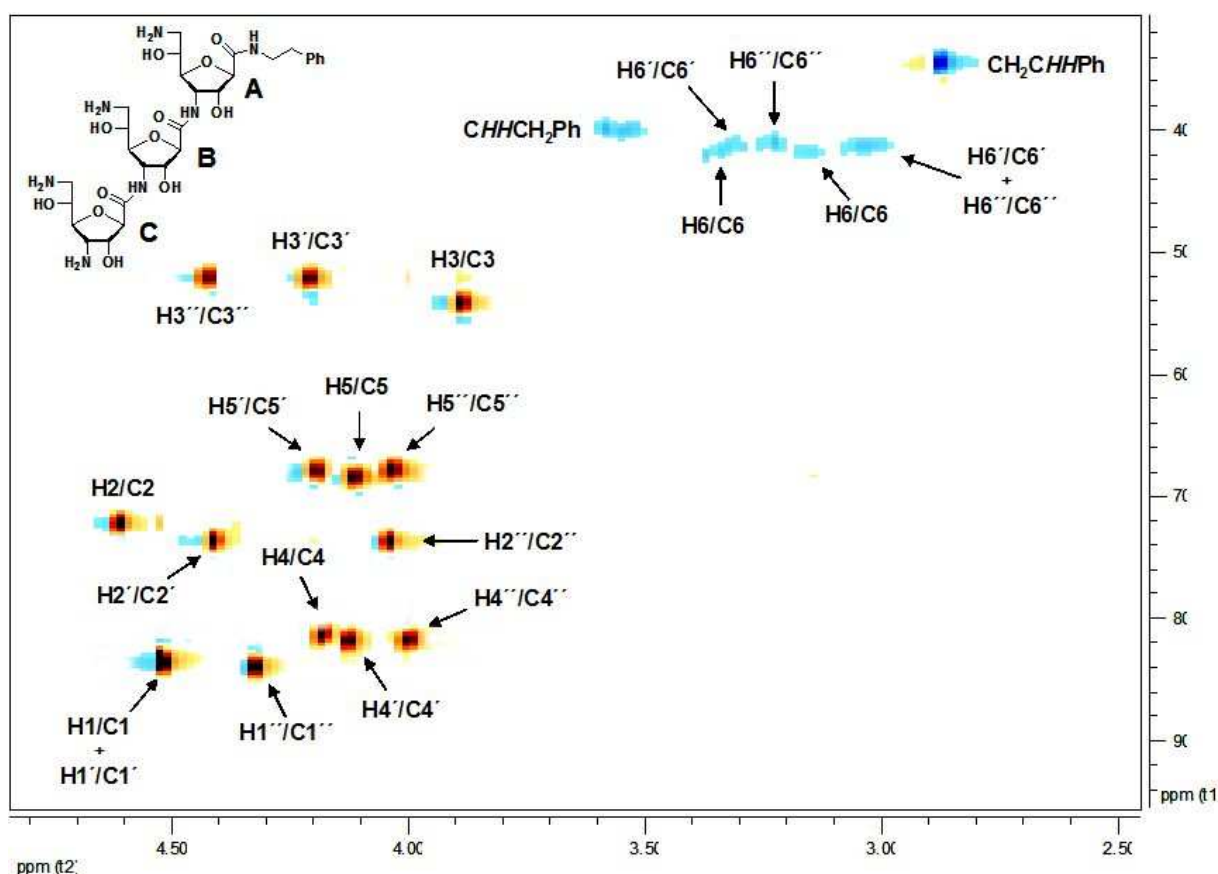


Abb. 9.6: HSQC Spektrum des Trimers **79**. pH-Wert 1.3 in  $\text{D}_2\text{O}$

Es lassen sich also wie am Beispiel des Trimers **79** gezeigt, durch eine Kombination mehrerer zweidimensionaler NMR-Techniken alle Signale der Zuckeruntereinheiten eindeutig zuordnen.

Welches Set von Protonen an welchem Zuckerring lokalisiert ist, lässt sich mit den in  $\text{D}_2\text{O}$  gemessenen Spektren nicht zuordnen. Dazu müssten Spektren in Wasser aufgenommen

werden, um zusätzliche Informationen über die leicht austauschbaren amidischen NH-Protonen und deren Kopplungen zu benachbarten Kernen zu erhalten.

Dennoch lassen sich aus den NMR-Daten durch Vergleich der chemischen Verschiebungen von zusammengehörenden Protonen eines Rings und den äquivalenten Protonen in den benachbarten Ringen plausible Annahmen darüber treffen, welche Protonensets an welchem der Ringe A, B und C liegen. Ein Vergleich der Signale der Kerne H-3, H-3' und H-3'' zum Beispiel legt nahe, dass Kern H-3 an Ring C lokalisiert ist: H-3 ist benachbart zu einer Aminogruppe, während H-3' und H-3'' in Nachbarschaft zu Gruppen mit Amidbindungen liegen. Aufgrund dieser unterschiedlichen chemischen und somit auch magnetischen Umgebung ist eine Hochfeldverschiebung des Signals von H-3 im Vergleich zu H-3' und H-3'' zu erwarten. Die Daten der Verschiebung des Protons H-1'' lassen hingegen darauf schließen, dass dieses Proton an Ring A lokalisiert ist, da durch den Phenylethylaminlinker ebenfalls wie im zuvor genannten Fall eine Hochfeldverschiebung im Vergleich zu H-1 und H-1' zu erwarten ist. Diese und weitere Beobachtungen der chemischen Verschiebungen der Protonen in einem Ring und den äquivalenten Protonen in den benachbarten Ringen indizieren, dass die Protonen mit Kennzeichnung '' (Zweistrich) an Ring A, die Protonen mit Kennzeichnung ' (Strich) an Ring B und die Protonen ohne Kennzeichnung an Ring C lokalisiert sind.

## 10 RNA-Bindungsstudien

Trypanosomen sind eine Gattung von einzelligen geißeltragenden Parasiten, die ihren Namen ihrer Bohrer-artigen Form verdanken. Sie werden zumeist durch Insekten übertragen und sind in den unterschiedlichsten Wirbeltieren anzutreffen. Unterarten der Familie der Trypanosomen, welche für den Ausbruch der afrikanischen Schlafkrankheit (afrikanische Trypanosomiasis) verantwortlich sind, werden in der Gattung der *Trypanosoma brucei* zusammengefasst. Für das Überleben von *Trypanosoma brucei* ist eine spezifische RNA-Prozessierung essentiell, die auch als RNA-Editierung bezeichnet wird. Ein viel versprechender Ansatz bei der Suche nach neuen Wirkstoffen gegen die Schlafkrankheit ist die Entwicklung von RNA-Liganden, die in diese RNA-Editierungsreaktion eingreifen und sie nach Möglichkeit spezifisch blockieren oder modifizieren können.

Die RNA-Editierung findet bei den Trypanosomen in den Mitochondrien statt und ist ein komplexer Vorgang bei dem mithilfe einer mRNA, einer sogenannten guide RNA (gRNA) und einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine, U-Nukleotide in ansonsten unvollständige Primärtranskripte eingebaut (Insertion) werden können. Auch die Umkehrung dieser Reaktion, nämlich der Abbau vorhandener U-Nukleotide (Deletion) ist möglich.

Der genaue Vorgang bei der RNA-Editierung der Trypanosomen ist bislang nicht in allen Einzelheiten verstanden. Nach dem heutigen Stand der Forschung gilt es jedoch als gesichert, dass der Editierungsprozess durch die Bildung eines antiparallelen RNA-Duplexes zwischen der präeditierten mRNA und einer komplementären gRNA eingeleitet wird.

Abbildung 10.1 zeigt an einem Beispiel die Deletion und anschließende Ligation einer am 3'-Ende radioaktiv markierten präeditierten mRNA. Die gRNA dient bei diesem Vorgang als Matrize an der die präeditierte mRNA mit einem anderen Nukleotid ligiert wird. Für eine effektive Ligation der aus 22 und 15 Nukleotiden bestehenden Einheiten, muss die U<sub>4</sub>-Einheit am 5'-Ende zunächst schrittweise abgebaut werden.

Das ebenfalls in Abbildung 10.1 abgebildete Polyacrylamidgel zeigt die Bildung des Editierungsprodukts (37mer) als Hauptprodukt an. Daneben werden unterschiedliche Deletionsprodukte (22mer – 26mer) und ein geringer Anteil des Editierungsprodukts ohne Deletion (41mer) detektiert.

Lässt man die Editierungsreaktion in Anwesenheit eines RNA-Liganden ablaufen, der in der Lage ist in den Editiervorgang einzugreifen, so wird in Abhängigkeit der Konzentration des Liganden eine geringere Menge des Editierungsprodukts (37mer) gebildet. Durch Auftragung der prozentualen Bildung des Editierungsprodukts gegen die Konzentration des Liganden, lassen sich IC<sub>50</sub>-Werte ermitteln. Alternativ kann auch die Konzentration der präeditierten,

also nicht ligierten mRNA gegen die Konzentration des Liganden aufgetragen werden. Dies ist an einem Beispiel in Abbildung 10.2 gezeigt. Als RNA-Ligand wurde im gezeigten Beispiel Neomycin verwendet.

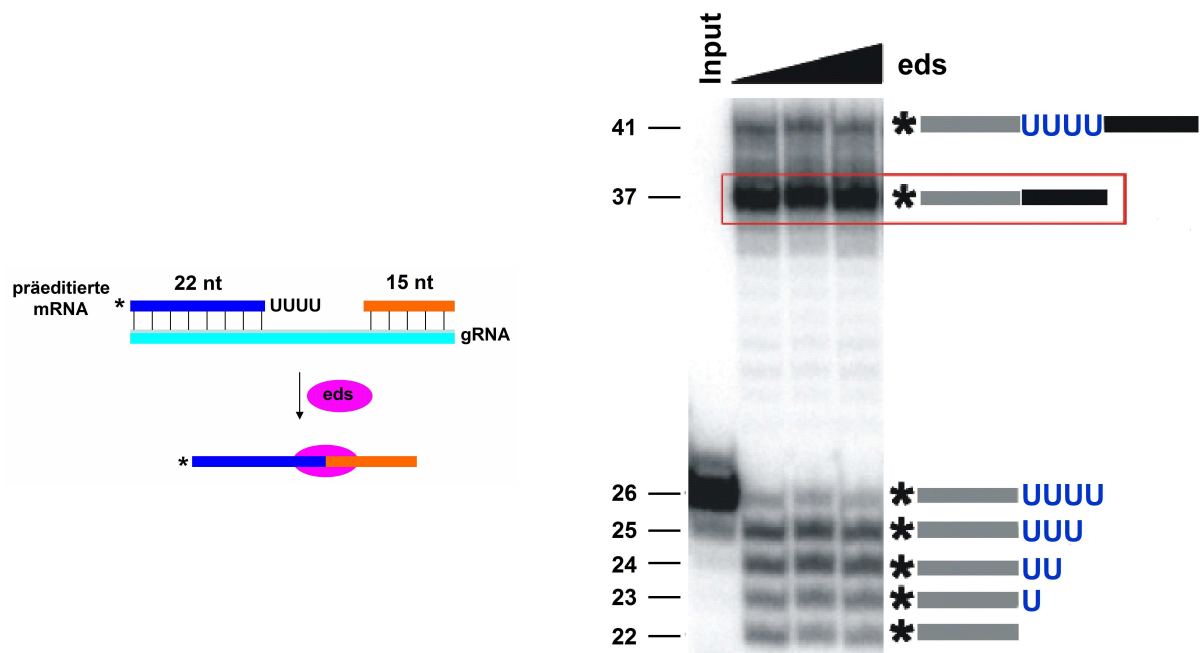


Abb. 10.1: Rechts: Schema der Editierungsreaktion unter Deletion eines tetra U-Rests am 5'-Ende der präeditierten, radioaktiv markierten (\*) mRNA mit Hilfe des Editosoms. Links: Auftrennung der Produkte der Editierungsreaktion in einem Polyacrylamidgel.

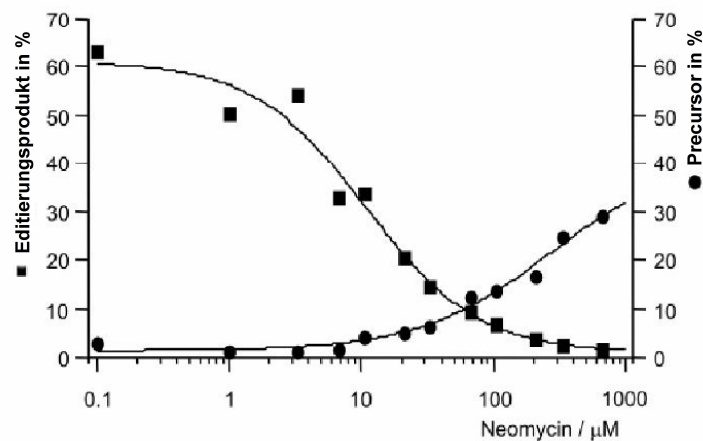


Abbildung 10.2: Untersuchung der Hemmung der Editierungsreaktion durch Neomycin. Es sind die prozentualen Anteile an Editierungsprodukt, bzw. präeditierter mRNA gegen die Neomycin-Konzentration aufgetragen.

Ein einfaches Vorexperiment zur Simulation der Wirkung eines potentiellen Wirkstoffs in einem Deletionsassay ist die Untersuchung der Bindungseigenschaften des Stoffes an eine doppelsträngige RNA (dsRNA), bei der ein Loop aus 5-Uracileinheiten eingebaut wurde (siehe Abb. 10.3). Um ein Maß für die Bindung der Substanz an die RNA zu haben wird ein sogenannter Fluoreszenzverdrängungsassay (*fluorescence displacement assay*) durchgeführt.

Bei diesem FDA wird die Fähigkeit der Substanz untersucht den Farbstoff SYBR-Green II, welcher unspezifisch an die dsRNA bindet, zu verdrängen.

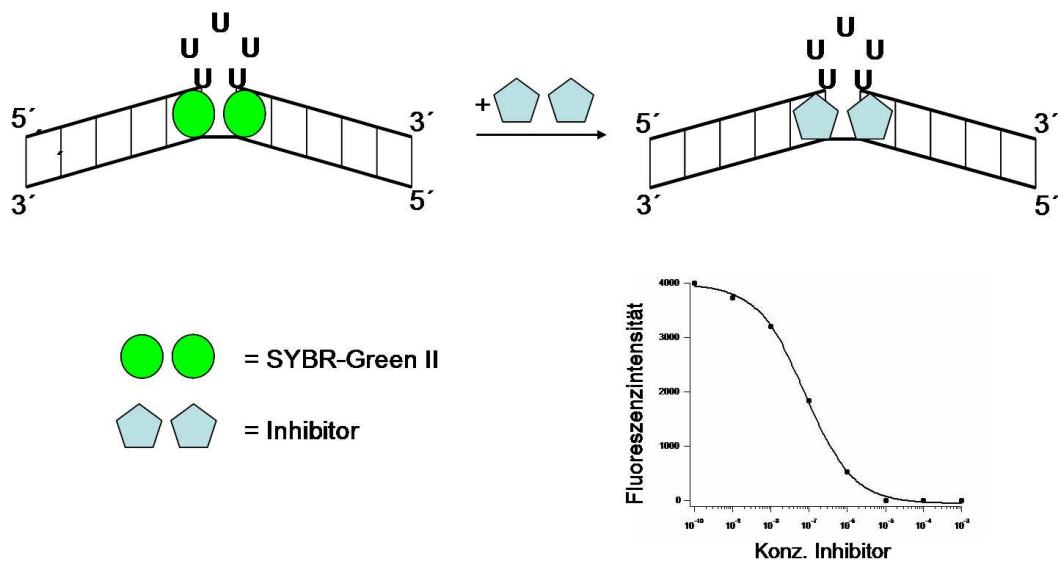


Abb. 10.3: Schema der Fluoreszenzverdrängungsreaktion von SYBR-Green II mit einem Inhibitor an einer dsRNA mit eingebautem U<sub>5</sub>-Loop.

Mit steigender Konzentration des Wirkstoffs wird der Fluoreszenzfarbstoff zunehmend verdrängt, was zu einer Abnahme der messbaren Fluoreszenz führt. Durch die Messung dieser Fluoreszenzabnahme lassen sich IC<sub>50</sub>-Werte bestimmen, die mit den IC<sub>50</sub>-Werten bekannter Aminoglycosidantibiotika verglichen werden können.

## 10.1 Ergebnisse der RNA-Bindungsstudien

Der in Abbildung 10.3 skizzierte FDA wurde mit allen synthetisierten Oligomeren durchgeführt. Die Auswertung der Assays erfolgte durch Auftragung der Konzentration der Oligomere gegen die Fluoreszenzintensität. Dies ist am Beispiel des Oligomers **81** in Abbildung 10.4 gezeigt. Als Positivkontrolle wurde Neomycin verwendet.

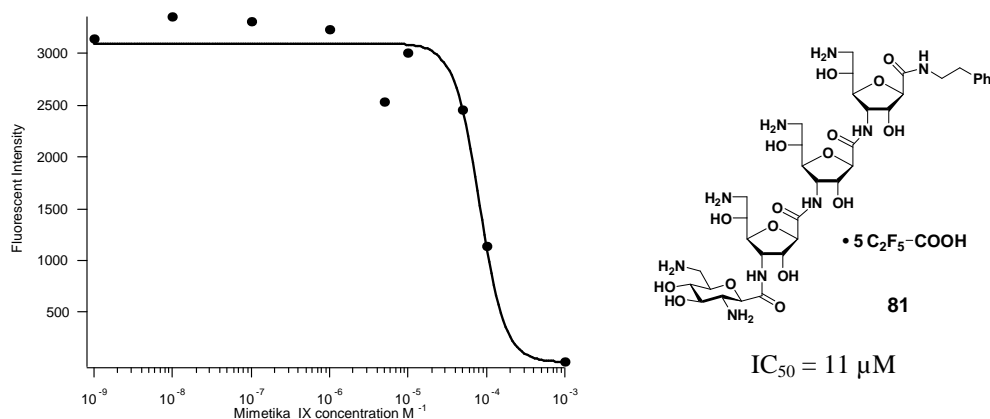
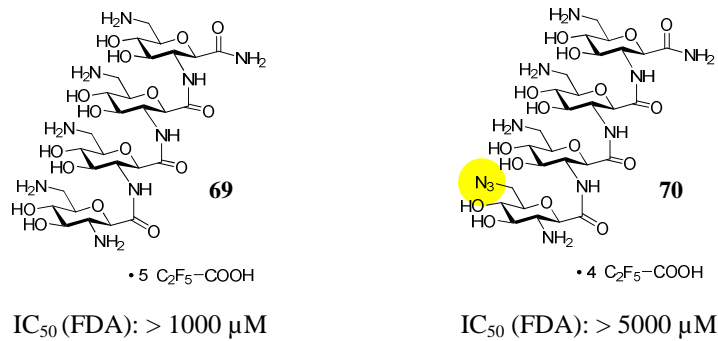


Abb. 10.4: Auswertung des Fluoreszenzverdrängungsassays mit Oligomer **81**.



Abb. 10.6: Tetramere **69** und **70** und zugehörige IC<sub>50</sub>-Werte.

Auffällig ist, dass allein drei der fünf aktiven Oligomere die gleiche Substruktur aus drei aufeinander folgenden (3→1)-amidverknüpften Alloseuntereinheiten enthalten. Diese Substruktur könnte daher als neues Leitmotiv für die Synthese weiterer aktiver Oligomere herangezogen werden.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Trimere **73** und **79** aus drei (3→1)-amidverknüpften Alloseeinheiten weder mit, noch ohne Linker im untersuchten Konzentrationsbereich gute Bindungseigenschaften zeigen. Offensichtlich bedarf es einer weiteren Zuckereinheit, um eine gute Bindung an die zur Verfügung gestellt RNA zu erzielen. Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass eine gute Bindung einer bestimmten räumlichen Anordnung bedarf, die erst durch das Anknüpfen eines vierten Zuckerdiaminosäurebausteins erreicht wird. Durch diese Änderung der räumlichen Anordnung können die Aminogruppen in der gewünschten Weise präsentiert werden und führen so zu einer besseren Bindung. Um diese These zu stützen müssten NMR oder Kristallstrukturuntersuchungen der Oligomere durchgeführt werden, die Aufschluss über die räumliche Anordnung der Oligomere geben können.

Durch den Austausch einer Aminogruppe gegen ein Azid sollte die Bedeutung der freien Aminogruppen für die Bindung der Zuckerdiaminosäureoligomere an RNA untersucht werden. Zu diesem Zweck bot es sich an die Glucoseeinheit in Tetramer **81** zu modifizieren, da erst durch die Anknüpfung der Glucoseeinheit eine gute Bindung des Oligomers beobachtet wurde. Diese Verbesserung der Bindungseigenschaften wurde daher wahrscheinlich wesentlich durch eine der beiden Aminogruppen der Glucoseeinheit hervorgerufen.

Durch Austausch der Aminogruppe an C-6 gegen ein Azid (siehe Abbildung 10.7) stieg der IC<sub>50</sub>-Wert um einen Faktor von etwa 40 von zuvor 11 μM (freies Amin) auf 460 μM (Azid).

Dieser Wert zeigt erstmals, dass die freien Aminogruppen und damit das Prinzip der elektrostatischen Komplementarität sehr wahrscheinlich auch bei den Zuckerdiaminosäureoligomeren von entscheidender Bedeutung für die Bindung an RNA ist.

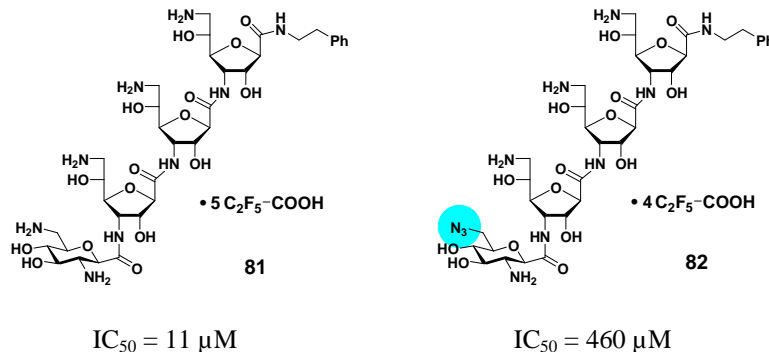


Abb. 10.7: Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte bei Austausch einer Aminogruppe gegen ein Azid.

Mithilfe der Daten aus den FDAs konnte nun ein Kandidat für die Durchführung des in Abbildung 10.1 gezeigten Deletionsassays bestimmt werden. Da zu erwarten ist, dass das aktivste Oligomer im FDA bei beiden Tests die besten Bindungseigenschaften zeigt, bot es sich an Oligomer **81** mit dem niedrigsten  $IC_{50}$ -Wert aller getesteten Verbindungen für die Durchführung des Deletionsassays zu wählen. Leider verwendete unser Kooperationslabor bei der AG Göringer in Darmstadt nicht das aktivste Oligomer für die Durchführung des Deletionsassays, sondern das mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $100 \mu M$  um einen Faktor von 10 schlechter bindende Oligomer **80**. Da der Deletionsassay in der Regel zu höheren  $IC_{50}$ -Werten führt als der FDA (Erfahrung aus vorhergehenden Tests, sowie persönliche Mitteilung von M. Brecht/AG Göringer) zeigte Oligomer **80** im Deletionsassay wie nicht anders zu erwarten einen  $IC_{50}$ -Wert  $> 100 \mu M$ . Das aktivste Oligomer **81** hingegen wurde nach Durchführung der FDA-Messungen in Darmstadt ausgemustert und konnte aus Zeitgründen nicht abermals synthetisiert werden.

Die Ergebnisse der RNA-Bindungsstudien sind vielversprechend und aufschlussreich, da zum einen die Bedeutung der Aminogruppen der Oligomere für die Bindung an RNA gezeigt werden konnte und zum anderen mit der in den Oligomeren **80**, **81** und **82** enthaltenen Substruktur dreier aufeinander folgender (3→1) amidverknüpfter Alloseeinheiten eine potentielle neue Leitstruktur für die Synthese aktiver Oligomere gefunden wurde.

## 10.2 Vergleich der Ergebnisse der RNA-Bindungsstudien

Mit den neun synthetisierten Oligomeren aus dieser Arbeit wurden insgesamt 25 Zuckerdiaminosäureoligomere in der Arbeitsgruppe Wittmann synthetisiert und bei der Arbeitsgruppe Göringer in Darmstadt auf ihre Eigenschaften als RNA-Liganden untersucht. Alle nachfolgend erwähnten Oligomere die nicht bereits in den Kapiteln 8 oder 10.1 erwähnt wurden, wurden in den Doktorarbeiten von F. Sicherl und F. John synthetisiert.

Anhand der vorliegenden Daten der RNA-Bindungsstudien lassen sich zwei Leitmotive für die Synthese aktiver Oligomere erkennen. Zum einen die erstmals in dieser Arbeit synthetisierte Substruktur aus drei (3→1)-amidverknüpften Alloseeinheiten (nachfolgend Alloseleitstruktur genannt) und zum anderen die erstmals in der Doktorarbeit von F. Sicherl synthetisierte Substruktur mit drei (2→1)-amidverknüpften Glucoseeinheiten (nachfolgend Glucoseleitstruktur genannt). Interessant ist die Gegenüberstellung der aus den beiden Leitmotiven hervorgehenden Trimere und der um jeweils eine identische Einheit verlängerten Tetramere (siehe Abbildung 10.8). Während die Allose-trimere **73** und **79** keine erkennbaren Aktivitäten zeigten, wurde beim Glucosetrimer **86** mit 0.75  $\mu\text{M}$  der niedrigste FDA  $\text{IC}_{50}$ -Wert aller getesteten Oligomeren gemessen.

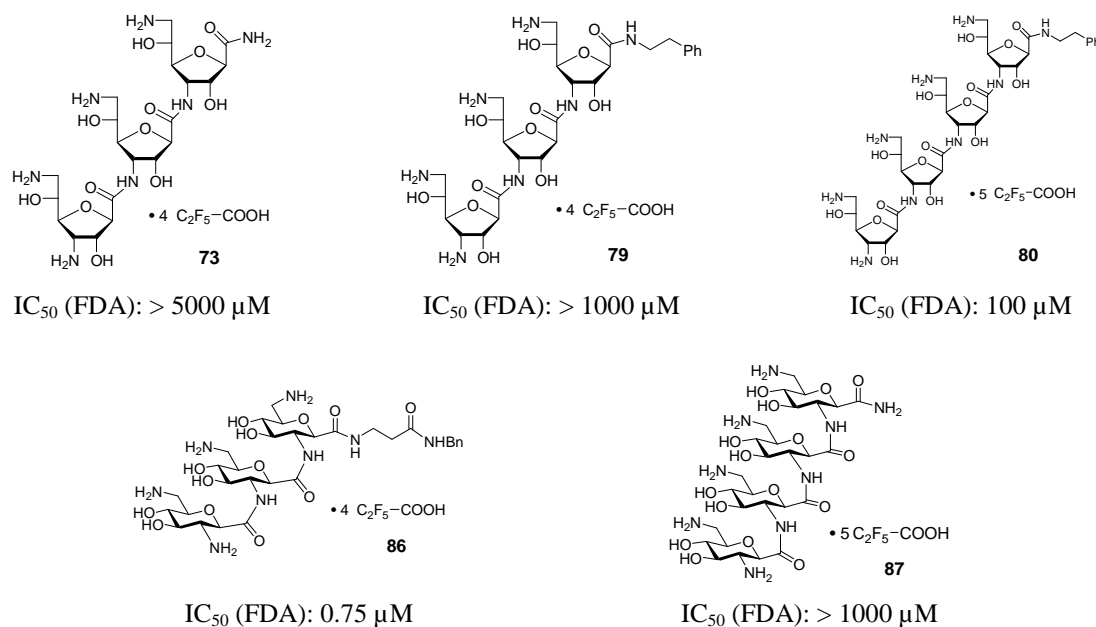


Abb. 10.8: Vergleich der  $\text{IC}_{50}$ -Werte aus FDA-Messungen strukturähnlicher Allose-, bzw. Glucosetri- und tetramere

Sieht man sich die Ergebnisse der um jeweils eine identische Einheit verlängerten Tetramere an, so verhält es sich umgekehrt. Das Glucosetetramer **87** zeigt keine erkennbare Aktivität im untersuchten Bereich, während das Allose-tetramer **80** mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 100  $\mu\text{M}$  eine deutliche Erhöhung der Affinität zur bereitgestellten RNA im Vergleich zum

korrespondierenden Trimer **79** zeigt. Das Ergebnis im Fall des Glucosetetramers **87** ist unter anderem deshalb überraschend, weil durch eine größere Zahl an zur Verfügung gestellten Aminogruppen potentiell eine größere Affinität an die bereitgestellte RNA erwartet wurde.

Diese beiden gegensätzlichen Beobachtungen sprechen dafür, dass durch die Verlängerung der Kette eine Änderung der räumlichen Struktur der Oligomere stattfindet, wodurch im einen Fall eine günstige und im anderen Fall eine ungünstige Anordnung der freien Aminogruppen und damit eine Erniedrigung, bzw. eine Erhöhung des  $IC_{50}$ -Werts bedingt wird. Anhand der vorliegenden Daten kann für diesen Fall gefolgert werden, dass die Art der Strukturänderung maßgeblich durch die Position und durch die Art des vierten Bausteins beeinflusst wird.

Der Einfluss der Position ist durch einen Vergleich der Tetramere **87**, **88** und **89** zu erkennen, die sich alle lediglich durch die Position des vierten Bausteins an der Glucoseleitstruktur unterscheiden. Während bei Tetramer **87** ein  $IC_{50}$ -Wert von  $> 1000 \mu\text{M}$  gemessen wurde, zeigen die Tetramere **88** und **89** mit  $IC_{50}$ -Werten um  $1 \mu\text{M}$  eine um mindestens einen Faktor von 1000 höhere Aktivität (siehe in Abbildung 10.9).

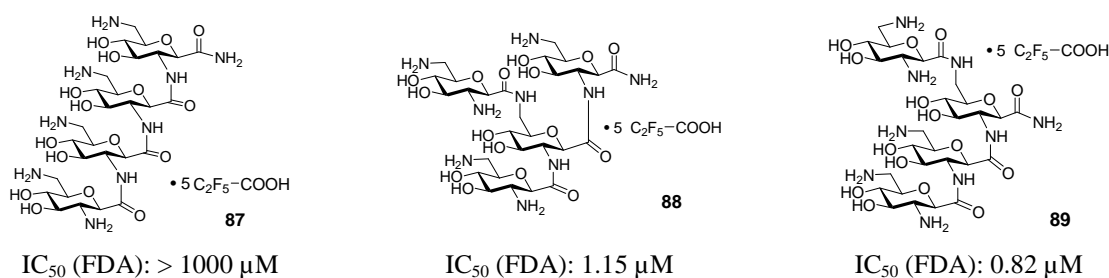


Abb. 10.9: Einfluss der Position des vierten Zuckerdiaminosäurebausteins bei Anknüpfung an die Glucoseleitstruktur.

Der Einfluss der Art des vierten Bausteins konnte durch die Synthese der Oligomere **85** und **90** gezeigt werden. Hierbei wurden einmal am Kopf und einmal am Schwanz der Glucoseleitstruktur ein Alloose-, bzw. ein Ribosebaustein anstelle des Glucosebausteins eingesetzt. In beiden Fällen wurden mit  $30 \mu\text{M}$ , bzw.  $0.77 \mu\text{M}$  bedeutend niedrigere  $IC_{50}$ -Werte erhalten, als bei Tetramer **87**.

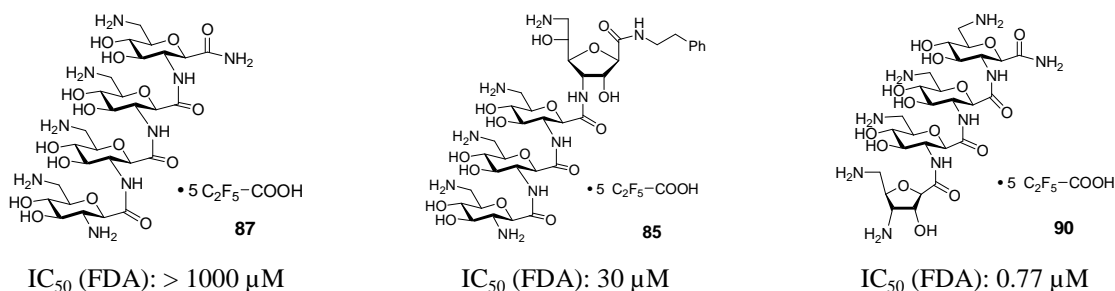


Abb. 10.8: Einfluss der Art des vierten Zuckerdiaminosäurebausteins bei Anknüpfung an die Glucoseleitstruktur.

Allgemein sind die  $IC_{50}$ -Werte der aktiven Oligomere mit Alloseitstruktur höher als die  $IC_{50}$ -Werte der aktiven Oligomere mit der Glucoseleitstruktur. Aufgrund der oben gezogenen Schlussfolgerungen aus den Daten der RNA-Bindungstests kann dies durch die räumliche Struktur und damit die Positionierung der freien Aminogruppen in den Zuckerdiaminosäureoligomeren hervorgerufen werden.

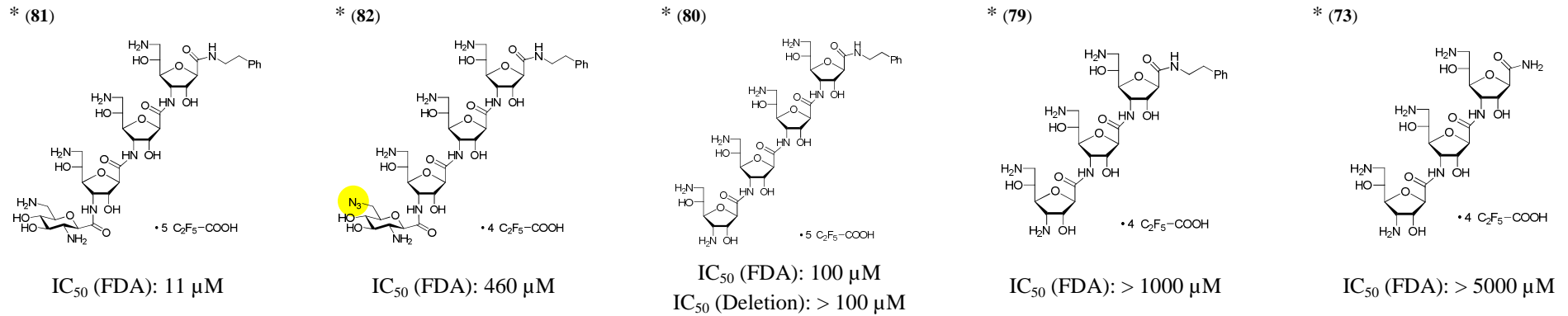
Aus Zeitgründen konnten leider keine ausführlichen Untersuchungen zum räumlichen Aufbau der Oligomere durchgeführt werden, aber gerade die generell etwas höheren Werte für die Oligomere mit Alloseitstruktur machen die beiden Leitmotive zu interessanten Modellen, mit denen mit Hilfe von Röntgenbeugung und NMR-spektroskopischen Methoden Unterschiede und Gemeinsamkeiten im räumlichen Bau untersucht und gegebenenfalls detaillierte Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Zuckerdiaminosäureoligomere abgeleitet werden können.

Eine Gegenüberstellung aller synthetisierten Oligomere zeigen die Übersichtstabellen auf den nächsten Seiten. Oligomere aus dieser Arbeit sind dort mit einem \* gekennzeichnet; Oligomere aus den Doktorarbeiten von F. Sicherl, bzw. F. John sind mit \*\*, bzw. \*\*\* gekennzeichnet.

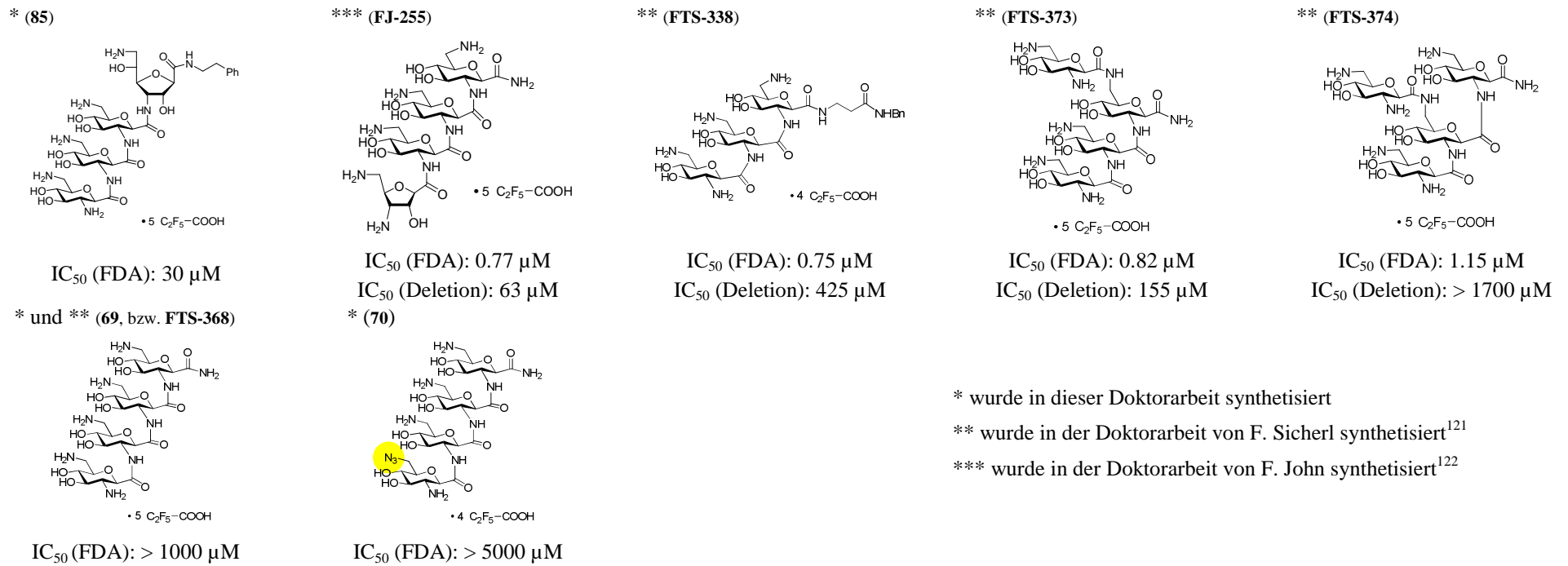
Die Oligomere wurden in vier Gruppen unterteilt. Die ersten beiden Gruppen enthalten alle Oligomere mit Allose-, bzw. Glucoseleitstruktur. Ein Vergleich mit den Oligomeren der anderen beiden Gruppen verdeutlicht die Bedeutung der beiden Leitstrukturen für die Bindung an die RNA. Es konnte lediglich eine Verbindung mit einem FDA  $IC_{50}$ -Wert  $< 100 \mu\text{M}$  synthetisiert werden, die nicht eine dieser beiden Leitmotive enthielt.

Für vier der 25 in der AG Wittmann synthetisierten und getesteten Oligomere sind Vergleiche mit den Bindungsaffinitäten der anderen Oligomere nur bedingt möglich, da sie lediglich bei Konzentrationen bis zu einem  $IC_{50}$ -Wert von  $5 \mu\text{M}$  getestet wurden. Acht der übrigen 21 Oligomere haben FDA  $IC_{50}$ -Werte zwischen  $0.75$  und  $100 \mu\text{M}$ . Die restlichen 13 Oligomere zeigen FDA  $IC_{50}$ -Werte  $> 100 \mu\text{M}$  (für 4 der getesteten Verbindungen liegt der FDA  $IC_{50}$ -Wert sogar nachweislich oberhalb  $1000 \mu\text{M}$ ). Diese grosse Spanne zwischen den gemessenen FDA  $IC_{50}$ -Werten ist ein klares Indiz dafür, dass die Bindung der Zuckerdiaminosäureoligomere spezifischer Natur ist.

Oligomere mit mindestens drei (3→1)-amidverknüpften Alloseinheiten

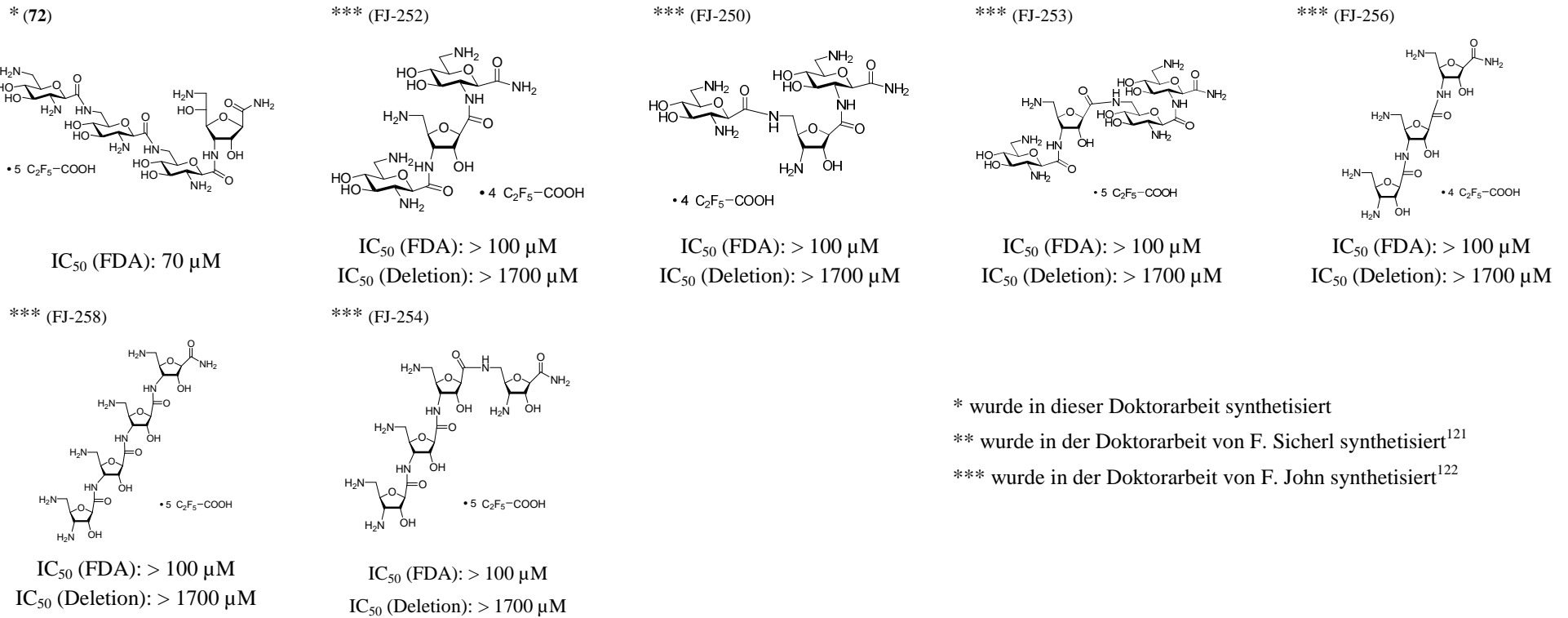


Oligomere mit mindestens drei (2→1)-amidverknüpften Glucoseeinheiten

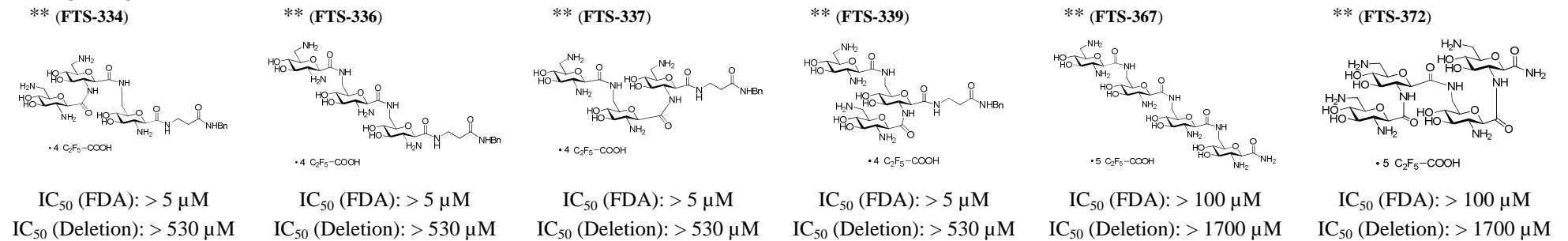


# RNA-Bindungsstudien

## Sonstige Alloose- und Ribose-haltige Oligomere



## Sonstige Oligomere



## 11 Zusammenfassung und Ausblick

Natürlich vorkommende Aminoglycoside sind Oligosaccharid-artige Verbindungen die durch spezifische Bindung an prokaryotische 16S rRNA antibiotisch wirken. Die Bindung führt zu Fehlern bei der Proteinbiosynthese und damit zur Bildung von Nonsense-Proteinen, was letztlich zum Absterben der Mikroorganismen führt. Neben der 16S rRNA können Aminoglycoside auch an andere biologisch bedeutende RNAs binden. Beispiele hierfür sind verschiedene Ribozyme, sowie die Trans-Aktivierungs-Region viraler mRNAs.

Durch Röntgenstrukturanalyse, sowie durch NMR-spektroskopische Methoden, konnten in den letzten Jahren Schlüsselwechselwirkungen zwischen den Aminoglycosiden und ihren RNA-Targets identifiziert werden. Anhand dieser Erkenntnisse wurden und werden weltweit in zahlreichen Arbeitsgruppen Strategien zur Entwicklung von Aminoglycosidmimetika erforscht. Wirkungsvolle Aminoglycosidmimetika können zum einen helfen Resistenzen gegen die als *second line* Antibiotika eingesetzten Aminoglycoside zu überwinden und können zum anderen als Werkzeuge benutzt werden, um Wirkstoffe gegen RNA-Targets des Postgenomzeitalters zu finden.

Im Fall der Aminoglycoside sind Kohlenhydratbausteine *O*-glycosidisch miteinander verknüpft. Diese Art der Verknüpfung ist bei einem rein synthetischen Ansatz zur Entwicklung neuer RNA-Liganden von Nachteil. Zwar existiert eine Reihe von etablierten Methoden für die Synthese von *O*-Glycosiden,<sup>11</sup> jedoch gelingt deren Synthese nicht immer mit den gewünschten Ausbeuten und Stereoselektivitäten. Aus diesem Grund werden modifizierte Aminoglycoside fast immer aus biosynthetisch gewonnen Aminoglycosiden dargestellt. Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz zur Entwicklung von Aminoglycosidmimetika basierte auf der Synthese und Verknüpfung orthogonal geschützter, Zuckerdiaminosäurebausteine (SDAs), die mithilfe etablierter Methoden aus der Peptidchemie zu Oligomeren verknüpft werden können. Der Vorteil von Zuckerdiaminosäuren gegenüber herkömmlichen Zuckeraminoinsäuren besteht darin, dass erstens durch die zusätzliche Aminogruppe ein weiterer potentieller Bindungspartner für die Bindung an RNA zur Verfügung gestellt wird, was zu einer verbesserten Bindung führen kann und dass zweitens neben linearen auch verzweigte Oligomere synthetisiert werden können.

Die Verwendung von Zuckeraminoinsäuren (SAAs) wurde bereits für eine Reihe unterschiedlicher Anwendungen in der Literatur beschrieben. Diese Anwendungen sollten sich aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit auch auf SDAs übertragen lassen. Unter anderem

wurden Zuckerdiaminosäuren für die Synthese unterschiedlicher Oligosaccharidmimetika und als Gerüstsubstanzen zur definierten räumlichen Ausrichtung von Pharmakophoren verwendet.<sup>17</sup>

## 11.1 Synthese von Zuckerdiaminosäurebausteinen der D-Allose

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die drei Allosebausteine **30**, **31** und **33** zur Verwendung als Bausteine für die Synthese von Zuckerdiaminosäureoligomeren dargestellt. Es wurden drei unterschiedliche Synthesewege für die Darstellung beschrieben. Das Syntheschema der letztlich erfolgreichen Strategie, sowie Informationen zu den Gesamtausbeuten sind in Abbildung 11.1 und Tabelle 11.1 gezeigt. Als Ausgangsmaterial für die Synthese diente in allen Fällen 1,2:5,6-Di-*O*-isopropylidenglucose (**1**), welche sich in wenigen Schritten in ein 3-Azidoallosederivat überführen ließ.

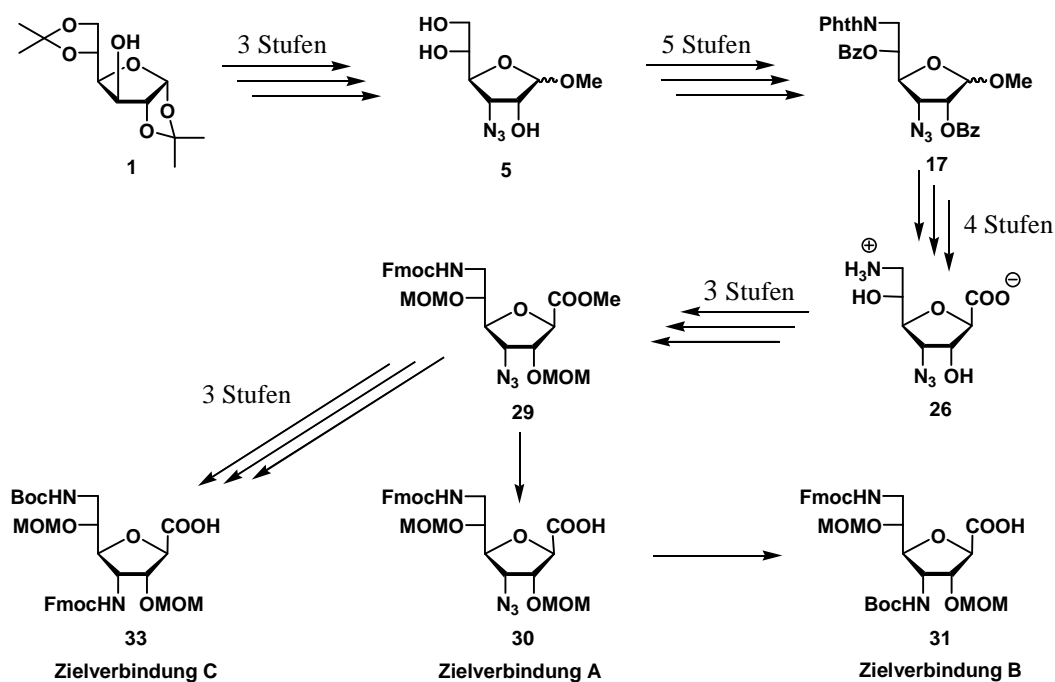


Abb. 11.1: Zusammenfassung des Synthesewegs der drei Zielverbindungen mit Allofuranosekonfiguration

Tab. 11.1: Zusammenfassung der Ausbeuten bei der Synthese der drei Zielverbindungen **30**, **31** und **33**. Die Ausbeuten wurden ausgehend von Verbindung **3** (siehe Abbildung 11.2) angegeben. Ausgehend von Verbindung **3** wurde die erste nicht literaturbekannte Verbindung dieser Arbeit synthetisiert.

Nummer der Zielverbindung	Anzahl Stufen ausgehend von Verbindung <b>1</b>	Gesamtausbeute ausgehend von <b>3</b>	∅ Ausbeute pro Stufe ausgehend von <b>3</b>
<b>30</b>	16	11 %	85 %
<b>31</b>	17	6 %	83 %
<b>33</b>	18	8 %	85 %

## 11.2 Synthese von Zuckertetrazolen und Untersuchungen zum Mechanismus ihrer Bildung

Parallel zur Synthese der Zielverbindungen mit D-Allofuranosekonfiguration wurden Versuche zur Synthese von Zuckerdiaminosäurebausteinen mit D-Allopyranosekonfiguration durchgeführt. Beim Versuch aus Acetat **35** mit einer Standardmethode ein anomeres Cyanid zu synthetisieren trat eine unerwartete Nebenreaktion auf. Statt des gewünschten anomeren Cyanids bildete sich Tetrazol **37**.

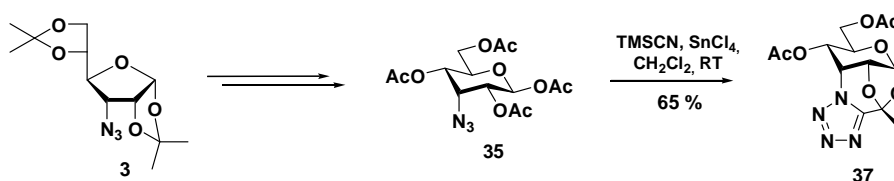


Abb. 11.2: Synthese des Zuckertetrazols **37**.

Nachfolgend wurde der Mechanismus der Reaktion mithilfe von NMR und IR-Spektroskopie untersucht. Als Zwischenprodukt der Reaktion konnte das *exo*-Cyanoethylidenderivat **36** isoliert werden, das sich nur unter Verwendung von Lewis-Säure ebenfalls in Tetrazol **37** überführen ließ. Mithilfe der erhaltenen NMR- und IR-Daten ließ sich der nachfolgend gezeigte Mechanismus postulieren.

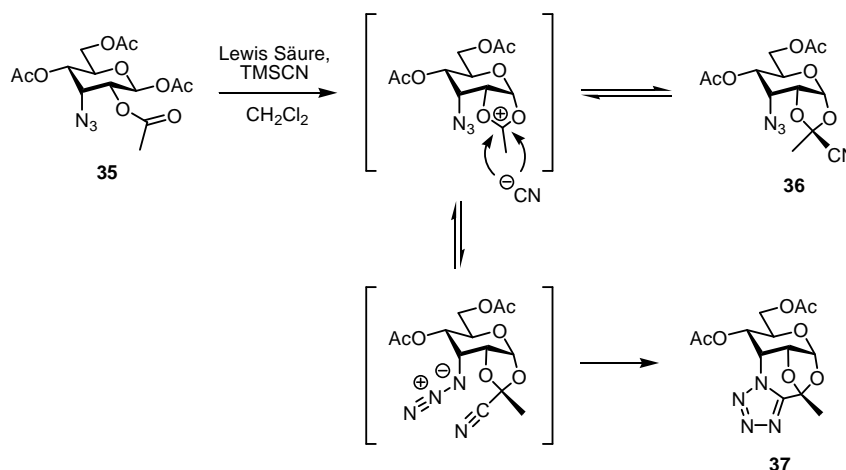


Abb. 11.3: Postulierter Mechanismus für die Bildung von Cyanoethyliden **36** und Tetrazol **37**.

Da Benzoylschutzgruppen eine geringere Nachbargruppenaktivität als Acetylschutzgruppen zeigen, wurde versucht, die Bildung des Cyanoethylidens durch Einführen einer Benzoylschutzgruppe an C-2 zurückzudrängen und so die Bildung des gewünschten anomeren Cyanids zu ermöglichen. Trotz der geringeren Nachbargruppenaktivität war die Bildung eines Cyanoethylidens begünstigt gegenüber einem Angriff des Cyanids am

anomeren Zentrum. Die Reaktion führte daher auch in diesem Fall zur Bildung eines Tetrazols (siehe Abb. 11.4).

Nachfolgend wurde untersucht, ob auch die korrespondierenden 3-Azidoallofuranosen als Template für die Tetrazolbildung dienen können. Im Fall der peracetylierten 3-Azidoallofuranose **45** konnte nach der Reaktion mit Trimethylsilylcyanid und Lewissäure das Tetrazol **47** isoliert werden; gleichzeitig bildete sich das anomere Cyanid **48**. Als Zwischenprodukte ließen sich hierbei abermals Cyanoethylenverbindungen nachweisen.

Die Einführung einer Benzoylschutzgruppe an C-2 konnte im Fall der Allofuranose die Bildung des Tetrazols vollständig unterdrücken; es ließ sich in diesem Fall ausschließlich das anomere Cyanid **9** und kein Zuckertetrazol isolieren.

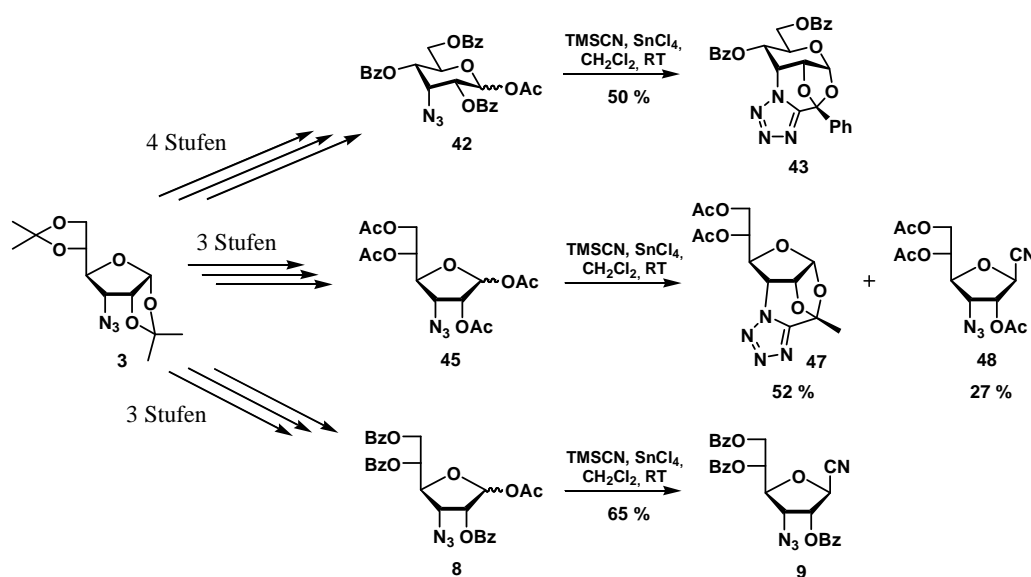


Abb. 11.4: Versuche zur Synthese von anomeren Cyaniden und Zuckertetrazolen von 3-Azidoallosederivaten.

Die Ergebnisse der Versuche sind konsistent; über die Bildung von Cyanoethylenverbindungen als Zwischenstufen führt die Reaktion durch eine intramolekulare [2+3]-Cycloaddition zwischen Cyanid- und Azidgruppe zur Bildung von verbrückten, tetracyclischen Zuckertetrazolen. Die Effizienz der intramolekularen Cycloaddition hängt dabei von der räumlichen Anordnung von Cyanid und Azid und damit von der Struktur des Zuckerrings ab.

Die Cycloaddition war am effektivsten mit der peracetylierten 3-Azidoallopyranose **35**. Hier ist die räumliche Anordnung von Azid und Cyanid im Vergleich zu den anderen getesteten anomeren acetylierten Verbindungen offensichtlich ideal für die Bildung eines Tetrazols.

Es ist wahrscheinlich, dass pyranoide Zucker die an C-2 und C-3 über eine identische Stereochemie wie Allose verfügen – beispielsweise die Gulopyranose – ebenfalls als Gerüstsubstanzen für die gleiche Reaktion dienen können.

### 11.3 Synthese von Zuckerdiaminosäurebausteinen der D-Mannose

Zusätzlich zu den Synthesen mit D-Allose wurde versucht, einen gangbaren Weg für die Synthese von Zuckerdiaminosäurebausteinen der D-Mannose zu finden.

Als Ausgangsmaterial für die Synthese diente das peracetylierte D-Glucal **49** aus dem in nur drei Stufen das anomere Cyanid **54** dargestellt werden konnte. **54** wurde nachfolgend in das Diazid **57** überführt (siehe Abbildung 11.5), welches im Anschluss durch basische Hydrolyse zur anomeren Carbonsäure oxidiert und später durch selektive Reduktion der Azidgruppen<sup>180,195,196</sup> derart funktionalisiert werden sollte, dass die Bausteine für Kupplungen nach der Fmoc-Strategie verwendet werden können.

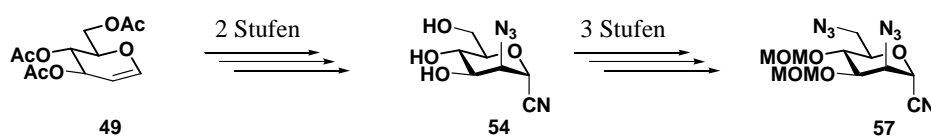


Abb. 11.5: Synthese des geschützten Diazids **57**.

Statt der erwarteten Hydrolyse des Cyanids entstanden unter basischen Bedingungen jedoch die Eliminierungsprodukte **58**, **59** und **60** (siehe Abbildung 11.6). Da die Eliminierung im basischen Milieu durchgeführt wurde und die Abgangsgruppe nicht antiperiplanar zum aciden Proton steht, muss die Eliminierung nach einem E1cB-Mechanismus verlaufen sein.

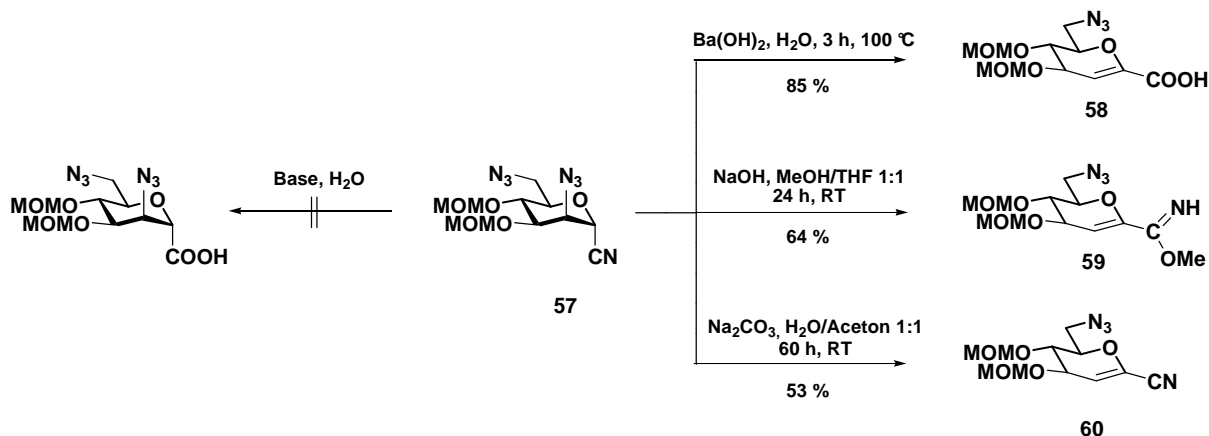


Abb. 11.6: Bildung von Eliminierungsprodukten bei Versuchen zur basischen Verseifung des Cyanids **57**.

Aus Zeitgründen wurde die Synthese ab diesem Schritt nicht weitergeführt. Der eingeschlagene Syntheseweg ist jedoch äußerst vielversprechend, da die Erzeugung des C-Glycosids und die Einführung der beiden Aminofunktionalitäten in Form zweier Azidgruppen in nur fünf Reaktionsschritten ausgehend von günstigem, kommerziell erhältlichem Tri-*O*-acetyl-D-glucal **49** gelang und die Synthese mit einer sehr einfachen Schutzgruppenstrategie durchgeführt werden konnte.

Ziel der Weiterführung dieser Synthesestrategie muss die Vermeidung der gezeigten Eliminierungsreaktion sein.

Eine mögliche Alternative, um die gewünschten geschützten Zuckerdiaminosäurebausteine zu synthetisieren, zeigt Abbildung 11.7. Durch saure Hydrolyse von Verbindung **56** und anschließende Reduktion der Azidgruppen kann die Eliminierung verhindert und der bis zu diesem Punkt eingeschlagene Syntheseweg weiterverfolgt werden. Werden beide Azidgruppen gleichzeitig reduziert, könnte eine selektive Einführung von Fmoc- oder Boc-Schutzgruppen durch Verwendung von Kupferacetat als Chelatkomplexbildner<sup>197</sup> oder durch Verwendung von NBD-Estern<sup>179</sup> gelingen. In beiden Fällen sollte bevorzugt die Aminogruppe an C-6 geschützt werden.

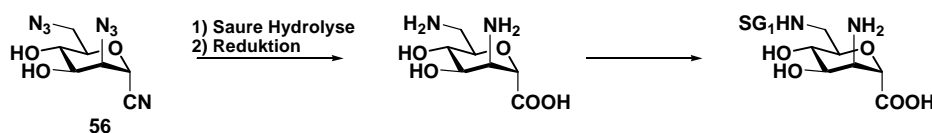


Abb. 11.7: Alternative Synthesestrategie von Zuckerdiaminosäuren der D-Mannose durch saure Hydrolyse und anschließende Reduktion von Verbindung **56**.

Eine weitere Möglichkeit die gewünschten Verbindungen zu erhalten, besteht in einer grundlegenden Änderung der Synthesestrategie. So könnten wie in Abbildung 11.8 gezeigt zunächst die beiden Aminofunktionalitäten in Form von Aziden eingeführt werden. Diese ließen sich anschließend selektiv reduzieren und mit geeigneten Schutzgruppen blockieren. Im Gegensatz zur bislang verfolgten Strategie würde das C-Glycosid bei dieser Strategie erst nach der Einführung der Aminogruppen erzeugt werden.

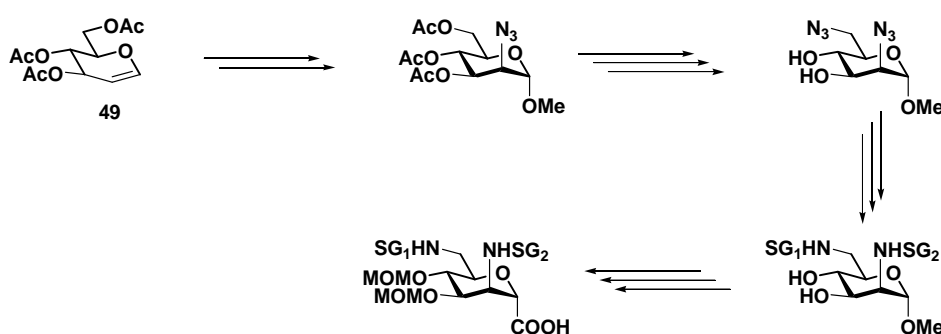


Abb. 11.8: Alternative Strategie zur Synthese von Zuckerdiaminosäuren der D-Mannose.

## 11.4 Zuckerdiaminosäureoligomere

Es wurden in dieser Arbeit insgesamt neun Zuckerdiaminosäureoligomere dargestellt und durch die Arbeitsgruppe Göringer in Darmstadt auf ihre Eigenschaften als RNA-Liganden untersucht. Dabei wurden Oligomere sowohl an der festen Phase als auch in Lösung erfolgreich synthetisiert. Für die Synthesen wurden die in dieser Arbeit synthetisierten Zuckerdiaminosäurebausteine der D-Allofuranose, sowie Zuckerdiaminosäurebausteine der D-Glucopyranose aus der Doktorarbeit von F. Sicherl<sup>121</sup> verwendet.

### 11.4.1 Oligomersynthesen an der festen Phase

Für die Festphasensynthesen wurde ein Rink-Amid-Polystyrolharz als polymerer Träger verwendet. Alle Festphasensynthesen wurden mit dem Kupplungssystem HATU, HOAt, DIPEA in den Lösemitteln DMF, bzw. NMP durchgeführt.

Abbildung 11.9 zeigt die in dieser Arbeit an der festen Phase synthetisierten Oligomere.

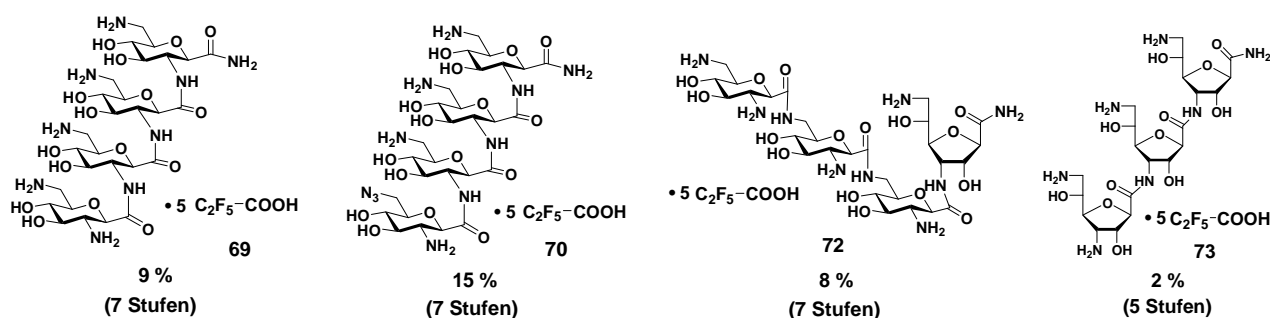


Abb. 11.9: An der festen Phase synthetisierte Zuckerdiaminosäureoligomere.

Mit den Glucopyranosebausteinen gelangen unter Verwendung von je zwei Äquivalenten der Zuckerdiaminosäurebausteine sowohl die Anknüpfung an die feste Phase als auch die nachfolgenden Kupplungsreaktionen vollständig und mit guten Ausbeuten. Um eine vollständige Kupplung der D-Allofuranosebausteine an den beladenen polymeren Träger zu erreichen, mussten dagegen wesentlich größere Überschüsse (4 eq.) eingesetzt werden. Für künftige Oligomersynthesen sollte daher mit unterschiedlichen polymeren Trägermaterialien experimentiert werden (z. B. Sieber-Amid-Polystyrolharz oder *Controlled Pore Glass*), um die Effizienz der Kupplung mit den aufwendig synthetisierten Zuckerdiaminosäurebausteinen weiter steigern und optimieren zu können.

Die vergleichsweise schlechte Ausbeute des Oligomers **73** ist auf das Auftreten zahlreicher Nebenprodukte bei der finalen Abspaltung vom Harz zurückzuführen. Wie spätere Untersuchungen der Abspaltreaktion in Lösung zeigten, lassen sich die Nebenprodukte durch Verlängerung der Reaktionsdauer (> 20 h) zurückdrängen und so die Ausbeuten deutlich verbessern.

### 11.4.2 Oligomersynthesen in Lösung

Die Oligomersynthesen in Lösung wurden ebenso wie die Synthesen an der festen Phase mit dem Kupplungssystem HATU, HOAt, DIPEA durchgeführt.

Abbildung 11.10 zeigt die in dieser Arbeit in Lösung synthetisierten Oligomere, sowie deren Gesamtausbeuten ausgehend von Zuckerdiaminosäurebaustein **33**.

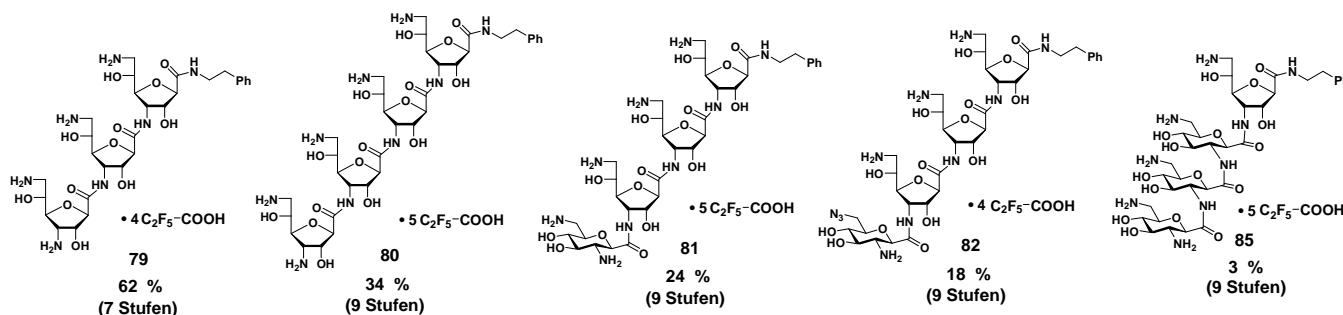


Abb. 11.10: In Lösung synthetisierte Zuckerdiaminosäureoligomere.

Die Kupplungen gelangen mit der gewählten Synthesestrategie sowohl mit den Glucose- als auch mit den Alloosebausteinen unter Verwendung von 1.2 - 1.5 Äquivalenten der Zuckerdiaminosäuren - mit Ausnahme der Synthese des Oligomers **85** - vollständig und mit sehr guten Ausbeuten. Bei der Synthese des Oligomers **85** musste auf einen verunreinigten Glucosezuckerdiaminosäurebaustein aus der Doktorarbeit von F. Sicherl für die Synthese zurückgegriffen werden, was zu einer deutlich geringeren Ausbeute führte.

Die Anknüpfung des vierten Bausteins war bei der Synthese der Tetramere erschwert (längere Reaktionszeiten auch bei Verwendung von 1.5 Äquivalenten Zuckerdiaminosäure), was als Hinweis auf die Ausbildung bevorzugter räumlicher Strukturen bei Zuckerdiaminosäureoligomeren hinweist, durch welche die für die Kupplung notwendige freie Aminogruppe schlechter erreichbar wird.

Bei der finalen sauren Entschützung eines Allofuranoseoligomers an der festen Phase wurde die Bildung zahlreicher Nebenprodukte festgestellt. Eine Untersuchung dieser Entschützungreaktion in Lösung wies auf die Bildung von Carbaminsäuren als Zwischenprodukte bei der Abspaltreaktion hin, wodurch ungewöhnlich lange Entschützungzeiten für Alloose-haltige Oligomere resultierten. Es konnte gezeigt werden, dass die Nebenprodukte durch Verlängerung der Reaktionszeit ebenfalls in die gewünschten Oligomere überführt werden und dadurch bei ausreichend langer Reaktionszeit für die Gesamtausbeute unproblematisch sind.

#### 11.4.4 Nachweis der Bedeutung freier Aminogruppen für die Bindung an RNA

Um die Bedeutung der Aminogruppen für die Bindung von Zuckerdiaminosäureoligomeren an RNA nachzuweisen wurde die Glucoseeinheit von Tetramer **81** - durch Austausch der Aminogruppe an C-6 gegen ein Azid - modifiziert (siehe Abbildung 11.11). Durch den Austausch der Aminogruppe stieg der  $IC_{50}$ -Wert wie erwartet um einen Faktor von etwa 40 von zuvor 11  $\mu\text{M}$  auf 460  $\mu\text{M}$ . Diese Werte zeigen erstmals, dass die freien Aminogruppen - und damit vermutlich auch das Prinzip der elektrostatischen Komplementarität - auch bei Zuckerdiaminosäureoligomeren von entscheidender Bedeutung für die Bindung an RNA sind.

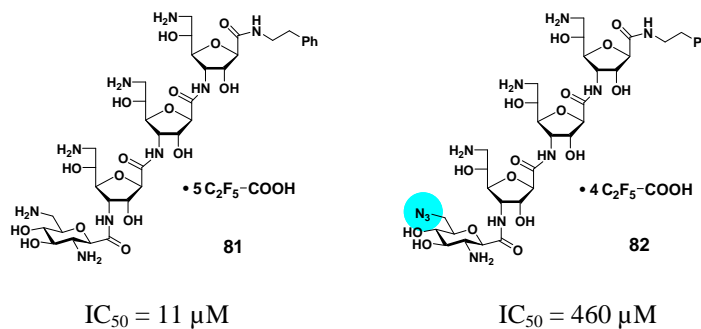


Abb. 11.11: Bedeutung freier Aminogruppen für die Bindung an RNA.

#### 11.4.3 Leitstrukturen und Bindungsaffinitäten der synthetisierten Oligomere

Fünf der insgesamt neun in dieser Arbeit synthetisierten Oligomere zeigten bei RNA-Bindungsassays eine Aktivität im untersuchten Konzentrationsbereich. Während bei den beiden getesteten Trimeren keinerlei messbare Aktivität beobachtet werden konnte, ließen sich bei fünf der sieben getesteten Tetramere  $IC_{50}$ -Werte in einem Bereich zwischen 11  $\mu\text{M}$  und 460  $\mu\text{M}$  messen. Dabei zeigte Oligomer **81** mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 11  $\mu\text{M}$  die besten RNA-Bindungseigenschaften. Eine Gegenüberstellung aller 25 in der Arbeitsgruppe Wittmann synthetisierten Oligomere und ihrer Ergebnisse bei RNA-Bindungsassays geben die Übersichtstabellen am Ende von Kapitel 10.2.

Aus den Daten der RNA-Bindungsassays konnte gefolgert werden, dass die Bindungsaffinität der Tetramere maßgeblich durch Position und Art des zuletzt angeknüpften Bausteins beeinflusst wird. Zudem weisen sowohl die Beobachtungen während der Synthese der Oligomere in Lösung als auch die Daten der biologischen Untersuchungen daraufhin, dass Zuckerdiaminosäureoligomere bevorzugte räumliche Strukturen ausbilden.

Anhand der vorliegenden Daten der RNA-Bindungsstudien ließ sich eine neue potentielle Leitstruktur aus drei (3→1)-amidverknüpften Alloseinheiten für die Synthese aktiver Oligomere identifizieren, welche allein in drei der fünf aktiven Tetramere aus dieser Arbeit

enthalten war. Damit stehen nun zwei Leitstrukturen für die Synthese von Zuckerdiaminosäureoligomeren als RNA-Liganden zur Verfügung (siehe Abbildung 11.12).

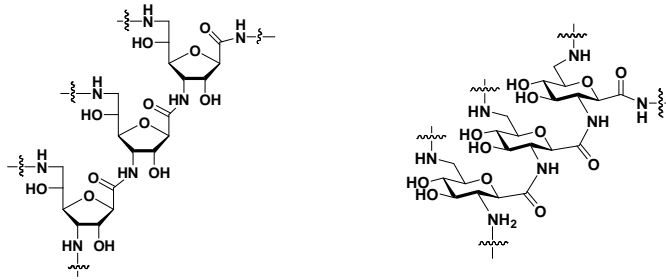


Abb. 11.12: Allose- und Glucoseleitstruktur für die Synthese aktiver Zuckerdiaminosäureoligomere.

Unter allen bislang synthetisierten Oligomeren wurde lediglich eine Verbindung mit einem FDA  $IC_{50}$ -Wert  $< 100 \mu\text{M}$  synthetisiert, welche nicht eines dieser beiden Leitmotive enthielt. Für vier der 25 in der AG Wittmann synthetisierten und getesteten Oligomere sind Vergleiche mit den Bindungsaffinitäten der anderen Oligomere nur bedingt möglich, da sie lediglich bei Konzentrationen bis zu einem  $IC_{50}$ -Wert von  $5 \mu\text{M}$  getestet wurden.

Acht der übrigen 21 Oligomere haben FDA  $IC_{50}$ -Werte zwischen  $0.75$  und  $100 \mu\text{M}$ . Die restlichen 13 Oligomere zeigen FDA  $IC_{50}$ -Werte  $> 100 \mu\text{M}$  (für 4 der getesteten Verbindungen liegt der FDA  $IC_{50}$ -Wert sogar nachweislich oberhalb  $1000 \mu\text{M}$ ).

Diese grosse Spanne zwischen den gemessenen FDA  $IC_{50}$ -Werten ist ein klares Indiz dafür, dass die Bindung der Zuckerdiaminosäureoligomere spezifischer Natur ist.

## 12 Experimenteller Teil

### 12.1 Allgemeines

Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach literaturbekannten Methoden gereinigt, bzw. absolutiert.<sup>198,199</sup> Lösungsmittel für die Flash-Chromatographie wurden vor Gebrauch destilliert. Es wurde Petrolether mit einem Siedebereich bis 80 °C benutzt.

Die präparativen säulenchromatographischen Trennungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei einem Überdruck von 0.3 bar mit Flash-Kieselgel 60 (200-400 mesh) durchgeführt.

Die analytische Dünnschichtchromatographie wurde auf „Aluminiumfolien Kieselgel 60, F<sub>254</sub>“ der Firma Merck durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption oder durch Eintauchen in eines der folgenden Färbereagenzien und Erhitzen mit einem Heißluftfön:

- 15 %ige Schwefelsäure
- „Mostain“, eine ethanolische Lösung aus Ammoniummolybdat (20g) und Cer(IV)sulfat (0,4g) in 10 %iger Schwefelsäure (400ml)
- 1 %ige Ninhydrinlösung in Ethanol

Die Kernresonanzspektren wurden an folgenden Geräten aufgenommen:

- Bruker AC 250 (250 MHz für <sup>1</sup>H-Spektren und 100 MHz für <sup>13</sup>C-Spektren)
- Bruker DRX 600 (600 MHz für <sup>1</sup>H-Spektren und 150 MHz für <sup>13</sup>C-Spektren)

Als Standard diente bei den Messungen das jeweilige Lösemittelsignal.

CDCl<sub>3</sub>:  $\delta_{\text{H}} = 7.26$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 77.00$  ppm; d<sub>4</sub>-MeOH:  $\delta_{\text{H}} = 3.31$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 49.05$  ppm; d<sub>6</sub>-Aceton:  $\delta_{\text{H}} = 2.05$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 30.83$  ppm; d<sub>6</sub>-DMSO:  $\delta_{\text{H}} = 2.50$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 39.43$  ppm; D<sub>2</sub>O:  $\delta_{\text{H}} = 4.79$  ppm; CD<sub>3</sub>CN:  $\delta_{\text{H}} = 1.94$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 1.24$  ppm.

Bei <sup>13</sup>C-Spektren von Zuckerdiaminosäureoligomeren wurde das Carbonylsignal der Pentafluorpropionsäure bei 163.40 ppm zur Referenzierung der <sup>13</sup>C-Spektren herangezogen.

Die Zuordnung der Signale wurde durch mehrdimensionale Techniken (COSY, HMQC, HSQC, ROESY, NOESY und HMBC) oder durch Einstrahlexperimente gesichert. Die chemischen Verschiebungen werden im Folgenden in ppm ( $\delta$ -Skala), die Kopplungskonstanten *J* in Hertz angegeben.

Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen.

Es bedeuten: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, bd = breites Dublett, dd = Dublett eines Dubletts, t = Triplett, bt = breites Triplett, quart. = Quartett, m = Multiplett

Die Angaben entsprechen dem experimentellen Erscheinungsbild und nicht unbedingt der theoretisch zu erwartenden Multiplizität.

MALDI-Massenspektren wurden mit einem Bruker Biflex III Spektrometer aufgenommen. Dabei wurde im positiven Modus mit einem gepulsten Stickstofflaser (Wellenlänge 337 nm) gearbeitet. Als Matrizen wurden wahlweise  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymtsäure (CHCA), Ferulasäure (FA) oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) verwendet. Zur Probenpräparation wurden je 0.6  $\mu$ l einer Acetonitrillösung der Matrix (20 mg/ml) und einer Lösung der Probe (0.5 mg/ml) in Acetonitril/Wasser-Gemischen zusammen auf das Target aufgetragen. Die Kalibrierung wurde mit CHCA (379.06 [M+H]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse) sowie mit einem Peptidmix aus Bradykinin 1-7 (757.40 [M+H]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse), Angiotensin II (1046.54 [M+H]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse) und Angiotensin I (1296.69 [M+H]<sup>+</sup>, monoisotopische Masse) vorgenommen.

Hochaufgelöste ESI-Massenspektren (ESI-HRMS) wurden netterweise von Reinhold Weber (AG Przybylski) auf einem Apex II-Massenspektrometer (ein FT-ICR Massenspektrometer) der Firma Bruker aufgenommen.

Routine ESI-Massenspektren wurde auf einem „esquire 3000 plus“ der Firma Bruker aufgenommen. Die regelmäßige Kalibrierung des Spektrometers wurde freundlicherweise von Mitgliedern der AG Marx übernommen.

Die IR-Spektren wurden auf einem System-2000-FT-IR-Gerät der Firma PerkinElmer aufgenommen. Die Werte der Schwingungen werden in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben.

HPLC-Trennungen wurden mit Hilfe eines HPLC-Systems der Firma Shimadzu durchgeführt. Für die Trennungen wurden Acetonitril/Wasser-Mischungen benutzt. In einigen Fällen wurde 0.1 % TFA, bzw. 0.1 % PFPA zu den Lösemitteln gegeben und dann eluiert. Einzelheiten zur Durchführung finden sich bei den Daten der mittels HPLC gereinigten Präparate.

Die Elementaranalysen (C, H und N) wurden im mikroanalytischen Labor der Universität Konstanz durchgeführt.

## 12.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

### 12.2.1 AAV 1: Abspalten einer Fmoc-Schutzgruppe in Lösung

Das geschützte Zuckerdiaminosäuremonomer oder Zuckerdiaminosäureoligomer wird mit einer 20%igen Piperidinlösung in DMF (2 ml der Piperidinlösung pro 60  $\mu$ mol des Zuckers) versetzt, durch kurze Behandlung im Ultraschallbad zur Lösung gebracht und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung fünfmal mit Toluol und zweimal mit Chloroform coevaporiert und über Nacht am Feinvakuum getrocknet. Das so gewonnene Rohprodukt kann ohne weitere Aufreinigung für die Kupplung von Bausteinen nach AAV 2 verwendet werden.

### 12.2.2 AAV 2: Kupplungen der Zuckerdiaminosäuren in Lösung

Das gemäß AAV 1 gewonnene freie Amin wird mit HATU, HOAt und der zu kuppelnden geschützten Zuckerdiaminosäure in DMF/NMP 1:1 (0.7 ml pro 60  $\mu$ mol des freienamins) gelöst, mit DIPEA versetzt und bei Raumtemperatur gerührt.\*

Die Reaktionsmischung wird mit Chloroform aufgefüllt und anschließend mit 0.1 M HCl gewaschen. Die wässrige Phase wird dreimal mit Chloroform gewaschen und die vereinigten organischen Phasen werden anschließend über  $MgSO_4$  getrocknet und *in vacuo* eingengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird in Chloroform aufgenommen, auf Kieselgel aufgezogen und anschließend mit einem geeigneten Eluenten per Flash-Chromatographie gereinigt.

*\*Die genauen Reaktionszeiten, sowie die verwendeten Mengen an HATU, HOAt, DIPEA und Zuckerdiaminosäurebausteinen, sind für jedes hergestellte Oligomer nachfolgend im Kapitel „Beschreibung der Versuche“ aufgeführt.*

### 12.2.3 AAV 3: Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen in Lösung

Das gemäß AAV 1 gewonnene freie Amin wird mit einer Mischung von TFA/ $H_2O$  93:7 (1 ml der Mischung pro 20  $\mu$ mol des freienamins) für mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt kann dabei per ESI-MS im positiven Modus verfolgt werden. Die Anwesenheit von Peaks mit Massen von  $M+44$ ,  $M+88$ ,  $M+132$  etc. zeigt, dass die Reaktion noch nicht vollständig beendet ist. Sind keine Peaks mit Massen von  $M+n\cdot44$  mehr zu erkennen, wird das Lösemittel im Stickstoffstrom ausgetrieben.

Werden nach 20 h noch immer ein oder mehrere Peaks mit Massen von  $M+n\cdot44$  in den ESI-MS Spektren detektiert, wird die Produktmischung - nach Austreiben des Lösemittels mit Stickstoff - erneut mit TFA/ $H_2O$  93:7 versetzt und solange weitergerührt, bis keine Massen von  $M+n\cdot44$  mehr detektiert werden.

Nachdem das Lösmittel mit Stickstoff ausgetrieben wurde, wird der verbleibende Rückstand in einer 0.13%igen wässrigen PFPA-Lösung aufgenommen und etwa 60 Minuten in einem Kühlschrank stengelassen. Die Lösung wird mit einem Spritzenfilter von unlöslichen Partikeln getrennt und anschließend per HPLC gereinigt (siehe AAV 10).

#### **12.2.4 AAV 4: Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe an der festen Phase**

In einer Einwegspritze mit eingesetzter Fritte lässt man das Harz 30 Minuten in DMF (0.6 ml/100 mg Harz) quellen. Man saugt ab, zieht anschließend eine 20%ige Piperidinlösung in DMF auf (0.6 ml pro 100 mg Harz) und schüttelt 20 Minuten. Es wird abgesaugt, nochmals 10 min mit der Piperidin-Lösung behandelt und anschließend zehnmal je eine Minute mit DMF (0.6 ml pro 10 mg Harz) gewaschen.

#### **12.2.5 AAV 5: Kupplungen der Zuckerdiaminosäuren an der festen Phase**

Die zu kuppelnde Zuckerdiaminosäure, HATU und HOAt werden in NMP (1 ml pro 100 mg Harz) gelöst, mit DIPEA versetzt und zu dem nach AAV4 gewonnen Harz gegeben. Die Mischung wird bei Raumtemperatur geschüttelt.\* Anschließend wird abgesaugt, das Harz zehnmal je eine Minute mit DMF und dreimal je drei Minuten mit DCM gewaschen. Zuletzt wird das Harz in einem Exsikkator am Feinvakuum getrocknet.

Die Vollständigkeit der Kupplung wird mithilfe des Kaisertests (AAV 7 a), bzw. des TNBS-Tests (AAV 7 b) überprüft.

*\*Die genauen Reaktionszeiten, sowie die verwendeten Mengen an HATU, HOAt, DIPEA und Zuckerdiaminosäurebausteinen, sind für jedes hergestellte Oligomer nachfolgend im Kapitel „Beschreibung der Versuche“ aufgeführt.*

#### **12.2.6 AAV 6: Bestimmung der Beladungsdichte**

Eine kleine Menge des nach AAV 5 behandelten und getrockneten Harzes (5-10 mg) wird mit 3 ml einer 20 %igen Piperidin-Lösung in DMF versetzt und 20 Minuten geschüttelt. Die Lösung wird verdünnt und die UV-Absorption bei 301 nm gemessen. Zur Berechnung der Beladung wurde der literaturbekannte Extinktionskoeffizient ( $\epsilon_{301}$ ) des Piperidin-Dibenzofulven-Addukts verwendet.<sup>188</sup>

$$\epsilon_{301} = 7800 \frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$$

### 12.2.7 AAV 7: Nachweis freier Aminogruppen an der festen Phase

#### a) Kaisertest<sup>189</sup>

Zur Durchführung des Kaisertests werden folgende Lösungen verwendet:

Lösung 1: 5 g Ninhydrin in 100 ml Ethanol

Lösung 2: 80 g Phenol in 20 ml Ethanol

Lösung 3: 2 ml 0.001 M  $\text{KCN}_{\text{aq}}$  in 98 ml Pyridin

Eine Spatelspitze des zu untersuchenden Harzes wird mit je drei Tropfen der Lösungen 1 bis 3 versetzt und fünf Minuten bei 90 °C im Wasserbad erwärmt. Blaufärbung der Harzkugeln zeigt freie Aminogruppen an.

#### b) TNBS-Test<sup>200</sup>

Zur Durchführung des TNBS-Tests werden zwei Lösungen hergestellt:

Lösung 1: 10 % DIPEA in DMF

Lösung 2: 1 % TNBS in DMF

Eine Spatelspitze des zu untersuchenden Harzes wird auf einem Uhrglas mit je zwei Tropfen der Lösungen 1 und 2 versetzt und fünf Minuten bei RT stehen gelassen. Die Harzkugeln werden mit DMF gewaschen und anschließend unter einem Mikroskop betrachtet. Orange-, bzw. Rotfärbung der Kugeln zeigt freie Aminogruppen an.

### 12.2.8 AAV 8: Cappen freier Aminogruppen

In einer Einwegspritze mit eingesetzter Fritte lässt man das Harz 10 min in DMF (0.6 ml pro 100 mg Harz) quellen. Man saugt ab und zieht anschließend eine 10%ige Lösung von  $\text{Ac}_2\text{O}$  in DMF (0.6 ml pro 100 mg Harz) auf. Es wird 30 Minuten geschüttelt, abgesaut und anschließend zehnmal je eine Minute mit DMF (0.6 ml pro 100 mg Harz) gewaschen.

### 12.2.9 AAV 9: Abspaltung vom Harz und Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen

Die verbleibenden Fmoc-Schutzgruppen werden nach AAV 4 entfernt. Nach Waschen mit DMF wird mit einer frisch hergestellten Lösung von TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ /TIS 90:7:3 (1 ml/100 mg Harz) für 3 Stunden geschüttelt. Die Lösung wird in einen Kolben abgesaugt und das Harz nochmals mit Abspalllösung versetzt und eine Stunde geschüttelt. Die vereinigten

Abspalllösungen werden im Stickstoffstrom von TFA befreit und anschließend zweimal mit je 1 ml Wasser lyophilisiert.

Der verbleibende Rückstand wird mit einer 0.13%igen wässrigen PFPA-Lösung aufgenommen und etwa 60 Minuten stehengelassen. Die Lösung wird im Anschluss mit einem Spritzenfilter von unlöslichen Partikeln befreit und das Produkt per HPLC aufgereinigt (siehe AAV 10).

### **12.2.10 AAV 10: HPLC-Reinigung nach Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen**

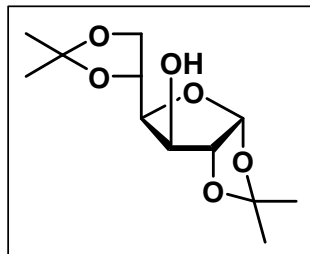
Zur Aufreinigung der Oligomere wurden zwei unterschiedliche HPLC-Methoden verwendet. Die nachfolgend aufgeführte Methode b wurde gegen Ende der Oligomersynthesen entwickelt und erwies sich bei den getesteten Oligomeren als überlegen im Vergleich zu Methode a.

a) Die nach AAV 3, bzw. nach AAV 9 entschützten Oligomere werden mithilfe einer Knauer Nucleosil C-18 Säule (analytisch: 250 mm x 4 mm, präparativ: 250 mm x 8 mm) und einem Eluenten aus Acetonitril und 0.13%iger wässriger PFPA bei einem Fluss von 1.0 ml/min (analytisch), bzw. 9.7 ml/min (präparativ) (Gradient jeweils 1-50% Acetonitril in 30 Minuten) isoliert. Der Produktpeak kann per ESI-MS (positiver Modus) identifiziert werden. Die PFPA-sauren Produktfraktionen werden vereinigt, mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert.

b) Die nach AAV 3, bzw. nach AAV 9 entschützten Oligomere werden mithilfe einer Vydac Protein & Peptide Nucleosil C-18 Säule (analytisch: 250 mm x 4 mm) und einem Eluenten aus Acetonitril und 0.13%iger wässriger PFPA bei einem Fluss von 1.0 ml/min (Gradient: 5-40% Acetonitril in 30 Minuten) isoliert. Der Produktpeak kann per ESI-MS (positiver Modus) identifiziert werden. Die PFPA-sauren Produktfraktionen werden vereinigt, mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert.

## 12.3 Beschreibung der Versuche

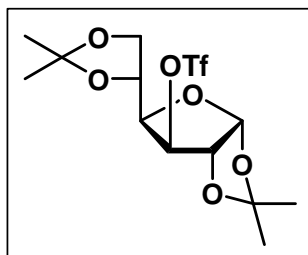
### 1,2:5,6-Di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-glucofuranose (1):



Verbindung **1** wurde nach einer Vorschrift von *Glen et al.*<sup>135</sup> hergestellt oder alternativ von der Firma Fluka bezogen und ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

Die physikalischen Daten des Produkts stimmten mit denen der Literatur überein.<sup>135</sup>

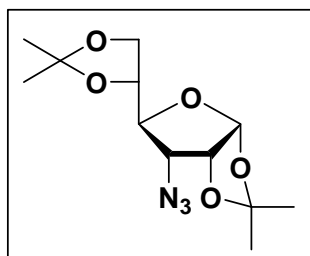
### 1,2:5,6-Di-*O*-isopropyliden-3-*O*-triflyl- $\alpha$ -D-glucofuranose (2):



Verbindung **2** wurde nach einer Vorschrift von *Gruner et al.*<sup>120</sup> hergestellt.

Die Daten des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums stimmten mit denen der Literatur überein.

### 3-Azido-3-desoxy-1,2:5,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-allofuranose (3):

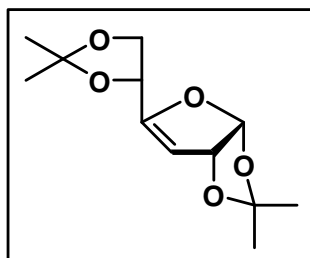


Verbindung **3** wurde nach einer Vorschrift von *Gruner et al.*<sup>120</sup> hergestellt.

Trotz mehrfacher Durchführung konnte die in der Literatur angegebene Ausbeute nicht erreicht werden. Es wurde eine maximale Ausbeute von 52 % erzielt (Literatur: 70 %).

Die Daten des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums stimmten mit denen der Literatur überein.

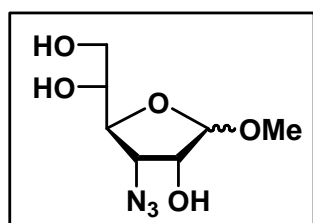
(4):



Verbindung **4** entsteht als Nebenprodukt bei der Synthese von Verbindung **3**.

Die Daten des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>120</sup>

#### Methyl-3-azido-3-desoxy-( $\alpha,\beta$ )-D-allofuranosid (**5**):

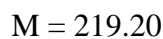
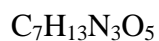


Verbindung **5** kann auf zwei unterschiedlichen Wegen dargestellt werden:

a) Verbindung **3** (857 mg, 3.0 mmol) wird in 9.3 ml abs. MeOH unter Stickstoff vorgelegt. Es werden AcCl (86  $\mu\text{l}$ , 1.2 mol, 0.4 eq.) und weitere 2.5 ml abs. MeOH zugegeben. Die schwach gelbe

Reaktionslösung wird 48 h bei RT gerührt und anschließend durch Zugabe von 170  $\mu\text{l}$  Et<sub>3</sub>N neutralisiert. Einengen *in vacuo* und anschließende säulenchromatographische Reinigung (EE/PE 3:2  $\rightarrow$  4:1) liefern **5** als farblose, kristalline Verbindung (366.6 mg, 0.964 mmol, 56 %) mit einem Isomerenverhältnis von  $\alpha:\beta = 1:3$ . Als Nebenprodukt dieser Reaktion entsteht Verbindung **6** (250.0 mg, 0.964 mmol, 32 %).

b) Verbindung **6** (69.1 mg, 0.267 mmol) wird analog zur in a) beschriebenen Synthese mit einer Lösung von AcCl in MeOH umgesetzt. Säulenchromatographische Reinigung (EE/PE 3:2  $\rightarrow$  4:1) liefert Verbindung **5** als farblose Kristalle (45.6 mg, 0.208 mmol, 78 %) mit einem Isomerenverhältnis von  $\alpha:\beta = 1:3$ .



#### Elementaranalyse:

Ber.: C 38.36 %, H 5.98 %, N 19.17 %

Gef.: C 38.50 %, H 6.05 %, N 19.01 %

DC (EE/PE 4:1):  $R_f = 0.23$  ( $\beta$ -Anomer)

$R_f = 0.18$  ( $\alpha$ -Anomer)

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH):  $\delta$  = **4.82** (d, H-1 <sub>$\alpha$</sub> ), **4.74** (s, H-1 <sub>$\beta$</sub> ), **4.22** (dd, H-2 <sub>$\alpha$</sub> ), **4.10** (d, H-2 <sub>$\beta$</sub> ), **3.92-3.97** (m, H-3 <sub>$\beta$</sub> , H-3 <sub>$\alpha$</sub> , H-4 <sub>$\beta$</sub> ), **3.90** (t, 4-H <sub>$\alpha$</sub> ), **3.75** (dd, 6-H <sub>$\beta$</sub> ), **3.56-3.63** (m, H-5 <sub>$\alpha$</sub> , H-6 <sub>$\beta$</sub> , H-6 <sub>$\alpha$</sub> , H-6' <sub>$\alpha$</sub> ), **3.51** (m, H-5 <sub>$\beta$</sub> ), **3.39** (s, (OMe) <sub>$\alpha$</sub> ), **3.32** (s, (OMe) <sub>$\beta$</sub> )

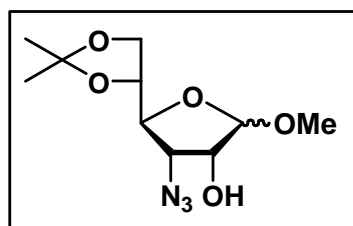
Kopplungskonstanten:

$\alpha$ -Verbindung: (J<sub>1,2</sub> = 4.4 Hz), (J<sub>2,3</sub> = 7.6 Hz), (J<sub>3,4</sub>  $\approx$  J<sub>4,5</sub> = 4.2 Hz);

$\beta$ -Verbindung: (J<sub>1,2</sub> < 1 Hz), (J<sub>2,3</sub> = 4.2 Hz), (J<sub>5,6</sub> = 3.3 Hz), (J<sub>6,6'</sub> = 11.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = **109.76** (C-1 <sub>$\beta$</sub> ), **103.64** (C-1 <sub>$\alpha$</sub> ), **83.72** (C-4 <sub>$\alpha$</sub> ), **81.65** (C-4 <sub>$\beta$</sub> ), **77.16** (C-2 <sub>$\beta$</sub> ), **75.39** (C-5 <sub>$\beta$</sub> ), **74.20** (C-2 <sub>$\alpha$</sub> ), **73.28** (C-5 <sub>$\alpha$</sub> ), **65.39** (C-3 <sub>$\beta$</sub> ), **64.82** (2 C, C-6 <sub>$\alpha$</sub> , C-6 <sub>$\beta$</sub> ), **61.60** (C-3 <sub>$\alpha$</sub> ), **55.37** ((OMe) <sub>$\beta$</sub> ), **55.31** ((OMe) <sub>$\alpha$</sub> )

### Methyl-3-azido-3-desoxy-5,6-O-isopropyliden-( $\alpha,\beta$ )-D-allofuranosid (**6**):



Verbindung **6** (250.0 mg, 0.964 mmol, 32.2 %) entsteht als Nebenprodukt bei der Synthese von Verbindung **5** aus Verbindung **3** mit einem Isomerenverhältnis von  $\alpha:\beta = 1:4.5$ .

C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

M = 259.26

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 46.33 %, H 6.61 %, N 16.21 %

Gef.: C 46.41 %, H 6.74 %, N 16.00 %

**DC** (EE/PE 2:1): R<sub>f</sub> = 0.27 ( $\beta$ -Anomer)

R<sub>f</sub> = 0.21 ( $\alpha$ -Anomer)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz):  $\delta$  **4.80** (d, H-1 <sub>$\alpha$</sub> ), **4.75** (s, H-1 <sub>$\beta$</sub> ), **4.20** (m, H-2 <sub>$\alpha$</sub> ), **4.02-4.12** (m, H-6 <sub>$\beta$</sub> , H-2 <sub>$\beta$</sub> , H-3 <sub>$\beta$</sub> , H-5 <sub>$\alpha$</sub> , H-6 <sub>$\alpha$</sub> ), **3.89-3.97** (m, H-6' <sub>$\beta$</sub> , H-5 <sub>$\beta$</sub> , H-4 <sub>$\beta$</sub> , H-3 <sub>$\alpha$</sub> , H-6 <sub>$\alpha$</sub> ), **3.84** (dd, H-4 <sub>$\alpha$</sub> ), **3.80** (m, H-6 <sub>$\alpha$</sub> ), **3.40** (s, (OMe) <sub>$\alpha$</sub> ), **3.26** (s, (OMe) <sub>$\beta$</sub> ), **1.41** (s, (CH<sub>3</sub>) <sub>$\beta$</sub> , (CH<sub>3</sub>) <sub>$\alpha$</sub> ), **1.31** (s, (CH<sub>3</sub>) <sub>$\beta$</sub> ), **1.30** (s, (CH<sub>3</sub>) <sub>$\alpha$</sub> )

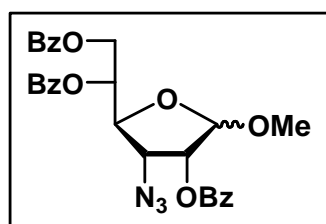
Kopplungskonstanten:

$\alpha$ -Verbindung: (J<sub>1,2</sub> = 4.5 Hz), (J<sub>3,4</sub> = 3.4 Hz), (J<sub>4,5</sub> = 5.9 Hz)

$\beta$ -Verbindung: (J<sub>1 $\beta$ ,2 $\beta$</sub>  < 1 Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 109.86$  (Dioxolan  $\underline{C}_\alpha$ ),  $109.77$  (Dioxolan  $\underline{C}_\beta$ ),  $107.83$  ( $\text{C-1}_\beta$ ),  $101.92$  ( $\text{C-1}_\alpha$ ),  $82.58$  ( $\text{C-4}_\alpha$ ),  $81.99$  ( $\text{C-4}_\beta$ ),  $77.56$  ( $\text{C-5}_\beta$ ),  $75.50$  ( $\text{C-5}_\alpha$ ),  $75.48$  ( $\text{C-2}_\beta$ ),  $72.38$  ( $\text{C-2}_\alpha$ ),  $67.67$  ( $\text{C-6}_\beta$ ),  $66.34$  ( $\text{C-6}_\alpha$ ),  $65.31$  ( $\text{C-3}_\beta$ ),  $60.95$  ( $\text{C-3}_\alpha$ ),  $55.33$  ( $(\text{OMe})_\alpha$ ),  $54.82$  ( $(\text{OMe})_\beta$ ),  $26.33$  ( $(\text{CH}_3)_\beta$ ),  $26.27$  ( $(\text{CH}_3)_\alpha$ ),  $25.03$  ( $(\text{CH}_3)_\beta$ ),  $24.61$  ( $(\text{CH}_3)_\alpha$ )

**Methyl-3-azido-2,5,6-tri-*O*-benzoyl-3-desoxy-( $\alpha,\beta$ )-D-allofuranosid (7):**



Verbindung **5** (948 mg, 4.32 mmol) wird in Pyridin (10 ml) suspendiert und anschließend mit Benzoylchlorid (2.26 ml, 19.44 mmol, 4.5 eq. pro OH-Gruppe) versetzt. Nach 12 h Rühren bei RT werden 100 ml EE zur Reaktionsmischung gegeben. Die schwerlöslichen Pyridinsalze werden abfiltriert und nochmals mit

20 ml EE gewaschen. Die organische Phase wird einmal mit 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und zweimal mit 100 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, anschließend über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, einrotiert und viermal mit Toluol coevaporiert. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 8:1  $\rightarrow$  5:1) liefert Verbindung **7** als farbloses Öl (2.05 g, 3.86 mmol, 89 %).

$\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_8$        $M = 531.51$

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 63.27 %, H 4.74 %, N 7.91 %

Gef.: C 63.13 %, H 4.86 %, N 7.76 %

DC (PE/EE 4:1):  $R_f = 0.38$

MALDI-MS (positive mode, CHCA, Dioxan):

Ber.: 554.4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  570.2  $[\text{M}+\text{K}]^+$

Gef.: 554.4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  570.3  $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.73\text{-}5.76$  (m,  $\text{H-5}_\alpha$ ,  $\text{H-5}_\beta$ ),  $5.54$  (d,  $\text{H-2}_\beta$ ),  $5.29$  (d,  $\text{H-1}_\alpha$ ),  $5.25$  (dd,  $\text{H-2}_\alpha$ ),  $5.07$  (s,  $\text{H-1}_\beta$ ),  $4.88$  (dd,  $\text{H-6}_\beta$ ),  $4.82$  (dd,  $\text{H-6}_\alpha$ ),  $4.66\text{-}4.70$  (dd,  $\text{H-6}'_\alpha$ ,  $\text{H-6}'_\beta$ ),  $4.55\text{-}4.59$  (t,  $\text{H-4}_\beta$ ,  $\text{H-3}_\alpha$ ),  $4.51$  (dd,  $\text{H-3}_\beta$ ),  $4.46$  (t,  $\text{H-4}_\alpha$ ),  $3.44$  (s,  $(\text{OMe})_\alpha$ ),  $3.34$  (s,  $(\text{OMe})_\beta$ )

Kopplungskonstanten:

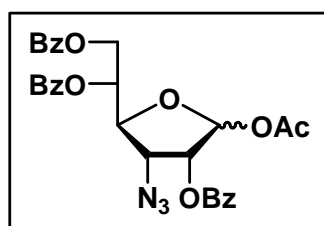
$\alpha$ -Verbindung: ( $J_{1,2} = 4.2$  Hz), ( $J_{2,3} = 7.7$  Hz), ( $J_{3,4} = 4.2$  Hz), ( $J_{5,6} = 3.4$  Hz), ( $J_{6,6'} = 12.2$  Hz)

$\beta$ -Verbindung: ( $J_{1,2} < 1$  Hz), ( $J_{2,3} = 4.7$  Hz), ( $J_{3,4} \approx J_{4,5} = 7.5$  Hz), ( $J_{5,6} = 3.1$  Hz), ( $J_{6,6'} = 12.1$  Hz)

$^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 128.13\text{-}134.26$  (36 C, 3  $\text{Ph}_\alpha$ , 3  $\text{Ph}_\beta$ ), **106.11** ( $\text{C-1}_\beta$ ), **100.93** ( $\text{C-1}_\alpha$ ), **79.71** ( $\text{C-4}_\alpha$ ), **78.76** ( $\text{C-4}_\beta$ ), **76.61** ( $\text{C-2}_\beta$ ), **73.02** ( $\text{C-2}_\alpha$ ), **72.33** ( $\text{C-5}_\beta$ ), **71.22** ( $\text{C-5}_\alpha$ ), **62.93** ( $\text{C-6}_\beta$ ), **62.70** ( $\text{C-6}_\alpha$ ), **61.75** ( $\text{C-3}_\beta$ ), **58.87** ( $\text{C-3}_\alpha$ ), **55.19** (2 C,  $(\text{OMe})_\alpha$ ,  $(\text{OMe})_\beta$ )

IR (dünnere Film auf NaCl-Fenster): **2112.6** (mittel, Azid), **1724.6** (stark, Carbonyl)

**Acetyl-3-azido-2,5,6-tri-O-benzoyl-3-desoxy-( $\alpha,\beta$ )-D-allofuranosid (8):**



Verbindung **7** (2.01 g, 3.78 mmol) wird mit 15.1 ml HOAc versetzt und 2 min im Ultraschallbad gelöst. Es werden nacheinander  $\text{Ac}_2\text{O}$  (3.55 ml) und  $c\text{-H}_2\text{SO}_4$  (990  $\mu\text{l}$ ) zur essigsaurer Lösung getropft. DC-Kontrolle nach 35 min zeigt das Ende der Reaktion an. Die Reaktionslösung wird zu 200 ml einer gesättigten  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gegeben und dreimal mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (70 ml, 50 ml, 50 ml) extrahiert. Die organischen Phasen werden mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und *in vacuo* eingedunstet. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 5:1) liefert Verbindung **8** als farbloses Öl (1.90 mg, 3.40 mmol, 90 %) mit einem Isomerenverhältnis von  $\alpha:\beta = 1:3.4$ .

Das Anomerengemisch wurde zur NMR-spektroskopischen Untersuchung mittels HPLC getrennt (Säule: Eurosphere 100 C-18,  $\varnothing$  16 mm, Firma Knauer; Gradient: MeCN/ $\text{H}_2\text{O}$  40 % - 90 % in 30 Minuten; Fluss: 9.0 ml/min;  $R_t$  ( $\alpha$ ) = 25.9 min,  $R_t$  ( $\beta$ ) = 26.5 min).

$\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_9$                       M = 559.52

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 62.25 %, H 4.50 %, N 7.51 %

Gef.: C 62.11 %, H 4.69 %, N 7.51 %

DC (PE/EE 4:1):  $R_f = 0.38$

MALDI-MS (positive mode, DHB, Dioxan):

Ber.: 582.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  598.2  $[\text{M}+\text{K}]^+$

Gef.: 582.4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  598.5  $[\text{M}+\text{K}]^+$

**NMR-Daten der  $\beta$ -Verbindung:**

$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.07\text{-}8.11$  (m, 4 H, arom.), **8.00-8.03** (m, 2 H, arom.), **7.54-7.63** (m, 3 H, arom.), **7.41-7.50** (m, 6 H, arom.), **6.34** (s, 1 H, H-1), **5.76** (m, 1 H, H-5), **5.62** (d, 1 H, H-2), **4.79** (dd, 1 H, H-6), **4.60** (dd, 1 H, H-6'), **4.50-4.56** (m, 2 H, H-4, H-3), **1.92** (s, 3 H, OAc)

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} < 1$  Hz), ( $J_{2,3} = 4.3$  Hz), ( $J_{5,6} = 3.6$  Hz), ( $J_{5,6'} = 6.4$  Hz), ( $J_{6,6'} = 12.1$  Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 168.70$  (CO),  $168.03$  (CO),  $165.51$  (CO),  $165.18$  (CO),  $133.87$ ,  $133.64$ ,  $133.27$ ,  $130.03$ ,  $129.89$ ,  $129.69$ ,  $129.45$ ,  $129.15$ ,  $128.61$ ,  $128.58$ ,  $128.50$ ,  $128.47$  (18 C, C-arom.),  $98.21$  (C-1),  $80.36$  (C-4),  $76.39$  (C-2),  $71.81$  (C-5),  $62.92$  (C-6),  $61.36$  (C-3),  $20.67$  ( $\text{CH}_3$ )

**NMR-Daten der  $\alpha$ -Verbindung:**

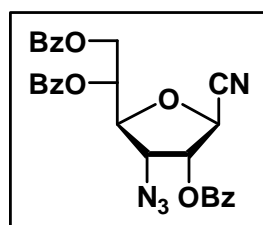
$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.01$ - $8.09$  (m, 6 H, arom.),  $7.55$ - $7.64$  (m, 3 H, arom.),  $7.43$ - $7.50$  (m, 6 H, arom.),  $6.57$  (d, 1 H, H-1),  $5.68$  (m, 1 H, H-5),  $5.45$  (dd, 1 H, H-2),  $4.76$  (dd, 1 H, H-6),  $4.63$  (dd, 1 H, H-6'),  $4.58$  (t, 1 H, H-4),  $4.54$  (dd, 1 H, H-3),  $2.14$  (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ )

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 4.4$  Hz), ( $J_{2,3} = 7.6$  Hz), ( $J_{3,4} = 4.0$  Hz), ( $J_{4,5} \approx 4.4$  Hz), ( $J_{5,6} = 3.9$  Hz), ( $J_{5,6'} = 5.5$  Hz), ( $J_{6,6'} = 12.3$  Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 169.39$  (CO),  $165.98$  (CO),  $165.35$  (CO),  $165.32$  (CO),  $133.88$ ,  $133.70$ ,  $133.36$ ,  $129.95$ ,  $129.83$ ,  $129.71$ ,  $129.34$ ,  $129.02$ ,  $128.68$ ,  $128.55$ ,  $128.43$  (18 C, C-arom.),  $93.63$  (C-1),  $82.50$  (C-4),  $72.49$  (C-2),  $71.19$  (C-5),  $62.78$  (C-6),  $58.68$  (C-3),  $21.04$  ( $\text{CH}_3$ )

**(3-Azido-2,5,6-tri-*O*-benzoyl-3-desoxy- $\beta$ -D-allofuranosyl)cyanid (9):**



Verbindung **8** (331 mg, 591  $\mu\text{mol}$ ) wird in 12 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst, mit  $\text{TMSCN}$  (369  $\mu\text{l}$ , 2.95 mmol, 5 eq.) versetzt und 10 min bei RT gerührt. Anschließend wird  $\text{SnCl}_4$  (1 M in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) (650  $\mu\text{l}$ , 650  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq.) zugegeben und auf 60 °C erwärmt. Nach 4 h wird die Reaktionslösung zu 60 ml einer gesättigten  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gegeben und dreimal mit je 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Anschließende säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 5:1) liefert Verbindung **9** (202 mg, 384  $\mu\text{mol}$ , 64 %) als farbloses Öl.

$\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_7$

$M = 526.50$

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 63.87 %, H 4.21 %, N 10.64 %

Gef.: C 63.20 %, H 4.49 %, N 10.04 %

DC (PE/EE 5:1):  $R_f = 0.33$

ESI-HRMS (positive mode, MeOH):

Ber.: 549.1386  $[M+Na]^+$

Gef.: 549.1367  $[M+Na]^+$

MALDI-MS (positive mode, DHB, Dioxan):

Ber.: 549.2  $[M+Na]^+$  565.2  $[M+K]^+$

Gef.: 549.2  $[M+Na]^+$  565.2  $[M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.02\text{-}8.11$  (m, 6 H, arom.), **7.43-7.51** (m, 9 H, arom.), **5.83** (dd, H-2), **5.76** (m, H-5), **4.86** (d, H-1), **4.78** (dd, H-6), **4.65-4.69** (m, H-6', H-3), **4.45** (t, H-4)

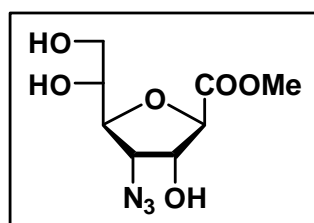
Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 3.8$  Hz), ( $J_{2,3} = 5.2$  Hz), ( $J_{3,4} \approx J_{4,5} \approx 6.4$  Hz), ( $J_{5,6} = 3.8$  Hz), ( $J_{6,6'} = 12.3$  Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 165.96$  (CO), **165.49** (CO), **165.15** (CO), **134.27**, **133.75**, **133.38**, **130.08**, **129.90**, **129.69**, **129.28**, **128.85**, **128.75**, **128.60**, **128.52**, **127.79** (18 C, C-arom.), **115.28** (CN), **80.91** (C-4), **76.10** (C-2), **71.00** (C-5), **69.35** (C-1), **62.59** (C-6), **61.96** (C-3)

IR (dünnere Film auf NaCl-Fenster): **2115.6** (mittel, Azid), **1727.8** (stark, Carbonyl)

**(3-Azido-3-desoxy- $\beta$ -D-allofuranosyl)carbonsäuremethylester (10):**



Verbindung **9** (107 mg, 0.203 mmol) wird mit KCN (7.5 mg, 0.115 mmol, 0.6 eq.) versetzt und anschließend in 6 ml MeOH abs. unter Argon gelöst. Die Reaktionsmischung wird 17 h bei RT gerührt, anschließend auf Kieselgel aufgezogen und *in vacuo* eingeeengt.

Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 1:4  $\rightarrow$  EE/MeOH

15:1) liefert Verbindung **10** als farbloses Öl (22mg, 91  $\mu\text{mol}$ , 45 %). Als Nebenprodukt dieser Reaktion entsteht Verbindung **11** (7 mg, 31  $\mu\text{mol}$ , 15 %).

$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_6$

$M = 247.21$

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 38.87 %, H 5.30 %, N 17.00 %

Gef.: C 38.87 %, H 5.34 %, N 16.88 %

**DC** (EE/MeOH 15:1):  $R_f = 0.17$

**ESI-MS** (positive mode, MeOH):

Ber.: 270.1 [M+Na]<sup>+</sup>

Gef.: 269.9 [M+Na]<sup>+</sup>

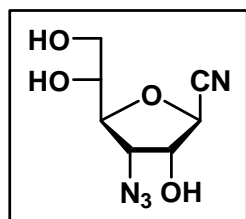
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH):  $\delta = 4.44$  (t, 1 H, H-2), **4.29** (d, 1 H, H-1), **3.96-3.98** (m, 2 H, H-3, H-4), **3.75** (bs, 4 H, OMe, H-5), **3.68** (dd, 1 H, H-6), **3.60** (dd, 1 H, H-6')

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 4.8$  Hz), ( $J_{2,3} \approx 4.8$  Hz), ( $J_{5,6} = 4.2$  Hz), ( $J_{5,6'} = 5.4$  Hz), ( $J_{6,6'} = 11.4$  Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH):  $\delta = 173.49$  (CO), **83.80** (C-4), **82.78** (C-1), **76.94** (C-2), **73.39** (C-5), **64.35** (C-3), **64.12** (C-6), **52.90** (OMe)

**(3-Azido-3-desoxy- $\beta$ -D-allofuranosyl)cyanid (11):**



Verbindung **11** (7 mg, 31  $\mu$ mol, 15 %) entsteht als Nebenprodukt bei der Synthese von Verbindung **10** aus Verbindung **9**.

$C_7H_{10}N_4O_4$

$M = 214.18$

**DC** (PE/EE 1:4):  $R_f = 0.19$

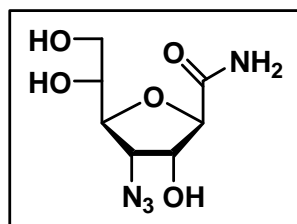
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH):  $\delta = 4.64$  (t, 1 H, H-2), **4.46** (d, 1 H, H-1), **4.16** (dd, 1 H, H-3), **3.95** (t, 1 H, H-4), **3.67** (m, 1 H, H-5), **3.61** (m, 1 H, H-6), **3.56** (dd, 1 H, H-6')

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 6.0$  Hz), ( $J_{2,3} = 5.4$  Hz), ( $J_{3,4} = 4.2$  Hz), ( $J_{4,5} \approx 4.8$  Hz), ( $J_{5,6'} = 5.4$  Hz), ( $J_{6,6'} = 11.4$  Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH):  $\delta = 118.79$  (CN), **85.28** (C-4), **77.56** (C-2), **73.04** (C-5), **71.38** (C-1), **64.14** (C-6), **64.07** (C-3)

**(3-Azido-3-desoxy-β-D-allofuranosyl)carbonsäureamid (12):**



Verbindung **12** entsteht als Nebenprodukt bei der Synthese von Verbindung **11** aus Verbindung **9** in Fällen, in denen Spuren von Wasser in der Reaktionslösung enthalten sind. Die Produktmenge hängt dabei von der Menge an Wasser in der Reaktionslösung ab.

$C_7H_{12}N_4O_5$                        $M = 232.19$

DC (EE/MeOH 9:1):  $R_f = 0.10$

ESI-MS (positive mode, MeOH):

Ber.: 255.1  $[M+Na]^+$

Gef.: 254.9  $[M+Na]^+$

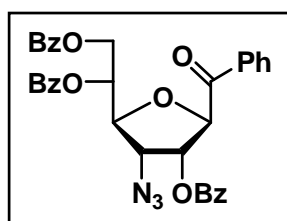
$^1H$ -NMR (600 MHz,  $d_4$ -MeOH):  $\delta = 4.37$  (m, 1 H, H-2), **4.18** (d, 1 H, H-1), **4.08** (m, 1 H, H-4), **3.91** (m, 1 H, H-5), **3.86** (t, 1 H, H-3), **3.59-3.69** (m, 2 H, H-6, H-6')

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 3.8$  Hz), ( $J_{2,3} = 5.3$  Hz), ( $J_{3,4} = 7.1$  Hz), ( $J_{4,5} = 3.7$  Hz)

$^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $d_4$ -MeOH):  $\delta = 176.10$  (CO), **84.54** (C-1), **82.97** (C-4), **77.71** (C-2), **72.68** (C-5), **63.94** (C-6), **62.19** (C-3)

**(3-Azido-2,5,6-tri-O-benzoyl-3-desoxy-β-D-allofuranosyl)phenylketon (13):**



Verbindung **9** (100 mg, 190  $\mu$ mol) wird in 8 ml  $Et_2O$  abs. gelöst, mit  $PhMgBr$  (3 M in  $Et_2O$ ) (3 eq., 495  $\mu$ mol) versetzt und 2 h bei 50 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 ml  $H_2O$  abgebrochen. Das Gemisch wird mit  $Et_2O$  (3 x 50 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $MgSO_4$  getrocknet und *in vacuo* eingedunstet. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 5:1) liefert Verbindung **13** (61 mg, 100  $\mu$ mol, 53 %) als farbloses Öl.

$C_{34}H_{27}N_3O_8$                        $M = 605.59$

Elementaranalyse:

Ber.: C 67.43 %, H 4.49 %, N 6.94 %

Gef.: C 66.90 %, H 4.77 %, N 7.27 %

**MALDI-MS** (positive mode, DHB, Dioxan): Ber.: 628.2 [M+Na]<sup>+</sup> 644.1 [M+K]<sup>+</sup>  
 Gef.: 628.2 [M+Na]<sup>+</sup> 644.2 [M+K]<sup>+</sup>

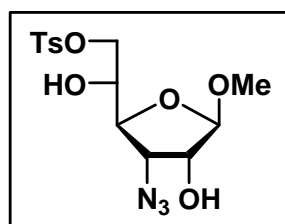
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = **7.95-8.13** (m, 8 H, arom.), **7.41-7.63** (m, 12 H, arom.), **5.98** (dd, H-2), **5.83** (m, H-5), **5.52** (d, H-1), **4.78** (dd, H-6), **4.67** (dd, H-6'), **4.57** (dd, H-4), **4.46** (dd, H-3)

Kopplungskonstanten:

(J<sub>1,2</sub> = 2.3 Hz), (J<sub>2,3</sub> = 5.1 Hz), (J<sub>3,4</sub> = 8.0 Hz), (J<sub>4,5</sub> = 6.4 Hz), (J<sub>5,6</sub> = 3.4 Hz), (J<sub>5,6'</sub> = 5.9 Hz), (J<sub>6,6'</sub> = 12.2 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = **194.40** (CO-Keton), **166.11** (CO), **165.65** (CO), **165.51** (CO), **128.45-134.20** (24 C, C-arom.), **83.07** (C-1) **79.67** (C-4), **75.68** (C-2), **71.81** (C-5), **63.19** (C-6), **62.74** (C-3)

**Methyl-3-azido-3-desoxy-6-O-tosyl-β-D-allofuranosid (14):**



Das β-Anomer von Verbindung **5** (277 mg, 1.26 mmol) wird mehrere Tage über Phosphorpentoxid im Feinvakuum getrocknet und anschließend in Pyridin (5 ml) unter Argon gelöst. Die Lösung wird mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt und anschließend mit Tosylchlorid (336 mg, 1.76 mmol, 1.4 eq.) versetzt. Nach 20 h wird *in vacuo* eingengt und viermal mit Toluol coevaporiert. Der gelartige Rückstand wird in EE aufgenommen und auf 2 g Kieselgel aufgezogen. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 8:1 → 4:1) liefert Verbindung **14** als orangefarbenes Öl (376 mg, 1.12 mmol, 89 %).

C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S      M = 373.38

**Elementaranalyse:** Ber.: C 45.03 %, H 5.13 %, N 11.25 %  
 Gef.: C 45.12 %, H 5.24 %, N 11.21 %

**DC** (PE/EE 2:1): R<sub>f</sub> = 0.63

**ESI-MS** (positive mode, MeOH): Ber.: 396.1 [M+Na]<sup>+</sup> 412.1 [M+K]<sup>+</sup>  
 Gef.: 395.8 [M+Na]<sup>+</sup> 411.8 [M+K]<sup>+</sup>

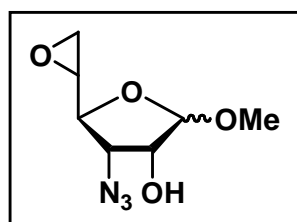
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-Aceton):  $\delta$  = **7.81-7.84** (bd, 2 H, *Ts*), **7.47-7.49** (bd, 2 H, *Ts*), **4.80** (d, 1 H, OH an C-5), **4.74** (s, 1 H, H-1), **4.72** (d, 1 H, OH an C-2), **4.26** (dd, 1 H, H-6), **4.17** (m, 1 H, H-2), **4.07** (dd, 1 H, H-6'), **3.92-3.95** (m, 2 H, H-3; H-4), **3.76** (m, 1 H, H-5), **3.37** (s, 3 H, OMe), **2.45** (s, 3 H, CH<sub>3</sub><sup>Ts</sup>)

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} < 1$  Hz), ( $J_{OH,2} = 4.7$  Hz), ( $J_{OH,5} = 5.9$  Hz), ( $J_{5,6} = 2.7$  Hz), ( $J_{5,6'} = 6.7$  Hz), ( $J_{6,6'} = 10.3$  Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, d<sub>6</sub>-Aceton):  $\delta$  = **146.85**, **134.98**, **131.79**, **129.74** (6 C, *Ts*), **110.52** (C-1), **81.69** (C-4), **77.77** (C-2), **73.95** (C-6), **73.55** (C-5), **66.08** (C-3), **56.09** (OMe), **22.48** (CH<sub>3</sub><sup>Ts</sup>)

### Methyl-5,6-anhydro-3-azido-3-desoxy- $\beta$ -D-allofuranosid (15):



Verbindung **15** entsteht als Nebenprodukt bei der Synthese von Verbindung **14** aus Verbindung **5**. Die Produktmenge ist abhängig von der Reaktionszeit und der Qualität des verwendeten Pyridins.

C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

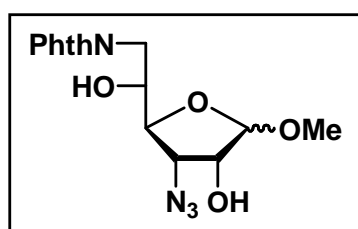
M = 201.18

DC (PE/EE 2:1): R<sub>f</sub> = 0.73

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = **4.85** (s, 1 H, H-1), **4.17** (bs, 1 H, H-2), **4.07** (m, 1 H, H-3), **3.88** (m, 1 H, H-4), **3.37** (s, 3 H, OMe), **3.09** (m, 1 H, H-5), **2.91** (m, 1 H, H-6), **2.69** (m, 1 H, H-6')

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH):  $\delta$  = **107.97** (C-1), **81.15** (C-4), **75.68** (C-2), **64.21** (C-3), **55.24** (OMe), **52.27** (C-5), **46.29** (C-6)

### Methyl-3-azido-3,6-didesoxy-6-phthalimido-( $\alpha,\beta$ )-D-allofuranosid (16):



Verbindung **16** kann auf zwei unterschiedlichen Wegen dargestellt werden:

a) Verbindung **5** (9.94 g, 45.35 mmol) wird in 210 ml frisch destilliertem Pyridin gelöst und mit einem Eisbad gekühlt. Die

fahlgelbe Lösung wird mit Tosylchlorid (12.10 g, 63.44 mmol, 1.4 eq.) versetzt und 20 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird *in vacuo* eingengt und dreimal mit Toluol coevaporiert. Der verbleibende orangefarbene Sirup wird in 550 ml EE und 500 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen, in einen Scheidetrichter überführt und ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird viermal mit EE (500 ml, 3 x 300 ml) gewaschen, die organischen Phasen im Anschluss vereinigt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und *in vacuo* eingengt.

Der verbleibende Sirup wird in 250 ml frisch destilliertem DMF im Ultraschallbad gelöst und innerhalb 90 Minuten bei 100 °C zu einer Lösung aus KPhth (9.30 g, 50.21 mmol, 1.1 eq.) und 18-Krone-6 (13.11 g, 49.60 mmol, 0.99 eq. bezogen auf KPhth) getropft. Nach 7 h 30 min wird die schwarz gefärbte Lösung auf das halbe Volumen eingengt, mit saurem Ionentauscher (Amberlite IR-120 H<sup>+</sup>) bis zu einem pH-Wert von 7 versetzt und anschließend am Feinvakuum zur Trockne eingengt. Der verbleibende Rückstand wird in 500 ml EE im Ultraschallbad suspendiert und mit 500 ml 0.1 M HCl gewaschen. Die wässrige Phase wird dreimal mit EE (je 500 ml) gewaschen, die vereinigten organischen Phasen anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und *in vacuo* eingengt.

Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 2:1 → PE/EE 1:1) liefert Verbindung **16** (10.60 g, 30.43 mmol, 67 %) als farbloses Öl.

In den NMR Spektren sind auch nach der säulenchromatographischen Reinigung noch Verunreinigungen durch unerwünschte Nebenprodukte zu erkennen, die sich nur mit Hilfe einer HPLC von den gewünschten Produkten abtrennen lassen.

b) Verbindung **17** (109mg, 196 µmol) wird in 5 ml MeOH p.a. im Ultraschallbad gelöst und im Abstand von je 2 Stunden mit 40, 30, 25 und 20 µl einer 0.5 M NaOMe-Lösung versetzt. Die Lösung wird 24 h bei RT gerührt und dann mit saurem Ionentauscher (Amberlite IR-120 H<sup>+</sup>) bis pH 7 versetzt. Anschließend wird der Ionentauscher abfiltriert und die Lösung *in vacuo* eingengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 1:1) liefert Verbindung **16** (57 mg, 162 µmol, 83 %) als farbloses Öl.

Das Anomerengemisch wurde zur NMR-spektroskopischen Untersuchung mittels HPLC getrennt (Säule: Eurosphere 100 C-18, Firma Knauer; Gradient: MeCN/H<sub>2</sub>O 30 % - 50 % in 12 Minuten; Fluss: 9.5 ml/min; R<sub>t</sub> (α) = 8.92 min, R<sub>t</sub> (β) = 9.62).

C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>            M = 348.31

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 51.72 %, H 4.63 %, N 16.09 %

Gef.: C 51.66 %, H 4.70 %, N 15.92 %

DC (PE/EE 1:2):  $R_f = 0.51$

MALDI-MS (positive mode, CHCA, Acetonitril): Ber.: 371.1  $[M+Na]^+$  387.1  $[M+K]^+$   
Gef.: 371.2  $[M+Na]^+$  387.2  $[M+K]^+$

**NMR-Daten der  $\beta$ -Verbindung:**

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $d_4$ -MeOH):  $\delta = 7.85-7.89$  (m, 2 H, *Phth*),  $7.78-7.84$  (m, 2 H, *Phth*),  $4.74$  (s, 1 H, H-1),  $4.10$  (m, 1 H, H-2),  $3.92-3.97$  (m, 3 H, H-3, H-4, H-6),  $3.79-3.84$  (m, 2 H, H-5, H-6'),  $3.37$  (s, 3 H, OMe)

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} < 1$  Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $d_4$ -MeOH):  $\delta = 170.03$  (2 C, CO, *Phth*),  $135.34$ ,  $133.50$ ,  $124.12$ , (6 C, *Phth*),  $110.01$  (C-1),  $83.55$  (C-4),  $76.97$  (C-2),  $72.62$  (C-5),  $66.31$  (C-3),  $55.49$  (OMe),  $43.25$  (C-6)

**NMR-Daten der  $\alpha$ -Verbindung:**

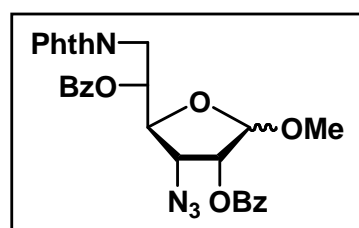
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $d_4$ -MeOH):  $\delta = 7.86-7.88$  (m, 2 H, *Phth*),  $7.79-7.82$  (m, 2 H, *Phth*),  $4.80$  (d, 1 H, H-1),  $4.25$  (dd, 1 H, H-2),  $3.98$  (dd, 1 H, H-3),  $3.95$  (m, 1 H, H-5),  $3.82$  (dd, 1 H, H-4),  $3.78-3.80$  (bd, 2 H, H-6, H-6'),  $3.38$  (s, 3 H, OMe)

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 4.4$  Hz), ( $J_{2,3} = 7.6$  Hz), ( $J_{3,4} = 3.6$  Hz), ( $J_{4,5} = 5.7$  Hz), ( $J_{5,6} \approx 6.5$  Hz), ( $J_{5,6'} \approx 12.6$  Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $d_4$ -MeOH):  $\delta = 169.91$  (2 C, CO, *Phth*),  $135.36$ ,  $133.45$ ,  $124.13$ , (6 C, *Phth*),  $103.90$  (C-1),  $84.71$  (C-4),  $74.02$  (C-2),  $70.08$  (C-5),  $62.15$  (C-3),  $55.36$  (OMe),  $42.08$  (C-6)

**Methyl-3-azido-2,5-di-O-benzoyl-3,6-dideoxy-6-phthalimido-( $\alpha,\beta$ )-D-allofuranosid (17):**



Verbindung **17** kann auf zwei unterschiedlichen Wegen dargestellt werden:

a) Verbindung **16** (1.05 g, 3.02 mmol) wird in Pyridin (20 ml) gelöst und anschließend mit Benzoylchlorid (1.19 ml, 10.25 mmol, 1.7 eq. pro OH-Gruppe) versetzt. Nach 19 h Rühren bei RT wird *in vacuo* eingengt,



$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 167.7$  (2 C, CO, *Phth*), **166.0** (CO, *Bz*), **165.4** (CO, *Bz*), **134.05**, **133.65**, **133.36**, **131.87**, **129.99**, **129.88**, **129.17**, **128.94**, **128.55**, **128.42**, **123.42** (18 C, 2 *Bz*, *Phth*), **106.5** (C-1), **80.2** (C-4), **76.7** (C-2), **73.1** (C-5), **62.3** (C-3), **55.6** (OMe), **39.0** (C-6)

**NMR-Daten der  $\alpha$ -Verbindung:**

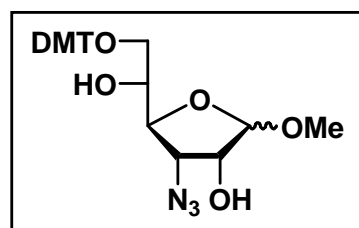
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.11-8.13$  (d, 2 H, *Bz*), **7.98-8.00** (d, 2 H, *Bz*), **7.81-7.83** (quart., 2 H, *Phth*), **7.69-7.71** (quart., 2 H, *Phth*), **7.55-7.61** (m, 2 H, *Bz*), **7.42-7.48** (m, 4 H, *Bz*) **5.66** (m, 1 H, H-5), **5.25** (d, 1 H, H-1), **5.16** (dd, 1 H, H-2), **4.34** (dd, 1 H, H-3), **4.29** (t, 1 H, H-4) **4.19** (dd, 1 H, H-6), **4.10** (dd, 1 H, H-6'), **3.47** (s, 3 H, OMe)

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 4.2$  Hz), ( $J_{2,3} = 8.0$  Hz), ( $J_{3,4} = 4.4$  Hz), ( $J_{4,5} \approx 4.9$  Hz), ( $J_{5,6} = 8.2$  Hz), ( $J_{5,6'} = 3.4$  Hz), ( $J_{6,6'} = 14.6$  Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 167.9$  (2 C, CO, *Phth*), **168.1** (2 C, CO, *Bz*), **134.12**, **133.62**, **133.47**, **131.83**, **130.08**, **129.86**, **129.06**, **128.81**, **128.54**, **123.50** (18 C, 2 *Bz*, *Phth*), **101.3** (C-1), **80.7** (C-4), **73.1** (C-2), **71.4** (C-5), **59.2** (C-3), **55.6** (OMe), **38.5** (C-6)

**Methyl-3-azido-3-desoxy-6-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-( $\alpha,\beta$ )-D-allofuranosid (18):**



Verbindung **18** entsteht als Zwischenprodukt bei der Eintopf-Synthese von Verbindung **20** aus Verbindung **5**. Verbindung **18** wurde MALDI-spektroskopisch nachgewiesen und direkt weiter umgesetzt.

$\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7$

$M = 521.56$

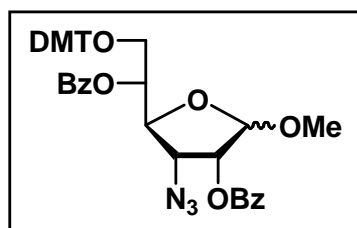
DC (EE/PE 5:1):  $R_f = 0.79$

MALDI-MS (positive mode, CHCA, Acetonitril):

Ber.: 544.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  560.2  $[\text{M}+\text{K}]^+$

Gef.: 544.4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  560.4  $[\text{M}+\text{K}]^+$

**Methyl-3-azido-2,5-di-O-benzoyl-3-desoxy-6-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-( $\alpha,\beta$ )-D-allofuranosid (19):**



Verbindung **19** entsteht als Zwischenprodukt bei der Synthese von Verbindung **20** aus Verbindung **5**. Verbindung **19** wurde MALDI-spektroskopisch nachgewiesen und direkt weiter umgesetzt.

$C_{42}H_{39}N_3O_9$

$M = 729.77$

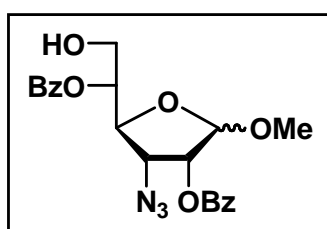
DC (EE/PE 1:3):  $R_f = 0.29$

MALDI-MS (positive mode, CHCA, Acetonitril):

Ber.: 752.3  $[M+Na]^+$  768.2  $[M+K]^+$

Gef.: 752.4  $[M+Na]^+$  768.4  $[M+K]^+$

**Methyl-3-azido-2,5-di-O-benzoyl-3-desoxy-( $\alpha,\beta$ )-D-allofuranosid (20):**



Verbindung **5** (852 mg, 2.986 mmol) wird in 25 ml Pyridin gelöst und mit Hilfe eines Eis-/Acetonbads auf  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Es wird DMTCI (1.35 g, 4.03 mmol, 1.35 eq.) zugegeben, die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und 18 h gerührt.

Die Lösung wird erneut auf  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt, anschließend mit Benzoylchlorid (1.06 g, 876  $\mu\text{l}$ , 7.54 mmol, 2.6 eq.) versetzt, 2 h bei  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend auf RT erwärmt. Dünnschichtchromatographische Kontrolle zeigt das Ende der Reaktion nach 6 h an. Die Reaktionslösung wird *in vacuo* eingengt, zweimal mit Toluol coevaporiert, in 70 ml  $\text{CHCl}_3$  aufgenommen und mit 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Die wässrige Phase wird anschließend zweimal mit  $\text{CHCl}_3$  (60 ml, 60 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, *in vacuo* eingengt und über Nacht im Feinvakuum getrocknet. Der verbleibende wachsartige Feststoff wird in 55 ml MeOH aufgenommen und in einem Eisbad gekühlt (!). Im Anschluss wird  $\text{AcCl}$  (328 mg, 298  $\mu\text{l}$ , 4.18 mmol, 1.4 eq.) langsam zugetropft und das Eisbad nach 20 min entfernt. Dünnschichtchromatographische Kontrolle zeigt das Ende der Reaktion nach 1 h bei RT an. Die Reaktionslösung wird mit  $\text{Et}_3\text{N}$  neutralisiert und *in vacuo* eingengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 4:1) liefert Verbindung **20** (1.12 g, 2.61 mmol, 87 %) als fahlgelbes Öl mit einem Isomerenverhältnis von  $\alpha:\beta = 4:1$ . Als



$C_{21}H_{21}N_3O_7$  M = 427.41

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 59.01 %, H 4.95 %, N 9.83 %

Gef.: C 58.94 %, H 4.90 %, N 9.85 %

DC (PE/EE 5:2):  $R_f = 0.34$

**MALDI-MS** (positive mode, DHB, Acetonitril):

Ber.: 450.1  $[M+Na]^+$  466.1  $[M+K]^+$

Gef.: 450.2  $[M+Na]^+$  466.2  $[M+K]^+$

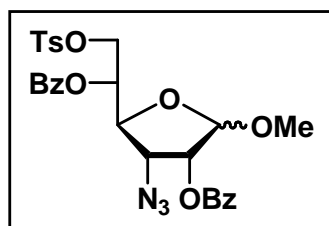
**$^1H$ -NMR** (600 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 8.07$ - $8.09$  (d, 2 H, Bz), **7.56-7.61** (quart, 4 H, Bz) **7.43-7.48** (quart, 4 H, Bz), **5.48** (d, 1 H, 2-H,  $J_{2,3} = 5.0$  Hz), **5.03** (s, 1 H, 1-H), **4.63** (dd, 1 H, 6-H), **4.49** (dd, 1 H, 6'-H), **4.44** (dd, 1 H, 3-H), **4.39** (t, 1 H, 4-H), **4.10** (m, 1 H, 5-H), **3.45** (s, 3 H, OMe)

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} < 1$  Hz), ( $J_{2,3} = 5.0$  Hz), ( $J_{3,4} = 6.8$  Hz), ( $J_{4,5} \approx 6.7$  Hz), ( $J_{5,6} = 3.7$  Hz), ( $J_{5,6'} = 6.3$  Hz), ( $J_{6,6'} = 11.8$  Hz)

**$^{13}C$ -NMR** (150 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 166.8$  (CO, Bz), **165.5** (CO, Bz), **133.5**, **133.29**, **129.92**, **129.71**, **129.52**, **128.93**, **128.49**, **128.43** (12 C, 2 Bz), **106.5** (C-1), **81.6** (C-4), **77.0** (C-2), **71.5** (C-5), **66.0** (C-6), **61.5** (C-3), **55.7** (OMe)

**Methyl-3-azido-2,5-di-O-benzoyl-3-desoxy-6-O-tosyl-( $\alpha,\beta$ )-D-allofuranosid (22):**



Verbindung **20** (59.8 g, 139.9 mmol) wird in 1400 ml Pyridin im Ultraschallbad gelöst und mit einem Eisbad gekühlt. Es wird Tosylchlorid (74.7 g, 391.7 mmol, 2.8 eq.) zur Zuckerlösung gegeben und 64 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird *in vacuo* eingedunstet und zweimal mit Toluol coevaporiert.

Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 3:1  $\rightarrow$  PE/EE 5:2  $\rightarrow$  PE/EE  $\rightarrow$  2:1) liefert Verbindung **22** als orange-rosa Schaum (71.0 g, 122.1 mmol, 87 %).

$C_{28}H_{27}N_3O_9S$  M = 581.59

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 57.82 %, H 4.68 %, N 7.22 %

Gef.: C 57.85 %, H 4.63 %, N 7.21 %

DC (PE/EE 2:1):  $R_f = 0.50$

MALDI-MS (positive mode, CHCA, Acetonitril): Ber.: 604.1  $[M+Na]^+$  620.1  $[M+K]^+$   
 Gef.: 604.3  $[M+Na]^+$  620.3  $[M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8.11-8.13$  (d, 2  $\text{H}_\alpha$ , H-arom.), **8.06-8.08** (d, 2  $\text{H}_\beta$ , H-arom.), **7.97-7.99** (d, 2  $\text{H}_\beta$ , 2  $\text{H}_\alpha$ , H-arom.), **7.74-7.77** (t, 2  $\text{H}_\beta$ , 2  $\text{H}_\alpha$ , H-arom.), **7.58-7.63** (q, 2  $\text{H}_\beta$ , 2  $\text{H}_\alpha$ , H-arom.), **7.43-7.50** (m, 4  $\text{H}_\beta$ , 4  $\text{H}_\alpha$ , H-arom.), **5.44** (d, H-2 $_\beta$ ), **5.31-5.36** (m, H-5 $_\alpha$ , H-5 $_\beta$ ), **5.20** (d, H-1 $_\alpha$ ), **5.10** (dd, H-2 $_\alpha$ ), **4.98** (s, H-1 $_\beta$ ) **4.47** (dd, H-6 $_\beta$ ), **4.39-4.44** (m, H-6' $_\beta$ , H-6 $_\alpha$ , H-4 $_\beta$ ), **4.37** (dd, H-6 $_\alpha$ ), **4.27-4.30** (m, H-3 $_\beta$ , H-3 $_\alpha$ , H-4 $_\alpha$ ), **3.43** (s, (OMe) $_\alpha$ ), **3.29** (s, (OMe) $_\beta$ ), **2.35** (s, (CH $_3^{\text{Ts}}$ ) $_\alpha$ ), **2.33** (s, (CH $_3^{\text{Ts}}$ ) $_\beta$ )

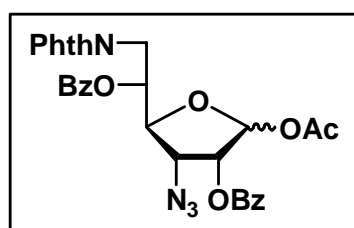
Kopplungskonstanten:

$\alpha$ -Verbindung: ( $J_{1,2} = 4.3$  Hz), ( $J_{2,3} = 7.5$  Hz), ( $J_{5,6'} = 4.1$  Hz), ( $J_{6,6'} = 11.3$  Hz)

$\beta$ -Verbindung: ( $J_{1,2} < 1$  Hz), ( $J_{2,3} = 4.8$  Hz), ( $J_{5,6} = 3.0$  Hz), ( $J_{6,6'} = 11.3$  Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 165.7$  (CO,  $Bz_\alpha$ ), **165.34** (CO,  $Bz_\beta$ ), **165.32** (CO,  $Bz_\beta$ ), **165.2** (CO,  $Bz_\alpha$ ), **127.9-145.1** (36 C, 2  $Bz_\alpha$ , 2  $Bz_\beta$ ,  $Ts_\alpha$ ,  $Ts_\beta$ ), **106.4** (C-1 $_\beta$ ), **101.2** (C-1 $_\alpha$ ), **79.3** (C-4 $_\alpha$ ), **78.0** (C-4 $_\beta$ ), **76.8** (C-2 $_\beta$ ), **73.0** (C-2 $_\alpha$ ), **72.5** (C-5 $_\beta$ ), **70.9** (C-5 $_\alpha$ ), **67.8** (C-6 $_\beta$ ), **67.4** (C-6 $_\alpha$ ), **62.4** (C-3 $_\beta$ ), **59.5** (C-3 $_\alpha$ ), **55.63** (OMe $_\alpha$ ), **55.56** (OMe $_\beta$ ), **21.59** ((CH $_3^{\text{Ts}}$ ) $_\alpha$ ), **21.57** ((CH $_3^{\text{Ts}}$ ) $_\beta$ )

### Acetyl-3-azido-2,5-di-O-benzoyl-3,6-didesoxy-6-phthalimido-( $\alpha,\beta$ )-D-allofuranosid (23):



Verbindung **22** (56.68 g, 101.85 mmol) wird mit 435 ml HOAc (75 eq.) versetzt und im Ultraschallbad gelöst. Es werden nacheinander 115 ml  $\text{Ac}_2\text{O}$  (12 eq) und 32 ml  $c\text{-H}_2\text{SO}_4$  (6 eq) zur essigsauren Lösung gegeben. DC-Kontrolle nach 40 min zeigt das Ende der Reaktion an. Nach insgesamt 55 min wird die

Reaktionslösung in 5 Portionen aufgeteilt. Jede Portion wird wie nachfolgend beschrieben behandelt: Die stark saure Reaktionslösung wird langsam in ein 5 Liter Becherglas zu einer Mischung aus 1660 ml sat.  $\text{NaHCO}_3$ , 310 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 700 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und 320 g Eis gegeben und 30 min gerührt (Achtung starkes Schäumen!). Die wässrige Phase wird dekantiert und viermal mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gewaschen. Die verbleibende organische Phase wird mit  $\text{H}_2\text{O}$  (1000 ml) gewaschen und die wässrige Phase im Anschluss viermal mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und *in vacuo* eingeeengt.







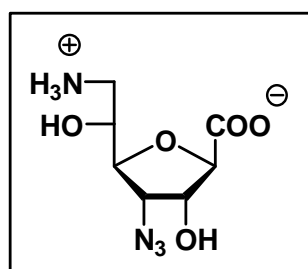
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = **7.96-8.09** (2 d, 4 H, *Bz*), **7.65-7.80** (2 quart, 4 H, *Phth*), **7.50-7.61** (2 t, 2 H, *Bz*), **7.37-7.48** (2 t, 4 H, *Bz*), **5.89** (dd, 1 H, H-2), **5.77** (m, 1 H, H-5), **4.75** (d, 1 H, H-1), **4.47** (dd, 1 H, H-3), **4.36** (t, 1 H, H-4) **4.29** (dd, 1 H, H-6), **4.21** (dd, 1 H, H-6')

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2}$  = 2.6 Hz), ( $J_{2,3}$  = 5.0 Hz), ( $J_{3,4}$  = 7.6 Hz), ( $J_{4,5}$   $\approx$  6.3 Hz), ( $J_{5,6}$  = 8.3 Hz), ( $J_{5,6'}$  = 3.2 Hz), ( $J_{6,6'}$  = 14.7 Hz)

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = **171.9** (CO<sub>2</sub>H), **168.1** (2 C, CO, *Phth*), **166.0** (CO, *Bz*), **165.4** (CO, *Bz*), **134.07**, **133.78**, **133.38**, **131.78**, **130.04**, **129.86**, **129.01**, **128.59**, **128.56**, **128.42**, **123.48** (18 C, 2 *Bz*, *Phth*), **81.3** (C-4), **80.6** (C-1), **75.9** (C-2), **71.8** (C-5), **62.7** (C-3), **38.6** (C-6)

**(3-Azido-3,6-dideoxy-6-amino- $\beta$ -D-allofuranosyl)carbonsäure (26):**



Verbindung **26** kann auf zwei unterschiedlichen Wegen dargestellt werden:

a) Verbindung **25** (152.7 mg, 267.6  $\mu$ mol) wird auf einem Schüttler in 2.7 ml i-PrOH/H<sub>2</sub>O 6:1 gelöst. Es wird NaBH<sub>4</sub> (50.8 mg, 5 eq.) zugegeben und über Nacht gerührt. Am nächsten Morgen zeigt sich ein gelartiger Feststoff am Boden des Kolbens. Die Reaktionsmischung wird mit HOAc bis zu einem pH von 4.75 versetzt, woraufhin erneut eine klare Lösung entsteht. Die Lösung wird nachfolgend auf 80 °C erwärmt, 2h 30min gerührt und im Anschluss *in vacuo* eingengt. Säulenchromatographische Reinigung mit RP-18 Kieselgel (reines H<sub>2</sub>O) ergibt einen rein weißen Feststoff, der sich aus der gewünschten Zuckeraminosäure und NaOAc zusammensetzt und sich mittels RP-Säulenchromatographie nicht reinigen lässt. Die Ausbeute wird durch Berechnung der Integrale unter den NMR-Signalen von NaOAc und des anomeren Zuckerprotons abgeschätzt. Es ergibt sich eine Ausbeute von 62 % (39 mg, 165.9  $\mu$ mol).

b) Verbindung **25** (1.4 g, 2.54 mmol) wird in 42.4 ml EtOH (97 %) im Ultraschallbad gelöst und anschließend mit 21.2 ml Hydrazinhydrat versetzt. Die Lösung wird in ein 80 °C warmes Ölbad gebracht, 7 min gerührt und anschließend *in vacuo* bis zur Trockne eingengt. Der verbleibende weiße, wachsartige Feststoff wird in wenig Wasser gelöst und mit reinem Wasser über eine Umkehrphasenfiltriersäule vorgereinigt. Das Filtrat wird einrotiert, erneut in



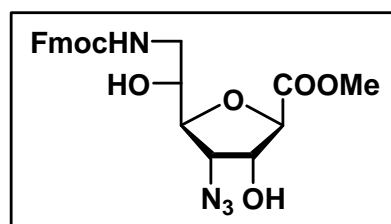
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, D<sub>2</sub>O/d<sub>3</sub>-MeCN 1:3):  $\delta$  = **7.79-7.81** (bd, 2 H, *Fmoc*), **7.64-7.66** (bd, 2 H, *Fmoc*), **7.38-7.41** (bt, 2 H, *Fmoc*), **7.31-7.34** (bt, 2 H, *Fmoc*), **4.39** (bs, 1 H, H-2), **4.29-4.31** (m, 2 H, CH<sub>2</sub><sup>Fmoc</sup>), **4.21** (t, 1 H, CH<sup>Fmoc</sup>), **4.16** (d, 1 H, H-1), **3.95-3.99** (m, 2 H, H-4; H-5), **3.87** (t, 1 H, H-3), **3.24** (dd, 1 H, H-6), **3.12** (dd, 1 H, H-6')

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 1.7$  Hz), ( $J_{2,3} \approx J_{3,4} \approx 6.0$  Hz), ( $J_{5,6} = 4.4$  Hz), ( $J_{5,6'} = 7.5$  Hz), ( $J_{6,6'} = 13.8$  Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, D<sub>2</sub>O/d<sub>3</sub>-MeCN 1:3):  $\delta$  = **158.16** (CO, *Fmoc*), **144.99**, **141.96**, **128.69**, **128.16**, **126.19**, **120.90** (12 C, *Fmoc*), **85.16** (C-1), **82.62** (C-4), **77.18** (C-2), **70.49** (C-5), **67.39** (CH<sub>2</sub><sup>Fmoc</sup>), **60.64** (C-3), **47.88** (CH<sup>Fmoc</sup>), **43.25** (C-6)

**(3-Azido-3,6-dideoxy-6-(fluorenyl-9-methoxycarbonylamino)- $\beta$ -D-allofuranosyl)-carbonsäuremethylester (28):**



Verbindung **25** (3.00 g, 5.26 mmol) wird in 97 % EtOH (80 ml) im Ultraschallbad gelöst, schnell mit Hydrazinhydrat (40 ml, 832 mmol, 156 eq.) versetzt und 7 min bei 80 °C gerührt. Die Lösung wird an einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Rotationsverdampfer am Feinvakuum eingengt und der

verbleibende Feststoff 6 h am Feinvakuum getrocknet. Mit einer kurzen Filtriersäule (6 cm Höhe; Acetonitril  $\rightarrow$  Acetonitril/H<sub>2</sub>O 3:1) werden die aromatischen Nebenprodukte abgetrennt. Der auf diese Weise isolierte Zucker (Verbindung **26**) wird in 50 ml einer 0.22 molaren Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gelöst, mit 56 ml Aceton und FmocOSu (2.06 g, 6.02 mmol, 1.15 eq. bezogen auf Verbindung **25**) versetzt und 12 h bei RT gerührt. Die Lösung wird im Anschluss mit 1 M HCl bis pH 4 versetzt und anschließend unter langsamer Reduktion des Drucks (starkes Schäumen) *in vacuo* eingengt. Der verbleibende Feststoff wird mit einer kurzen Filtriersäule (6 cm Höhe, Acetonitril  $\rightarrow$  Acetonitril/H<sub>2</sub>O 10:1) gereinigt, in Acetonitril/H<sub>2</sub>O 1:1 aufgenommen und lyophilisiert. Das Rohprodukt (Verbindung **27**) wird im Anschluss mehrere Tage am Feinvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

Das Rohprodukt kann auf drei unterschiedlichen Wegen in den gewünschten Methylester überführt werden.

### a) Veresterung mit MeOH und saurem Ionentauscher

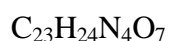
Das Rohprodukt (200 mg, 0.44 mmol (theor. bei 100 % Reinheit)) wird in MeOH (21.3 ml) im Ultraschallbad suspendiert und mit trockenem Natriumsulfat (1.3 g) versetzt. Anschließend wird Ionentauscher (Amberlite IR-120 H<sup>+</sup> stark saure Form) bis pH 0.9 zugesetzt und die Reaktionsmischung 24 h bei RT mit einem Schüttler durchmischt. Das Natriumsulfat wird mit einer Fritte abgesaugt und mehrmals mit Aceton gewaschen. Die verbleibende Lösung wird mit 350 mg Kieselgel versetzt und *in vacuo* eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 5:2 → PE/EE 3:2) liefert Verbindung **28** (145 mg, 0.31 mmol, 52 % ausgehend von Verbindung **25**) als weißen, kristallinen Feststoff.

### b) Veresterung mit MeOH, DIC und DMAP

Das Rohprodukt (127 mg, 279 µmol (theor. bei 100 % Reinheit)) wird in MeOH (5 ml) suspendiert, mit DIC (56 µl, 361 µmol, 1.3 eq.) und DMAP (24.6 mg, 201 µmol, 0.7 eq.) versetzt und 12 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird zu 30 ml einer 0.1 M HCl-Lösung gegeben und anschließend viermal mit EE extrahiert (50 ml, 3 x30 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, mit 2 g Kieselgel versetzt und *in vacuo* eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 5:2 → PE/EE 3:2) liefert Verbindung **28** (85.0 mg, 182 µmol, 48 % ausgehend von Verbindung **25**) als weißen, kristallinen Feststoff. Als Nebenprodukt dieser Reaktion entsteht DIU. Dieser lässt sich weder durch säulenchromatographische Reinigung, noch durch Umkristallisieren vom gewünschten Produkt abtrennen. Die Ausbeute wurde anhand der Integrale der Methylsignale von DIU und des Signals des anomeren Protons von Verbindung **28** im <sup>1</sup>H-NMR Spektrum bestimmt.

### c) Veresterung mit MeOH, DCC und DMAP

Das Rohprodukt (1.27 g, 2.80 mmol (theor. bei 100 % Reinheit)) wird in MeOH (53 ml) suspendiert, mit DCC (807 mg, 3.92 mmol, 1.4 eq.) und DMAP (376 mg, 3.08 mmol, 1.1 eq.) versetzt und 12 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird anschließend mit 1 M HCl neutralisiert und *in vacuo* eingeeengt. Der Rückstand wird in Aceton aufgenommen, 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt und schwerlöslicher DCU mit einer Fritte abgetrennt. Die verbleibende Lösung wird mit 3 g Kieselgel versetzt und *in vacuo* eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 5:2 → PE/EE 3:2) liefert Verbindung **28** (643 mg, 1.37 mmol, 36 % ausgehend von Verbindung **25**) als weißen, kristallinen Feststoff.



$$M = 468.46$$

ESI-HRMS (pos. Mode, MeOH/Aceton 1:1):

Ber.: 491.1543 [M+Na]<sup>+</sup>

Gef.: 491.1528 [M+Na]<sup>+</sup>

DC (PE/EE 2:3): R<sub>f</sub> = 0.28

MALDI-MS (pos. mode, CHCA, Acetonitril):

Ber.: 491.2 [M+Na]<sup>+</sup> 507.1 [M+K]<sup>+</sup>

Gef.: 491.2 [M+Na]<sup>+</sup> 507.2 [M+K]<sup>+</sup>

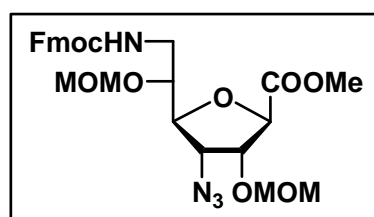
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, d<sub>6</sub>-Aceton): δ = **7.85-7.87** (bd, 2 H, *Fmoc*), **7.71-7.73** (bd, 2 H, *Fmoc*), **7.39-7.42** (bt, 2 H, *Fmoc*), **7.31-7.34** (bt, 2 H, *Fmoc*), **6.58** (bs, 0.9 H, NH), **5.19** (d, 0.8 H, OH an C-2), **4.65** (m, 1 H, H-2), **4.47** (d, 0.7 H, OH an C-5), **4.38** (d, 1 H, H-1), **4.34** (bd, 2 H, CH<sub>2</sub><sup>Fmoc</sup>), **4.24** (t, 1 H, CH<sup>Fmoc</sup>), **4.05** (t, 1 H, H-3), **4.01** (t, 1 H, H-4), **3.91** (m, 1 H, H-5), **3.73** (s, 3 H, COOMe), **3.47** (m, 1 H, H-6), **3.41** (m, 1 H, H-6')

Kopplungskonstanten:

(J<sub>1,2</sub> = 3.8 Hz), (J<sub>2,3</sub> ≈ J<sub>3,4</sub> ≈ J<sub>4,5</sub> ≈ 5.6 Hz), (J<sub>2,OH</sub> = 5.3 Hz), (J<sub>5,OH</sub> = 3.8 Hz)

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, d<sub>6</sub>-Aceton): δ = **173.71** (COOMe), **158.78** (CO, *Fmoc*), **146.15**, **143.09**, **129.50**, **128.92**, **127.15**, **121.78** (12 C, *Fmoc*), **84.94** (C-4), **83.89** (C-1), **77.79** (C-2), **72.81** (C-5), **68.14** (CH<sub>2</sub><sup>Fmoc</sup>), **64.60** (C-3), **53.67** (OMe), **49.07** (CH<sup>Fmoc</sup>), **45.62** (C-6)

**(3-Azido-3,6-dideoxy-6-(fluorenyl-9-methoxycarbonylamino)-2,5-di-O-methoxymethyl-β-D-allofuranosyl)carbonsäuremethylester (29):**



Verbindung **28** (7.87 g, 16.82 mmol) wird in 450 ml frisch absolutiertem THF im Ultraschallbad gelöst. Es werden nacheinander frisch destilliertes Formaldehyddimethylacetal (450 ml, 5.08 mol, 300 eq.) und in einer Glovebox unter Stickstoff abgewogenes Phosphorpentoxid (9.9 g) zugegeben. Dünnschichtchromatographische Kontrolle zeigt das Ende der Reaktion nach 100 min bei RT an. Die Reaktionslösung wird durch einer Fritte auf eine gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (1500 ml) filtriert und der verbleibende braune Feststoff mit Et<sub>2</sub>O gewaschen. Die wässrige Phase wird viermal mit Et<sub>2</sub>O gewaschen (je 1200 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und *in vacuo* eingengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 1:1) liefert Verbindung **29** (7.9 g, 14.2 mmol, 85 %) als farblose Kristalle.

C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>

M = 556.56

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 58.27 %, H 5.80 %, N 10.07 %

Gef.: C 58.23 %, H 5.77 %, N 10.06 %

DC (PE/EE 1:1):  $R_f = 0.47$

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA, Acetonitril):

Ber.: 579.2 [M+Na]<sup>+</sup> 595.2 [M+K]<sup>+</sup>

Gef.: 579.4 [M+Na]<sup>+</sup> 595.3 [M+K]<sup>+</sup>

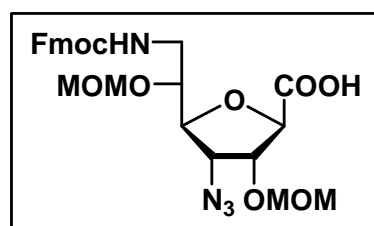
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.75-7.77$  (bd, 2 H, *Fmoc*), **7.61-7.63** (bd, 2 H, *Fmoc*), **7.38-7.41** (bt, 2 H, *Fmoc*), **7.29-7.32** (bt, 2 H, *Fmoc*), **5.62** (bs, 0.8 H, NH), **4.71-4.81** (m, 4 H, CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **4.48** (d, 1 H, H-1), **4.44** (t, 1 H, H-2), **4.41** (d, 2 H, CH<sub>2</sub><sup>Fmoc</sup>), **4.23** (t, 1 H, CH<sup>Fmoc</sup>), **4.10** (t, 1 H, H-4), **3.92** (t, 1 H, H-3), **3.81** (m, 1 H, H-5), **3.76** (s, 3 H, COOMe), **3.54** (m, 1 H, H-6), **3.45** (s, 3 H, OCH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>), **3.41** (H-6, unter OCH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>), **3.40** (s, 3 H, OCH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>)

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 4.2$  Hz), ( $J_{2,3} \approx 4.7$  Hz), ( $J_{3,4} \approx J_{4,5} \approx 5.5$  Hz)

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 170.63$  (CO<sub>2</sub>Me), **156.51** (CO, *Fmoc*), **143.99**, **141.29**, **127.63**, **126.99**, **125.08**, **119.92** (12 C, *Fmoc*), **96.96** (CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **96.33** (CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **82.60** (C-4), **80.35** (C-1), **79.57** (C-2), **77.09** (C-5), **66.72** (CH<sub>2</sub><sup>Fmoc</sup>), **62.00** (C-3), **56.11** (OCH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>), **55.94** (OCH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>), **52.52** (COOCH<sub>3</sub>), **47.23** (CH<sup>Fmoc</sup>), **41.67** (C-6)

**(3-Azido-3,6-dideoxy-6-(fluorenyl-9-methoxycarbonylamino)-2,5-di-O-methoxymethyl- $\beta$ -D-allofuranosyl)carbonsäure (30):**



Verbindung **29** (3.07 g, 5.52 mmol) wird in 70 ml Aceton im Ultraschallbad gelöst, mit 70 ml einer 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> -Lösung versetzt und 24 h bei RT gerührt. Es wird FmocOSu (185 mg, 0.1 eq.) zugegeben, weitere 2 h bei RT gerührt, anschließend mit 1 M HCl neutralisiert, mit 10 g Kieselgel versetzt und *in vacuo* eingengt. Das gewünschte Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 10:1  $\rightarrow$  4:1), getrocknet, anschließend in 750 ml CHCl<sub>3</sub> aufgenommen und mit wässriger HCl (300 ml, pH 3) gewaschen. Die wässrige Phase wird dreimal mit 350 ml CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Trocknen der vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> und anschließendes Einengen *in vacuo* liefert Verbindung **30** (2.40 g, 4.42 mmol, 80 %) als reinweißen Feststoff.

## Experimenteller Teil

---

$C_{26}H_{30}N_4O_9$              $M = 542.54$

**ESI-HRMS** (pos. Mode,  $H_2O/Dioxan$  1:3):

Ber.: 565.1910  $[M+Na]^+$

Gef.: 565.1908  $[M+Na]^+$

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 57.56 %, H 5.57 %, N 10.33 %

Gef.: C 57.50 %, H 5.65 %, N 10.26 %

**DC** (Acetonitril/ $H_2O$  7:1):  $R_f = 0.54$

**MALDI-MS** (pos. mode, FA,  $Dioxan/H_2O$  3:1):

Ber.: 565.2  $[M+Na]^+$  581.2  $[M+K]^+$

Gef.: 565.3  $[M+Na]^+$  581.2  $[M+K]^+$

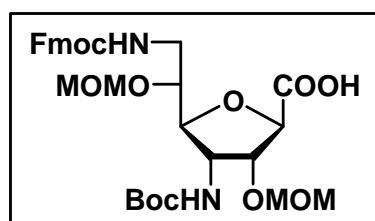
**$^1H$ -NMR** (600 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 7.85-7.87$  (bd, 2 H, *Fmoc*), **7.70-7.72** (m, 2 H, *Fmoc*), **7.39-7.42** (bt, 2 H, *Fmoc*), **7.30-7.33** (bt, 2 H, *Fmoc*), **4.81** (d, 1 H,  $CH_2^{MOM}$ ), **4.70** (d, 1 H,  $CH_2^{MOM}$ ), **4.66** (s, 2 H,  $CH_2^{MOM}$ ), **4.37** (bs, 1 H, H-2), **4.20-4.25** (m, 3 H,  $CH_2^{Fmoc}$ ,  $CH^{Fmoc}$ ), **4.17** (d, 1 H, H-1), **3.97** (t, 1 H, H-4), **3.87** (t, 1 H, H-3), **3.80** (m, 1 H, H-5), **3.35** (bs, 4 H, H-6,  $OCH_3^{MOM}$ ), **3.27** (bs, 4 H, H-6',  $OCH_3^{MOM}$ )

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 2.6$  Hz), ( $J_{2,3} \approx J_{3,4} \approx J_{4,5} \approx 6.0$  Hz)

**$^{13}C$ -NMR** (100 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 173.22$  ( $CO_2H$ ), **156.21** (CO, *Fmoc*), **143.82**, **143.73**, **140.55**, **127.45**, **126.92**, **125.27**, **119.91** (12 C, *Fmoc*), **95.30** ( $CH_2^{MOM}$ ), **94.80** ( $CH_2^{MOM}$ ), **82.79** (C-1), **80.63** (C-4), **79.73** (C-2), **75.02** (C-5), **65.51** ( $CH_2^{Fmoc}$ ), **61.83** (C-3), **55.06** ( $OCH_3^{MOM}$ ), **54.96** ( $OCH_3^{MOM}$ ), **46.54** ( $CH^{Fmoc}$ ), **40.70** (C-6)

**(3-(*tert.*-Butyloxycarbonylamino)-3,6-didesoxy-6-(fluorenyl-9-methoxycarbonylamino)-2,5-di-*O*-methoxymethyl- $\beta$ -D-allofuranosyl)carbonsäure (31):**



Verbindung **30** (73.3 mg, 135  $\mu$ mol) wird in 10 ml THF gelöst und anschließend mit BocON (53.2 mg, 216  $\mu$ mol, 1.6 eq.) versetzt. Die Mischung wird auf -30 °C gekühlt und anschließend mit einer 1 molaren Lösung von PMe<sub>3</sub> in THF (150  $\mu$ l, 1.1 eq.) versetzt. Nach 15 Minuten wird das Eisbad

entfernt und 19 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit Kieselgel versetzt und dreimal mit Toluol coevaporiert. Säulenchromatographische Reinigung (DCM/MeOH 10:1  $\rightarrow$  5:1) liefert Verbindung **31** (35 mg, 57  $\mu$ mol, 42 %) als fahlgelbes Öl.

C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>            M = 616.66

ESI-HRMS (pos. Mode, H<sub>2</sub>O/Dioxan 1:3):

Ber.: 639.2530 [M+Na]<sup>+</sup>

Gef.: 639.2519 [M+Na]<sup>+</sup>

DC (Acetonitril/H<sub>2</sub>O 7:1): R<sub>f</sub> = 0.40

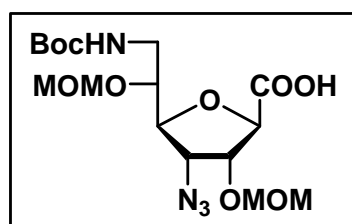
MALDI-MS (pos. mode, CHCA, Dioxan/H<sub>2</sub>O 3:1):

Ber.: 639.3 [M+Na]<sup>+</sup> 655.2 [M+K]<sup>+</sup>

Gef.: 639.3 [M+Na]<sup>+</sup> 655.2 [M+K]<sup>+</sup>

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = **156.17, 155.15** (2 C, CO, *Fmoc*, *Boc*), **143.82, 142.47, 140.57, 139.32, 137.33, 128.83, 127.48, 127.19, 126.99, 125.27, 121.29, 119.96** (12 C, *Fmoc*), **94.92** (CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **94.23** (CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **83.59** (C-1), **80.04** (C-4), **78.34** (C-2), **77.89** (CMe<sub>3</sub><sup>Boc</sup>), **74.31** (C-5), **65.42** (CH<sub>2</sub><sup>Fmoc</sup>), **55.10** (C-3), **54.79** (OCH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>), **54.74** (OCH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>), **46.63** (CH<sup>Fmoc</sup>), **39.97** (C-6), **28.08** (CH<sub>3</sub><sup>Boc</sup>)

**(3-Azido-6-(*tert.*-butyloxycarbonylamino)-3,6-didesoxy-2,5-di-*O*-methoxymehtyl- $\beta$ -D-allofuranosyl)carbonsäure (32):**



Verbindung **29** (2.02 g, 3.62 mmol) wird in 76 ml MeOH im Ultraschallbad suspendiert, mit 13.8 ml einer 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> -Lösung versetzt und 30 h bei RT gerührt. Es wird Boc<sub>2</sub>O (1.19 g, 5.44 mmol, 1.5 eq.) gelöst in 14 ml MeOH zugegeben und weitere 36 h bei RT gerührt. Anschließend wird



organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> und anschließendes Einengen *in vacuo* liefert Verbindung **30** (1.57 g, 2.55 mmol, 78 %) als reinweißen Feststoff.

C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>            M = 616.66

**ESI-HRMS** (pos. Mode, H<sub>2</sub>O/Dioxan 1:3):

Ber.: 639.2530 [M+Na]<sup>+</sup>

Gef.: 639.2524 [M+Na]<sup>+</sup>

**DC** (Acetonitril/H<sub>2</sub>O 7:1): R<sub>f</sub> = 0.47

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA, Dioxan/H<sub>2</sub>O 3:1):

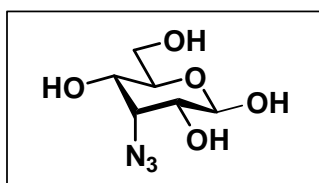
Ber.: 639.3 [M+Na]<sup>+</sup> 655.2 [M+K]<sup>+</sup>

Gef.: 639.4 [M+Na]<sup>+</sup> 655.4 [M+K]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = **7.87-7.89** (bd, 2 H, *Fmoc*), **7.68-7.73** (q, 2 H, *Fmoc*), **7.39-7.42** (bt, 2 H, *Fmoc*), **7.29-7.32** (bt, 2 H, *Fmoc*), **4.76** (d, 1 H, CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **4.70** (d, 1 H, CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **4.56** (d, 1 H, CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **4.51** (d, 1 H, CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **4.27-4.32** (m, 2 H, CH<sub>2</sub><sup>Fmoc</sup>), **4.20** (1 H, CH<sup>Fmoc</sup>), **4.15** (bs, 2 H, H-1, H-2), **4.06** (m, 1 H, H-3), **3.94** (bd, 1 H, H-4), **3.75** (m, 1 H, H-5), **3.26** (s, 3 H, OCH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>), **3.16-3.20** (m, 4 H, H-6', OCH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>), **3.13** (m, 1 H, H-6'), **1.36** (s, 9 H, CH<sub>3</sub><sup>Boc</sup>)

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = **174.58** (CO<sub>2</sub>H), **155.73**, **155.64** (2 C, CO, *Fmoc*, *Boc*), **143.89**, **143.70**, **140.71**, **127.61**, **126.99**, **125.22**, **120.08** (12 C, *Fmoc*), **95.42** (CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **94.44** (CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **83.04** (C-1), **80.19** (C-4), **78.28** (C-2), **77.44** (CMe<sub>3</sub><sup>Boc</sup>), **74.28** (C-5), **65.54** (CH<sub>2</sub><sup>Fmoc</sup>), **54.89** (OCH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>), **54.78** (OCH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>), **53.34** (C-3), **46.62** (CH<sup>Fmoc</sup>), **40.04** (C-6), **28.24** (CH<sub>3</sub><sup>Boc</sup>)

### 3-Azido-3-desoxy-β-D-allopyranose (**34**):



Verbindung **35** (3.90 g, 10.45 mmol) wird in 20 ml MeOH p.a. gelöst und mit 2.6 ml einer 0.4 M NaOMe-Lösung in MeOH (0.1 eq.) versetzt. Nach 6 h wird Ionentauscher Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>-Form) bis zur Neutralisation zugegeben und anschließend abfiltriert. Einengen der Reaktionslösung *in vacuo* liefert Verbindung **34** als wachsartigen weißen Feststoff (1.93 g, 9.4 mmol, 90 %).

Neben der β-Pyranoseform wurden im NMR-Spektrum auch geringfügige Mengen der α-Pyranose-, sowie der α- und β-Furanoseformen detektiert.

$C_6H_{11}N_3O_5$                        $M = 205.17$

**Elementaranalyse** ( $M \cdot 0.75 H_2O$ ):                      Ber.: C 32.95 %, H 5.76 %, N 19.22 %  
 Gef.: C 33.04 %, H 5.71 %, N 19.25 %

**DC** (EE/MeOH 9:1):  $R_f = 0.33$

**MALDI-MS** (pos. mode, DHB, MeCN/H<sub>2</sub>O 1:1):                      Ber.: 206.1 [M+H]<sup>+</sup> 228.1 [M+Na]<sup>+</sup>  
 Gef.: 206.1 [M+H]<sup>+</sup> 228.1 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 4.67$  (dd, 1 H, 1-H <sub>$\beta$</sub> ),  $4.09$  (dd, 1 H, 3-H <sub>$\beta$</sub> ), **3.68-3.70** (m, 1 H, 6-H, 4-H <sub>$\beta$</sub> ), **3.56** (m, 2 H, 5-H <sub>$\beta$</sub> ), **3.52** (dd, 1 H, 6'-H <sub>$\beta$</sub> ), **3.42** (dd, 1 H, 2-H <sub>$\beta$</sub> )

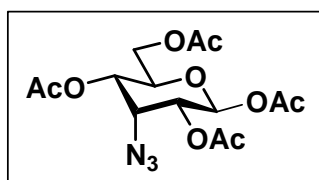
Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 8.2$  Hz), ( $J_{2,3} = 3.6$  Hz), ( $J_{3,4} \approx 3.4$  Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 92.87$  (C-1), **73.46** (C-5), **69.98** (C-2), **66.37** (C-3), **65.91** (C-4), **60.18** (C-6)

**Acetyl-2,4,6-tri-O-acetyl-3-azido-3-desoxy- $\beta$ -D-allopyranosid (35):**

Verbindung **35** kann auf zwei unterschiedlichen Wegen dargestellt werden:



a) Verbindung **3** (5.30 g, 18.57 mmol) wird in 180 ml 60%iger Ameisensäure suspendiert und 16 h bei RT gerührt. Die klare Reaktionslösung wird *in vacuo* eingeeengt und das vollständig entschützte Produkt säulenchromatographisch mit reinem EE vom formylierten Nebenprodukt getrennt. Das formylierte Nebenprodukt wird in 70 ml MeOH p.a. gelöst, mit 2.15 ml einer 0.4 M NaOMe-Lösung in MeOH versetzt und 2 h bei RT gerührt. Danach wird Ionentauscher Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>-Form) bis zur Neutralisation zugegeben und anschließend abfiltriert. Nach Einengen *in vacuo* werden die vereinigten Feststoffe in 260 ml Pyridin abs. gelöst, mit 130 ml Ac<sub>2</sub>O versetzt und über Nacht gerührt. Einengen der Reaktionslösung *in vacuo* und anschließende säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 4:1) liefert Verbindung **35** als farbloses Öl (6.31 g, 16.91 mmol, 91 %).

b) Verbindung **3** (2.18 g, 7.64 mmol) wird in 76.4 ml 2 M HCl im Ultraschallbad gelöst und 6 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird *in vacuo* eingeeengt. Das verbleibende dunkelbraune Öl wird in 110 ml Pyridin abs. im Ultraschallbad gelöst, im Anschluss mit 55



vereinigten organischen Phasen werden anschließend über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und *in vacuo* eingengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 5:1) liefert Verbindung **36** (38 mg, 111  $\mu\text{mol}$ , 22 %) als farblose Kristalle.

Als Nebenprodukt dieser Reaktion entsteht Verbindung **37** (57 mg, 168  $\mu\text{mol}$ , 33 %). Zusätzlich wird ein Teil des eingesetzten Edukts (23 mg, 62  $\mu\text{mol}$ , 12 %) zurück gewonnen.

$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_7$              $M = 340.29$

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 45.88 %, H 4.74 %, N 16.46 %

Gef.: C 45.62 %, H 4.55 %, N 16.31 %

DC (PE/EE 3:1):  $R_f = 0.34$

**MALDI-MS** (positive mode, DHB, Dioxan):

Ber.: 363.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  379.2  $[\text{M}+\text{K}]^+$

Gef.: 363.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  379.1  $[\text{M}+\text{K}]^+$

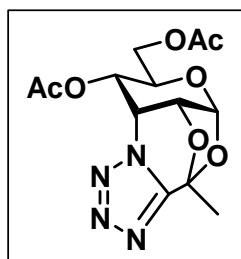
**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta =$  **5.81** (d, 1 H, H-1), **5.35** (m, 1 H, H-4), **4.69** (ddd, 1 H, H-2), **4.26** (dd, 1 H, H-6), **4.18** (dd, 1 H, H-6'), **3.97** (ddd, 1 H, H-5), **3.50** (dd, 1 H, H-3), **2.16** (s, 3 H, OAc), **2.09** (s, 3 H, OAc), **1.96** (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ )

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 5.6$  Hz), ( $J_{2,3} = 2.9$  Hz), ( $J_{2,4} = 1.0$  Hz), ( $J_{3,4} = 6.1$  Hz), ( $J_{4,5} = 6.9$  Hz), ( $J_{5,6} = 3.4$  Hz), ( $J_{5,6'} = 5.2$  Hz), ( $J_{6,6'} = 12.1$  Hz)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta =$  **170.35** (CO), **169.93** (CO), **116.39** (CN), **99.08** (Dioxolan C), **98.48** (C-1), **74.13** (C-2), **70.25** (C-5), **65.50** (C-4), **63.48** (C-6), **55.03** (C-3), **24.01** (Dioxolan  $\text{CH}_3$ ), **20.61** ( $\text{CH}_3$ ), **20.60** ( $\text{CH}_3$ )

**Tetrazol (37):**



Verbindung **35** (157 mg, 421  $\mu\text{mol}$ ) wird in 4 ml absolutem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  unter Stickstoff vorgelegt und mit  $\text{TMSCN}$  (263  $\mu\text{l}$ , 2.10 mmol, 5 eq.) versetzt. Im Anschluss wird eine 1 M  $\text{SnCl}_4$ -Lösung in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (505  $\mu\text{l}$ , 505  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) zugegeben, 2 h bei 60 °C gerührt und die dunkelbraun gefärbte Reaktionslösung anschließend zu 30 ml einer gesättigten  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gegeben. Die wässrige Phase wird dreimal mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (je 40 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden anschließend über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und *in vacuo* eingedunstet. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 2:1) liefert Verbindung **37** (93 mg, 273  $\mu\text{mol}$ , 65 %) als farblose Kristalle.

$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_7$              $M = 340.29$

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 45.88 %, H 4.74 %, N 16.46 %

Gef.: C 45.83 %, H 4.79 %, N 16.52 %

**DC** (PE/EE 2:1):  $R_f = 0.32$

**MALDI-MS** (positive mode, DHB, Dioxan):

Ber.: 363.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  379.1  $[\text{M}+\text{K}]^+$

Gef.: 363.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  379.1  $[\text{M}+\text{K}]^+$

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.73$  (d, 1 H, H-1), **5.59** (dd, 1 H, H-3), **5.08** (dd, 1 H, H-4), **4.89** (dd, 1 H, H-2), **4.28** (dd, 1 H, H-6), **4.16** (dd, 1 H, H-6'), **3.45** (m, 1 H, H-5), **2.16** (s, 3 H, OAc), **1.98** (s, 3 H, OAc), **1.95** (s, 3 H, Dioxolan  $\text{CH}_3$ )

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 3.9$  Hz), ( $J_{2,3} = 5.8$ ), ( $J_{3,4} = 3.1$  Hz), ( $J_{4,5} = 10.5$  Hz), ( $J_{5,6} = 3.9$  Hz), ( $J_{5,6'} = 2.1$  Hz), ( $J_{6,6'} = 12.4$  Hz)

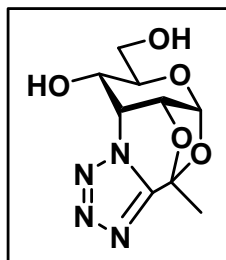
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 5.76$  (d, 1 H, H-1), **5.74** (dd, 1 H, H-3), **5.43** (dd, 1 H, H-2), **5.20** (dd, 1 H, H-4), **4.15** (dd, 1 H, H-6), **4.03** (dd, 1 H, H-6'), **3.34** (m, 1 H, H-5), **2.16** (s, 3 H, OAc), **1.98** (s, 3 H, OAc), **1.95** (s, 3 H, Dioxolan  $\text{CH}_3$ )

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 3.9$  Hz), ( $J_{2,3} = 5.6$  Hz), ( $J_{3,4} = 3.1$  Hz), ( $J_{5,6} = 4.3$  Hz), ( $J_{5,6'} = 1.5$  Hz), ( $J_{6,6'} = 12.5$  Hz)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (150 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 169.97$  (CO), **169.13** (CO), **155.20** (C-Tetrazol), **100.97** (Dioxolan C), **97.85** (C-1), **68.32** (C-2), **65.22** (C-4), **63.68** (C-5), **61.38** (C-6), **55.52** (C-3), **20.67** ( $\text{CH}_3$ ), **20.51** ( $\text{CH}_3$ ), **19.73** (Dioxolan  $\text{CH}_3$ )

**Tetrazol (38):**



Verbindung **37** (140 mg, 412  $\mu\text{mol}$ ) wird in 4.1 ml Methanol p.a. vorgelegt und mit einer 0.05 M NaOMe-Lösung (410  $\mu\text{l}$ , 0.05 eq.) versetzt. Nach 14 h wird Ionentauscher Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ -Form) bis zur Neutralisation zugegeben und anschließend abfiltriert. Einengen der Reaktionslösung *in vacuo* liefert Verbindung **38** als wachsartigen weißen Feststoff (88 mg, 345  $\mu\text{mol}$ , 84 %).

$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$                        $M = 256.22$

**Elementaranalyse** ( $M \cdot 0.25 \text{ H}_2\text{O}$ ):

Ber.: C 41.46 %, H 4.83 %, N 21.49 %

Gef.: C 41.62 %, H 5.12 %, N 21.54 %

**DC** (EE/PE 9:1):  $R_f = 0.19$

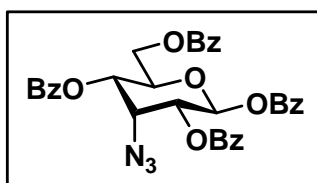
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 5.85$  (d, 1 H, H-1), **5.57** (dd, 1 H, H-3), **5.23** (dd, 1 H, H-2), **4.30** (dd, 1 H, H-4), **3.74-3.80** (m, 2 H, H-6, H-6'), **3.07** (m, 1 H, H-5), **2.07** (s, 3 H, Dioxolan  $\text{CH}_3$ )

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 3.9$  Hz), ( $J_{2,3} = 5.5$  Hz), ( $J_{3,4} = 3.0$  Hz), ( $J_{4,5} = 10.2$  Hz)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (150 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 156.41$  (Tetrazol C), **102.15** (Dioxolan C), **99.16** (C-1), **70.35** (C-2), **68.88** (C-5), **65.27** (C-4), **60.63** (C-6), **59.83** (C-3), **19.87** (Dioxolan  $\text{CH}_3$ )

**Benzoyl-3-azido-2,4,6-tri-O-benzoyl-3-desoxy- $\beta$ -D-allopyranosid (39):**

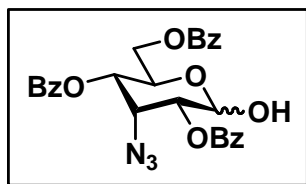


Verbindung **34** (1.01 g, 4.92 mmol) wird in 8 ml absolutem Pyridin gelöst, unter Kühlung in einem Eisbad mit Benzoylchlorid (11.4 ml, 98.5 mmol, 5 eq. pro OH-Gruppe) versetzt und 24 h bei RT gerührt.

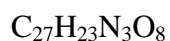
Die Reaktionslösung wird *in vacuo* eingeeignet. Der Rückstand wird in EE (160 ml) aufgenommen, nacheinander mit  $\text{H}_2\text{O}$  (80 ml) und gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (100 ml) gewaschen und anschließend über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Einengen *in vacuo* und anschließende säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 8:1  $\rightarrow$  5:1  $\rightarrow$  3:1) liefern Verbindung **39** (2.34 g, 3.78 mmol, 77 %) als farblosen Schaum.



### 3-Azido-2,4,6-tri-*O*-benzoyl-3-desoxy-( $\alpha,\beta$ )-D-allopyranose (41):



Verbindung **41** entsteht als Zwischenprodukt bei der Synthese von Verbindung **42** aus Verbindung **39**. Verbindung **41** wurde MALDI-spektroskopisch nachgewiesen.



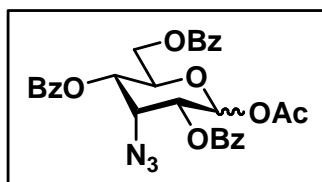
$$M = 517.49$$

**MALDI-MS** (positive mode, DHB, Dioxan):

Ber.: 540.2[M+Na]<sup>+</sup> 556.2 [M+K]<sup>+</sup>

Gef.: 540.4[M+Na]<sup>+</sup> 556.4 [M+K]<sup>+</sup>

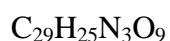
### Acetyl-3-azido-2,4,6-tri-*O*-benzoyl-3-desoxy-( $\alpha,\beta$ )-D-allopyranosid (42):



Verbindung **39** (1.54 g, 2.48 mmol) wird in 10 ml abs. DMF bei 50 °C unter Rühren gelöst. Im Anschluss wird Hydraziniumacetat (274.4 mg, 2.97 mmol, 1.2 eq.) in 2 ml abs. DMF suspendiert, zur Zuckerlösung gegeben und 3 h bei 50 °C gerührt. Die

Reaktionsmischung wird mit EE (70 ml) verdünnt und anschließend mit 50 ml Portionen gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, bis kein Salz mehr ausfällt. Die organische Phase wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, *in vacuo* eingedunstet und der entstehende Feststoff anschließend mit einer kurzen Filtriersäule gereinigt (PE/EE 3:1).

Der so gewonnene fahlgelbe Feststoff wird in 2.5 ml absolutem Pyridin gelöst, mit 2.5 ml Ac<sub>2</sub>O versetzt und 12 h bei RT gerührt. Nach Einengen der Reaktionslösung *in vacuo* wird dreimal mit Toluol coevaporiert. Anschließende säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 5:1) liefert Verbindung **42** als farblosen Schaum (565 mg, 1.01 mmol, 41 %) mit einem Isomerenverhältnis von  $\alpha:\beta = 1:3$ .



$$M = 559.52$$

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 62.25 %, H 4.50 %, N 7.51 %

Gef.: C 62.22 %, H 4.41 %, N 7.65 %

**DC** (PE/EE 3:1): R<sub>f</sub> = 0.37

**MALDI-MS** (positive mode, DHB, Dioxan):

Ber.: 582.2 [M+Na]<sup>+</sup> 598.2 [M+K]<sup>+</sup>

Gef.: 582.3 [M+Na]<sup>+</sup> 598.3 [M+K]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = **7.41-8.08** (3 m, 3 *Bz* <sub>$\alpha$</sub> , 3 *Bz* <sub>$\beta$</sub> ), **6.48** (d, H-1 <sub>$\alpha$</sub> ), **6.28** (d, H-1 <sub>$\beta$</sub> ), **5.54** (t, H-2 <sub>$\alpha$</sub> ), **5.46** (dd, H-4 <sub>$\beta$</sub> ), **5.40** (dd, H-4 <sub>$\alpha$</sub> ), **5.33** (dd, H-2 <sub>$\beta$</sub> ), **4.80** (t, H-3 <sub>$\alpha$</sub> ), **4.77** (t, H-3 <sub>$\beta$</sub> ), **4.68** (m, H-5 <sub>$\alpha$</sub> ), **4.64** (dd, H-6 <sub>$\alpha$</sub> ), **4.62** (dd, H-6 <sub>$\beta$</sub> ), **4.57** (m, H-5 <sub>$\beta$</sub> ), **4.44** (dd, H-6' <sub>$\alpha$</sub> ), **4.43** (dd, H-6' <sub>$\beta$</sub> ), **2.24** (s, 3 H, OAc <sub>$\alpha$</sub> ), **2.07** (s, 3 H, OAc <sub>$\beta$</sub> )

Kopplungskonstanten der  $\alpha$ -Verbindung:

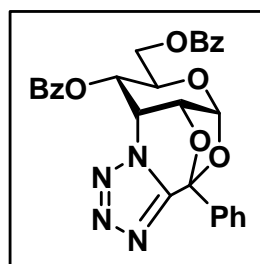
( $J_{1,2}$  = 3.8 Hz), ( $J_{2,3}$  = 3.9 Hz), ( $J_{3,4}$  = 3.4 Hz), ( $J_{4,5}$  = 10.1 Hz), ( $J_{5,6}$  = 2.4 Hz), ( $J_{5,6'}$  = 4.1 Hz)  
( $J_{6,6'}$  = 12.3 Hz)

Kopplungskonstanten der  $\beta$ -Verbindung:

( $J_{1,2}$  = 8.4 Hz), ( $J_{2,3}$  = 3.4 Hz), ( $J_{3,4}$  = 3.2 Hz), ( $J_{4,5}$  = 9.9 Hz), ( $J_{5,6}$  = 2.3 Hz), ( $J_{5,6'}$  = 4.6 Hz)  
( $J_{6,6'}$  = 12.2 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = **169.12** (CO <sub>$\alpha$</sub> <sup>Acetyl</sup>), **169.07** (CO <sub>$\beta$</sub> <sup>Acetyl</sup>), **166.11** (CO <sub>$\beta$</sub> ), **166.09** (CO <sub>$\alpha$</sub> ), **164.89** (CO <sub>$\alpha$</sub> ), **164.87** (2x CO <sub>$\beta$</sub> ), **128.39-133.89** (36 C, 3x *Bz* <sub>$\alpha$</sub> , 3x *Bz* <sub>$\beta$</sub> ), **89.99** (C-1 <sub>$\beta$</sub> ), **88.46** (C-1 <sub>$\alpha$</sub> ), **71.05** (C-5 <sub>$\beta$</sub> ), **69.75** (C-2 <sub>$\beta$</sub> ), **68.40** (C-2 <sub>$\alpha$</sub> ), **67.75** (C-4 <sub>$\beta$</sub> ), **67.21** (C-4 <sub>$\alpha$</sub> ), **66.14** (C-5 <sub>$\alpha$</sub> ), **62.84** (C-6 <sub>$\beta$</sub> ), **62.54** (C-6 <sub>$\alpha$</sub> ), **61.25** (C-3 <sub>$\beta$</sub> ), **58.88** (C-3 <sub>$\alpha$</sub> ), **20.98** ((CH<sub>3</sub>) <sub>$\alpha$</sub> ), **20.87** ((CH<sub>3</sub>) <sub>$\beta$</sub> )

#### Tetrazol (43):



Verbindung **42** (49.4 mg, 88.3  $\mu$ mol) wird in 2 ml absolutem Nitromethan unter Argon vorgelegt und mit TMSCN (111  $\mu$ l, 883  $\mu$ mol, 10 eq.) versetzt. BF<sub>3</sub>•OEt<sub>2</sub> wird alle 30 Minuten in Portionen zu je 2  $\mu$ l zugegeben, bis bei dünnschichtchromatographischer Kontrolle kein Edukt mehr zu erkennen ist. Nach Beendigung der Reaktion wird die dunkelbraun gefärbte Reaktionslösung zu 20 ml einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegeben und die wässrige Phase dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (je 30 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden im Anschluss über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und *in vacuo* eingeeignet. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 2:1) liefert Verbindung **43** (23.4 mg, 44.2  $\mu$ mol, 50 %) als fahlgelbes Öl.

C<sub>28</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>                      M = 526.50

**ESI-HRMS** (pos. mode, MeOH) :

Ber.: 565.1112 [M+K]<sup>+</sup>

Gef.: 565.1111 [M+K]<sup>+</sup>

DC (PE/EE 4:1):  $R_f = 0.28$

MALDI-MS (positive mode, DHB, Dioxan): Ber.: 549.2  $[M+Na]^+$  565.2  $[M+K]^+$   
Gef.: 549.2  $[M+Na]^+$  565.2  $[M+K]^+$

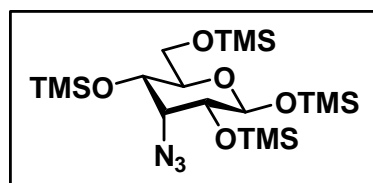
$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.41\text{-}8.17$  (4 m, 15 H, arom.), **5.94** (d, 1 H, H-1), **5.79** (dd, 1 H, H-3), **5.68** (dd, 1 H, H-4), **5.17** (dd, 1 H, H-2), **4.68** (dd, 1 H, H-6), **4.44** (dd, 1 H, H-6'), **3.86** (m, 1 H, H-5)

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 3.9$  Hz), ( $J_{2,3} = 5.8$  Hz), ( $J_{3,4} = 3.0$  Hz), ( $J_{4,5} = 10.4$  Hz), ( $J_{5,6} = 2.3$  Hz), ( $J_{5,6'} = 4.0$  Hz), ( $J_{6,6'} = 12.5$  Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 165.83$  (CO), **165.31** (CO), **155.96** (Tetrazol C) **134.13**, **133.33**, **131.83**, **130.85**, **130.30**, **129.74**, **129.32**, **128.74**, **128.62**, **128.45**, **128.36**, **126.38** (18 C, C-arom.), **102.82** (Dioxolan C), **98.55** (C-1), **69.39** (C-2), **66.39** (C-4), **64.64** (C-5), **61.94** (C-6), **56.09** (C-3)

#### Trimethylsilyl-3-azido-3-desoxy-2,4,6-tri-*O*-trimethylsilyl-( $\alpha,\beta$ )-D-allopyranosid (**44**):



Verbindung **34** (374 mg, 1.82 mmol) wird in 9.1 ml abs. DMF unter Argon vorgelegt, mit abs.  $\text{Et}_3\text{N}$  (1.13 ml, 8.03  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq. pro OH-Gruppe) versetzt und 5 min gerührt. Die schwach gelbe Reaktionslösung wird mit einem Eisbad gekühlt und anschließend frisch destilliertes  $\text{TMSCl}$  (1.03 ml, 8.03 mmol, 1.1 eq. pro OH-Gruppe) zugegeben (Rauchentwicklung). Es wird 30 min bei  $0^\circ\text{C}$  und weitere 18 h bei RT gerührt. Der Abbruch der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 50 ml Pentan und Eis. Die wässrige Phase wird viermal mit Pentan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Trocknen der organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  und einengen *in vacuo* liefert Verbindung **44** (848 mg, 1,71  $\mu\text{mol}$ , 93 %) als fahlgelbes Öl.

Im NMR-Spektrum von Verbindung **44** wurden geringfügige Verunreinigungen der korrespondierenden  $\alpha$ -Pyranose-, sowie der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Furanoseformen detektiert.

Für die Elementaranalyse wurde das Produkt zusätzlich destilliert, wobei ein farbloses Öl erhalten wurde.

$C_{18}H_{43}N_3O_5Si_4$        $M = 493.89$

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 43.77 %, H 8.78 %, N 8.51 %

Gef.: C 43.88 %, H 8.63 %, N 8.61 %

**DC** (PE/EE 20:1):  $R_f = 0.50$

**Siedepunkt:** 90 °C ( $3.0 \cdot 10^{-3}$  mbar)

**ESI-MS** (positive mode, MeOH):

Ber.: 516.2 [M+Na]<sup>+</sup> 532.2 [M+K]<sup>+</sup>

Gef.: 515.9 [M+Na]<sup>+</sup> 531.8 [M+K]<sup>+</sup>

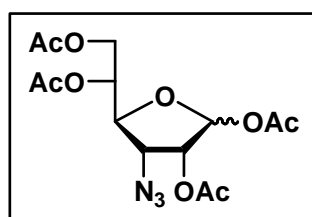
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 4.73$  (d, 1 H, H-1), **3.80** (dd, 1 H, H-4), **3.77** (t, 1 H, H-3), **3.71** (dd, 1 H, H-6), **3.64** (dd, H-6'), **3.59** (ddd, 1 H, H-5), **0.17** (s, 9 H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), **0.16** (s, 9 H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), **0.15** (s, 9 H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), **0.10** (s, 9 H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 7.3$  Hz), ( $J_{2,3} = 3.65$  Hz), ( $J_{3,4} = 3.3$  Hz), ( $J_{4,5} = 9.2$  Hz), ( $J_{5,6} = 1.8$  Hz), ( $J_{5,6'} = 4.5$  Hz), ( $J_{6,6'} = 11.0$  Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta = 95.17$  (C-1), **74.40** (C-5), **73.27** (C-2), **68.08** (C-3), **67.80** (C-4), **61.68** (C-6), **0.31** (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), **0.26** (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), **0.13** (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), **-0.47** (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

**Acetyl-2,5,6-tri-O-acetyl-3-azido-3-desoxy-( $\alpha,\beta$ )-D-allofuranosid (45):**



Verbindung **5** (271 mg, 1.24 mmol) wird in Pyridin (10 ml) gelöst, anschließend mit Ac<sub>2</sub>O (5 ml) versetzt und 12 h bei RT gerührt. Die Lösung wird *in vacuo* eingedunstet und mit Hilfe einer kurzen Kieselgelsäule (PE/EE 2:1) gereinigt. Die vereinigten

Produktphasen werden getrocknet, in einer Mischung aus HOAc (4.92 ml), Ac<sub>2</sub>O (1.29 ml) und c-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (360  $\mu$ l) gelöst und 90 min bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird anschließend zu einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegeben. Die wässrige Phase wird dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (je 30ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und *in vacuo* eingedunstet. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 2:1) liefert Verbindung **45** (386 mg, 1.03  $\mu$ mol, 83 %) als farbloses Öl mit einem Isomerenverhältnis von  $\alpha:\beta = 1:4$ .

$C_{14}H_{19}N_3O_9$

$M = 373.31$

ESI-HRMS (pos. Mode, MeOH):

Ber.: 396.1091 [M+Na]<sup>+</sup>

Gef.: 396.0990 [M+Na]<sup>+</sup>

DC (PE/EE 2:1): R<sub>f</sub> = 0.26

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = **6.37** (d, H-1<sub>α</sub>), **6.12** (s, H-1<sub>β</sub>), **5.31** (d, H-2<sub>β</sub>), **4.92-4.99** (m, H-2<sub>α</sub>, H-5<sub>β</sub>, H-5<sub>α</sub>), **4.45** (dd, H-6<sub>β</sub>), **4.38** (dd, H-6<sub>α</sub>), **4.26** (t, H-4<sub>α</sub>), **4.17-4.22** (m, H-4<sub>β</sub>, H-3<sub>α</sub>), **4.11-4.16** (m, H-3<sub>β</sub>, H-6'<sub>α</sub>), **4.08** (dd, H-6'<sub>α</sub>), **2.16** (s, OAc<sub>α</sub>, OAc<sub>β</sub>), **2.12** (s, OAc<sub>β</sub>, OAc<sub>α</sub>), **2.09** (s, OAc<sub>α</sub>), **2.08** (s, OAc<sub>β</sub>, OAc<sub>α</sub>), **2.06** (s, OAc<sub>β</sub>)

Kopplungskonstanten der α-Verbindung:

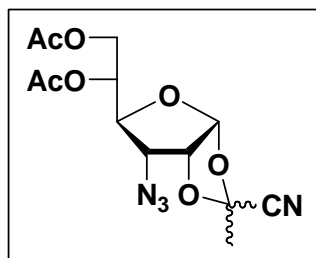
(J<sub>1,2</sub> = 4.4 Hz), (J<sub>3,4</sub> ≈ J<sub>4,5</sub> ≈ 4.3 Hz), (J<sub>5,6</sub> = 3.9 Hz), (J<sub>6,6'</sub> = 12.2 Hz)

Kopplungskonstanten der β-Verbindung:

(J<sub>1,2</sub> < 1 Hz), (J<sub>2,3</sub> = 4.9 Hz) (J<sub>3,4</sub> ≈ J<sub>4,5</sub> ≈ 7.3 Hz), (J<sub>5,6</sub> = 3.2 Hz), (J<sub>5,6'</sub> = 5.6 Hz), (J<sub>6,6'</sub> = 12.2 Hz)

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = **170.42** (CO<sub>β</sub>), **170.24** (CO<sub>α</sub>), **169.96** (2 C, CO<sub>α</sub>, CO<sub>β</sub>), **169.63** (CO<sub>α</sub>), **169.62** (CO<sub>α</sub>), **169.39** (CO<sub>β</sub>), **168.57** (CO<sub>β</sub>), **98.03** (C-1<sub>β</sub>), **93.29** (C-1<sub>α</sub>), **82.13** (C-4<sub>α</sub>), **79.80** (C-4<sub>β</sub>), **75.74** (C-2<sub>β</sub>), **71.75** (2 C, C-5<sub>β</sub>, C-2<sub>α</sub>), **70.34** (C-5<sub>α</sub>), **62.24** (C-6<sub>β</sub>), **61.97** (C-6<sub>α</sub>), **61.53** (C-3<sub>β</sub>), **58.24** (C-3<sub>α</sub>), **20.94** (OAc<sub>α</sub>), **20.89** (OAc<sub>β</sub>), **20.78** (OAc<sub>β</sub>), **20.77** (OAc<sub>α</sub>), **20.62** (OAc<sub>β</sub>), **20.56** (OAc<sub>α</sub>), **20.43** (OAc<sub>β</sub>), **20.15** (OAc<sub>α</sub>)

**5,6-Di-O-acetyl-3-azido-3-deoxy-1,2-O-(1-(*exo/endo*)-cyanoethyliden)-α-D-allofuranose (46):**



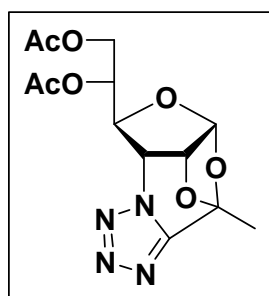
Verbindung **45** (75 mg, 201 μmol) wird in 4 ml absolutem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> unter Argon vorgelegt und mit TMSCN (150 μl, 1.20 mmol, 5 eq.) versetzt. Es wird eine 1 M SnCl<sub>4</sub>-Lösung in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 μl, 100 μmol, 0.5 eq.) zugegeben, 18 h bei RT gerührt und die dunkelbraun gefärbte Reaktionslösung anschließend zu 25 ml einer gesättigten

NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegeben. Die wässrige Phase wird dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (je 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden *in vacuo* eingedunstet, das verbleibende dunkelbraune Öl in Acetonitril (1 ml) aufgenommen und mit einem Spritzenaufsatz filtriert. Die beiden Isomere werden anschließend mit Hilfe einer HPLC getrennt. Man erhält die



$^{13}\text{C}$ -NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.44$  (CO), **169.93** (CO), **115.59** (CN), **106.11** (C-1), **104.67** (Dioxolan C), **83.60** (C-2), **76.40** (C-4), **70.18** (C-5), **62.18** (C-3), **61.86** (C-6), **20.77** ( $\text{CH}_3$ ), **20.65** ( $\text{CH}_3$ ), **20.63** ( $\text{CH}_3$ )

**Tetrazol (47):**



Verbindung **45** (81 mg, 217  $\mu\text{mol}$ ) wird in 4 ml absolutem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  unter Argon vorgelegt und mit  $\text{TMSCN}$  (136  $\mu\text{l}$ , 1.09 mmol, 5 eq.) versetzt. Es wird eine 1 M  $\text{SnCl}_4$ -Lösung in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (239  $\mu\text{l}$ , 239  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq.) zugegeben, 90 min bei 60 °C gerührt und die dunkelbraun gefärbte Reaktionslösung anschließend zu 30 ml einer gesättigten  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gegeben. Die wässrige Phase wird dreimal mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (je 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und *in vacuo* eingengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 3:2) liefert Verbindung **47** (38 mg, 112  $\mu\text{mol}$ , 52 %) als fahlgelbes Öl. Als Nebenprodukt dieser Reaktion entsteht Verbindung **48** (20 mg, 59  $\mu\text{mol}$ , 27 %).

$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_7$             M = 340.29

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 45.88 %, H 4.74 %, N 16.46 %

Gef.: C 45.80 %, H 4.76 %, N 16.48 %

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA, MeCN) :

Ber.: 363.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Gef.: 363.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**DC** (PE/EE 1:1):  $R_f = 0.28$

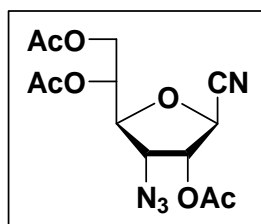
$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.84$  (d, 1 H, H-1), **5.62** (dd, 1 H, H-2), **5.41** (d, 1 H, H-3), **5.02** (m, 1 H, H-5), **4.55** (d, 1 H, H-4), **4.44** (dd, 1 H, H-6), **4.20** (dd, 1 H, H-6'), **2.19** (s, 3 H, OAc), **2.12** (s, 3 H, OAc), **2.05** (s, 3 H, Dioxolan  $\text{CH}_3$ )

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 3.9$  Hz), ( $J_{2,3} = 5.6$  Hz) ( $J_{3,4} < 1$  Hz ( $J_{4,5} = 6.5$  Hz)), ( $J_{5,6} = 3.3$  Hz), ( $J_{5,6'} = 4.6$  Hz), ( $J_{6,6'} = 12.5$  Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.24$  (CO), **169.79** (CO), **154.60** (C-Tetrazol), **103.43** (C-1), **102.79** (C-Dioxolan), **84.78** (C-4), **77.73** (C-2), **70.27** (C-5), **61.90** (C-6), **57.14** (C-3), **20.94** ( $\text{CH}_3$ ), **20.63** ( $\text{CH}_3$ ), **19.04** ( $\text{OCH}_3$ )

**2,5,6-Tri-O-acetyl-3-azido-3-desoxy-( $\beta$ )-D-allofuranosylcyanid (48):**



Verbindung **48** (20 mg, 59  $\mu\text{mol}$ , 27 %) entsteht als Nebenprodukt bei der Synthese von Verbindung **47** aus Verbindung **45**. Verbindung **48** liegt als farbloses Öl vor.

$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_7$

$M = 340.29$

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 45.88 %, H 4.74 %, N 16.46 %

Gef.: C 45.78 %, H 4.80 %, N 16.51 %

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA, MeCN) :

Ber.: 363.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Gef.: 363.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**DC** (PE/EE 3:2):  $R_f = 0.44$

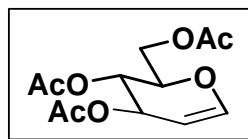
$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.55$  (dd, 1 H, H-2), **5.34** (dd, 1 H, H-5), **4.67** (d, 1 H, H-1), **4.35-4.43** (m, 2 H, H-3, H-6), **4.12-4.21** (m, 2 H, H-4, H-6'), **2.21** (s, 3 H, OAc), **2.17** (s, 3 H, OAc), **2.10** (s, 3 H, OAc)

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 3.2$  Hz), ( $J_{2,3} = 5.2$  Hz)

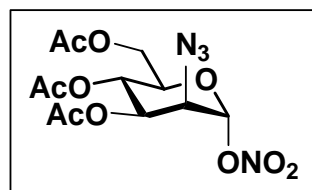
$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170.29$  (CO), **169.76** (CO), **169.38** (CO), **115.41** (CN), **80.96** (C-4), **75.82** (C-2), **69.71** (C-5), **69.32** (C-1), **61.59** (C-6), **60.75** (C-3), **20.91** ( $\text{CH}_3$ ), **20.61** ( $\text{CH}_3$ ), **20.35** ( $\text{CH}_3$ )

### 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-glucal (**49**):



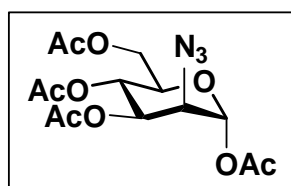
Verbindung **49** wurde nach einer Vorschrift von *Helferich et al.*<sup>201</sup> hergestellt oder alternativ von der Firma Acros bezogen und ohne weitere Reinigung umgesetzt. Die Daten des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums stimmten mit denen der Literatur überein.

### 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-1-*O*-nitro- $\alpha$ -D-mannopyranose (**50**):



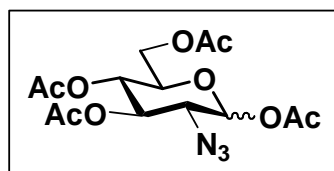
Verbindung **50** entsteht zusammen mit den korrespondierenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucoformen als Intermediat bei der Synthese von Verbindung **51** aus Verbindung **49** und bei der Synthese von Verbindung **53** aus Verbindung **49**.

### 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-mannopyranose (**51**):



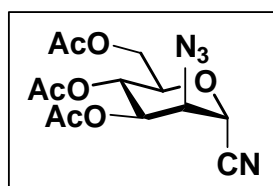
Verbindung **51** wurde nach einer Vorschrift von *Paulsen et al.*<sup>176</sup> ausgehend von Verbindung **49** synthetisiert. Die Daten des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums stimmten mit denen der Literatur überein, allerdings konnte die in der Literatur angegebene Ausbeute von 44 % nicht nachvollzogen werden. Bei den durchgeführten Versuchen wurde eine Ausbeute von 25 % erzielt. Zusätzlich zu Verbindung **51** entstanden die Glucoformen **52**. Das Verhältnis von Manno- zu Glucoform betrug 1:1 (Lit.: 2.5-3:1).

### 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-( $\alpha,\beta$ )-D-glucopyranose (**52**):



Verbindung **52** entstand bei der Synthese von Verbindung **51** aus Verbindung **49**. Die NMR-spektroskopischen Daten stimmten mit denen der Literatur überein.<sup>202</sup>

### 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-mannopyranosylcyanid (**53**):



Verbindung **53** kann auf zwei unterschiedlichen Wegen dargestellt werden:

a) Verbindung **51** (134 mg, 358  $\mu$ mol) wird in 5 ml Nitromethan abs. unter Argon gelöst und mit TMSCN (224  $\mu$ l, 1.79 mmol, 5 eq.) versetzt. Es wird eine 1 M SnCl<sub>4</sub>-Lösung in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (394  $\mu$ l, 394  $\mu$ mol, 1.1 eq.) zugegeben und 50 min bei RT gerührt. Die dunkelgelb gefärbte Reaktionslösung wird mit 130 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> verdünnt und anschließend zu 35 ml einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegeben. Die wässrige Phase wird zweimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (je 40 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 3:2) liefert Verbindung **53** (102 mg, 299  $\mu$ mol, 84 %) als fahlgelbes Öl.

b) Verbindung **50** (inkl. Nebenprodukte, 320 mg) wird unter Argon in 12 ml Nitromethan abs. gelöst und unter Rühren zunächst mit TMSCN (570  $\mu$ l, 4.25 mmol, 5 eq.) und anschließend mit einer 1 M SnCl<sub>4</sub>-Lösung in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (940  $\mu$ l, 940  $\mu$ mol, 1.1 eq) versetzt. Die Reaktionslösung wird mit 50 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und, nach Abklingen der Gasentwicklung, mit 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt. Die wässrige Phase wird fünfmal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (je 100 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und über Kieselgur filtriert. Entfernen des Lösemittels *in vacuo* und anschließende säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 4:1) liefert Verbindung **53** (60.1 mg, 0.18 mmol, 21 % bezogen auf die eingesetzte Menge an Verbindung **49**) als gelbes Öl.

C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>                      M = 214.18

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 39.25 %, H 4.71 %, N 26.16 %

Gef.: C 39.11 %, H 5.01 %, N 25.39 %

DC (PE/EE 3:2): R<sub>f</sub> = 0.44

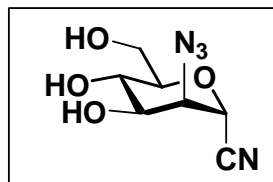
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH):  $\delta$  = **5.01** (d, 1 H, H-1), **4.14** (dd, 1 H, H-2), **3.98** (dd, 1 H, H-3), **3.86** (dd, 1 H, H-6), **3.69** (dd, 1 H, H-6'), **3.61** (t, 1 H, H-4), **3.55** (m, 1 H, H-5)

Kopplungskonstanten:

(J<sub>1,2</sub> = 1.9 Hz), (J<sub>2,3</sub> = 3.8 Hz), (J<sub>3,4</sub> = 9.1 Hz), (J<sub>4,5</sub>  $\approx$  9.3 Hz), (J<sub>5,6</sub> = 2.0 Hz), (J<sub>5,6'</sub> = 5.7 Hz), (J<sub>6,6'</sub> = 12.3 Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $d_4\text{-MeOH}$ ):  $\delta = 116.48$  (CN), **80.49** (C-5), **73.30** (C-3), **67.95** (C-4), **67.49** (C-1), **64.59** (C-2), **62.34** (C-6)

**2-Azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-mannopyranosylcyanid (54):**



Verbindung **53** (845 mg, 2.98 mmol) wird in 27 ml Methanol p.a. gelöst und anschließend mit einer 0.05 M NaOMe-Lösung (5 ml, 0.08 eq.) versetzt. Nach 90 min werden nochmals 0.6 ml der 0.05 M-Lösung zugegeben. Nach insgesamt 3 h wird Ionentauscher Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ -Form) bis zur Neutralisation zugegeben und anschließend abfiltriert. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 1:3) liefert Verbindung **54** (387 mg, 1.81 mmol, 73 %) als weißen, kristallinen Feststoff.

$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_4$                        $M = 214.18$

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 39.25 %, H 4.71 %, N 26.16 %

Gef.: C 39.11 %, H 5.01 %, N 25.39 %

**DC** (PE/EE 1:3):  $R_f = 0.29$

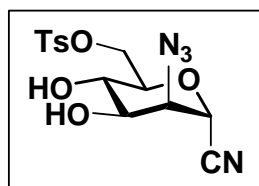
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $d_4\text{-MeOH}$ ):  $\delta = 5.01$  (d, 1 H, H-1), **4.14** (dd, 1 H, H-2), **3.98** (dd, 1 H, H-3), **3.86** (dd, 1 H, H-6), **3.69** (dd, 1 H, H-6'), **3.61** (t, 1 H, H-4), **3.55** (m, 1 H, H-5)

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 1.9$  Hz), ( $J_{2,3} = 3.8$  Hz), ( $J_{3,4} = 9.1$  Hz), ( $J_{4,5} \approx 9.3$  Hz), ( $J_{5,6} = 2.0$  Hz), ( $J_{5,6'} = 5.7$  Hz), ( $J_{6,6'} = 12.3$  Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $d_4\text{-MeOH}$ ):  $\delta = 116.48$  (CN), **80.49** (C-5), **73.30** (C-3), **67.95** (C-4), **67.49** (C-1), **64.59** (C-2), **62.34** (C-6)

**2-Azido-2-desoxy-6-O-tosyl- $\alpha$ -D-mannopyranosylcyanid (55):**



Verbindung **54** (200 mg, 935  $\mu\text{mol}$ ) wird in 10 ml Pyridin abs. gelöst und mit einem Eisbad gekühlt. Es wird Tosylchlorid (250 mg, 1.31 mmol, 1.4 eq.) zur Zuckerlösung gegeben und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird *in vacuo* eingeeignet und zweimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wird dreimal mit je 25 ml EE im Ultraschallbad suspendiert und

die organische Phase anschließend dekantiert. Der verbleibende Rückstand wird in Wasser aufgenommen und dreimal mit EE (je 50 ml) extrahiert. Die organischen Phasen werden im Anschluss vereinigt, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und *in vacuo* eingengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 1:1) liefert Verbindung **55** (312 mg, 850  $\mu\text{mol}$ , 91 %) als farbloses Öl.

$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$        $M = 368.37$

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 45.65 %, H 4.38 %, N 15.21 %

Gef.: C 45.77 %, H 4.33 %, N 15.20 %

**MALDI-MS** (pos. mode, CHCA, MeCN) :

Ber.: 391.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  407.0  $[\text{M}+\text{K}]^+$

Gef.: 391.0  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  406.9  $[\text{M}+\text{K}]^+$

**DC** (PE/EE 1:2):  $R_f = 0.53$

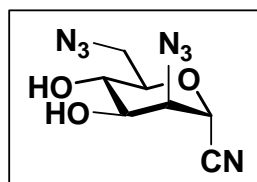
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.79\text{-}7.81$  (bd, 2 H,  $T_S$ ),  $7.35\text{-}7.37$  (d, 2 H,  $T_S$ ), **4.75** (d, 1 H, H-1), **4.44** (dd, 1 H, H-6), **4.21** (dd, 1 H, H-6'), **4.09-4.17** (m, 2 H, H-2, H-3), **3.90** (m, 1 H, H-4), **3.74** (ddd, 1 H, H-5), **2.44** (s,  $\text{CH}_3$ )

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 1.5$  Hz), ( $J_{4,5} = 9.6$  Hz), ( $J_{5,6} = 3.8$  Hz), ( $J_{5,6'} = 1.9$  Hz), ( $J_{6,6'} = 11.7$  Hz)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 145.43, 132.25, 130.00, 127.99$  (6 C,  $T_S$ ), **114.24** (CN), **75.67** (C-5), **71.84** (C-3), **67.70** (C-6), **66.38** (C-1), **66.21** (C-4), **62.01** (C-2), **21.68** ( $\text{CH}_3^{T_S}$ )

**2,6-Diazido-2,6-dideoxy- $\alpha$ -D-mannopyranosylcyanid (56):**



Verbindung **56** kann auf zwei unterschiedlichen Wegen dargestellt werden:

a) Verbindung **55** (60 mg, 163  $\mu\text{mol}$ ) wird in 2.4 ml MeCN unter Argon gelöst, anschließend mit Trimethylsilylazid (30  $\mu\text{l}$ , 228  $\mu\text{mol}$ , 1.4 eq.) und einer 1 M TBAF-Lösung in THF (225  $\mu\text{l}$ , 225  $\mu\text{mol}$ , 1.4 eq.) versetzt und 23 h bei 80 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 8 ml  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und dreimal mit EE (je 30 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und *in vacuo* eingengt.

Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 2:3) liefert Verbindung **56** (11 mg, 44  $\mu$ mol, 29 %) als farbloses Öl.

b) Verbindung **55** (75 mg, 204  $\mu$ mol) wird in 2 ml DMF unter Argon gelöst, mit Natriumazid (132 mg, 2.04 mmol, 10 eq.) versetzt und 22 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 40 ml einer gesättigten NaCl-Lösung versetzt und fünfmal mit EE (je 30 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und *in vacuo* eingengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 1:2) liefert Verbindung **56** (28 mg, 117  $\mu$ mol, 58 %) als farbloses Öl.

C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>                      M = 239.19

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 35.15 %, H 3.79 %, N 40.99 %

Gef.: C 35.55 %, H 3.81 %, N 40.88 %

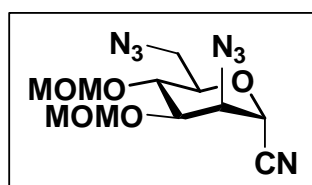
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, d<sub>6</sub>-Aceton):  $\delta$  = **5.15** (d, 1 H, H-1), **5.10** (d, 1 H, OH), **4.75** (d, 1 H, OH), **4.36** (m, 1 H, H-2), **4.08** (m, 1 H, H-3), **3.66-3.74** (m, 3 H, H-4, H-5, H-6), **3.54** (dd, 1 H, H-6')

Kopplungskonstanten:

(J<sub>1,2</sub> = 1.7 Hz), (J<sub>5,6'</sub> = 5.1 Hz), (J<sub>6,6'</sub> = 13.5 Hz)

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, d<sub>6</sub>-Aceton):  $\delta$  = **117.05** (CN), **79.58** (C-5), **74.03** (C-3), **69.35** (C-4), **68.15** (C-1), **64.80** (C-2), **52.93** (C-6)

### 2,6-Diazido-2,6-dideoxy-3,4-di-O-methoxymethyl- $\alpha$ -D-mannopyranosylcyanid (**57**):



Verbindung **56** (404 mg, 1.69 mmol) wird in 24 ml 1,2-Dichlorethan unter Argon gelöst, anschließend mit Formaldehyddimethylacetal (30 ml, 339 mmol, 200 eq.) und 1.1 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> versetzt und 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird dekantiert, mit 150 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und viermal mit Et<sub>2</sub>O (je 150 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und *in vacuo* eingengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 4:1) liefert Verbindung **57** (432 mg, 1.32 mmol, 78 %) als farbloses Öl.

C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>

M = 327.30

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 40.37 %, H 5.24 %, N 29.96 %

Gef.: C 40.41 %, H 5.28 %, N 29.91 %

DC (PE/EE 2:1):  $R_f = 0.54$

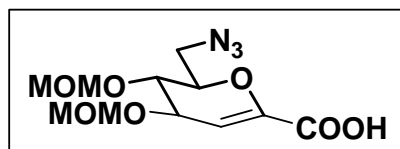
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 4.66\text{-}4.86$  (m, 5 H, 2 x  $\text{CH}_2^{\text{MOM}}$ , H-1), **4.17** (m, 1 H, H-2), **4.08** (dd, 1 H, H-3), **3.86** (t, 1 H, H-4), **3.81** (m, 1 H, H-5), **3.61** (dd, 1 H, H-6), **3.55** (dd, 1 H, H-6'), **3.45** (s, 3 H,  $\text{CH}_3^{\text{MOM}}$ ), **3.39** (s, 3 H,  $\text{CH}_3^{\text{MOM}}$ )

Kopplungskonstanten:

( $J_{2,3} = 3.6$  Hz), ( $J_{3,4} = 8.9$  Hz), ( $J_{4,5} \approx 9.2$  Hz), ( $J_{5,6} = 2.4$  Hz), ( $J_{5,6'} = 5.0$  Hz), ( $J_{6,6'} = 13.5$  Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 114.26$  (CN), **98.50** ( $\text{CH}_2^{\text{MOM}}$ ), **97.96** ( $\text{CH}_2^{\text{MOM}}$ ), **78.39** (C-3), **76.56** (C-5), **72.28** (C-4), **65.94** (C-1), **61.74** (C-2), **56.51** ( $\text{CH}_3^{\text{MOM}}$ ), **56.33** ( $\text{CH}_3^{\text{MOM}}$ ), **50.75** (C-6)

**6-Azido-2,6-dideoxy-3,4-di-O-methoxymethyl-D-arabino-hex-1-enopyranosyl carbon-säure (58):**



Verbindung **57** (79 mg, 241  $\mu\text{mol}$ ) wird mit 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  (152 mg, 482  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.) versetzt und 3 h unter Rückfluss gekocht. Die Reaktionslösung wird mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 6 eingestellt, anschließend mit 0.5 g Kieselgel versetzt und *in vacuo* eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung (DCM/MeOH 5:1) liefert Verbindung **58** (62 mg, 207  $\mu\text{mol}$ , 85 %) als farbloses Öl.

$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$        $M = 303.27$

**ESI-HRMS** (pos. Mode, MeOH):

Ber.: 326.0964  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Gef.: 326.0958  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**Elementaranalyse** ( $\text{M} \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$ ):

Ber.: C 42.31 %, H 5.81 %, N 13.46 %

Gef.: C 42.41 %, H 5.91 %, N 13.42 %

DC (DCM/MeOH 5:1):  $R_f = 0.30$

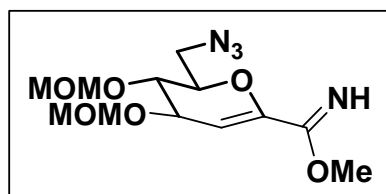
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH):  $\delta$  = **6.02** (d, 1 H, H-2), **4.83** (d, 1 H, CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **4.74-4.78** (m, 3 H, CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **4.24-4.28** (m, 2 H, H-3, H-5), **3.87** (dd, 1 H, H-4), **3.66-3.68** (m, 2 H, H-6, H-6'), **3.40** (s, 3 H, CH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>), **3.40** (s, 3 H, CH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>)

Kopplungskonstanten:

(J<sub>2,3</sub> = 3.5 Hz), (J<sub>3,4</sub> = 5.4 Hz), (J<sub>4,5</sub> = 6.6 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH):  $\delta$  = **168.80** (COOH), **147.44** (C-1), **107.30** (C-2), **97.86** (CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **96.92** (CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **77.69** (C-5), **73.76** (C-4), **73.67** (C-3), **56.46** (CH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>), **56.10** (CH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>), **51.20** (C-6)

**Methyl-C-(6-Azido-2,6-dideoxy-3,4-di-O-methoxymethyl-D-arabino-hex-1-enopyranosyl)formimidat (59):**



Verbindung **57** (78 mg, 238  $\mu$ mol) wird in 3.4 ml MeOH/THF 1:1 gelöst, anschließend mit einer 1 M NaOH-Lösung (700  $\mu$ l, 700  $\mu$ mol, 2.9 eq.) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 0.1 M HCl neutralisiert, anschließend mit 0.5 g Kieselgel versetzt und *in vacuo* eingeeengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 2:1) liefert Verbindung **59** (44 mg, 153  $\mu$ mol, 64 %) als farbloses Öl.

C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>            M = 316.31

**ESI-HRMS** (pos. Mode, MeOH):

Ber.: 339.1281 [M+Na]<sup>+</sup>

Gef.: 339.1280 [M+Na]<sup>+</sup>

**Elementaranalyse:**

Ber.: C 45.47 %, H 6.37 %, N 17.31 %

Gef.: C 45.68 %, H 6.86 %, N 17.62 %

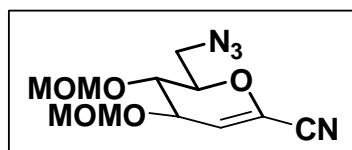
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = **8.02** (bs, 1 H, NH), **5.74** (d, 1 H, H-2), **4.82** (d, 1 H, CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **4.68-4.74** (m, 3 H, CH<sub>2</sub><sup>MOM</sup>), **4.20-4.27** (m, 2 H, H-3, H-5), **3.82** (dd, 1 H, H-4), **3.78** (s, 3 H, C(NH)OCH<sub>3</sub>), **3.63** (dd, 1 H, H-6), **3.50** (dd, 1 H, H-6'), **3.38** (s, 3 H, CH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>), **3.37** (s, 3 H, CH<sub>3</sub><sup>MOM</sup>)

Kopplungskonstanten:

(J<sub>2,3</sub> = 3.6 Hz), (J<sub>3,4</sub> = 5.3 Hz), (J<sub>4,5</sub> = 7.0 Hz), (J<sub>5,6</sub> = 6.9 Hz), (J<sub>6,6'</sub> = 13.4 Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{d}_4\text{-MeOH}$ ):  $\delta = 162.72$  ( $\text{C}(\text{NH})\text{OMe}$ ), **142.03** (C-1), **102.60** (C-2), **96.82** ( $\text{CH}_2^{\text{MOM}}$ ), **95.62** ( $\text{CH}_2^{\text{MOM}}$ ), **77.23** (C-5), **72.50** (C-4), **72.15** (C-3), **56.11** ( $\text{CH}_3^{\text{MOM}}$ ), **55.66** ( $\text{CH}_3^{\text{MOM}}$ ), **53.33** ( $\text{C}(\text{NH})\text{OCH}_3$ ), **50.21** (C-6)

**6-Azido-2,6-dideoxy-3,4-di-O-methoxymethyl-D-arabino-hex-1-enopyranosylcyanid (60):**



Verbindung **57** (50 mg, 153  $\mu\text{mol}$ ) wird in 2.3 ml Aceton p.a. gelöst, anschließend mit einer 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung (2.3 ml, 2.3 mmol, 15 eq.) versetzt und 60 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 1 M HCl neutralisiert, anschließend mit 0.5 g Kieselgel versetzt und *in vacuo* eingengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 5:1) liefert Verbindung **60** (23 mg, 81  $\mu\text{mol}$ , 53 %) als farbloses Öl.

$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5$              $M = 284.27$

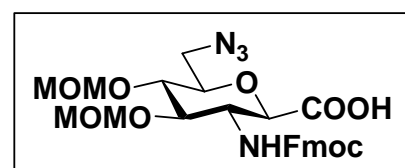
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.78$  (d, 1 H, H-2), **4.71-4.82** (m, 4 H,  $\text{CH}_2^{\text{MOM}}$ ), **4.19-4.22** (m, 2 H, H-3, H-5), **3.88** (dd, 1 H, H-4), **3.58-3.65** (m, 2 H, H-6, H-6'), **3.40** (s, 6 H,  $\text{CH}_3^{\text{MOM}}$ )

Kopplungskonstanten:

( $J_{2,3} = 3.6$  Hz), ( $J_{3,4} = 5.7$  Hz), ( $J_{4,5} = 6.9$  Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 129.06$  (C-1), **115.15** (C-2), **113.33** (CN) **97.06** ( $\text{CH}_2^{\text{MOM}}$ ), **96.47** ( $\text{CH}_2^{\text{MOM}}$ ), **77.75** (C-5), **72.12** (C-3), **71.63** (C-4), **56.28** ( $\text{CH}_3^{\text{MOM}}$ ), **55.88** ( $\text{CH}_3^{\text{MOM}}$ ), **49.74** (C-6)

**(6-Azido-2,6-dideoxy-2-(fluorenyl-9-methoxycarbonylamino)-3,4-di-O-methoxymethyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)carbonsäure (61):**



Verbindung **61** wurde von O. Tšubrik nach einer Vorschrift von F. Sicherl synthetisiert<sup>121</sup> und freundlicherweise für einige Kupplungsexperimente zur Verfügung gestellt. Zur Überprüfung der Identität wurde vor Einsatz der Verbindung ein ESI-MS aufgenommen, welches die erwartete Masse zeigte.

Material das längere Zeit im Kühlschrank lagerte (18 Monate) zeigte Verunreinigungen, bei denen vermutlich eine der beiden MOM-Schutzgruppen partiell abgespaltet wurde.

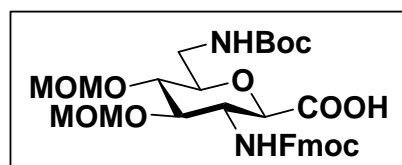


ESI-MS (pos. mode,  $CHCl_3/MeOH$ ):

Ber.: 565.2  $[M+Na]^+$

Gef.: 565.2  $[M+Na]^+$

**(6-(*tert.*-Butyloxycarbonylamino)-2,6-didesoxy-2-(fluorenyl-9-methoxycarbonylamino)-3,4-di-*O*-methoxymethyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)carbonsäure (62):**



Verbindung **62** wurde von O. Tšubrik nach einer Vorschrift von F. Sicherl synthetisiert<sup>121</sup> und freundlicherweise für einige Kupplungsexperimente zur Verfügung gestellt. Zur Überprüfung der Identität wurde vor Einsatz der

Verbindung ein ESI-MS aufgenommen, welches die erwartete Masse zeigte.

Material das längere Zeit im Kühlschrank lagerte (18 Monate) zeigte Verunreinigungen, bei denen vermutlich eine der beiden MOM-Schutzgruppen partiell abgespaltet wurde.

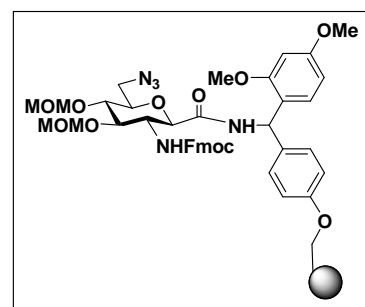


ESI-MS (pos. mode,  $CHCl_3/MeOH$ ):

Ber.: 639.3  $[M+Na]^+$

Gef.: 639.5  $[M+Na]^+$

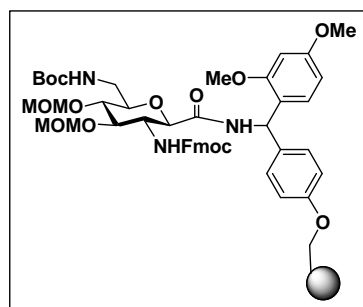
**(6-Azido-2,6-didesoxy-2-(fluorenyl-9-methoxycarbonylamino)-3,4-di-*O*-methoxymethyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)carbonsäure Rinkamid-AM-Polystyrolharz (63):**



Rink-Amid-AM-Polystyrolharz wurde nach AAV 5 mit Verbindung **61** gekuppelt. Die Reaktionszeit, sowie die relativen Mengen an verwendeten Reagenzien können der nachstehenden Tabelle entnommen werden. Der gemäß AAV 7 durchgeführte Kaiser-Test war negativ. Die Beladung des Harzes wurde anschließend nach AAV 6 bestimmt.

Kupplung	SDA	HATU	HOAt	DIPEA	Reaktionszeit	Kaiser-Test	Beladung
1	<b>61</b> (2 eq.)	2 eq.	3 eq.	5 eq.	16 h	negativ	0.59 mmol/g

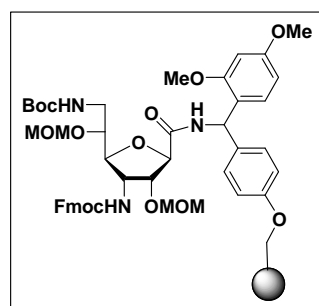
**(6-(*tert.*-Butyloxycarbonylamino)-2,6-didesoxy-2-(fluorenyl-9-methoxycarbonylamino)-3,4-di-*O*-methoxymethyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)carbonsäure-Rinkamid-AM-Polystyrolharz (64):**



Rink-Amid-AM-Polystyrolharz wurde nach AAV 5 mit Verbindung **62** gekuppelt. Die Reaktionszeit, sowie die relativen Mengen an verwendeten Reagenzien können der nachstehenden Tabelle entnommen werden. Der gemäß AAV 7 durchgeführte Kaiser-Test war negativ. Die Beladung des Harzes wurde anschließend nach AAV 6 bestimmt.

Kupplung	SDA	HATU	HOAt	DIPEA	Reaktionszeit	Kaiser-Test	Beladung
1	<b>62</b> (2 eq.)	2 eq.	2 eq.	5 eq.	16 h	negativ	0.59 mmol/g

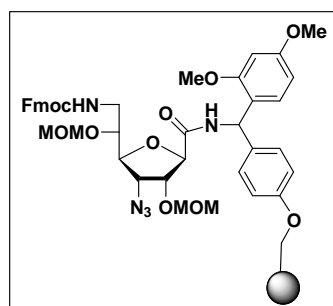
**(6-(*tert.*-Butyloxycarbonylamino)-3,6-didesoxy-3-(fluorenyl-9-methoxycarbonylamino)-2,5-di-*O*-methoxymethyl- $\beta$ -D-allofuranosyl)carbonsäure-Rinkamid-AM-Polystyrolharz (65):**



Rink-Amid-AM-Polystyrolharz wurde nach AAV 5 mit Verbindung **33** gekuppelt. Die Reaktionszeit, sowie die relativen Mengen an verwendeten Reagenzien können der nachstehenden Tabelle entnommen werden. Der gemäß AAV 7 durchgeführte Kaiser-Test war positiv. Die Beladung des Harzes wurde anschließend nach AAV 6 bestimmt.

Kupplung	SDA	HATU	HOAt	DIPEA	Reaktionszeit	Kaiser-Test	Beladung
1	<b>33</b> (4 eq.)	2 eq.	3 eq.	6 eq.	48 h	positiv	0.36 mmol/g

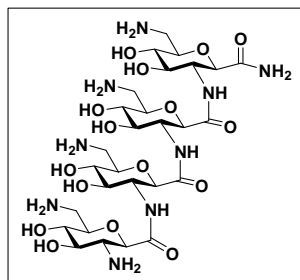
**(3-Azido-3,6-didesoxy-6-(fluorenyl-9-methoxycarbonylamino)-2,5-di-*O*-methoxymethyl- $\beta$ -D-allofuranosyl)carbonsäure-Rinkamid-AM-Polystyrolharz (66):**



Rink-Amid-AM-Polystyrolharz wurde nach AAV 5 mit Verbindung **30** gekuppelt. Die Reaktionszeit, sowie die relativen Mengen an verwendeten Reagenzien können der nachstehenden Tabelle entnommen werden. Der gemäß AAV 7 durchgeführte Kaiser-Test war positiv. Die Beladung des Harzes wurde nach AAV 6 bestimmt.

Kupplung	SDA	HATU	HOAt	DIPEA	Reaktionszeit	Kaiser-Test	Beladung
1	<b>30</b> (4 eq.)	2 eq.	3 eq.	6 eq.	81 h	positiv	0.37 mmol/g

**Oligomer 1 (69):**



Verbindung **64** wurde dreimal nach AAV 5 mit Verbindung **62** gekuppelt. Reaktionszeiten, sowie die relativen Mengen an verwendeten Reagenzien können der nachstehenden Tabelle entnommen werden. Der gemäß AAV 7 durchgeführte Kaiser-Test war jeweils negativ.

Kupplung	SDA	HATU	HOAt	DIPEA	Reaktionszeit	Kaiser-Test	Capping (AAV 8)
1	<b>62</b> (2 eq.)	2 eq.	2 eq.	5 eq.	12 h	negativ	nein
2	<b>62</b> (2 eq.)	2 eq.	2 eq.	5 eq.	3 h	negativ	nein
3	<b>62</b> (2 eq.)	2 eq.	2 eq.	5 eq.	12 h	negativ	nein

Im Anschluss an die Kupplungen wurde das Oligomer nach AAV 9 vom Harz abgespalten. Verbindung **69** wurde nach der Aufreinigung per HPLC (AAV 10b) als reinweißes Pentakis-PFPA-Salz erhalten. Die Gesamtausbeute betrug 9 % (3.2 mg) bezogen auf die Beladung des Edukts **64**. Die Daten des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums stimmten mit denen der Literatur überein.<sup>121</sup>

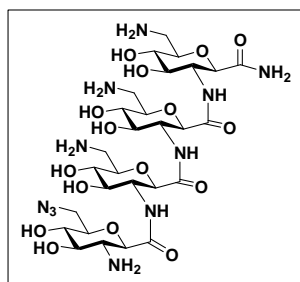
C<sub>28</sub>H<sub>51</sub>N<sub>9</sub>O<sub>16</sub>            M = 769.76

ESI-HRMS (pos. Mode, H<sub>2</sub>O):

Ber.: 770.3527 [M+H]<sup>+</sup>

Gef.: 770.3504 [M+H]<sup>+</sup>

HPLC (AAV 10b): t<sub>R</sub> = 16.0 min (Säule: 4 mm x 250 mm)

**Oligomer 2 (70):**

Verbindung **64** wurde nach AAV 5 zunächst zweimal mit Verbindung **62** und dann einmal mit Verbindung **61** gekuppelt. Reaktionszeiten, sowie die relativen Mengen an verwendeten Reagenzien können der nachstehenden Tabelle entnommen werden. Der gemäß AAV 7 durchgeführte Kaiser-Test war jeweils negativ.

Kupplung	SDA	HATU	HOAt	DIPEA	Reaktionszeit	Kaiser-Test	Capping (AAV 8)
1	<b>62</b> (2 eq.)	2 eq.	2 eq.	5 eq.	12 h	negativ	nein
2	<b>62</b> (2 eq.)	2 eq.	2 eq.	5 eq.	3 h	negativ	nein
3	<b>62</b> (2 eq.)	2 eq.	2 eq.	5 eq.	12 h	negativ	nein

Im Anschluss an die Kupplungen wurde das Oligomer nach AAV 9 vom Harz abgespalten. Verbindung **70** wurde nach der Aufreinigung per HPLC (AAV 10b) als reinweißes Pentakis-PPFA-Salz erhalten. Die Gesamtausbeute betrug 15 % (4.8 mg) bezogen auf die Beladung des Edukts **64**.

$C_{28}H_{49}N_{11}O_{16}$        $M = 795.76$

ESI-MS (pos. Mode,  $H_2O$ ):

Ber.: 796.3  $[M+H]^+$

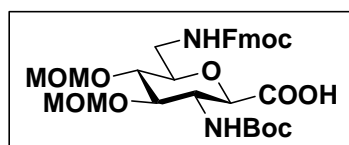
Gef.: 796.3  $[M+H]^+$

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 4.26$  (d, 1 H,  $J_{1,2} = 10.6$  Hz), **3.92-4.10** (m, 6 H), **3.70-3.85** (m, 9 H), **3.40-3.65** (m, 9 H), **3.20-3.28** (m, 3 H)

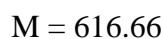
$^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 172.85, 170.56, 170.41, 170.31$  (4 C, CO), **78.15, 76.44, 76.34, 76.11, 75.31, 75.04, 73.67, 73.45, 73.18, 73.00, 71.25, 71.19, 71.08, 69.80, 53.36, 53.35, 53.28, 53.12, 50.47, 40.49, 40.36, 40.34**

HPLC (AAV 10b):  $t_R = 16.5$  min (Säule: 4 mm x 250 mm)

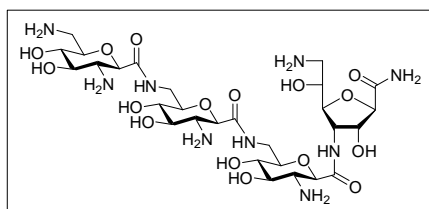
**(2-(*tert.*-Butyloxycarbonylamino)-2,6-didesoxy-6-(fluorenyl-9-methoxycarbonylamino)-3,4-di-*O*-methoxymethyl- $\beta$ -D-glucofuranosyl)carbonsäure (71)**



Verbindung **62** wurde von F. Sicherl synthetisiert<sup>121</sup> und freundlicherweise für einige Kupplungsexperimente zur Verfügung gestellt.



**Oligomer 3 (72):**

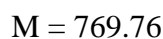
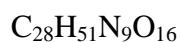


Verbindung **65** wurde zunächst nach AAV 8 gecappt und anschließend dreimal nach AAV 5 mit Verbindung **71** gekuppelt. Reaktionszeiten, sowie die relativen Mengen an verwendeten Reagenzien können der nachstehenden

Tabelle entnommen werden. Der gemäß AAV 7 durchgeführte TNBS-Test war jeweils negativ.

Kupplung	SDA	HATU	HOAt	DIPEA	Reaktionszeit	TNBS-Test	Capping (AAV 8)
1	<b>71</b> (4 eq.)	4 eq.	6 eq.	6 eq.	4 h	negativ	nein
2	<b>71</b> (4 eq.)	4 eq.	6 eq.	6 eq.	12 h	negativ	nein
3	<b>71</b> (4 eq.)	4 eq.	6 eq.	6 eq.	24 h	negativ	nein

Im Anschluss an die Kupplungen wurde das Oligomer nach AAV 9 vom Harz abgespalten. Verbindung **72** wurde nach der Aufreinigung per HPLC (AAV 10b) als reinweißes Pentakis-PFPA-Salz erhalten. Die Gesamtausbeute betrug 8 % (1.1 mg) bezogen auf die Beladung des Edukts **65**. Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde auf die Aufnahme eines NMR-Spektrums verzichtet. Die Masse des Moleküls im hochaufgelösten ESI-MS Spektrum entsprach der erwarteten Masse.



**ESI-HRMS** (pos. Mode,  $H_2O$ ):

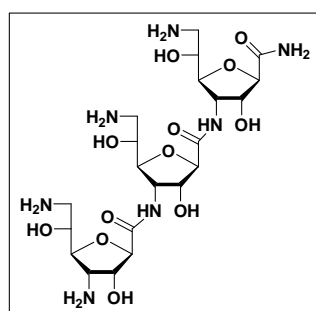
Ber.: 770.3527  $[M+H]^+$

Gef.: 770.3542  $[M+H]^+$

**HPLC (AAV 10a):**  $t_R = 18.8$  min (Säule: 4 mm x 250 mm)

**HPLC (AAV 10b):**  $t_R = 16.0$  min (Säule: 4 mm x 250 mm)

**Oligomer 4 (73):**



Verbindung **65** wurde zunächst nach AAV 8 gecappt und anschließend zweimal nach AAV 5 mit Verbindung **33** gekuppelt. Der gemäß AAV 7 durchgeführte Kaiser-Test war jeweils positiv. Daher wurde nach jedem Kupplungsschritt zusätzlich ein Capping nach AAV 8 durchgeführt. Reaktionszeiten, sowie die relativen Mengen an verwendeten Reagenzien können der nachstehenden

Tabelle entnommen werden.

Kupplung	SDA	HATU	HOAt	DIPEA	Reaktionszeit	Kaiser-Test	Capping (AAV 8)
1	<b>33</b> (4 eq.)	4 eq.	6 eq.	6 eq.	48 h	positiv	ja
2	<b>33</b> (4 eq.)	4 eq.	6 eq.	6 eq.	48 h	positiv	ja

Im Anschluss an die Kupplungen wurde das Oligomer nach AAV 9 vom Harz abgespalten. Verbindung **73** wurde nach der Aufreinigung per HPLC (AAV 10a) als reinweißes Tetrakis-PFPA-Salz erhalten. Die Gesamtausbeute betrug 2.2 % (0.5 mg) bezogen auf die Beladung des Edukts **65**. Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde auf die Aufnahme eines NMR-Spektrums verzichtet. Die Masse des Moleküls im ESI-MS Spektrum entsprach der erwarteten Masse.



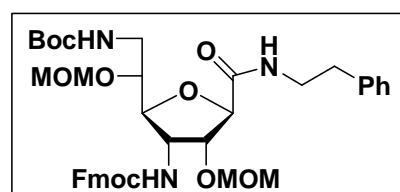
ESI-MS (pos. Mode,  $H_2O$ ):

Ber.: 582.3  $[M+H]^+$

Gef.: 582.3  $[M+H]^+$

HPLC (AAV 10a):  $t_R = 16.1$  min (Säule: 4 mm x 250 mm)

**(6-(tert.-Butyloxycarbonylamino)-3,6-dideoxy-3-(fluorenyl-9-methoxycarbonylamino)-2,5-di-O-methoxymethyl-β-D-allofuranosyl)-2-phenylethylcarbonsäureamid (74):**



Verbindung **33** (40 mg, 64.9  $\mu$ mol) wird mit HOAt (17.3 mg, 128  $\mu$ mol, 2 eq.) und HATU (37 mg, 97.3  $\mu$ mol, 1.5 eq.) in einem Kolben vorgelegt. Es werden 0.6 ml einer 0.16 molaren Lösung von Phenylethylamin in DMF/NMP

1:1 (97.2  $\mu$ mol Amin, 1.5 eq.) und im Anschluss DIPEA (44  $\mu$ l, 257  $\mu$ mol, 4 eq.) zugegeben und 4 h bei Raumtemperatur gerührt.

## Experimenteller Teil

---

Die Reaktionsmischung wird mit 40 ml  $\text{CHCl}_3$  aufgefüllt und mit 25 ml 0.1 M HCl gewaschen. Die wässrige Phase wird im Anschluss dreimal mit  $\text{CHCl}_3$  gewaschen.

Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und *in vacuo* eingengt. Der verbleibende Rückstand wird noch zweimal mit  $\text{CHCl}_3$  coevaporiert und anschließend ebenfalls mit  $\text{CHCl}_3$  auf Kieselgel aufgezogen. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 1:2) liefert Verbindung (43 mg, 60  $\mu\text{mol}$ , 92 %) als weißen Feststoff.

$\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_{10}$              $M = 719.82$

**ESI-HRMS** (pos. mode,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ):

Ber.: 742.3310  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Gef.: 742.3321  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**DC** (PE/EE 1:2):  $R_f = 0.45$

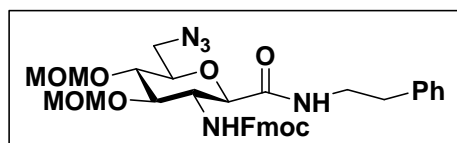
**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.75\text{-}7.77$  (bd, 2 H, *Fmoc*), **7.58-7.60** (bd, 2 H, *Fmoc*), **7.38-7.41** (bt, 2 H, *Fmoc*), **7.29-7.33** (m, 4 H, 2 *Fmoc*, 2 *Ph*), **7.18-7.23** (m, 3 H, *Ph*), **5.62** (bs, 0.8 H,  $\text{NH}^{\text{Fmoc}}$ ), **5.23** (bs, 0.8 H,  $\text{NH}^{\text{Boc}}$ ), **4.82** (d, 1 H,  $\text{CH}_2^{\text{MOM}}$ ), **4.69** (d, 1 H,  $\text{CH}_2^{\text{MOM}}$ ), **4.55** (d, 1 H,  $\text{CH}_2^{\text{MOM}}$ ), **4.46-4.49** (m, 1 H,  $\text{CH}_2^{\text{Fmoc}}$ ), **4.42** (d, 2 H,  $\text{CH}_2^{\text{Fmoc}}$ ,  $\text{CH}_2^{\text{MOM}}$ ), **4.36** (d, 1 H, H-1), **4.27** (d, 1 H, H-2), **4.17-4.23** (m, 2 H, H-3,  $\text{CH}^{\text{Fmoc}}$ ), **3.96** (d, 1 H, H-4), **3.75** (bs, 1 H, H-5), **3.53-3.57** (m, 1 H,  $\text{CHHCH}_2\text{Ph}$ ), **3.41-3.49** (m, 2 H, H-6,  $\text{CHHCH}_2\text{Ph}$ ), **3.36** (s, 3 H,  $\text{OCH}_3^{\text{MOM}}$ ), **3.31** (s, 3 H,  $\text{OCH}_3^{\text{MOM}}$ ), **3.12** (m, 1 H, H-6), **2.77-2.88** (m, 3 H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), **1.46** (s, 9 H,  $\text{CH}_3^{\text{Boc}}$ )

Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} = 1.8$  Hz)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 169.53$  (CONH), **156.12**, **155.85** (2 C, CO, *Fmoc*, *Boc*), **143.72**, **143.65**, **141.31**, **138.89**, **128.78**, **128.57**, **127.73**, **127.71**, **127.04**, **126.99**, **126.43**, **124.95**, **124.90**, **129.98** (18 C, *Fmoc*, *Ph*), **97.29** ( $\text{CH}_2^{\text{MOM}}$ ), **96.08** ( $\text{CH}_2^{\text{MOM}}$ ), **82.69** (C-1), **81.44** (C-4), **79.59** (C-2), **79.53** ( $\text{CMe}_3^{\text{Boc}}$ ), **74.41** (C-5), **66.77** ( $\text{CH}_2^{\text{Fmoc}}$ ), **56.04** ( $\text{OCH}_3^{\text{MOM}}$ ), **55.76** ( $\text{OCH}_3^{\text{MOM}}$ ), **52.43** (C-3), **47.16** ( $\text{CH}^{\text{Fmoc}}$ ), **41.38** (C-6), **40.45** ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), **35.77** ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ), **28.39** ( $\text{CH}_3^{\text{Boc}}$ )

**(6-(Azido)-2,6-didesoxy-2-(fluorenyl-9-methoxycarbonylamino)-3,4-di-O-methoxymethyl-β-D-glucopyranosyl)-2-phenylethylcarbonsäureamid (75) :**



Verbindung **63** (40 mg, 73.7 μmol) wird mit HOAt (20 mg, 147 μmol, 2 eq.) und HATU (42 mg, 111 μmol, 1.5 eq.) in einem Kolben vorgelegt. Es werden 0.7 ml einer

0.16 molaren Lösung von Phenylethylamin in DMF/NMP 1:1 (111 μmol Amin, 1.5 eq.) und im Anschluss DIPEA (50 μl, 295 μmol, 4 eq.) zugegeben und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 20 ml CHCl<sub>3</sub> aufgefüllt und mit 10 ml 0.1 M HCl gewaschen. Die wässrige Phase wird im Anschluss dreimal mit CHCl<sub>3</sub> gewaschen.

Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und *in vacuo* eingengt. Der verbleibende Rückstand wird noch zweimal mit CHCl<sub>3</sub> coevaporiert und anschließend ebenfalls mit CHCl<sub>3</sub> auf Kieselgel aufgezogen. Säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 1:3) liefert Verbindung (17 mg, 24 μmol, 94 %) als weißen Feststoff.

C<sub>34</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>                      M = 645.70

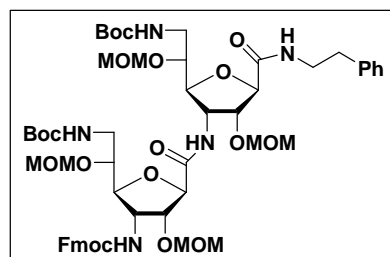
ESI-HRMS (pos. mode, CHCl<sub>3</sub>/MeOH):

Ber.: 646.2871 [M+H]<sup>+</sup>

Gef.: 646.2853 [M+H]<sup>+</sup>

DC (PE/EE 1:3): R<sub>f</sub> = 0.35

**Geschütztes Dimer (76):**



Verbindung **74** (43 mg, 60 μmol) wird zunächst nach AAV 1 entschützt und im Anschluss nach AAV 2 mit Zuckerdiaminosäurebaustein **33** gekuppelt.

Säulenchromatographische Reinigung liefert Verbindung **76** (59 mg, 52.7 μmol, 88 %) als farbloses Öl.

Kupplung	SDA	HATU	HOAt	DIPEA	Reaktionszeit
1	<b>33</b> (1.2 eq.)	1.8 eq.	2.4 eq.	5.4 eq.	15 h

C<sub>55</sub>H<sub>77</sub>N<sub>5</sub>O<sub>18</sub>                      M = 1119.21

ESI-HRMS (pos. mode, CHCl<sub>3</sub>/MeOH):

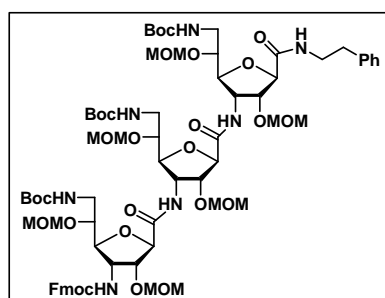
Ber.: 1118.5161 [M+Na]<sup>+</sup>

Gef.: 1118.5137 [M+Na]<sup>+</sup>

DC (EE):  $R_f = 0.57$

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.75\text{-}7.77$  (bd, 2 H, *Fmoc*),  $7.58\text{-}7.60$  (bd, 2 H, *Fmoc*),  $7.39\text{-}7.41$  (bt, 2 H, *Fmoc*),  $7.28\text{-}7.32$  (m, 4 H, 2 *Fmoc*, 2 *Ph*),  $7.19\text{-}7.22$  (m, 3 H, *Ph*),  $5.78$  (bs, 0.7 H,  $\text{NH}^{\text{Fmoc}}$ ),  $5.50$  (bs, 0.7 H,  $\text{NH}^{\text{Boc}}$ ),  $5.32$  (bs, 0.8 H,  $\text{NH}^{\text{Boc}}$ ),  $4.80\text{-}4.84$  (m, 4 H),  $4.66\text{-}4.69$  (bt, 2 H),  $4.57$  (d, 1 H),  $4.54$  (bs, 1 H),  $4.44\text{-}4.48$  (m, 2 H),  $4.38$  (s, 3 H),  $4.28$  (d, 1 H),  $4.19\text{-}4.25$  (m, 3 H),  $4.08$  (d, 1 H),  $3.94$  (bs, 1 H),  $3.86\text{-}3.88$  (m, 1 H),  $3.70$  (m, 1 H),  $3.50\text{-}3.57$  (m, 1 H,  $\text{CHHCH}_2\text{Ph}$ ),  $3.42\text{-}3.49$  (m, 5 H, u. a.  $\text{OCH}_3^{\text{MOM}}$ ,  $\text{CHHCH}_2\text{Ph}$ ),  $3.36\text{-}3.39$  (m, 4 H, u. a.  $\text{OCH}_3^{\text{MOM}}$ ),  $3.35$  (s, 3 H,  $\text{OCH}_3^{\text{MOM}}$ ),  $3.33$  (s, 3 H,  $\text{OCH}_3^{\text{MOM}}$ ),  $3.12$  (m, 1 H),  $2.81\text{-}2.87$  (m, 3 H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ),  $2.37$  (t, 1 H),  $2.03$  (m, 1 H),  $1.46$  (s, 9 H,  $\text{CH}_3^{\text{Boc}}$ ),  $1.42$  (bs, 9 H,  $\text{CH}_3^{\text{Boc}}$ )

### Geschütztes Trimer (77):



Verbindung **76** (53 mg, 48  $\mu\text{mol}$ ) wird zunächst nach AAV 1 entschützt und im Anschluss nach AAV 2 mit Zuckerdiaminosäurebaustein **33** gekuppelt.

Säulenchromatographische Reinigung liefert Verbindung **77** (63 mg, 43  $\mu\text{mol}$ , 89 %) als farbloses Öl.

Kupplung	SDA	HATU	HOAt	DIPEA	Reaktionszeit
1	<b>33</b> (1.2 eq.)	1.8 eq.	2.4 eq.	5.4 eq.	18 h

$\text{C}_{71}\text{H}_{105}\text{N}_7\text{O}_{26}$        $M = 1472.62$

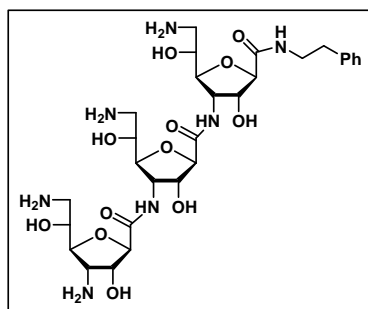
ESI-MS (pos. mode,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ):

Ber.: 1494.7  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Gef.: 1494.5  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

DC (EE):  $R_f = 0.49$

**Oligomer 5 (79):**



Verbindung **77** (56 mg, 38  $\mu$ mol) wird zunächst nach AAV 1 von der Fmoc-Schutzgruppe befreit. Anschließend wird ein Viertel des Ansatzes nach AAV 3 vollständig entschützt. Verbindung **79** wird nach der Aufreinigung per HPLC (AAV 10a) als reinweißes Tetrakis-PFPA-Salz mit einer Ausbeute von 79 % (10.2 mg, 7.5  $\mu$ mol) ausgehend von **77** erhalten.

$C_{29}H_{47}N_7O_{12}$        $M = 685.72$

**ESI-HRMS** (pos. mode,  $H_2O$ ):

Ber.: 686.3356  $[M+H]^+$

Gef.: 686.3368  $[M+H]^+$

**$^1H$ -NMR** (600 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 7.38-7.40$  (bt, 2 H, *Ph*) **7.29-7.31** (m, 3 H, *Ph*), **4.62** (t, 1 H, H-2), **4.51-4.53** (m, 2 H, H-1, H-1'), **4.40-4.45** (m, 2 H, H-2', H-3'), **4.33** (d, 1 H, H-1''), **4.17-4.23** (m, 3 H, H-3', H-5', H-4), **4.10-4.15** (m, 2 H, H-4', H-5), **3.98-4.06** (m, 3 H, H-5'', H-2'', H-4''), **3.89** (t, 1 H, H-3), **3.51-3.62** (m, 2 H, *CHHCH*<sub>2</sub>*Ph*), **3.36** (dd, 1 H, H-6<sub>a</sub>), **3.31** (dd, 1 H, H-6<sub>a</sub>'), **3.23** (m, 1 H, H-6<sub>a</sub>''), **3.16** (dd, 1 H, H-6<sub>b</sub>), **3.00-3.07** (m, 2 H, H-6<sub>b</sub>', H-6<sub>b</sub>''), **2.87-2.89** (bt, 2 H, *CH*<sub>2</sub>*CHHPh*)

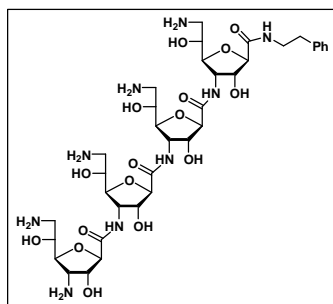
Kopplungskonstanten:

( $J_{1,2} \approx J_{2,3} \approx 5.4$  Hz), ( $J_{1'',2''} = 2.5$  Hz), ( $J_{2,3} \approx J_{3,4} \approx 5.4$  Hz), ( $J_{5,6a} = 3.5$  Hz), ( $J_{6a,6b} = 13.3$  Hz), ( $J_{5',6a'} = 2.6$  Hz), ( $J_{6a',6b'} = 13.2$  Hz), ( $J_{5'',6a''} = 2.8$  Hz), ( $J_{6a'',6b''} = 13.2$  Hz), ( $J_{5,6b} = 8.1$  Hz)

**$^{13}C$ -NMR** (150 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 171.70, 171.34, 171.15$  (3 C, CO), **139.05, 129.05, 128.62, 126.56** (6 C, *Ph*), **83.85** (C-1'), **83.62, 83.13** (2 C, C-1, C-1'), **81.72, 81.58** (2 C, C-4', C-4''), **81.22** (C-4), **73.60, 73.54** (2 C, C-2', C-2''), **72.10** (C-2), **68.32** (C-5), **67.78** (C-5'), **67.71** (C-5''), **54.14** (C-3), **52.05, 52.01** (2 C, C-3', C-3''), **41.87** (C-6), **41.32** (C-6''), **41.19** (C-6'), **39.98** (*CH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>*Ph*), **34.47** (*CH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>*Ph*)

**HPLC** (AAV 10a):  $t_R = 16.1$  min (Säule: 16 mm x 250 mm)

**Oligomer 6 (80):**



Verbindung **77** (78 mg, 53  $\mu$ mol) wird zunächst nach AAV 1 entschützt und im Anschluss nach AAV 2 mit Zuckerdiaminosäurebaustein **33** gekuppelt.

Kupplung	SDA	HATU	HOAt	DIPEA	Reaktionszeit
1	<b>33</b> (1.2 eq.)	1.8 eq.	2.4 eq.	5.4 eq.	18 h

Im Anschluss an die Kupplung wird ein Drittel des Ansatzes erneut nach AAV1 von der Fmoc-Schutzgruppe befreit und anschließend nach AAV 3 vollständig entschützt. Verbindung **80** wird nach der Aufreinigung per HPLC (AAV 10b) als reinweißes Pentakis-PFPA-Salz mit einer Ausbeute von 42 % (12.6 mg, 7.4  $\mu$ mol) ausgehend von **77** erhalten.

$C_{36}H_{59}N_9O_{16}$        $M = 873.90$

ESI-HRMS (pos. mode,  $H_2O$ ):

Ber.: 874.4153  $[M+H]^+$

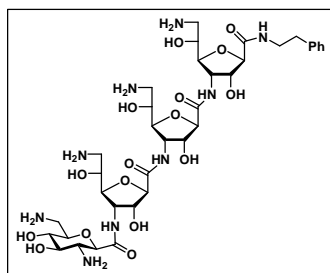
Gef.: 874.4164  $[M+H]^+$

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 7.36-7.39$  (bt, 2 H, *Ph*) **7.28-7.30** (m, 3 H, *Ph*), **4.58** (t, 1 H), **4.52** (d, 1 H), **4.49-4.51** (m, 2 H), **4.38-4.44** (m, 4 H), **4.31** (d, 1 H), **4.09-4.22** (m, 7 H), **3.97-4.04** (m, 3 H), **3.85** (t, 1 H), **3.50-3.61** (m, 2 H, *CHHCH<sub>2</sub>Ph*), **3.28-3.36** (m, 3 H), **3.22** (dd, 1 H), **3.14** (m, 1 H), **2.99-3.06** (m, 3 H), **2.85-2.88** (bt, 2 H, *CH<sub>2</sub>CHHPh*)

$^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 171.80, 171.68, 171.31, 171.15$  (4 C, CO), **139.01, 129.03, 128.58, 126.53** (6 C, *Ph*), **83.84, 83.71, 83.60, 83.07** (4 C, *C-1<sub>x</sub>*), **81.61, 81.53, 81.50, 81.27** (4 C, *C-4<sub>x</sub>*), **73.63, 73.59, 73.46, 72.14** (4 C, *C-2<sub>x</sub>*), **68.21, 67.69, 67.65, 67.64** (4 C, *C-5<sub>x</sub>*), **53.95, 51.98, 51.79, 51.68** (4 C, *C-3<sub>x</sub>*), **41.79** (*C-6<sub>x</sub>*), **41.25** (2 C, *C-6<sub>x</sub>*), **41.15** (*C-6<sub>x</sub>*), **39.94** (*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph*), **34.44** (*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph*)

HPLC (AAV 10b):  $t_R = 23.1$  min (Säule: 4 mm x 250 mm)

**Oligomer 7 (81):**



Verbindung **77** wird zunächst nach AAV 1 entschützt und im Anschluss nach AAV 2 mit Zuckerdiaminosäurebaustein **62** gekuppelt.

Kupplung	SDA	HATU	HOAt	DIPEA	Reaktionszeit
1	<b>62</b> (1.5 eq.)	1.8 eq.	2.4 eq.	5.4 eq.	72 h

Im Anschluss an die Kupplung wird das Oligomer erneut nach AAV1 von der Fmoc-Gruppe befreit und anschließend nach AAV 3 vollständig entschützt. Verbindung **81** wird nach der Aufreinigung per HPLC (AAV 10b) als reinweißes Pentakis-PFPA-Salz mit einer Ausbeute von 38 % erhalten.

$C_{36}H_{59}N_9O_{16}$        $M = 873.90$

**ESI-HRMS** (pos. mode,  $H_2O$ ):

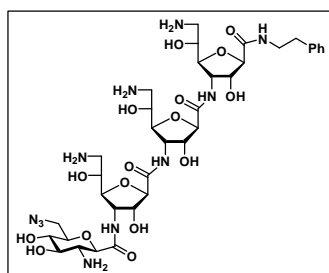
Ber.: 874.4153  $[M+H]^+$

Gef.: 874.4173  $[M+H]^+$

**$^1H$ -NMR** (250 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 7.22-7.36$  (m, 5 H, *Ph*), **4.25-4.48** (m, 8 H), **4.05-4.20** (m, 5 H), **3.87-4.01** (m, 3 H), **3.67-3.78** (m, 2 H), **3.11-3.58** (m, 9 H), **2.90-3.04** (m, 3 H), **2.79-2.84** (bt, 2 H,  $CH_2CHHPh$ )

**HPLC** (AAV 10b):  $t_R = 23.7$  min (Säule: 4 mm x 250 mm)

**Oligomer 8 (82):**



Verbindung **77** wird zunächst nach AAV 1 entschützt und im Anschluss nach AAV 2 mit Zuckerdiaminosäurebaustein **61** gekuppelt.

Kupplung	SDA	HATU	HOAt	DIPEA	Reaktionszeit
1	<b>62</b> (1.5 eq.)	1.8 eq.	2.4 eq.	5.4 eq.	72 h

Im Anschluss an die Kupplung wird das Oligomer erneut nach AAV1 von der Fmoc-Gruppe befreit und anschließend nach AAV 3 vollständig entschützt. Verbindung **82** wird nach der Aufreinigung per HPLC (AAV 10b) als reinweißes Pentakis-PFPA-Salz mit einer Ausbeute von 28 % erhalten.

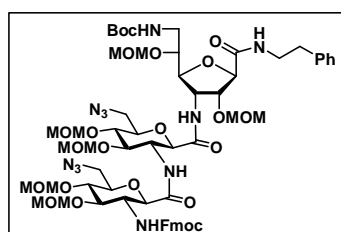
$C_{36}H_{57}N_{11}O_{16}$       M = 899.90

**ESI-MS** (pos. mode,  $H_2O$ ):      Ber.: 900.4  $[M+H]^+$   
 Gef.: 900.7  $[M+H]^+$

**$^1H$ -NMR** (600 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  = **7.40-7.43** (bt, 2 H, *Ph*) **7.32-7.34** (m, 3 H, *Ph*), **4.56** (t, 1 H), **4.55** (d, 1 H), **4.43-4.48** (m, 4 H), **4.33-4.36** (m, 2 H), **4.23-4.27** (m, 3 H), **4.15-4.19** (m, 2 H), **4.05-4.09** (m, 2 H), **4.03** (dd, 1 H), **3.81** (dd, 1 H), **3.74-3.78** (m, 2 H), **3.54-3.65** (m, 4 H), **3.31-3.38** (m, 3 H), **3.27** (dd, 1 H), **3.03-3.10** (m, 3 H), **2.89-2.92** (bt, 2 H,  $CH_2CHHPh$ )

**HPLC (AAV 10b):**  $t_R$  = 22.4 min (Säule: 4 mm x 250 mm)

**Geschütztes Trimer 2 (83):**

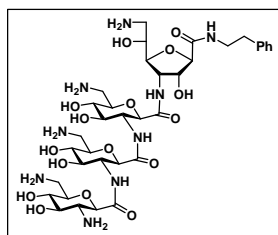


Verbindung **83** entsteht als Zwischenprodukt bei der Synthese von Oligomer **85**. Verbindung **83** wurde zur Kontrolle der Reaktion per ESI-MS nachgewiesen.

$C_{61}H_{85}N_{11}O_{22}$       M = 1324.39

**ESI-MS** (pos. mode,  $H_2O$ ):      Ber.: 1346.6  $[M+H]^+$   
 Gef.: 1346.1  $[M+H]^+$

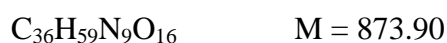
**Oligomer 9 (85):**



Verbindung **74** wird zunächst nach AAV 1 entschützt und im Anschluss dreimal nach AAV 2 mit Zuckerdiaminosäurebaustein **61** gekuppelt.

Kupplung	SDA	HATU	HOAt	DIPEA	Reaktionszeit
1	<b>61</b> (1.5 eq.)	1.8 eq.	2.4 eq.	5.4 eq.	12 h
2	<b>61</b> (1.5 eq.)	1.8 eq.	2.4 eq.	5.4 eq.	48 h
3	<b>61</b> (1.5 eq.)	1.8 eq.	2.4 eq.	5.4 eq.	48 h

Im Anschluss an die Kupplung wird das Oligomer erneut nach AAV1 von der Fmoc-Gruppe befreit und anschließend nach AAV 3 vollständig entschützt. Nach der Aufreinigung per HPLC (AAV 10b) wird das Azid-geschützte Intermediat als reinweißes PFPA-Salz erhalten. Das Intermediat wird in Wasser gelöst und mit 10 % Palladium auf Aktivkohle 60 Minuten unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Reaktionskontrolle per ESI-MS zeigt nach 60 Minuten kein Edukt mehr an. Der Rückstand wird nach Abfiltrieren des Katalysators über Kieselgur in einer 0.13 % igen wässrigen PFPA-Lösung gelöst und lyophilisiert. Verbindung **85** wird als reinweißes Pentakis-PFPA-Salz mit einer Ausbeute von 2.8 % ausgehend von **74** erhalten.



**ESI-HRMS** (pos. mode,  $H_2O$ ):

Ber.: 874.4153  $[M+H]^+$

Gef.: 874.4142  $[M+H]^+$

**$^1H$ -NMR** (600 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  = **7.36-7.38** (bt, 2 H, *Ph*) **7.27-7.30** (m, 3 H, *Ph*), **4.30** (bs, 1 H), **4.19** (dd, 1 H), **3.95-4.12** (m, 6 H), **3.88-3.92** (bt, 2 H), **3.67-3.81** (m, 5 H), **3.37-3.59** (m, 9 H), **3.16-3.26** (m, 4 H), **2.92-3.05** (m, 2 H), **2.84-2.86** (bt, 2 H,  $CH_2CHHPh$ )

### 13 Ausgewählte NMR- und Massenspektren

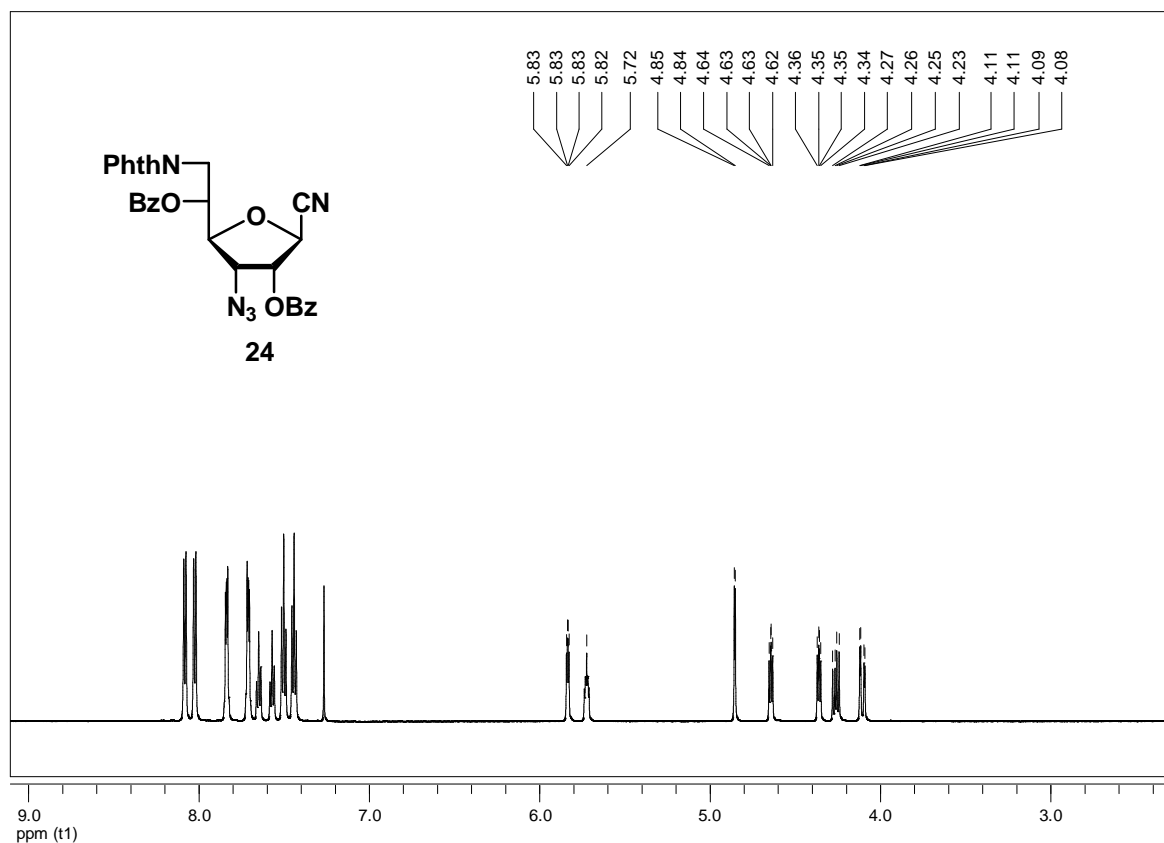


Abb. 13.1: <sup>1</sup>H-NMR von Verbindung **24** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

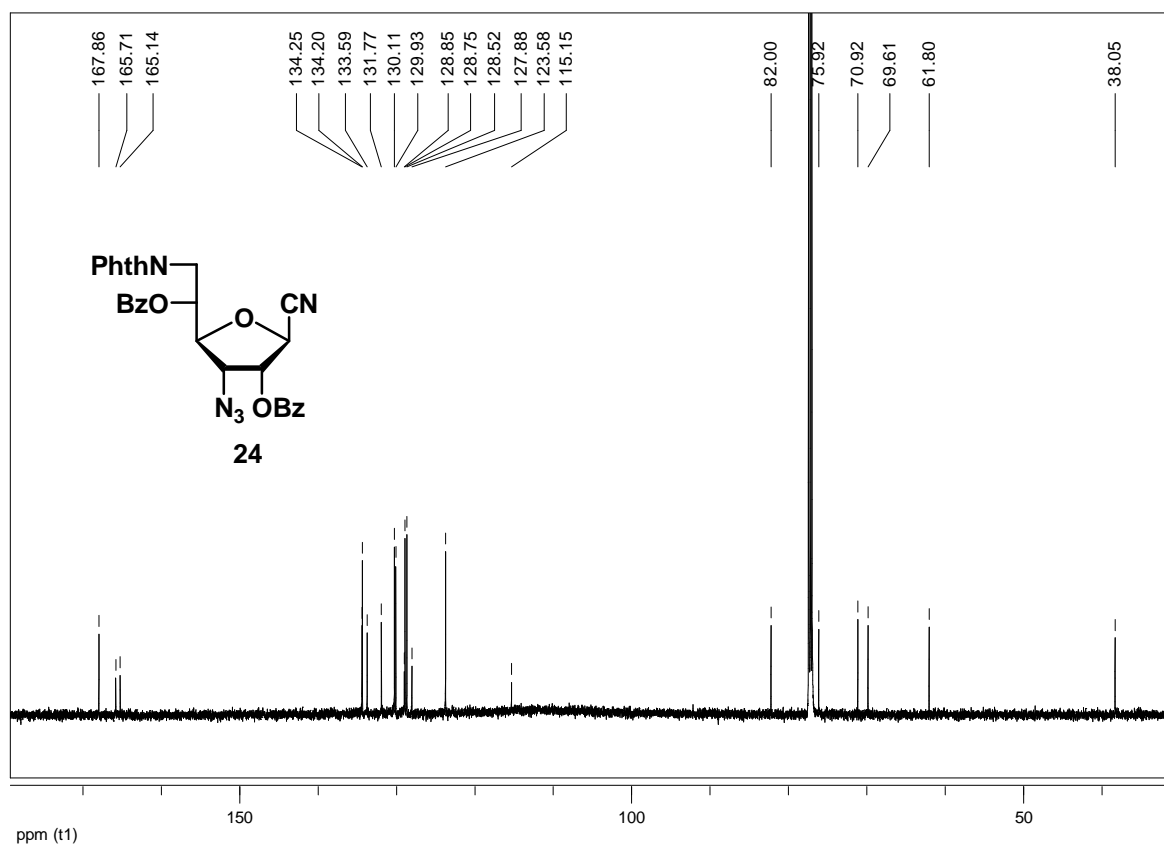


Abb. 13.2: <sup>13</sup>C-NMR von Verbindung **24** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

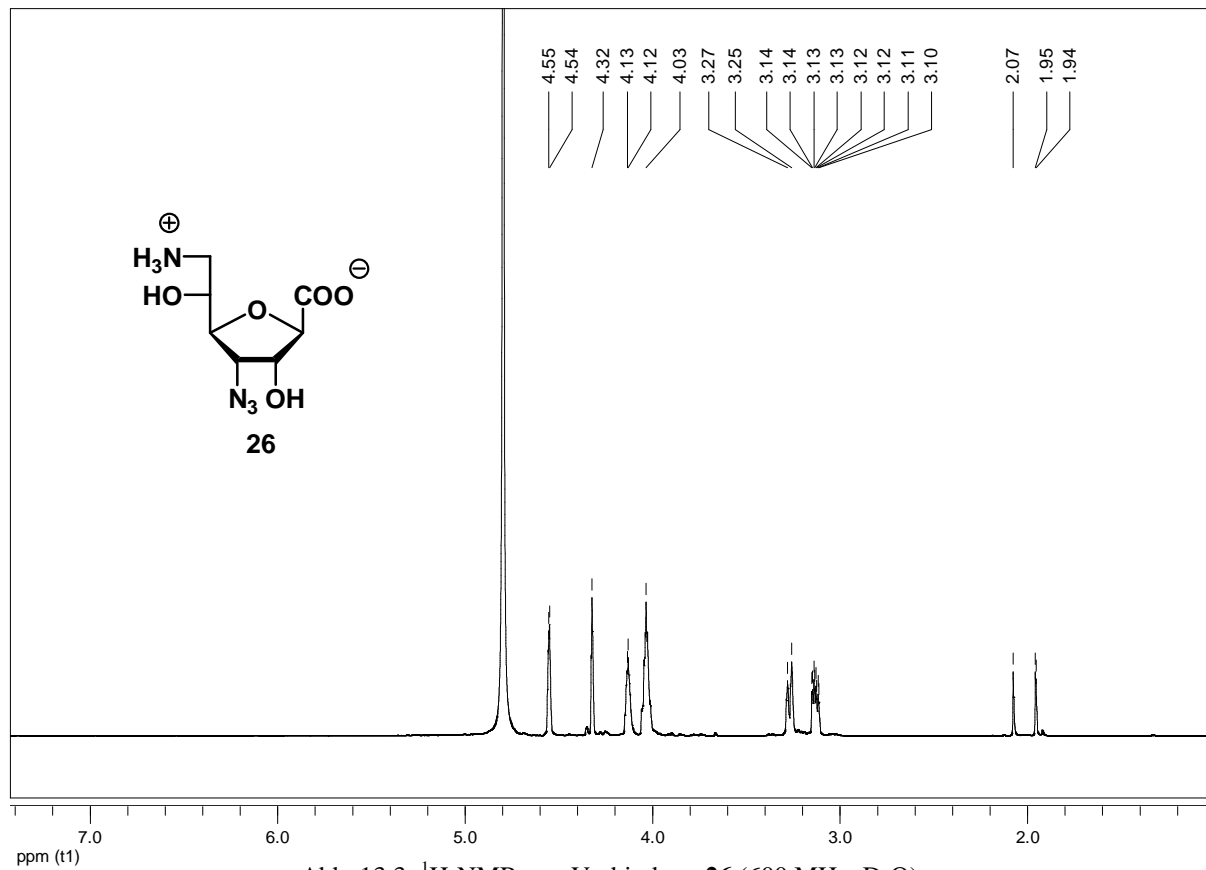


Abb. 13.3:  $^1\text{H-NMR}$  von Verbindung **26** (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

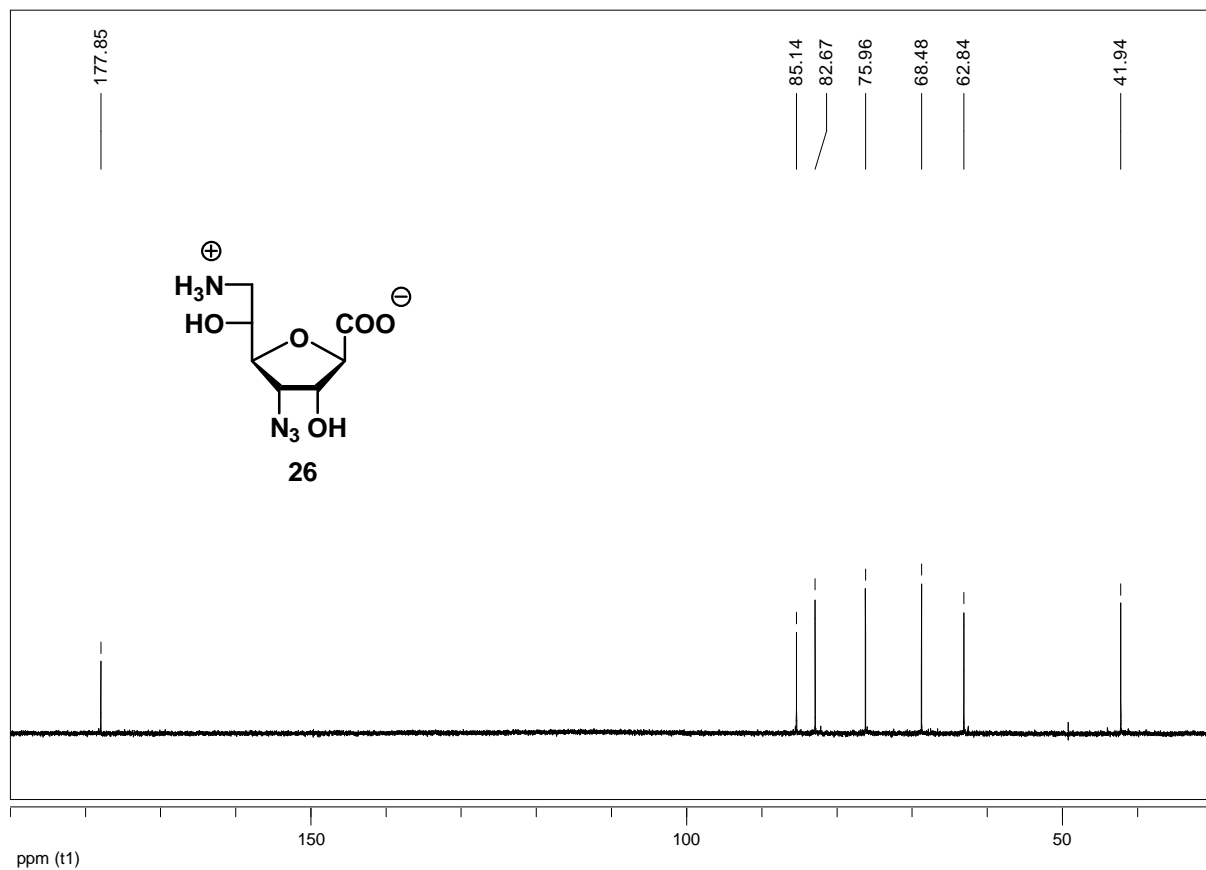


Abb. 13.4:  $^{13}\text{C-NMR}$  von Verbindung **26** (150 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

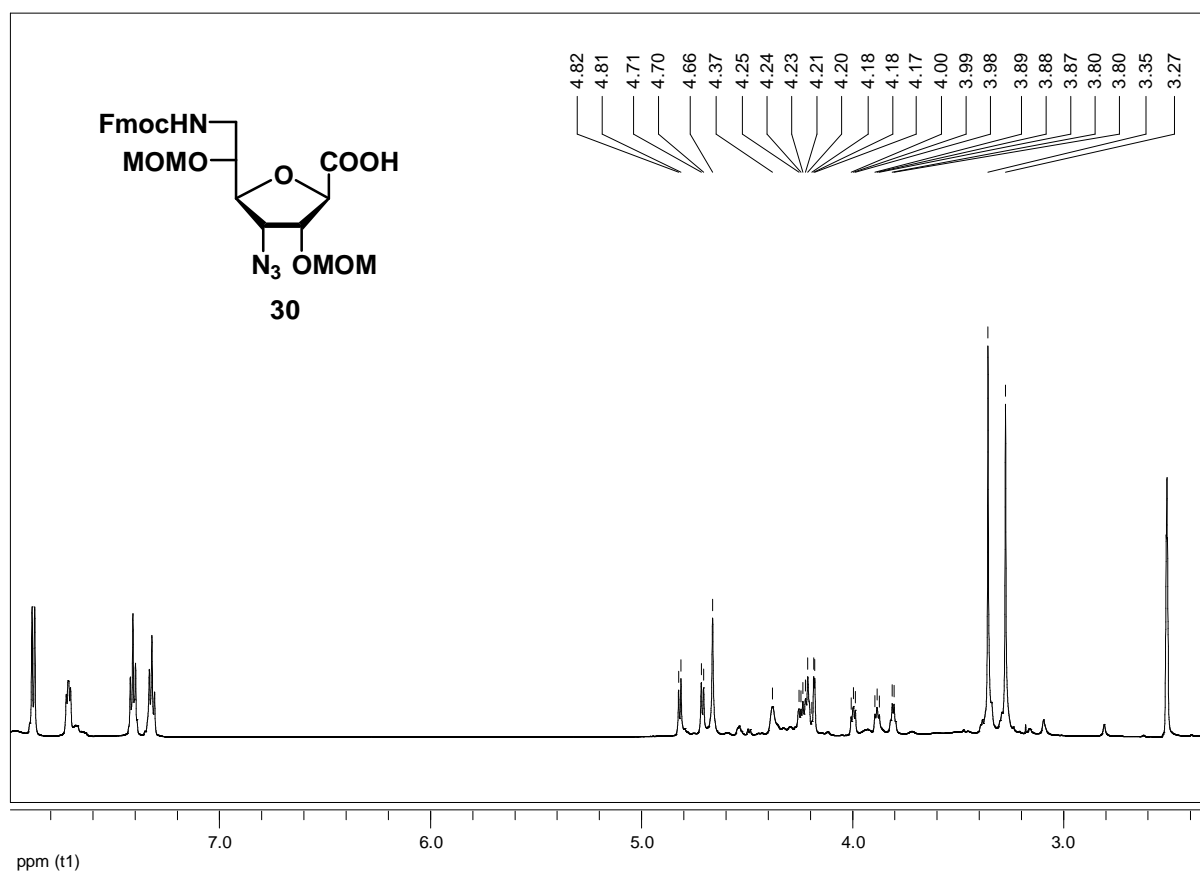


Abb. 13.5: <sup>1</sup>H-NMR von Verbindung **30** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO).

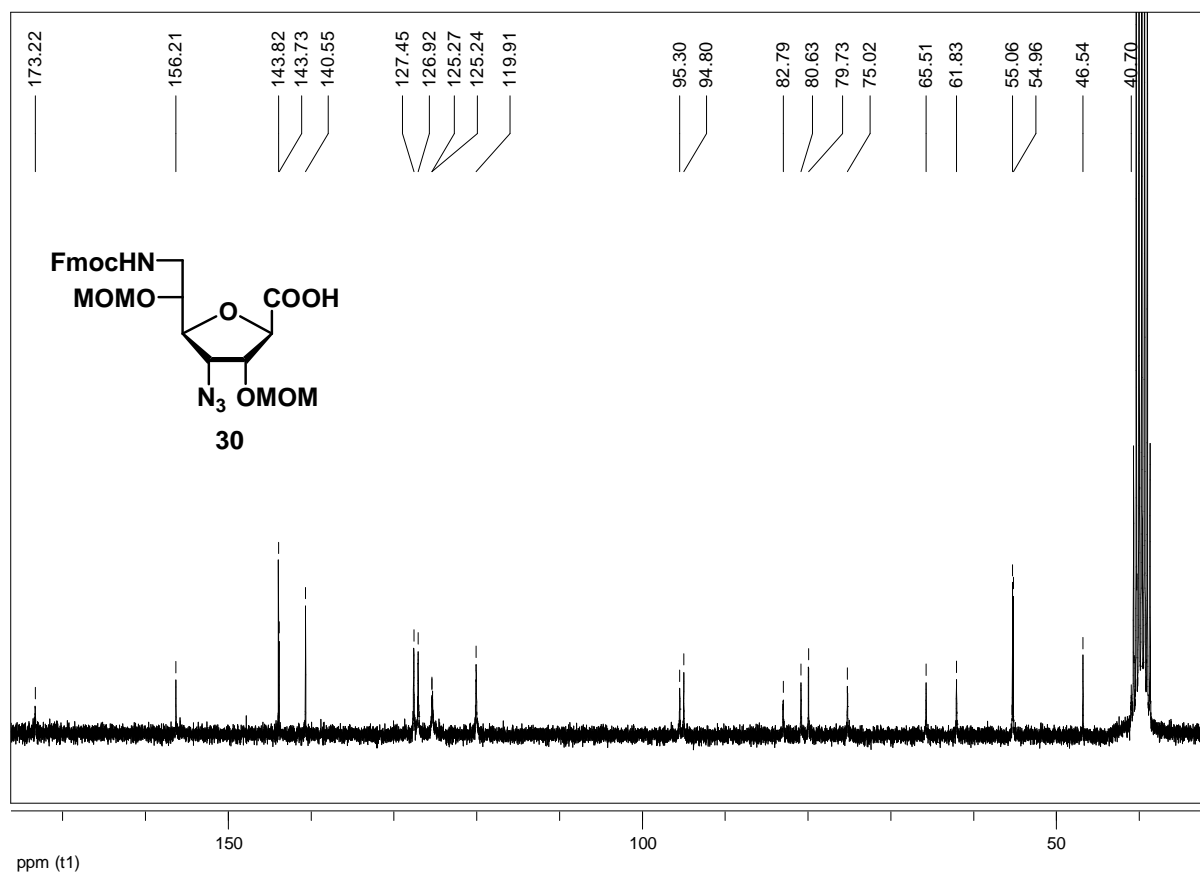


Abb. 13.6: <sup>13</sup>C-NMR von Verbindung **30** (100 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO).

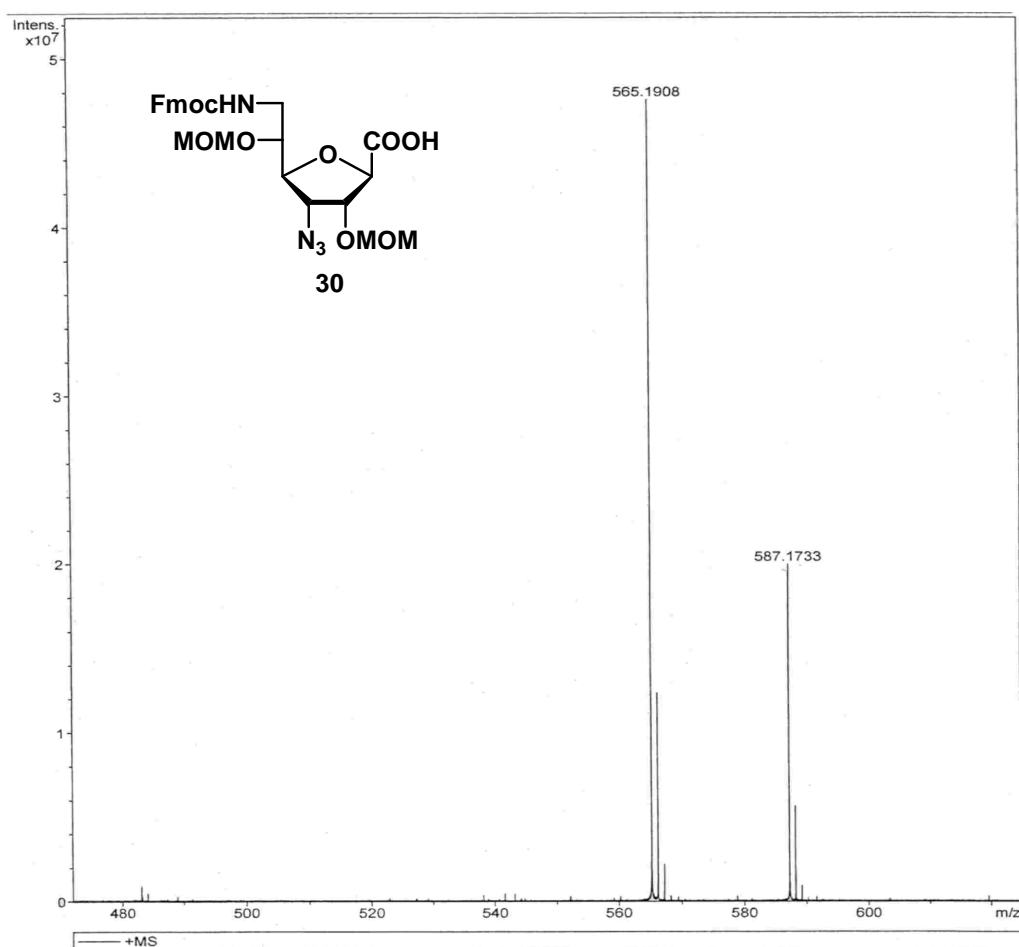


Abb. 13.7: Hochaufgelöstes ESI-Spektrum von Verbindung **30** (pos. Mode, H<sub>2</sub>O/Dioxan 1:3).

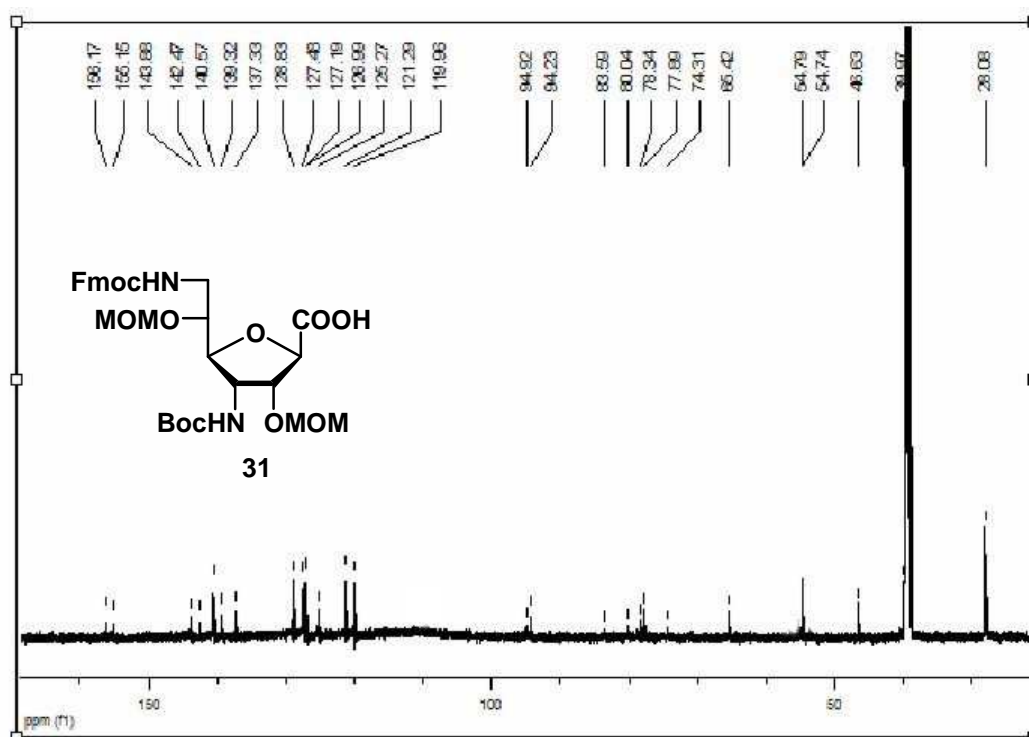


Abb. 13.8: <sup>13</sup>C-NMR von Verbindung **31** (150 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO).

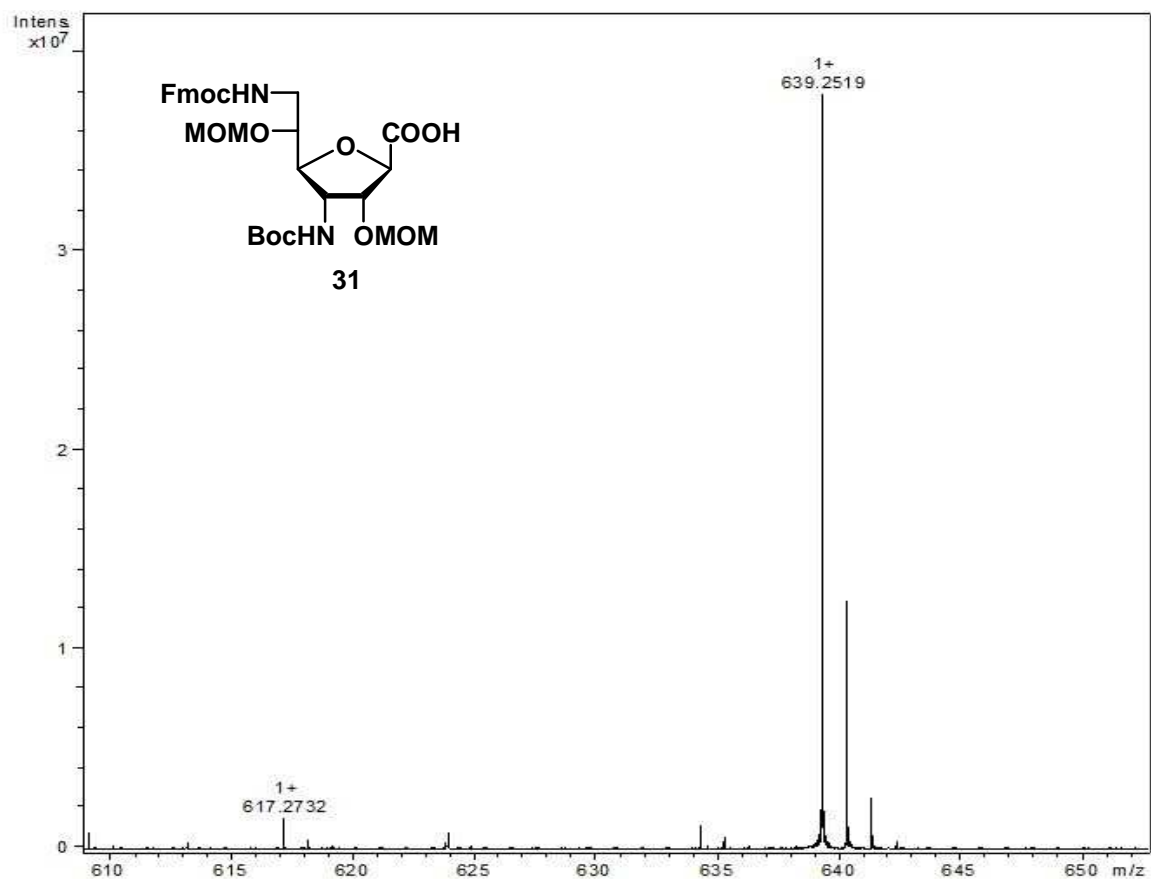


Abb. 13.9: Hochaufgelöstes ESI-Spektrum von Verbindung **31** (pos. Mode, H<sub>2</sub>O/Dioxan 1:3).

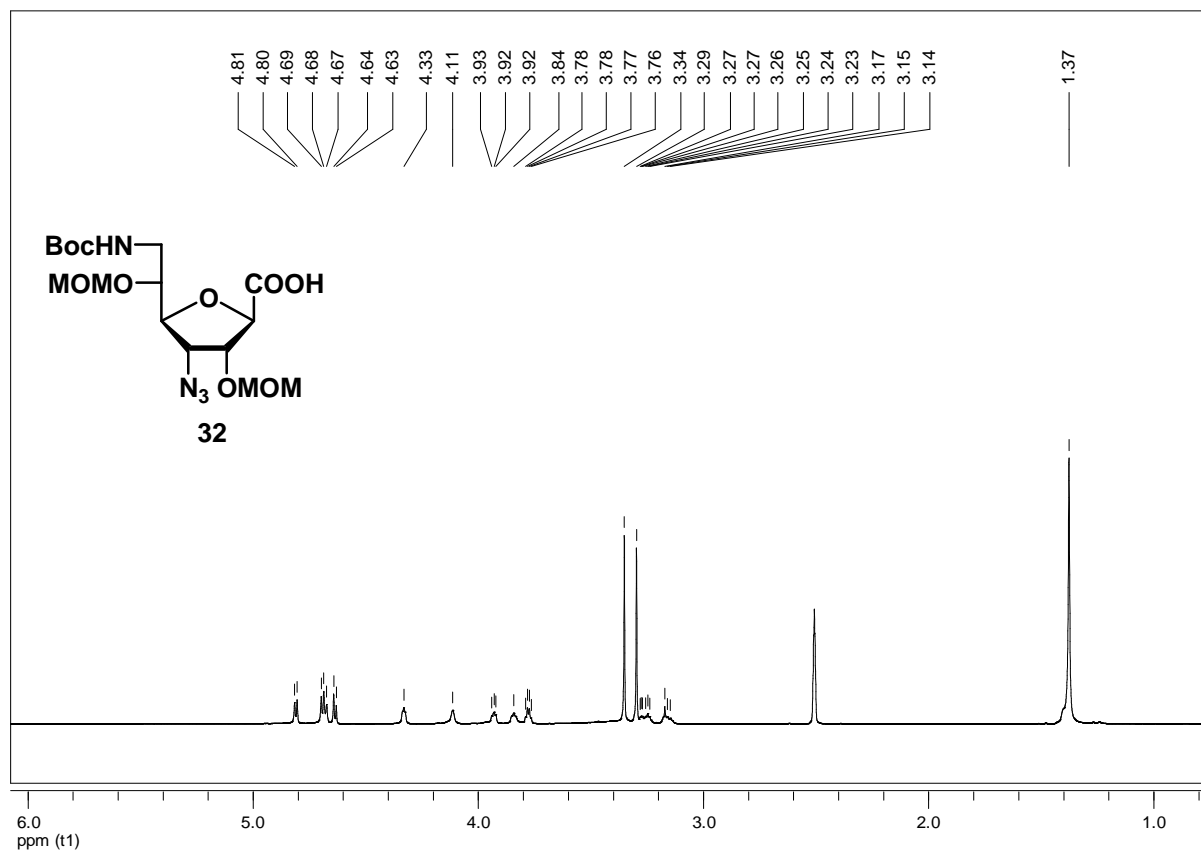


Abb. 13.10: <sup>1</sup>H-NMR von Verbindung **32** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO).

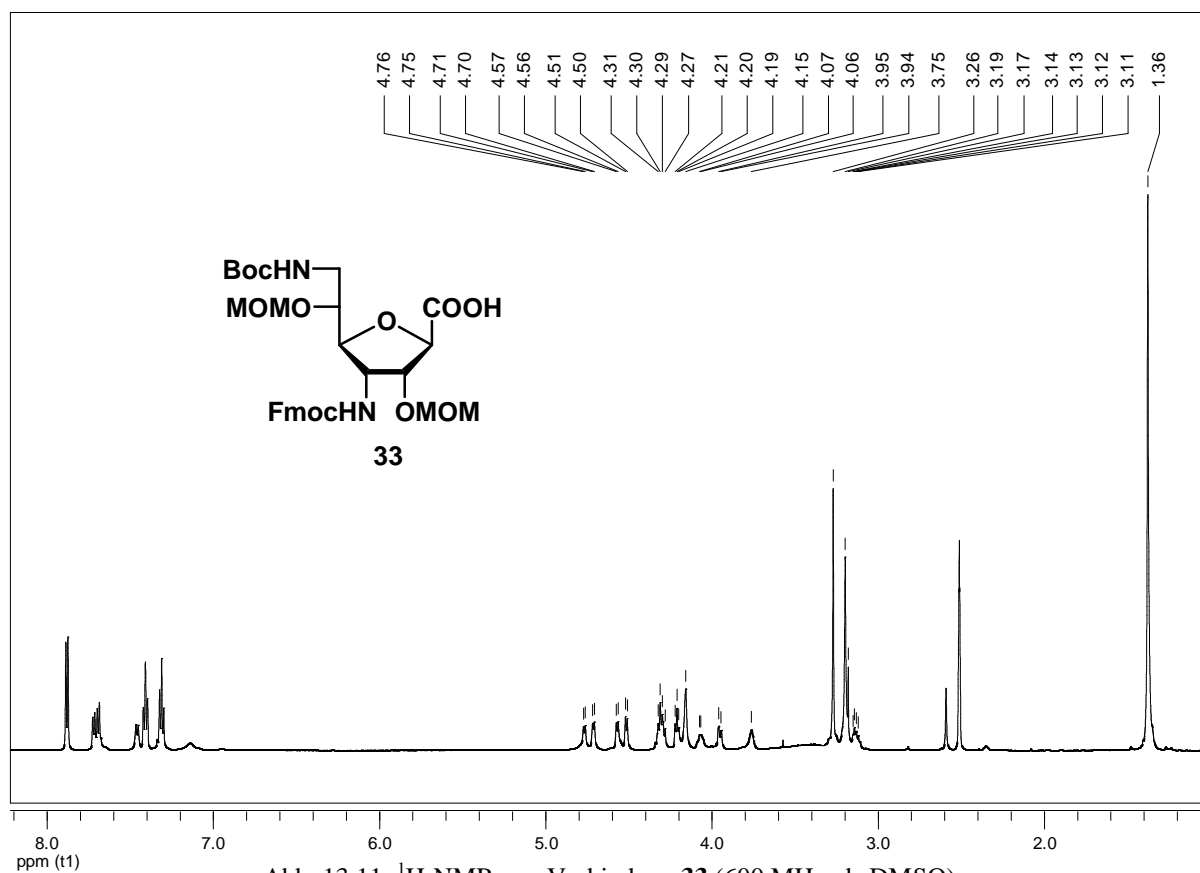


Abb. 13.11: <sup>1</sup>H-NMR von Verbindung **33** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO).

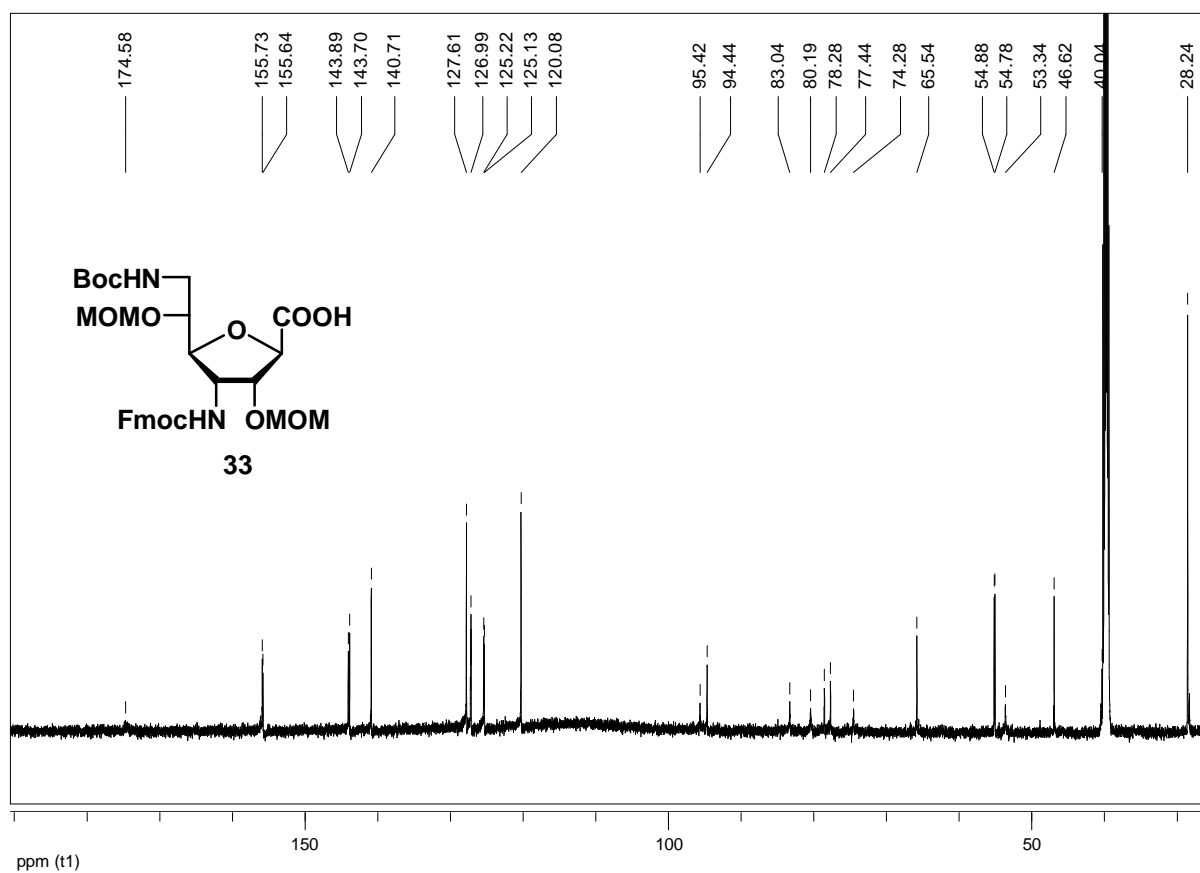


Abb. 13.12: <sup>13</sup>C-NMR von Verbindung **33** (150 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO).

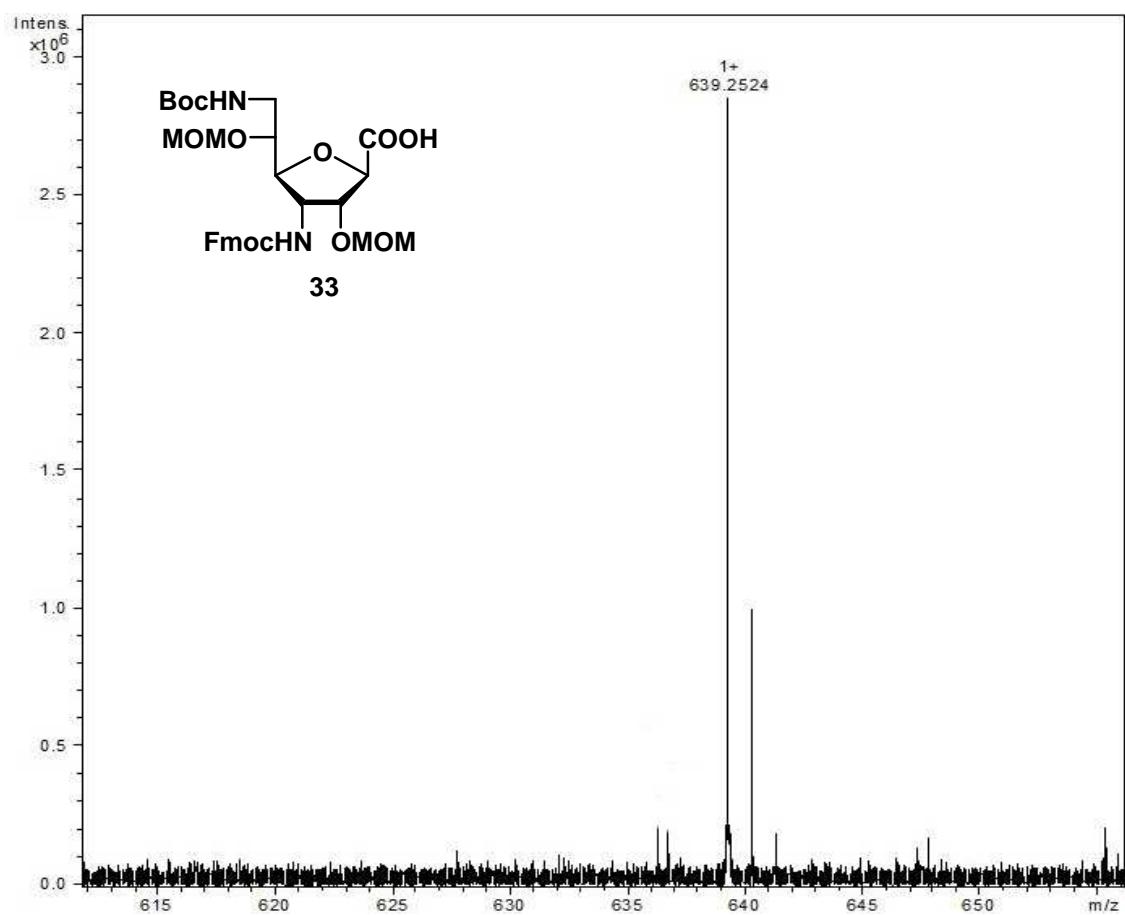


Abb. 13.13: Hochaufgelöstes ESI-Spektrum von Verbindung **33** (pos. Mode, H<sub>2</sub>O/Dioxan 1:3).

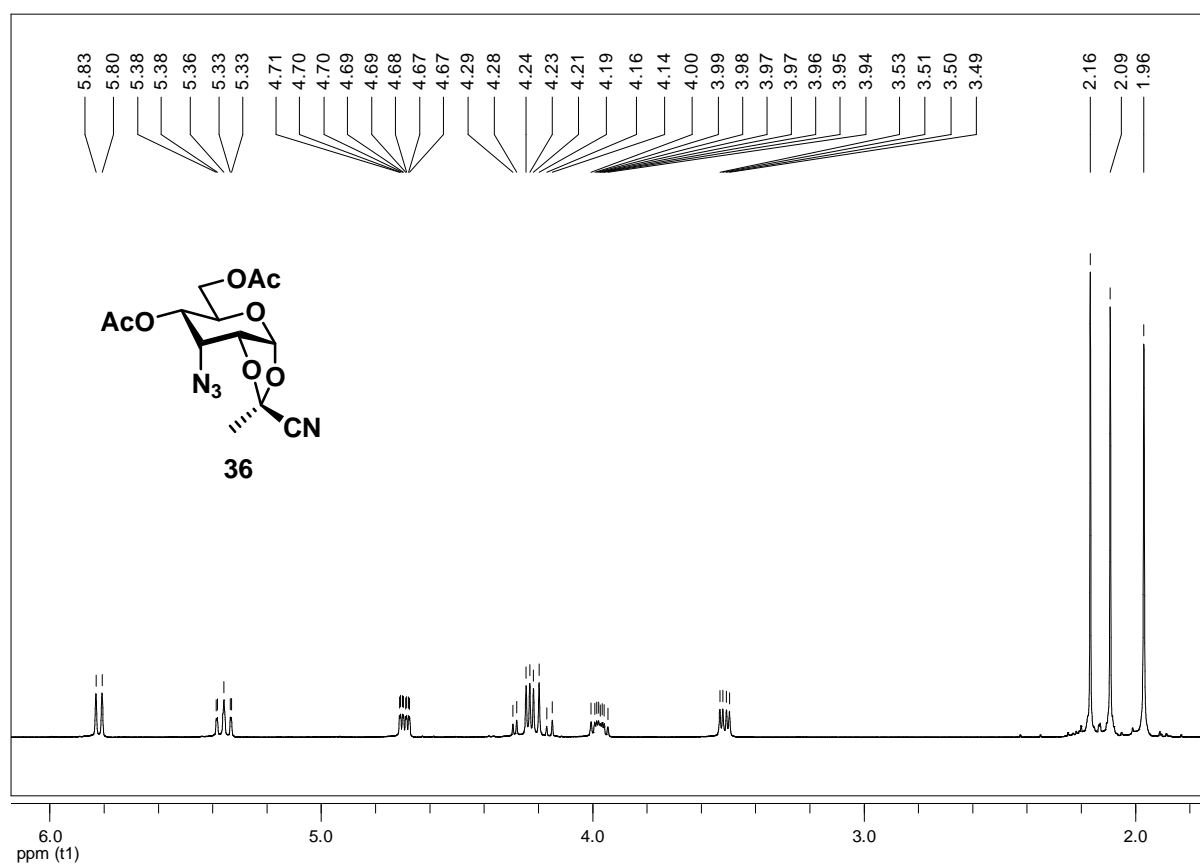


Abb. 13.14: <sup>1</sup>H-NMR von Verbindung **36** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

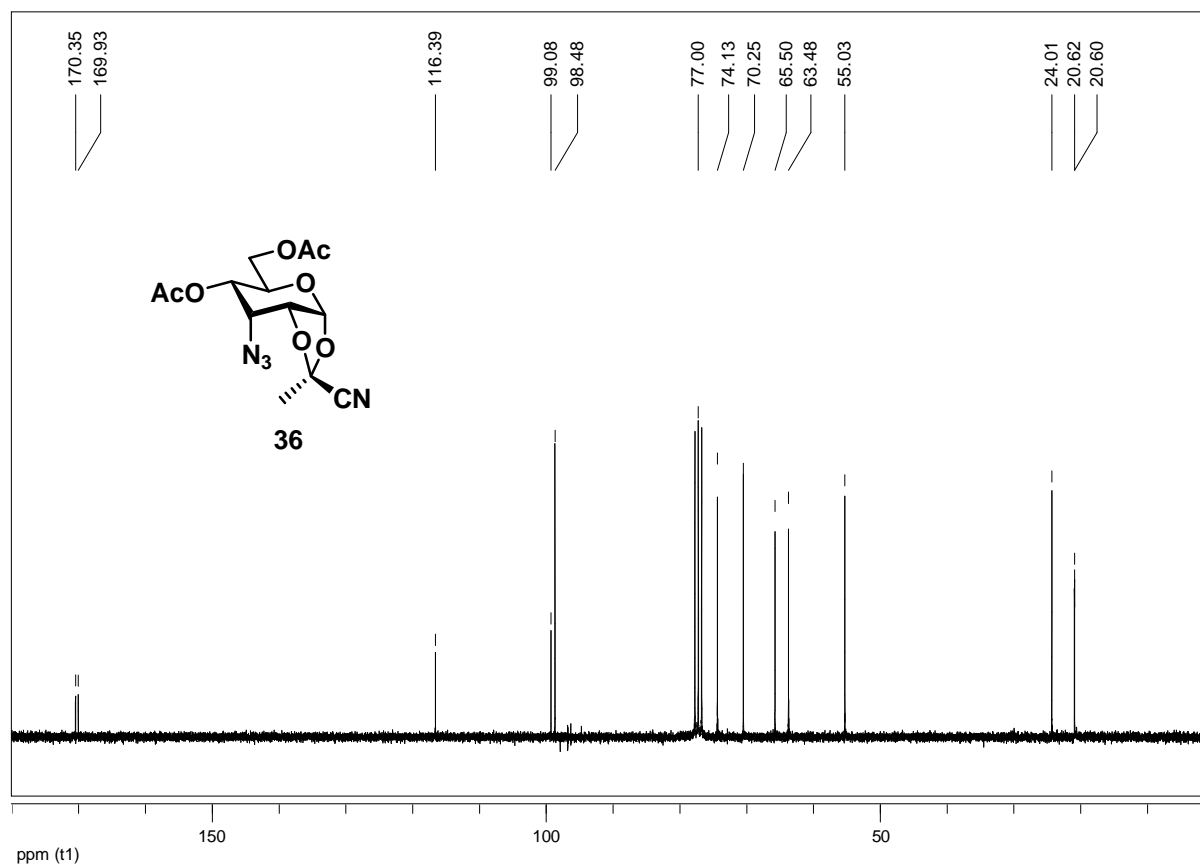


Abb. 13.15:  $^{13}\text{C}$ -NMR von Verbindung **36** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

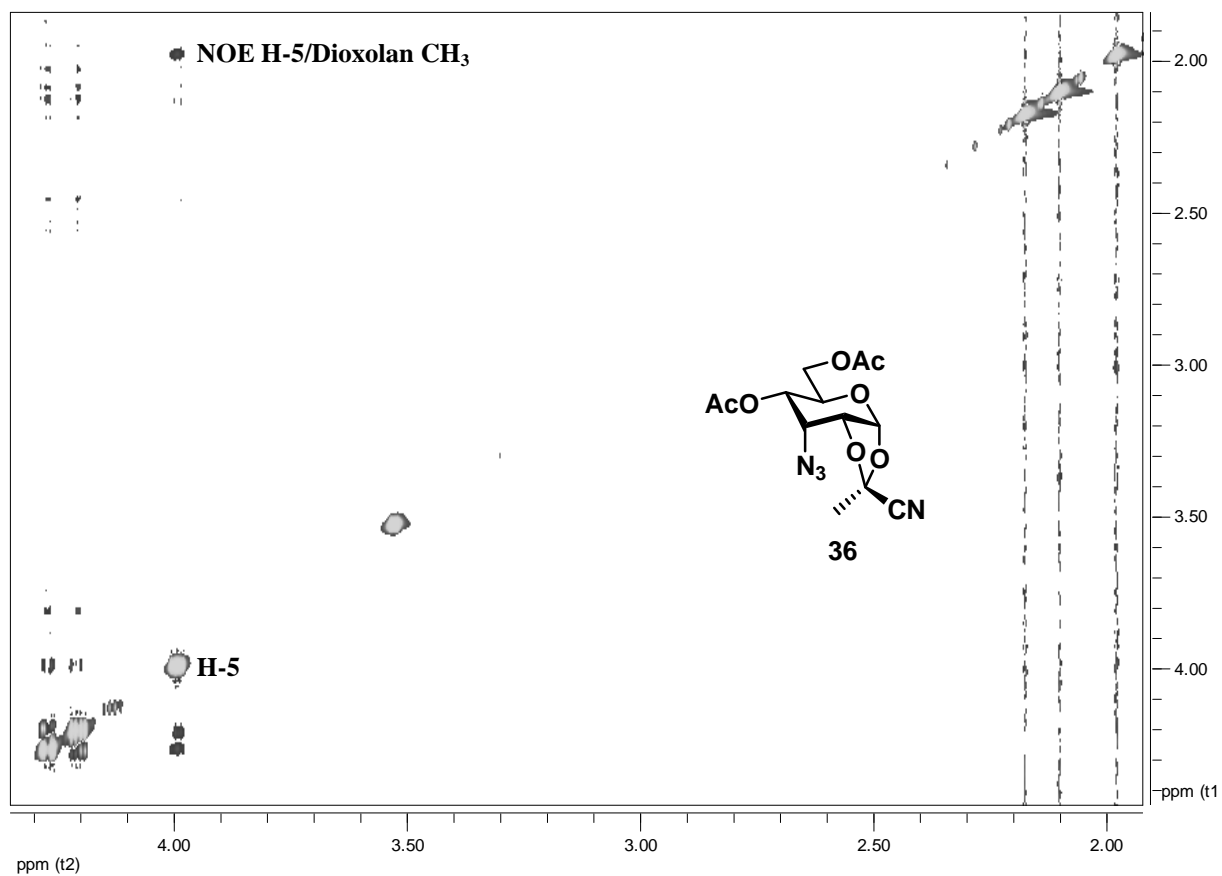


Abb. 13.16: Ausschnitt des NOESY-Spektrums von Verbindung **36** (Mischzeit 300ms, 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ); der gezeigte NOE bestätigt die exo-Konfiguration des Cyanoethylidens.

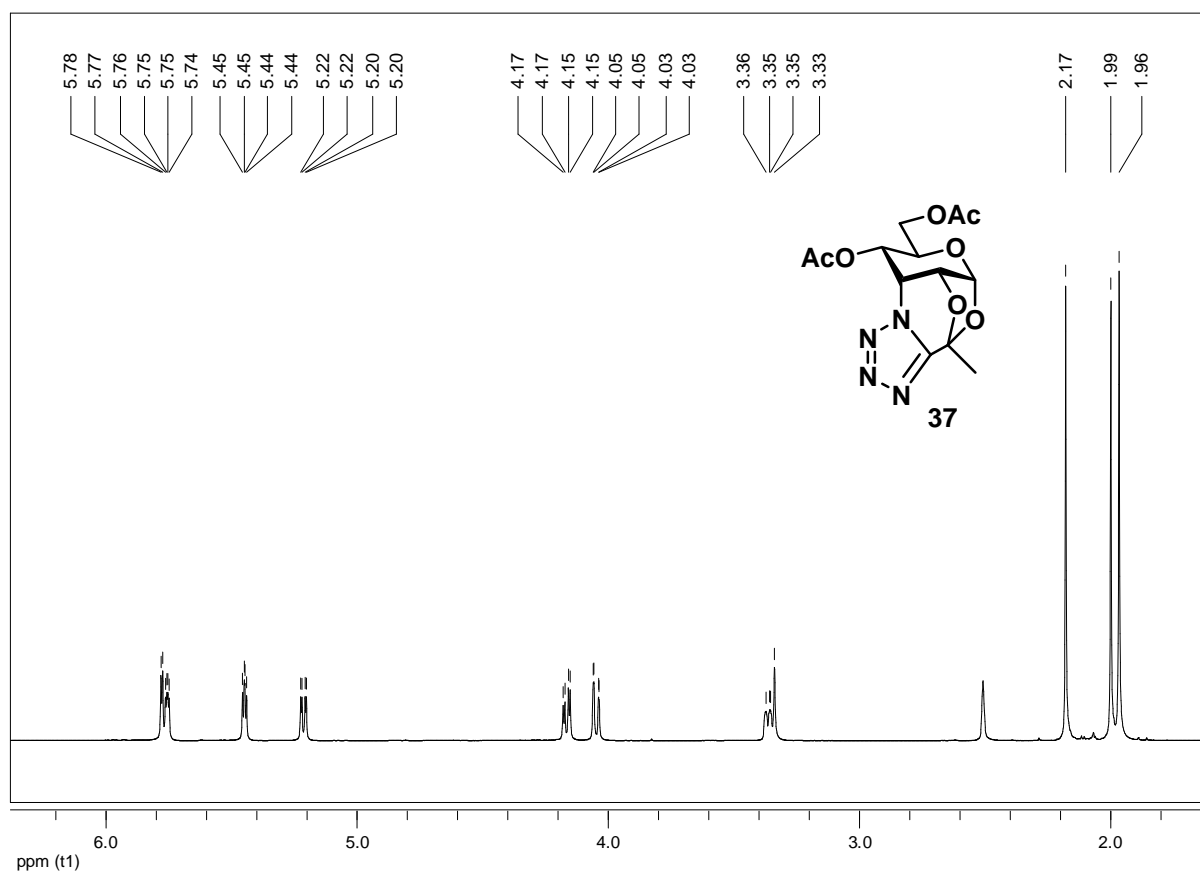


Abb. 13.17: <sup>1</sup>H-NMR von Verbindung **37** (600 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO).

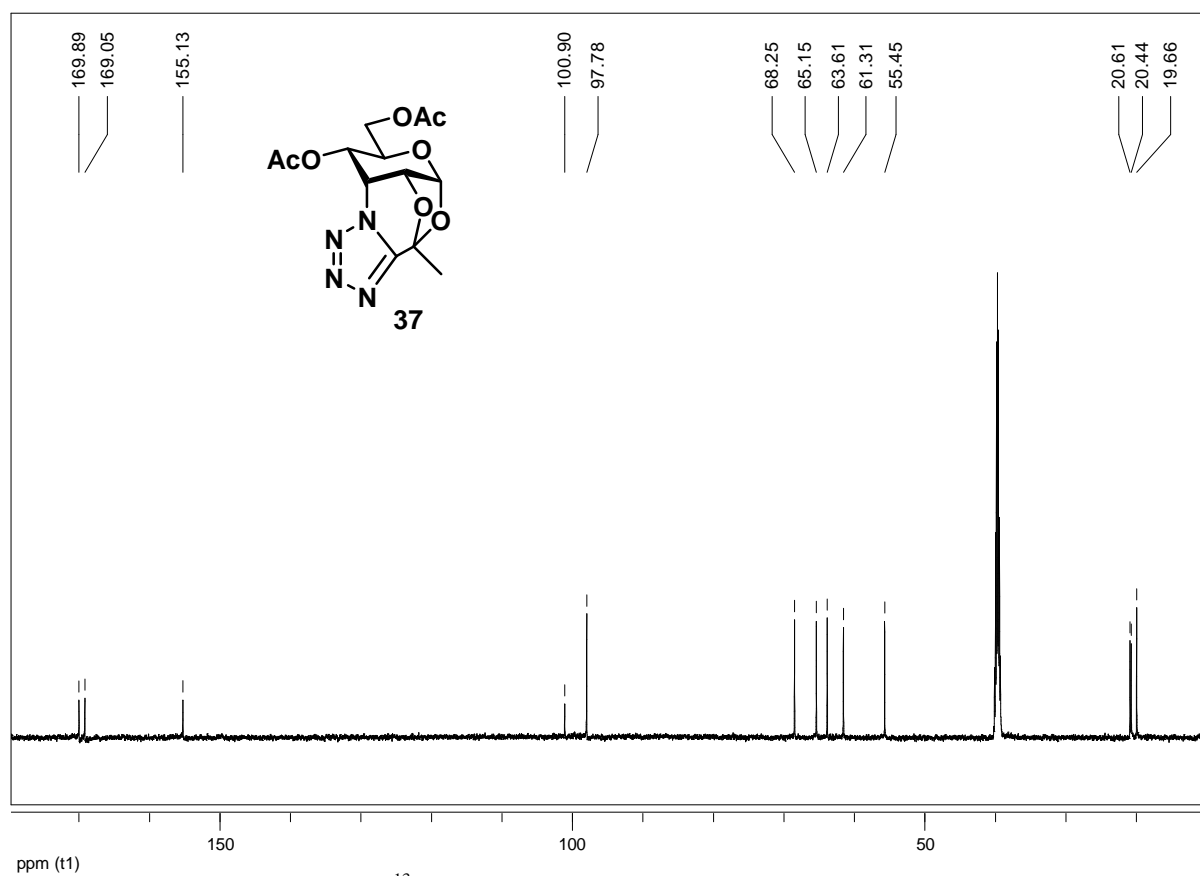


Abb. 13.18: <sup>13</sup>C-NMR von Verbindung **37** (150 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO).

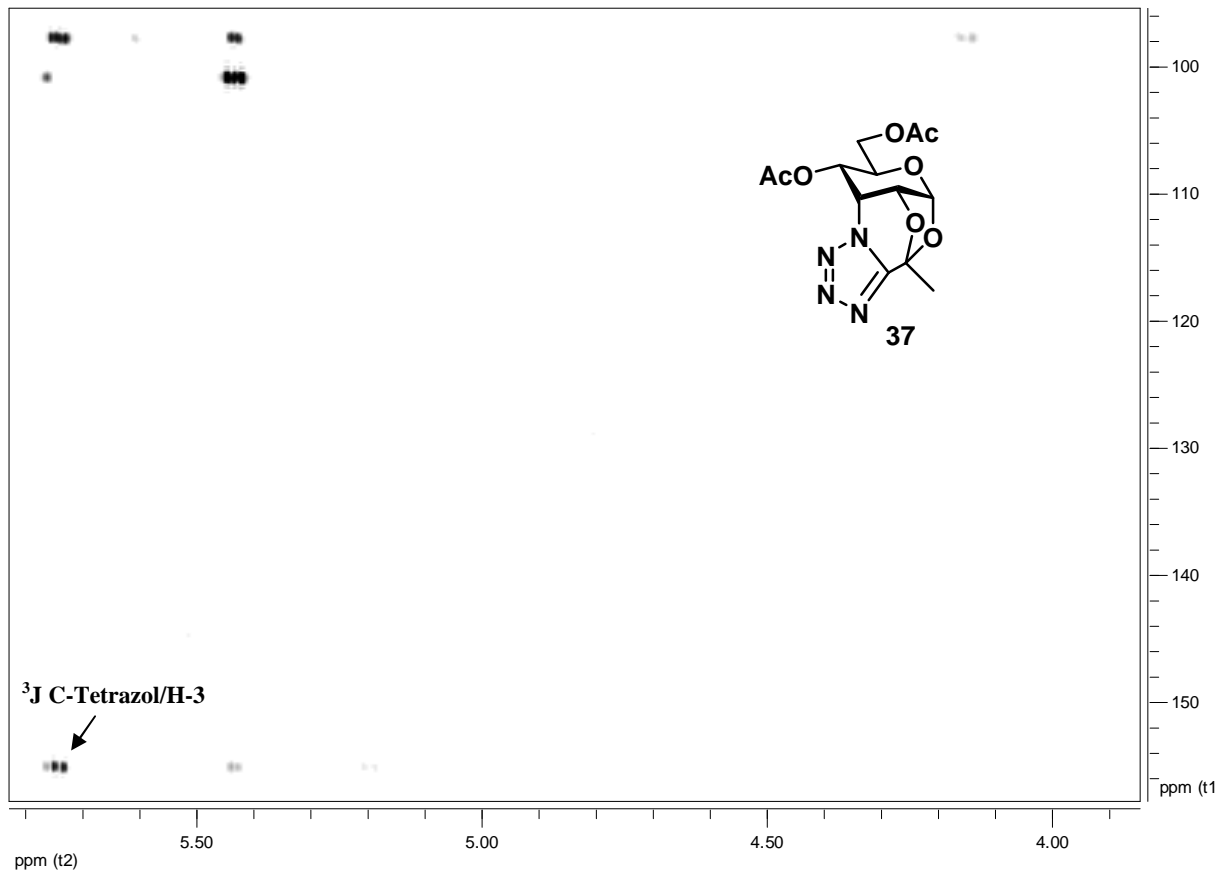


Abb. 13.19: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Verbindung **37** (600/150 MHz,  $d_6$ -DMSO); die markierte  $^3J$ -Kopplung zwischen H-3 und dem C-Atom des Tetrazols ist für die ermittelte Struktur des Tetrazols **37** zwingend erforderlich.

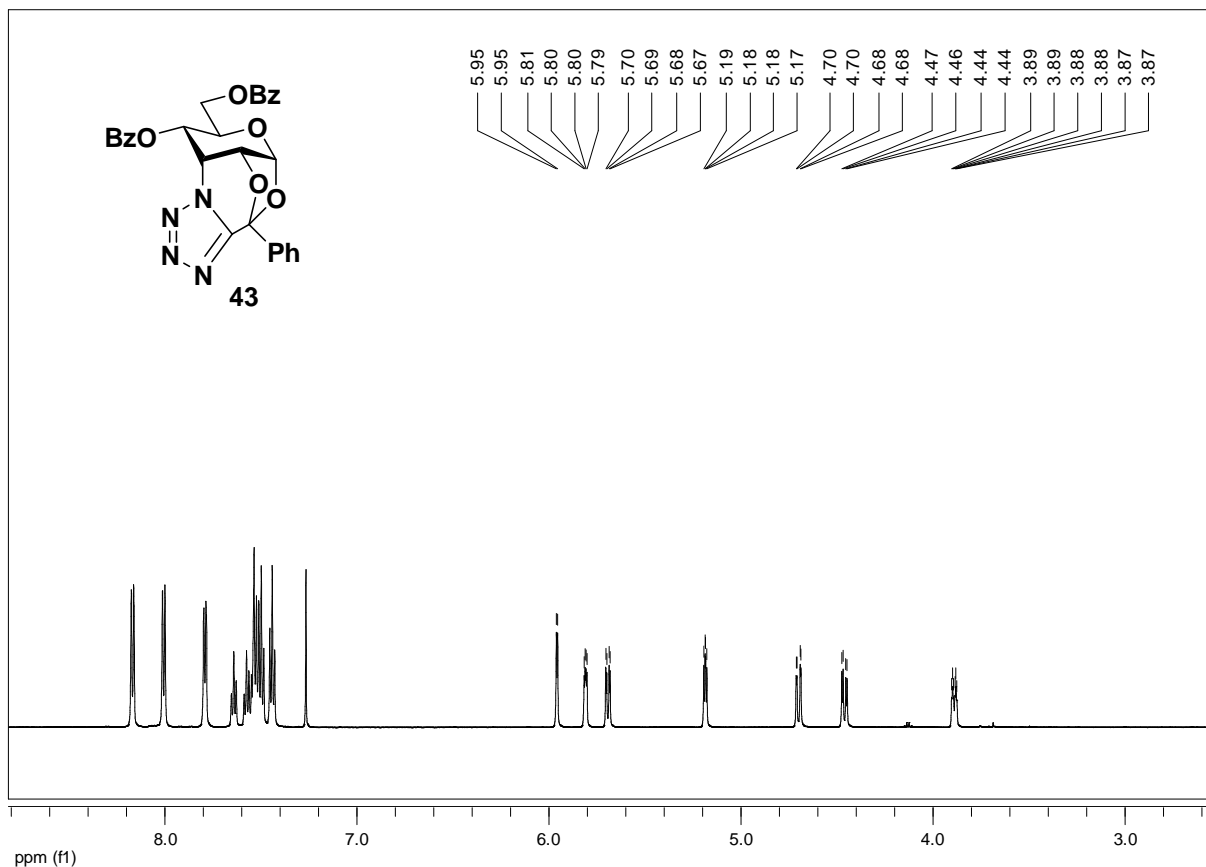


Abb. 13.20:  $^1H$ -NMR von Verbindung **43** (600 MHz,  $CDCl_3$ ).

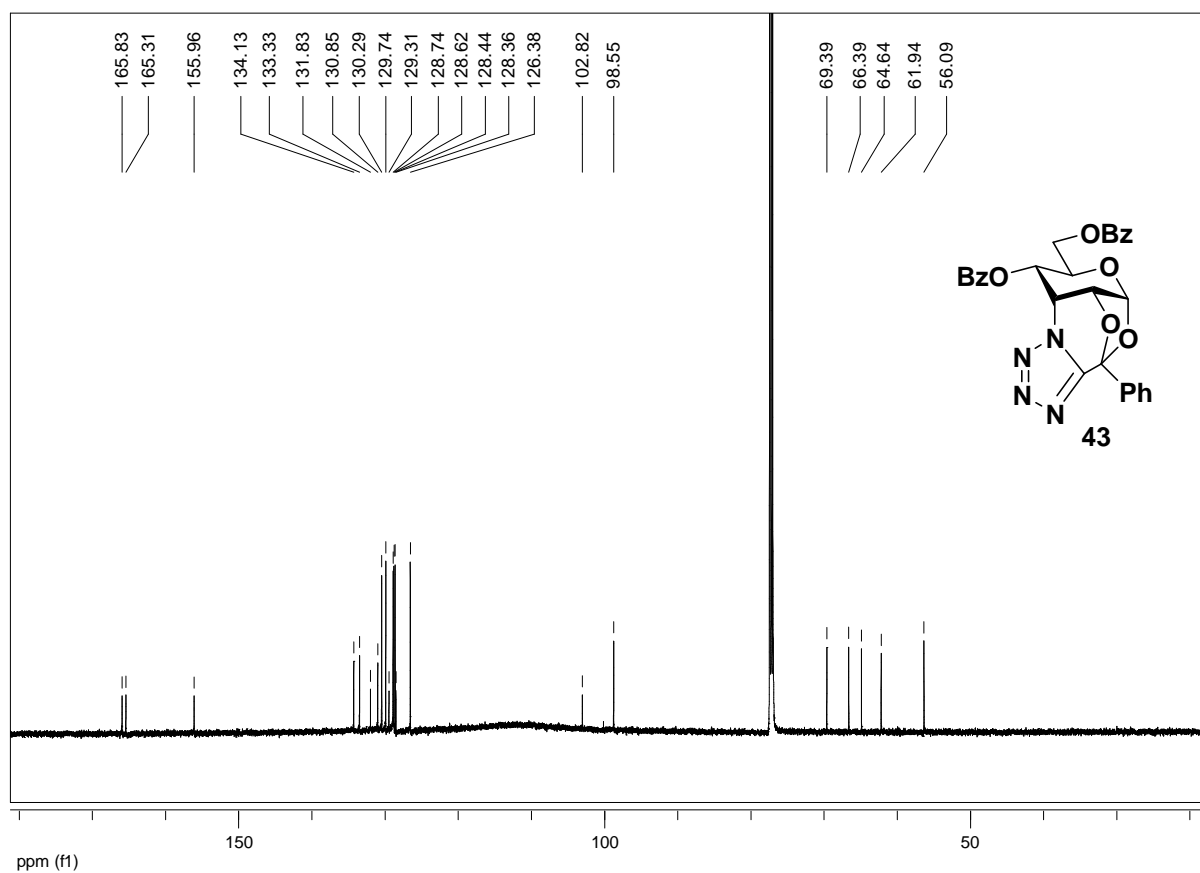


Abb. 13.21:  $^{13}\text{C}$ -NMR von Verbindung **43** (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

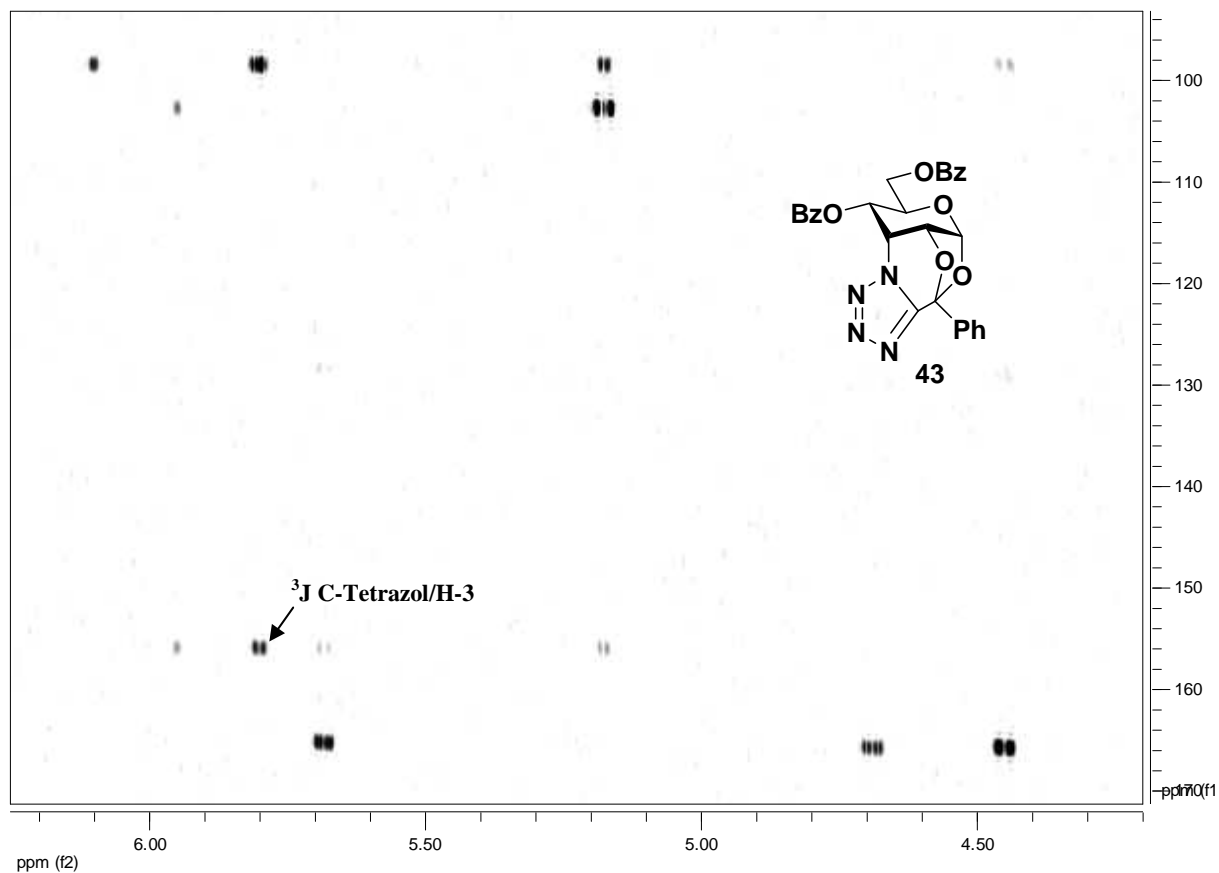


Abb. 13.22: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Verbindung **43** (600/150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ); die markierte  $^3\text{J}$ -Kopplung zwischen H-3 und dem C-Atom des Tetrazols ist für die ermittelte Struktur des Tetrazols **43** zwingend erforderlich.

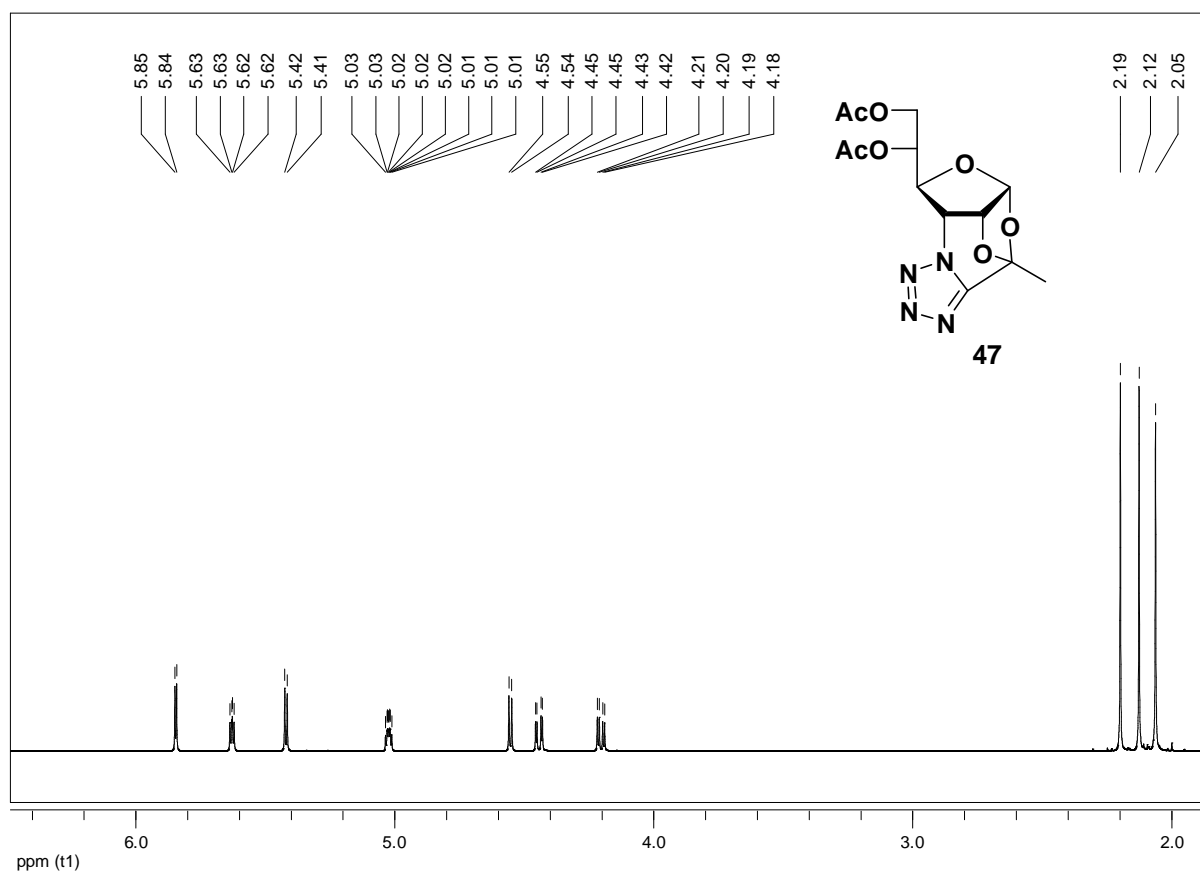


Abb. 13.23: <sup>1</sup>H-NMR von Verbindung **47** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

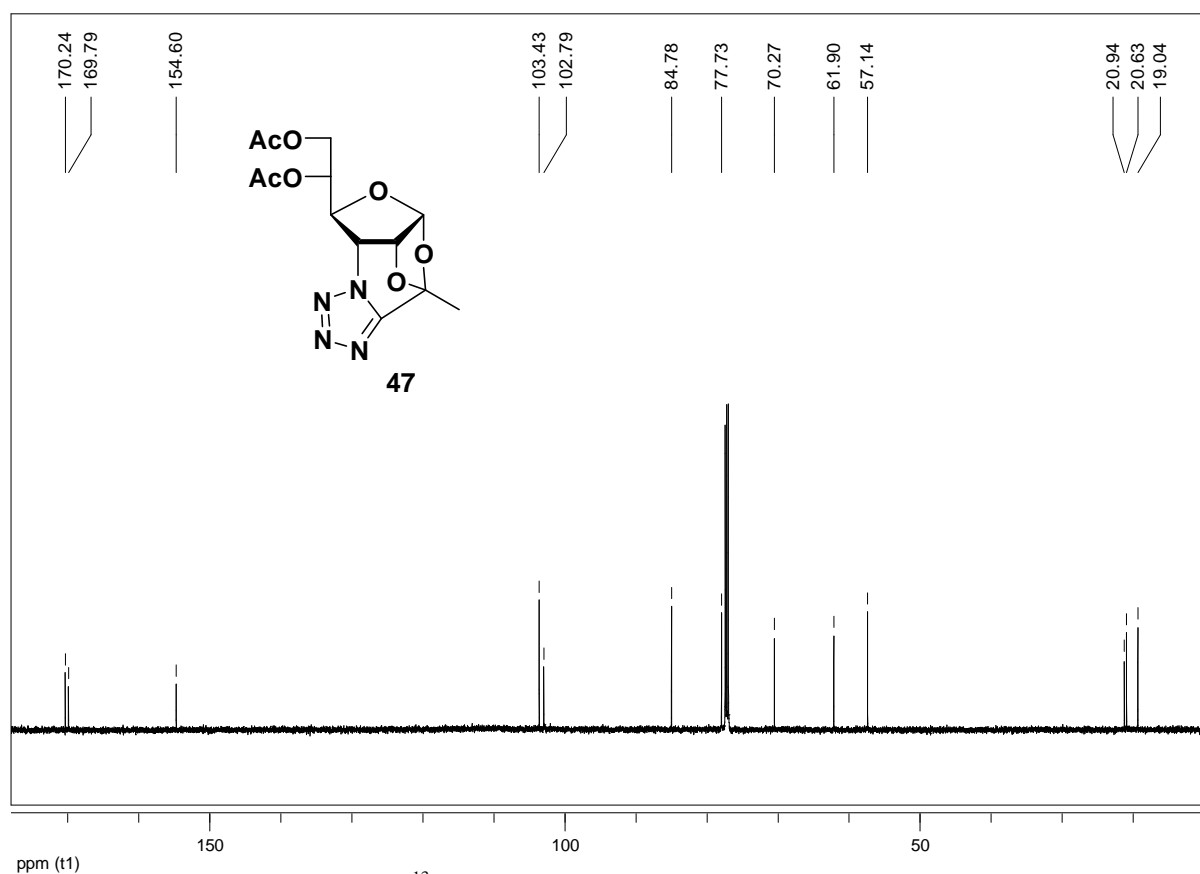


Abb. 13.24: <sup>13</sup>C-NMR von Verbindung **47** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

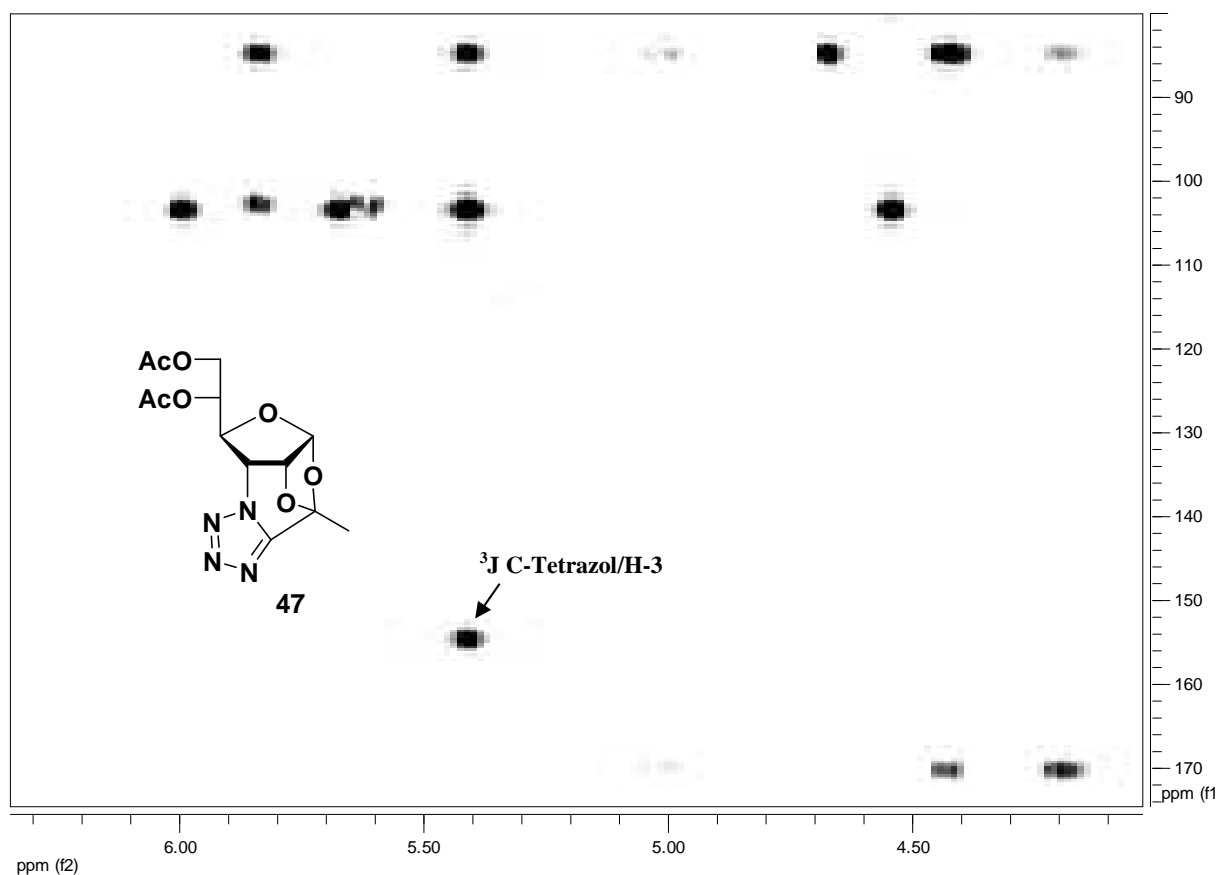


Abb. 13.25: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von Verbindung **47** (600/150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ); die markierte  $^3\text{J}$ -Kopplung zwischen H-3 und dem C-Atom des Tetrazols ist für die ermittelte Struktur des Tetrazols **47** zwingend erforderlich.

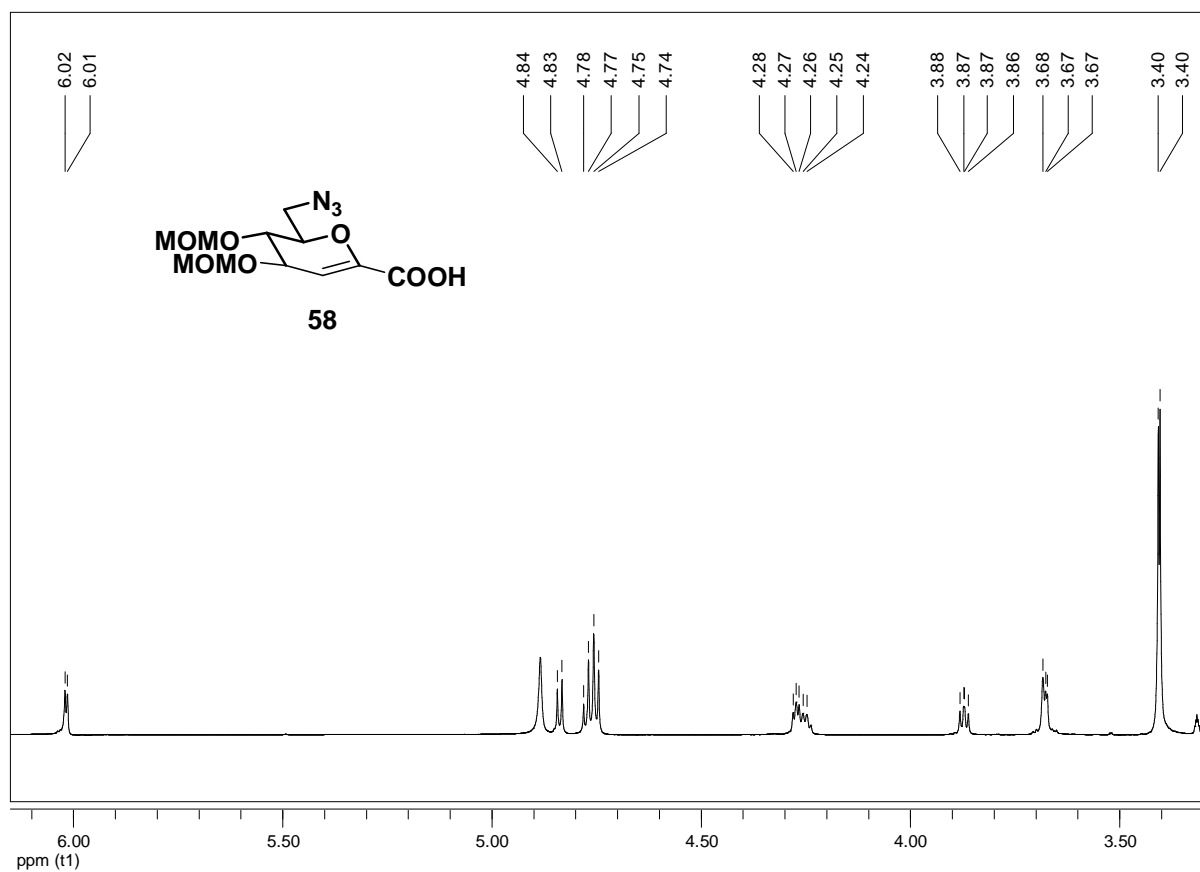


Abb. 13.26:  $^1\text{H}$ -NMR von Verbindung **58** (600 MHz,  $\text{d}_4\text{-MeOH}$ ).

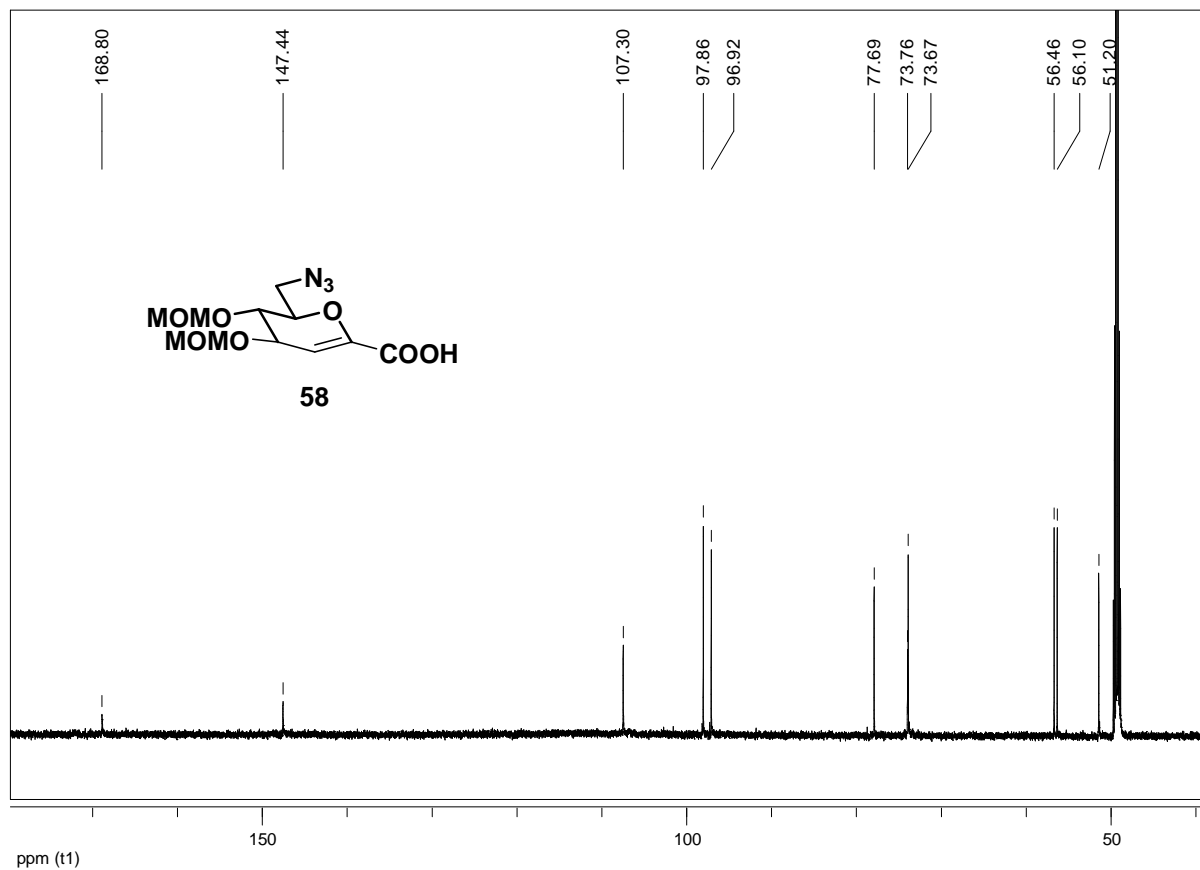


Abb. 13.27:  $^{13}C$ -NMR von Verbindung **58** (150 MHz,  $d_4$ -MeOH).

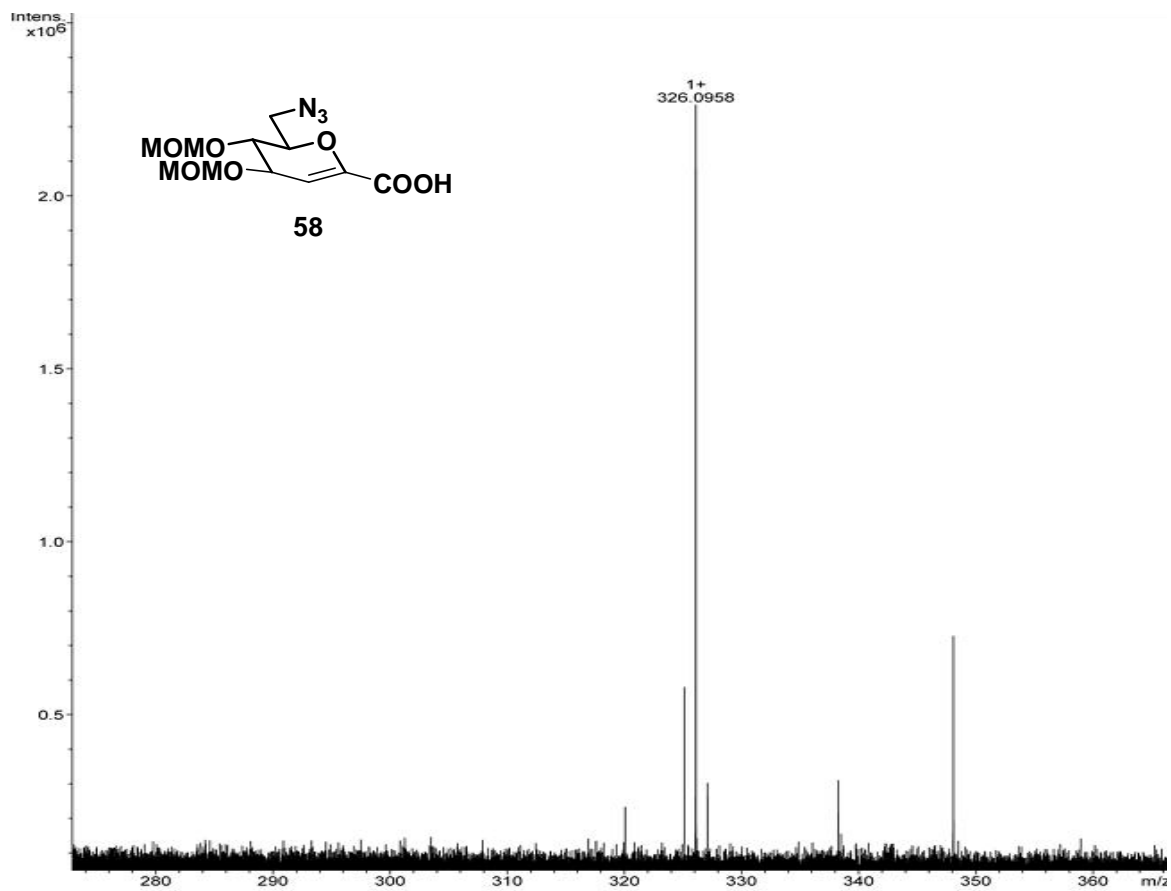


Abb. 13.28: Hochaufgelöstes ESI-Spektrum von Verbindung **58** (pos. Mode, MeOH).

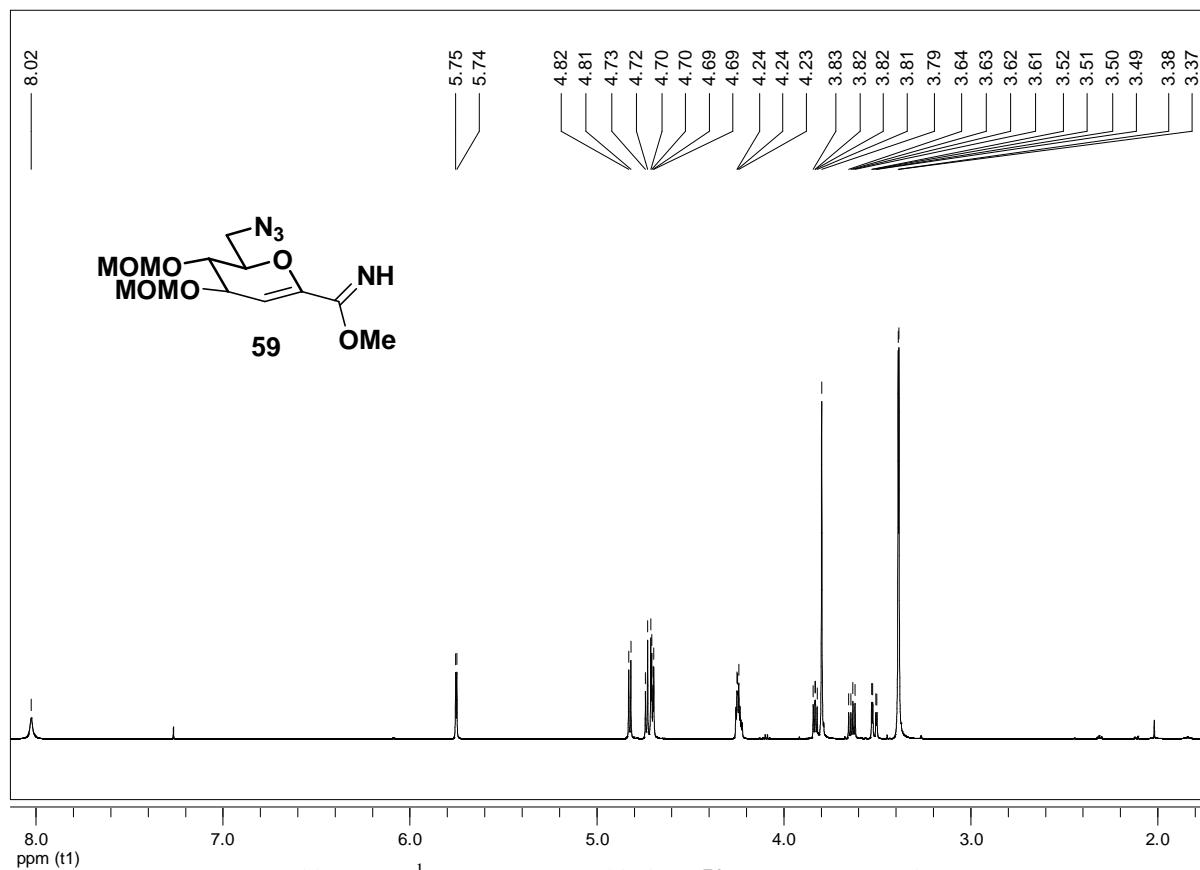


Abb. 13.29: <sup>1</sup>H-NMR von Verbindung **59** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

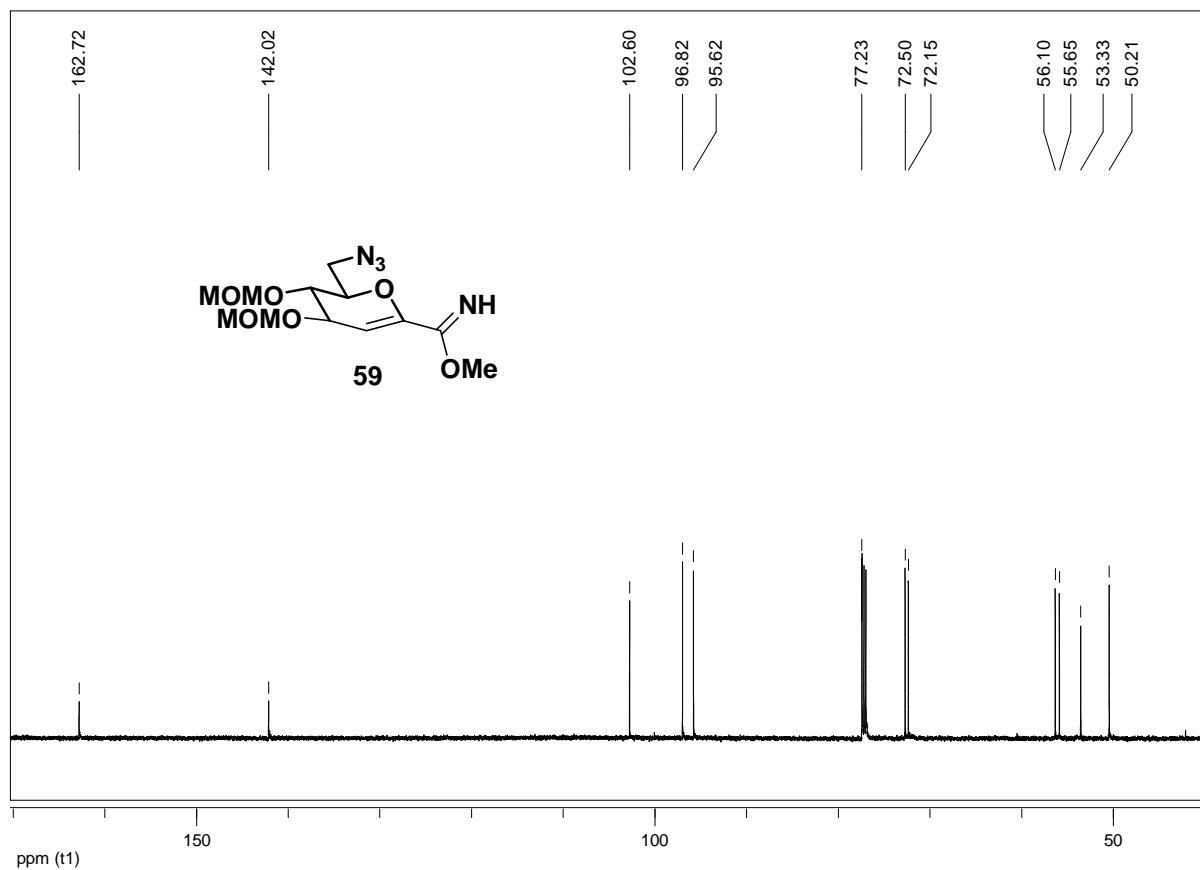


Abb. 13.30: <sup>13</sup>C-NMR von Verbindung **59** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

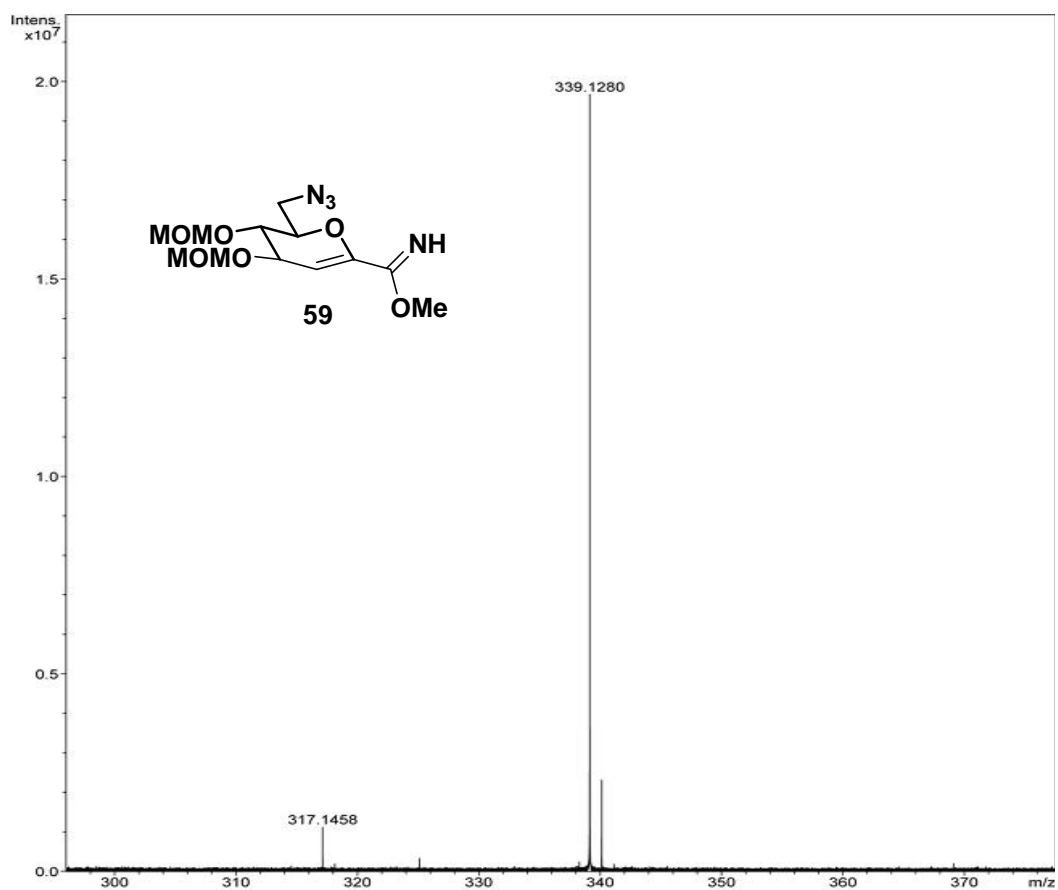


Abb. 13.31: Hochaufgelöstes ESI-Spektrum von Verbindung **59** (pos. Mode, MeOH).

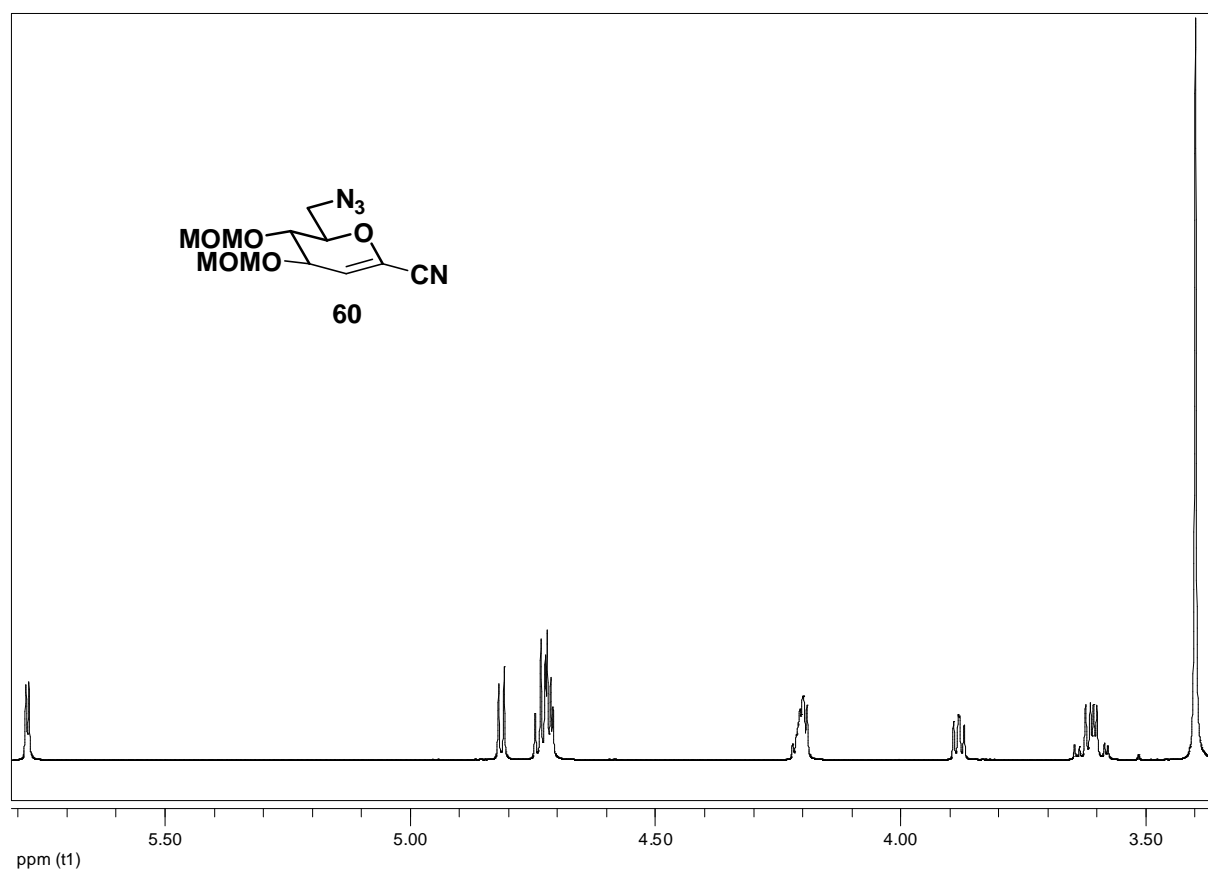


Abb. 13.32:  $^1H$ -NMR von Verbindung **60** (600 MHz,  $CDCl_3$ ).

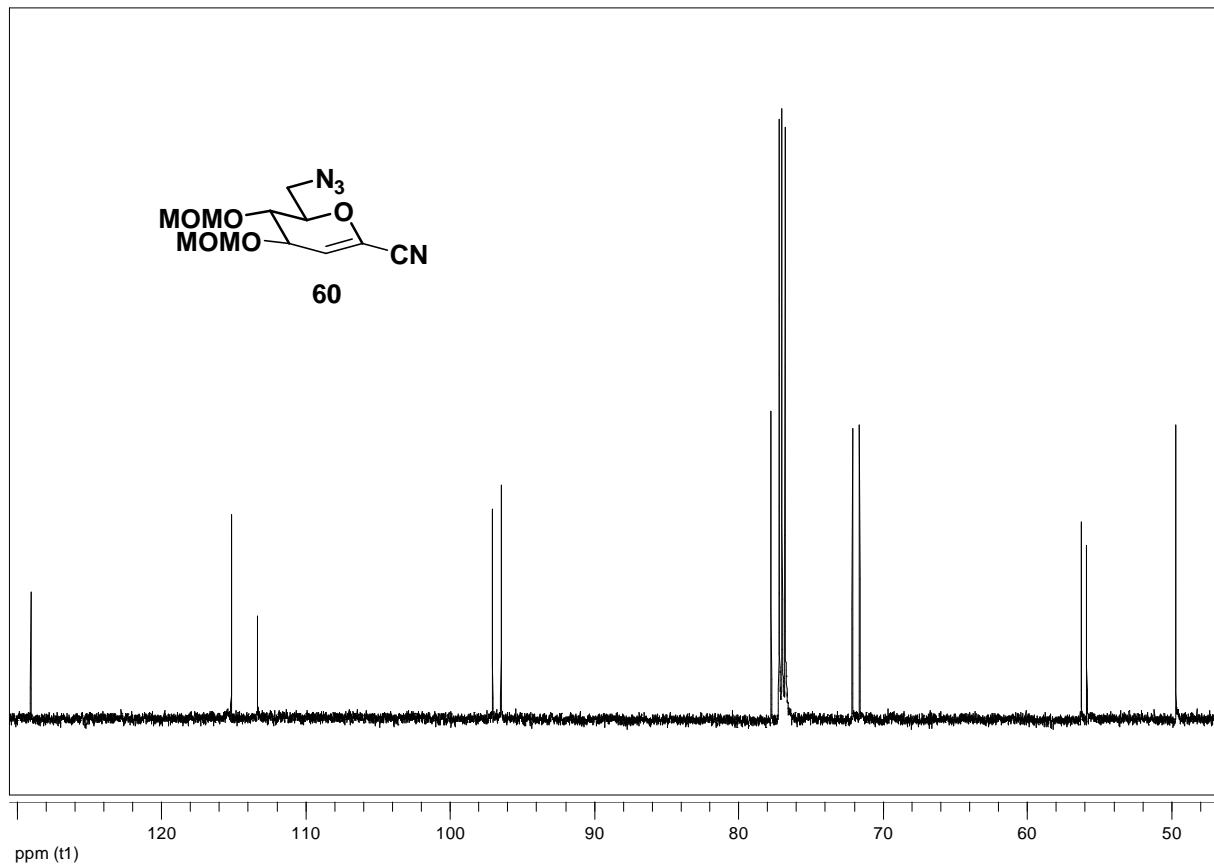


Abb. 13.33:  $^{13}C$ -NMR von Verbindung **60** (150 MHz,  $CDCl_3$ ).

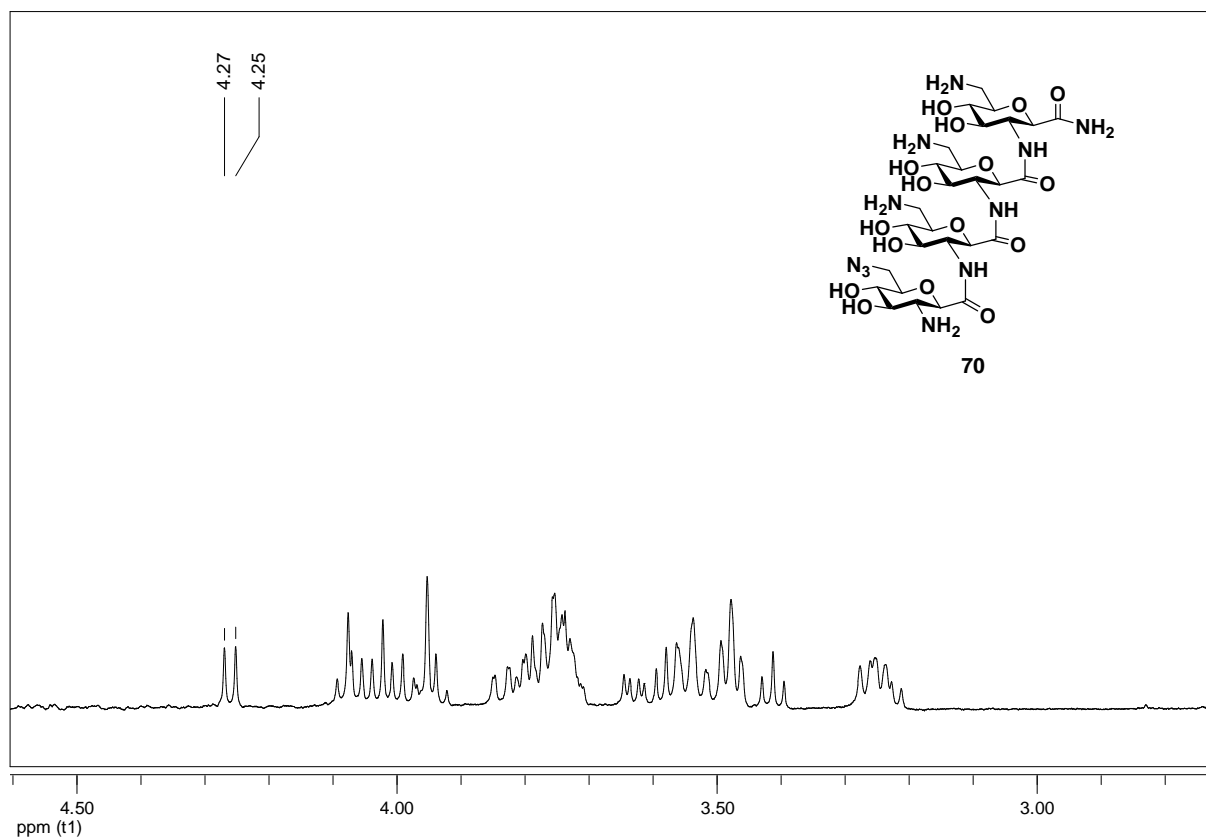


Abb. 13.34:  $^1H$ -NMR von Verbindung **70** (600 MHz,  $D_2O$ ).

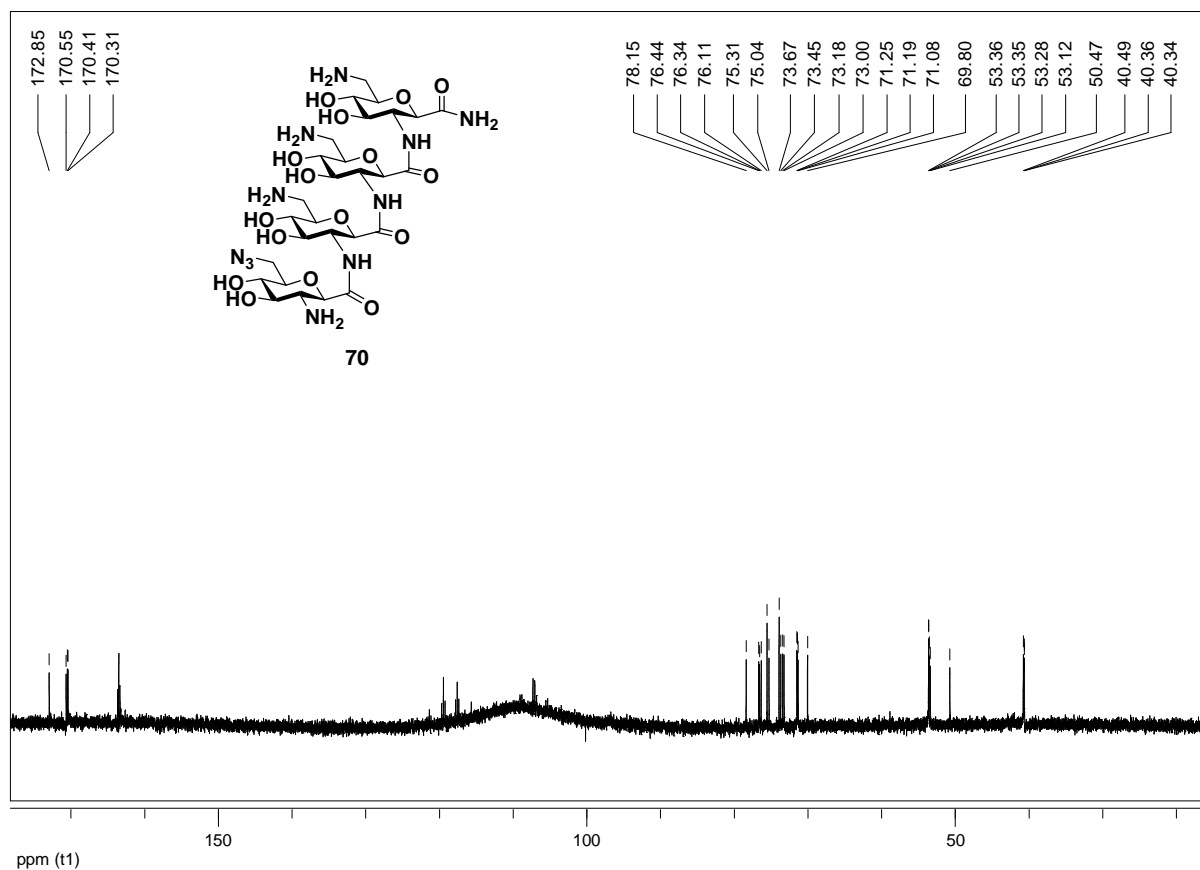


Abb. 13.35:  $^{13}\text{C}$ -NMR von Verbindung **70** (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

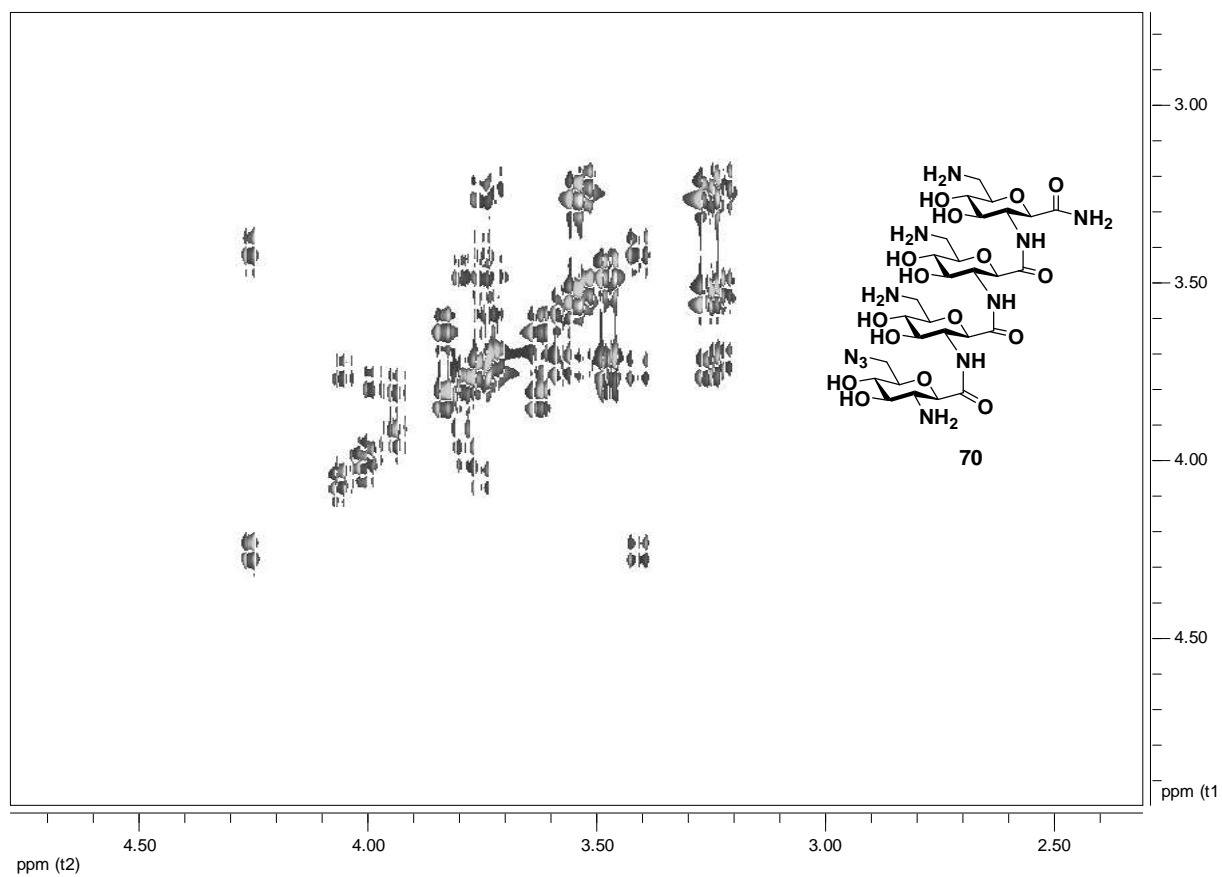


Abb. 13.36:  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von Verbindung **70** (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

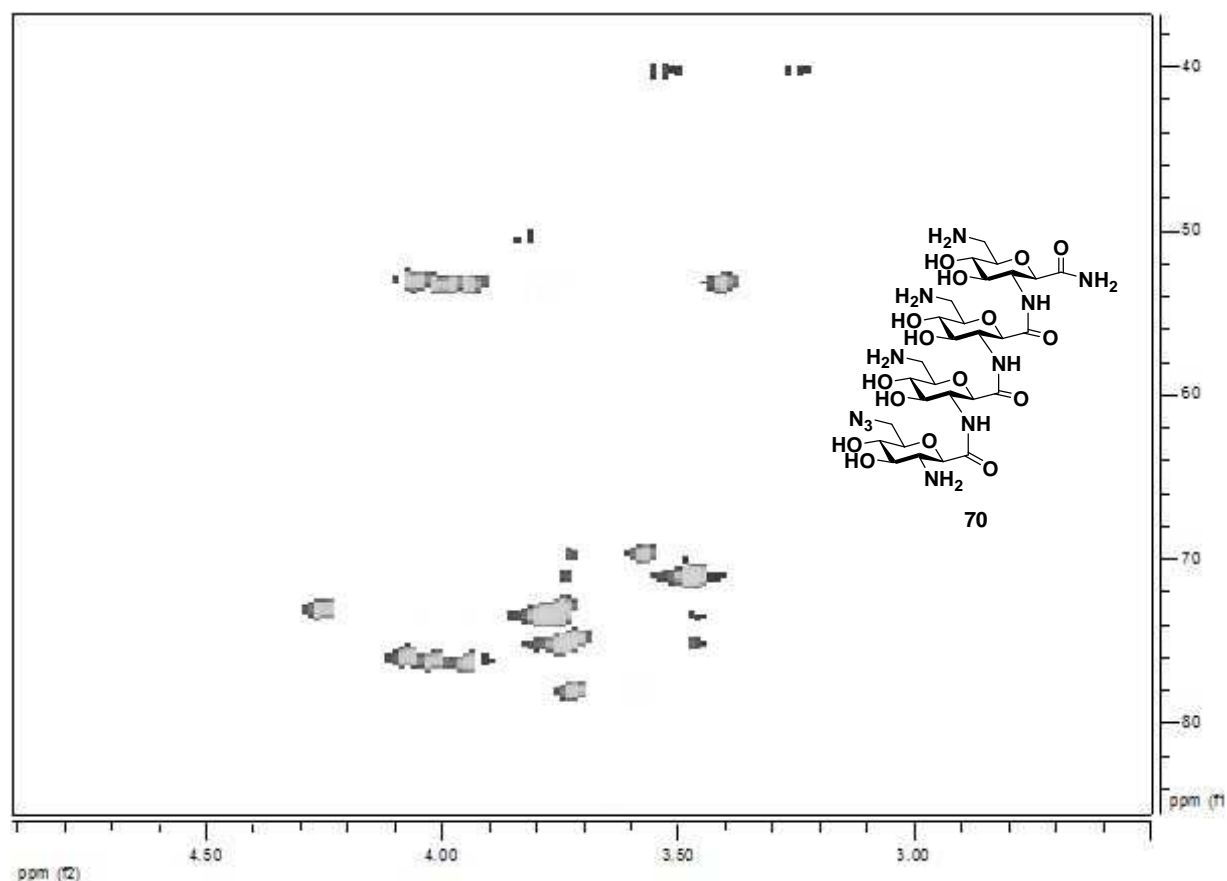


Abb. 13.37: Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Verbindung **70** (600/150 MHz, D<sub>2</sub>O).

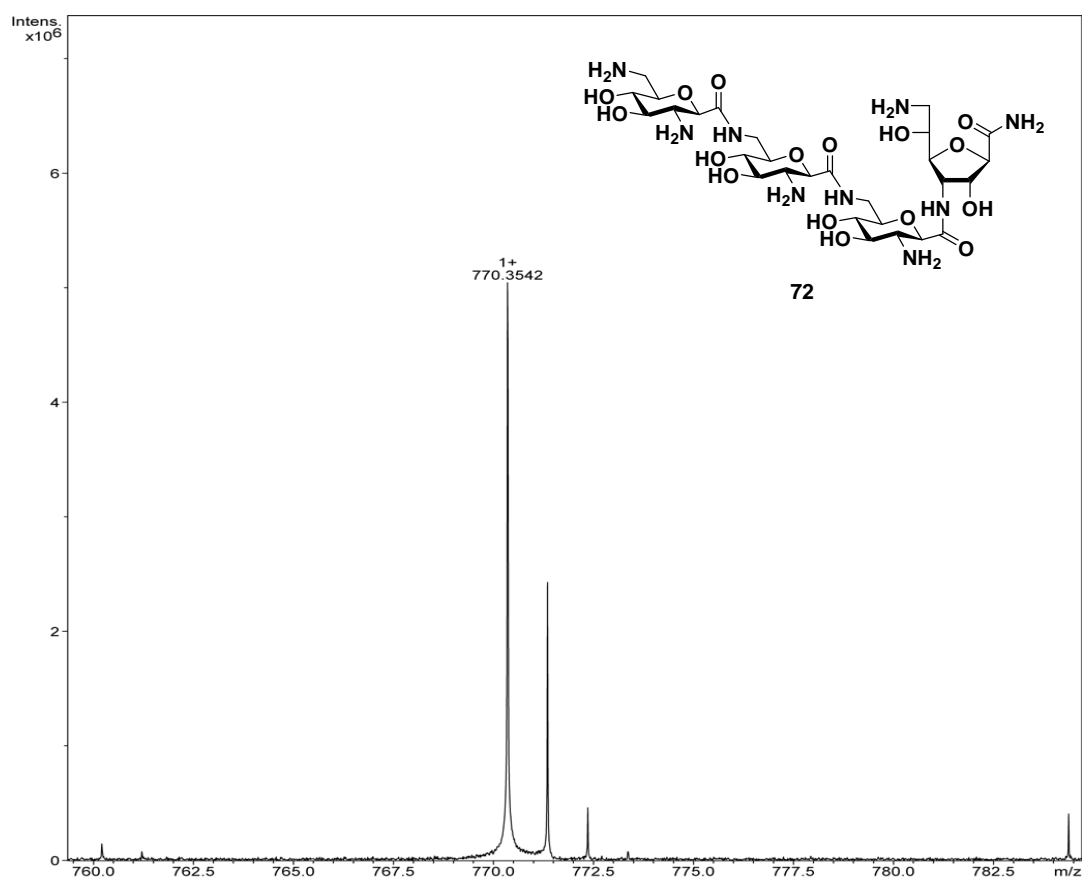


Abb. 13.38: Hochaufgelöstes ESI-Spektrum von Verbindung **72** (pos. Mode, H<sub>2</sub>O).

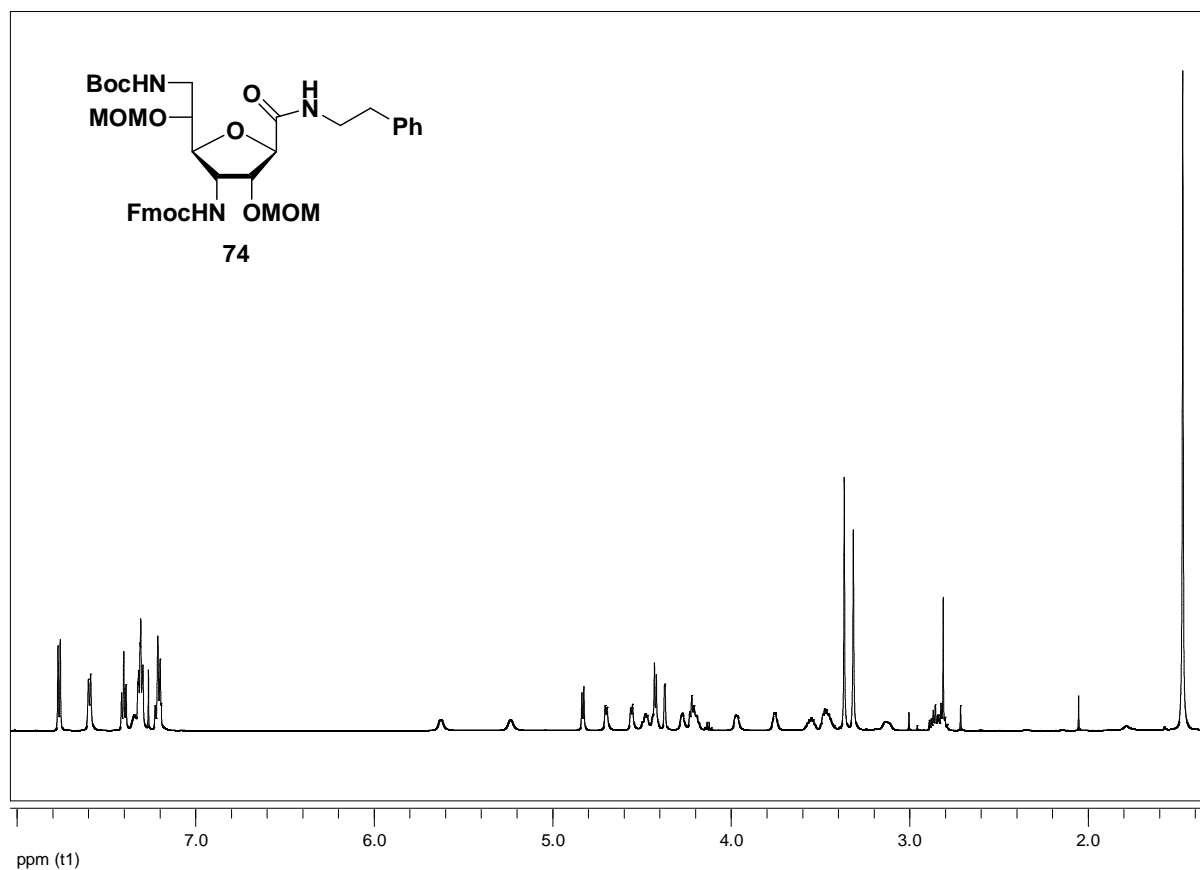


Abb. 13.39:  $^1\text{H-NMR}$  von Verbindung **74** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

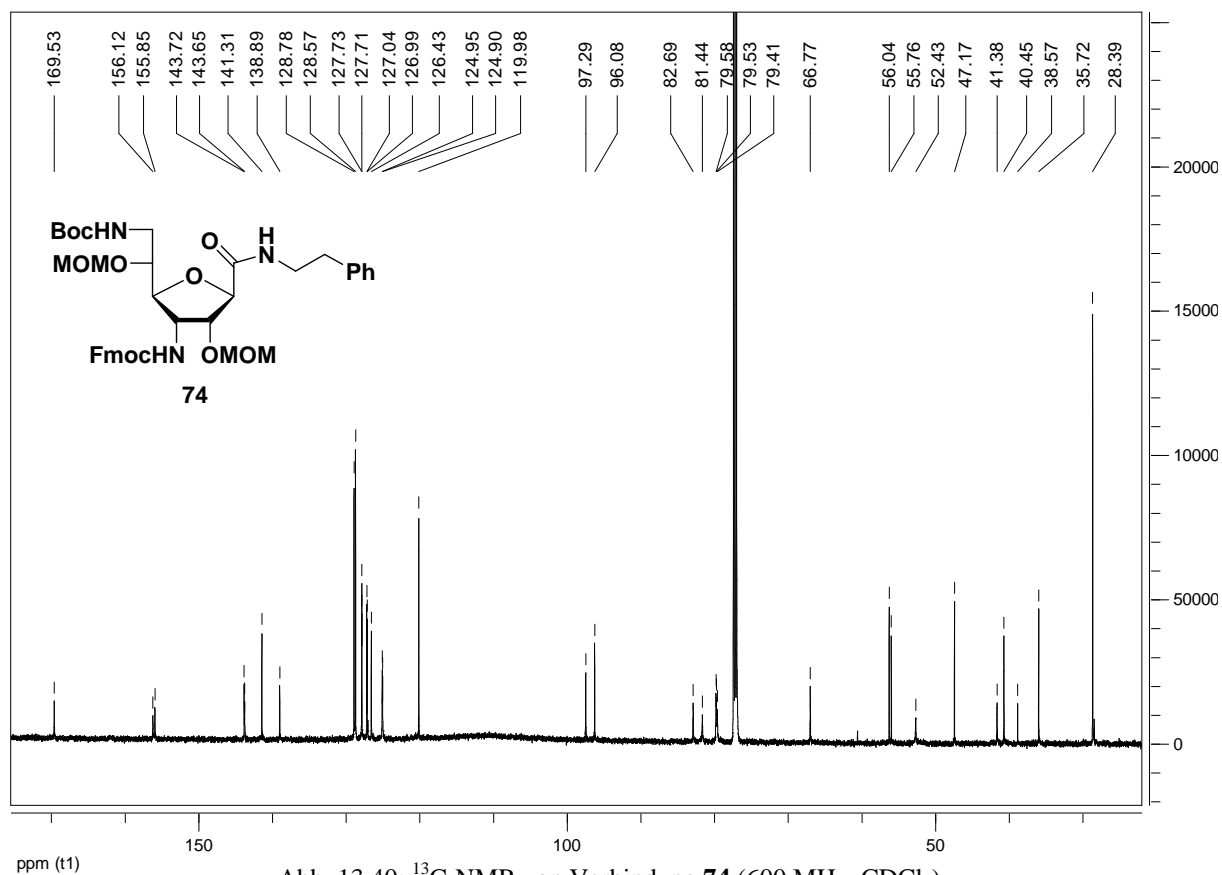


Abb. 13.40:  $^{13}\text{C-NMR}$  von Verbindung **74** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

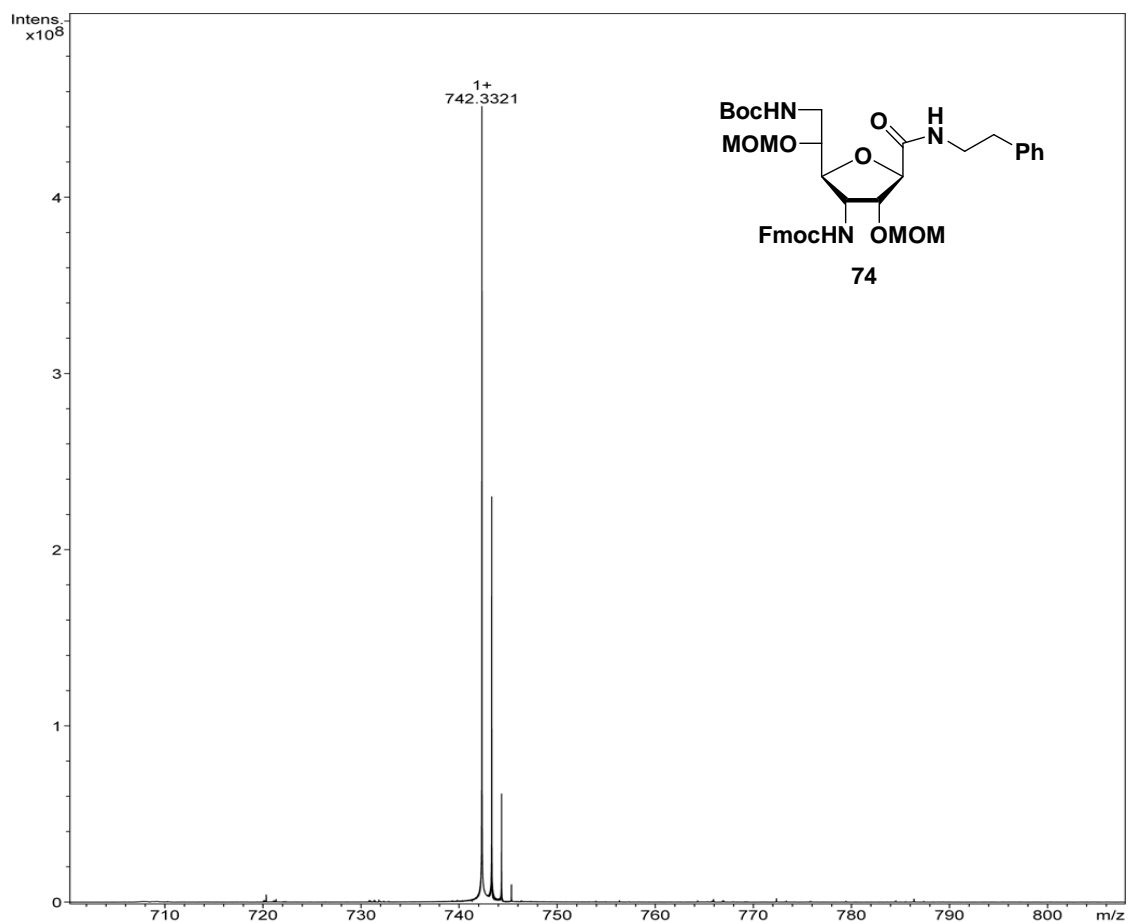


Abb. 13.41: Hochaufgelöstes ESI-Spektrum von Verbindung **74** (pos. Mode,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ).

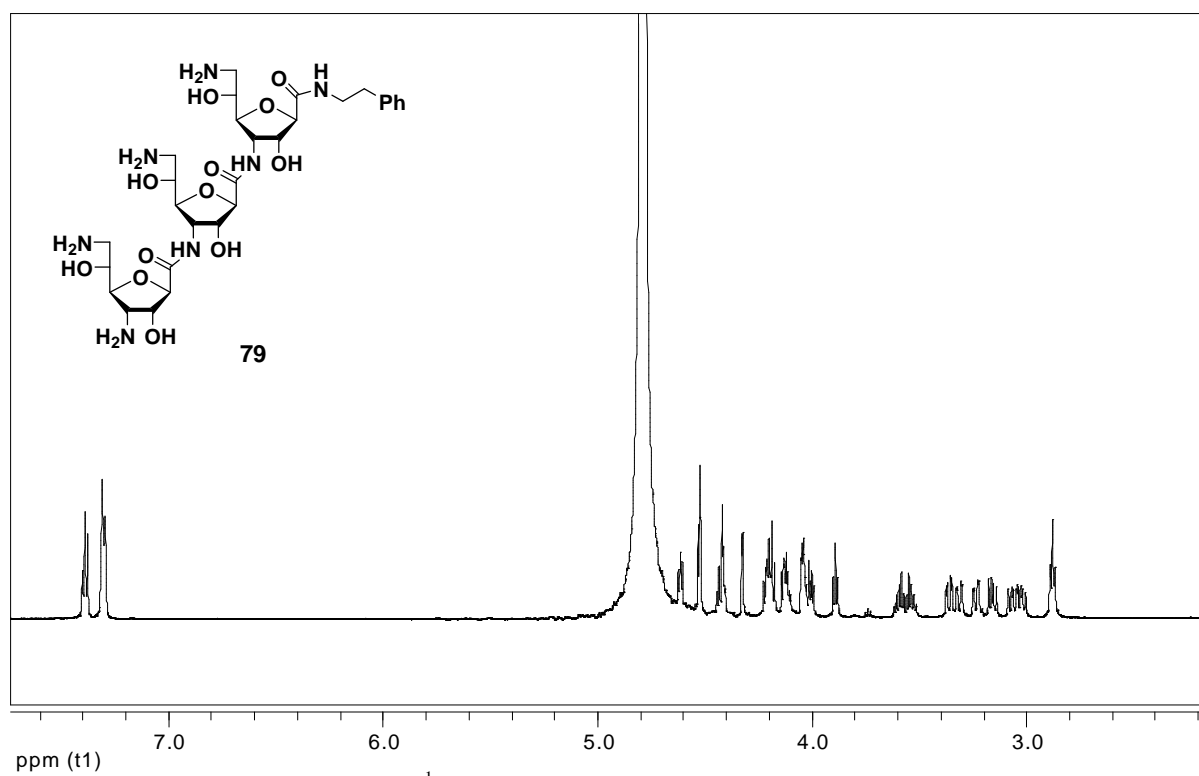


Abb. 13.42:  $^1\text{H-NMR}$  von Verbindung **79** (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

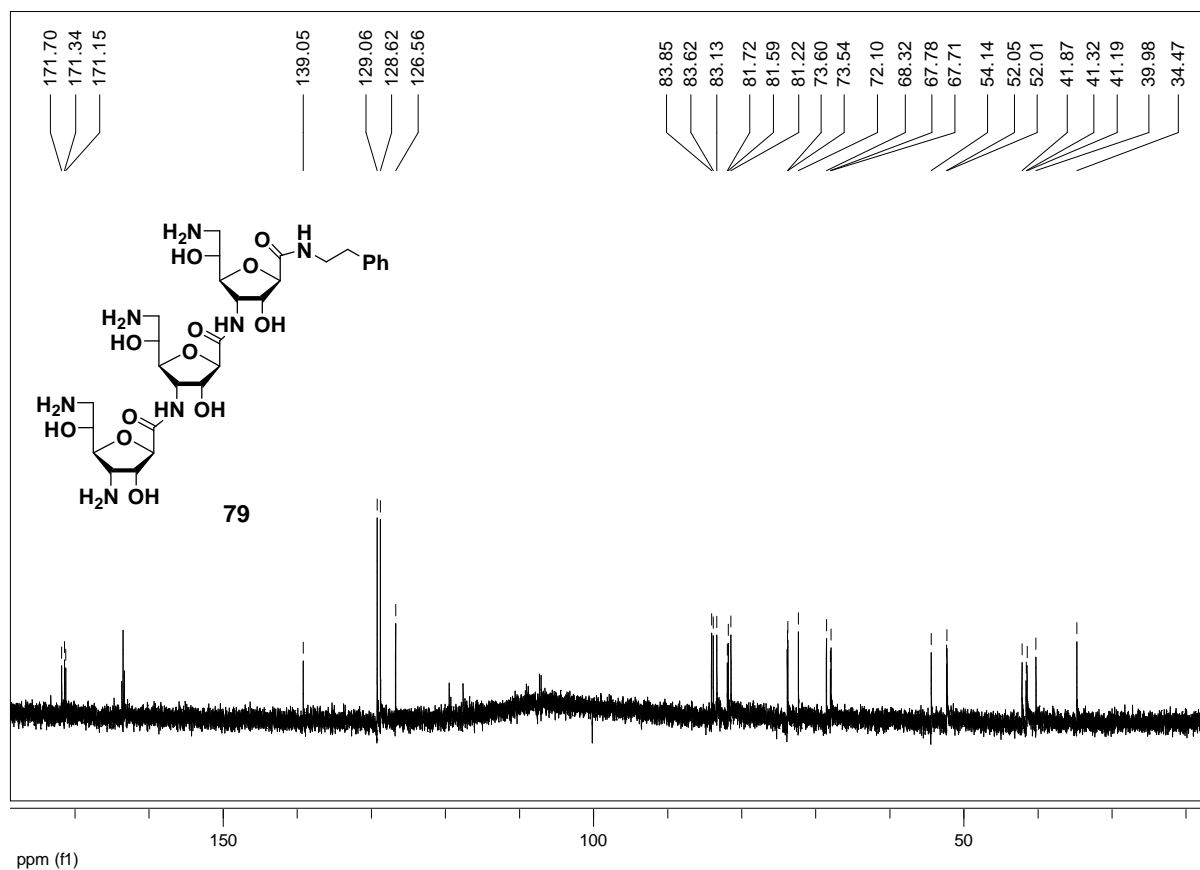


Abb. 13.43:  $^{13}\text{C-NMR}$  von Verbindung **79** (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

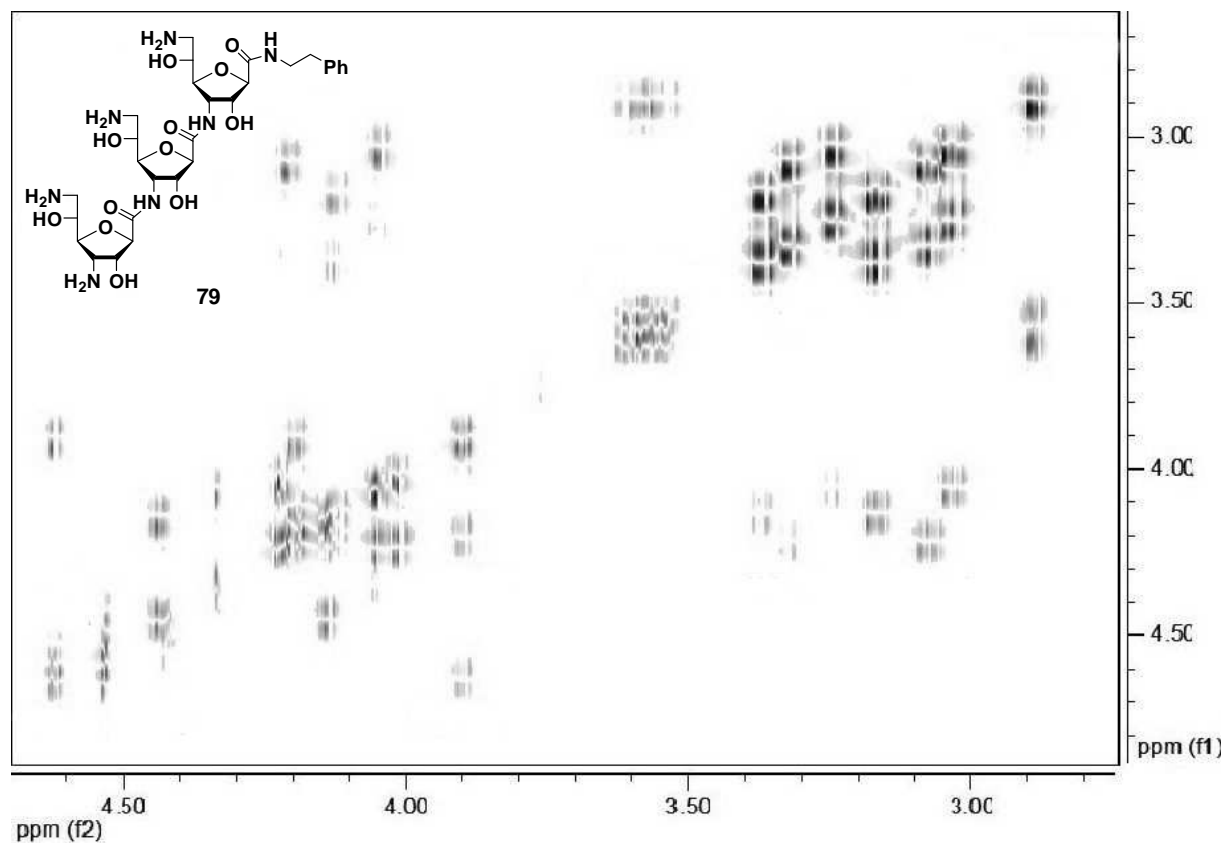


Abb. 13.44: Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}$ -Spektrum von Verbindung **79** (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

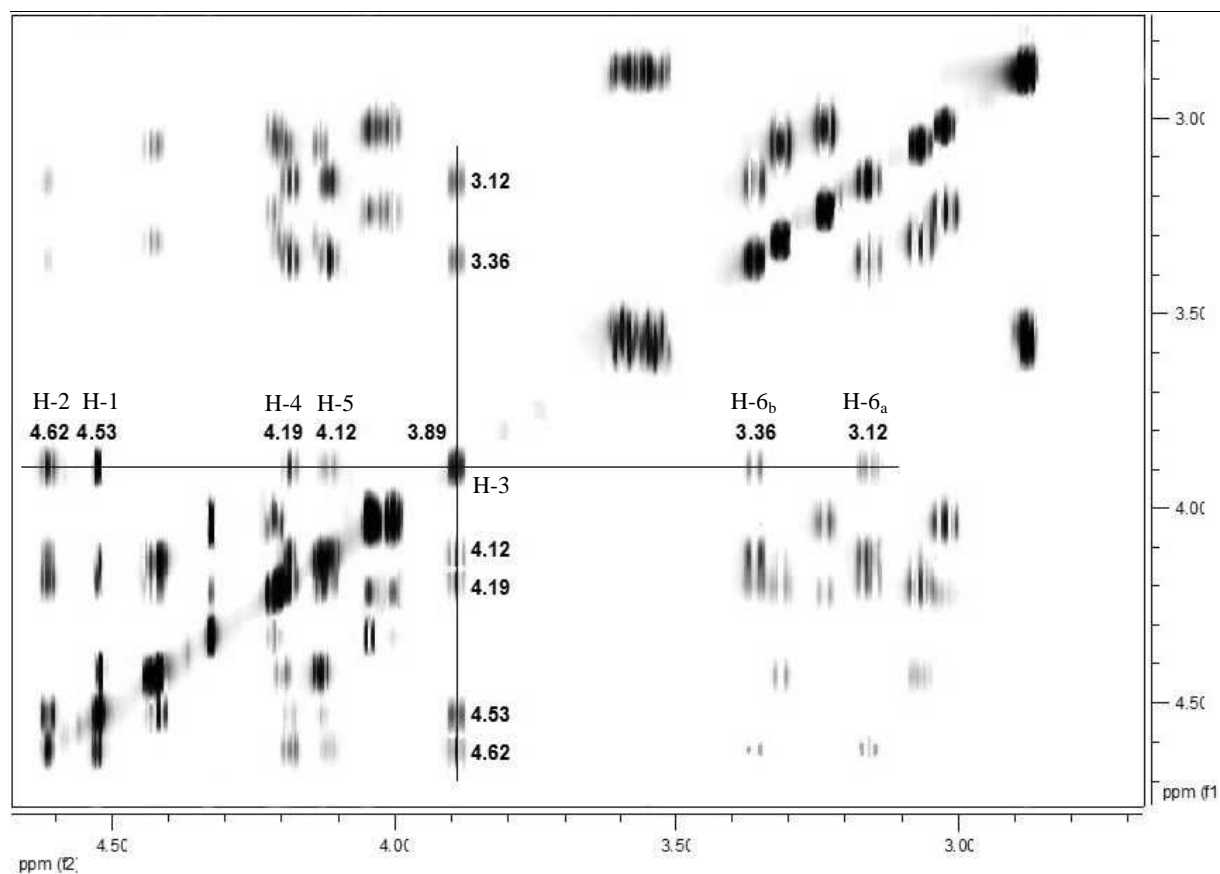


Abb. 13.45: Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY-Spektrum von Verbindung **79** (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ). Die TOCSY-Spur einer Alloseeinheit von Verbindung **79** wurde hervorgehoben.

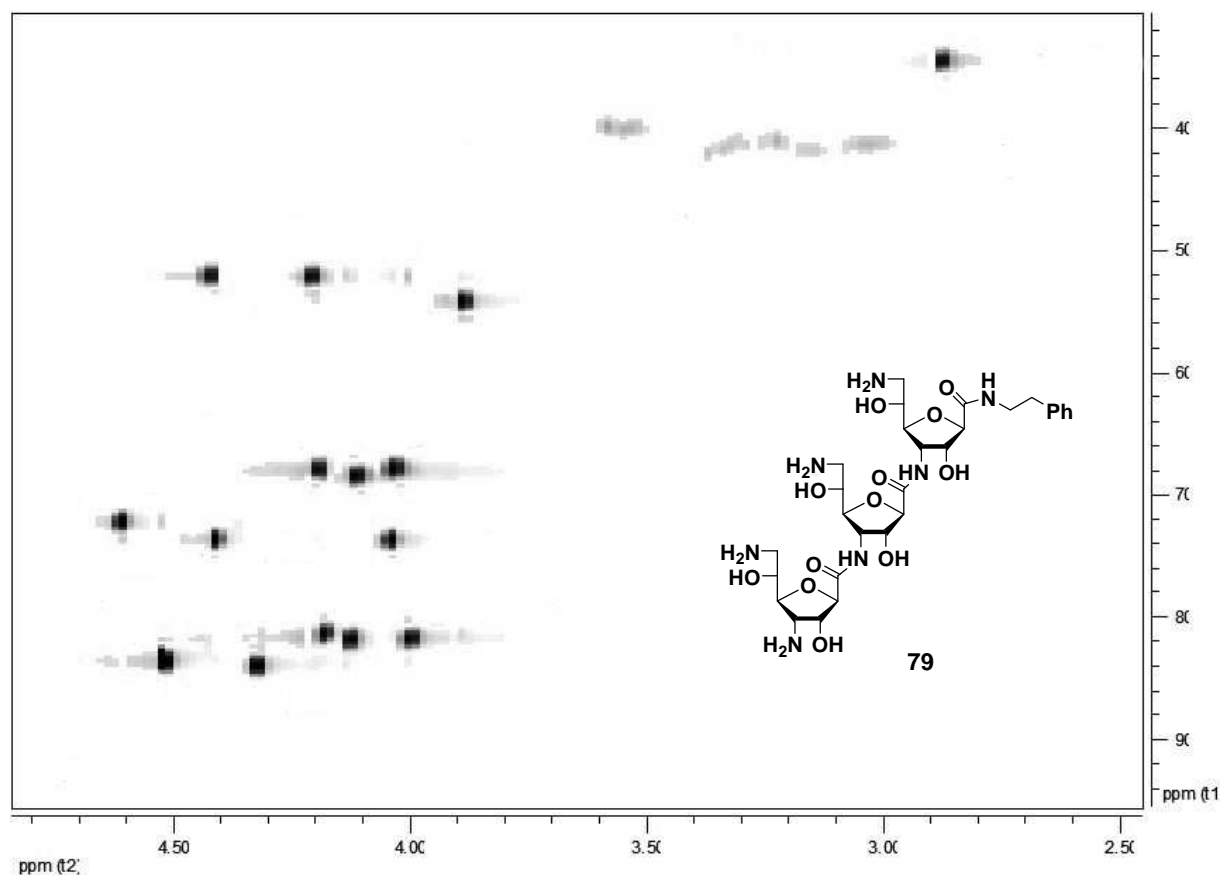


Abb. 13.46: Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Verbindung **79** (600/150 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

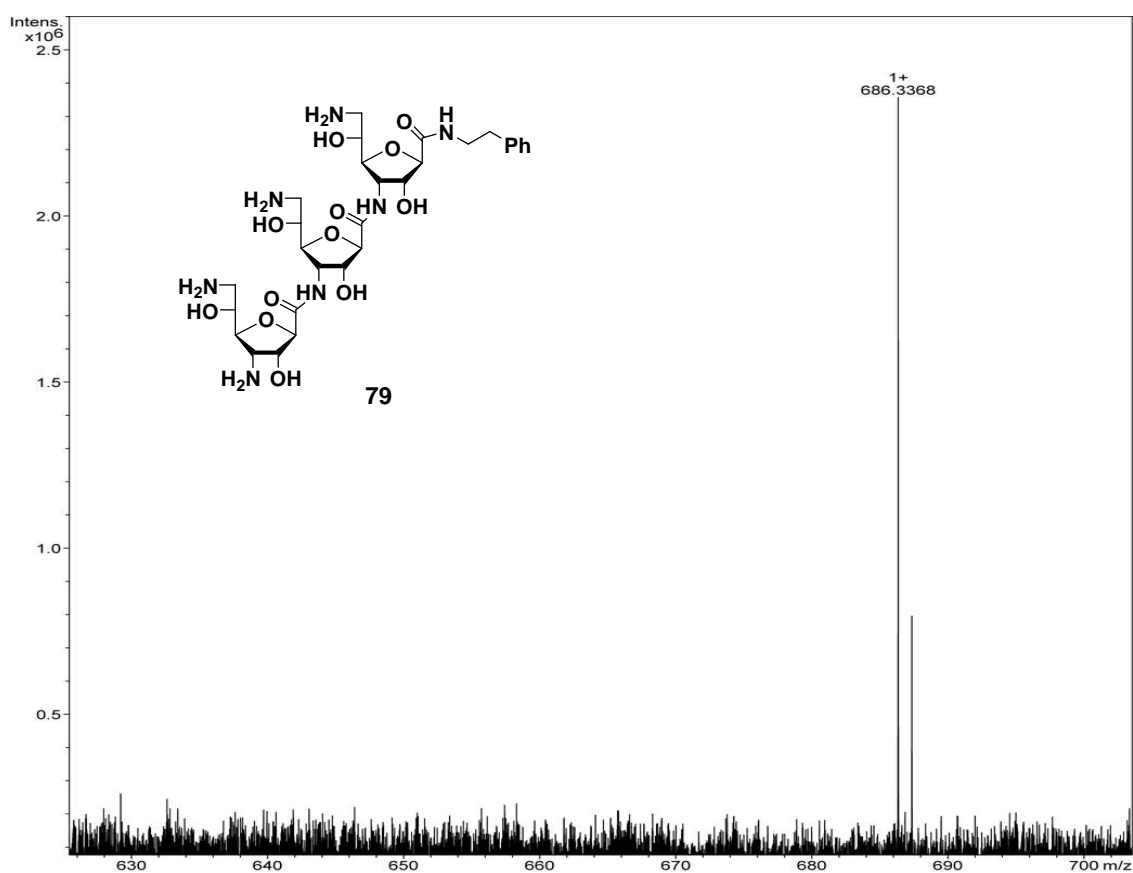


Abb. 13.47: Hochaufgelöstes ESI-Spektrum von Verbindung **79** (pos. Mode, H<sub>2</sub>O).

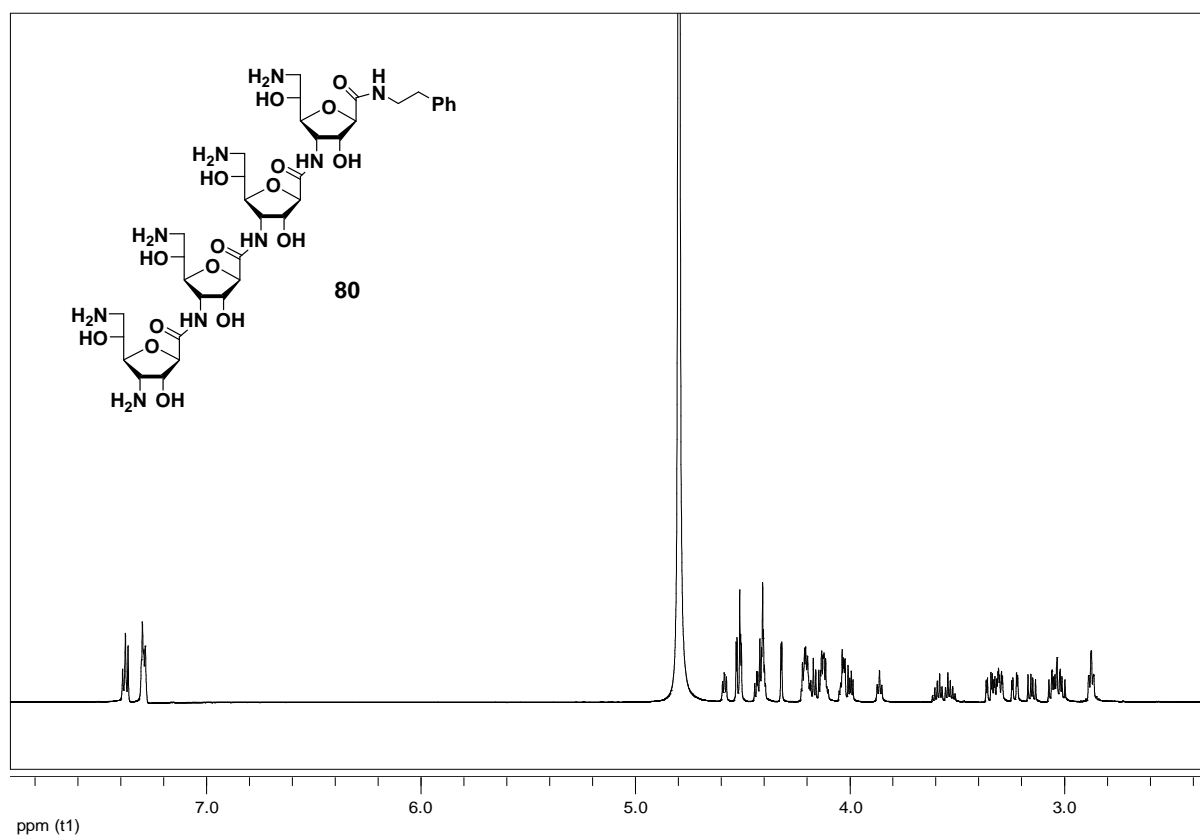


Abb. 13.48: <sup>1</sup>H-NMR von Verbindung **80** (600 MHz, D<sub>2</sub>O).

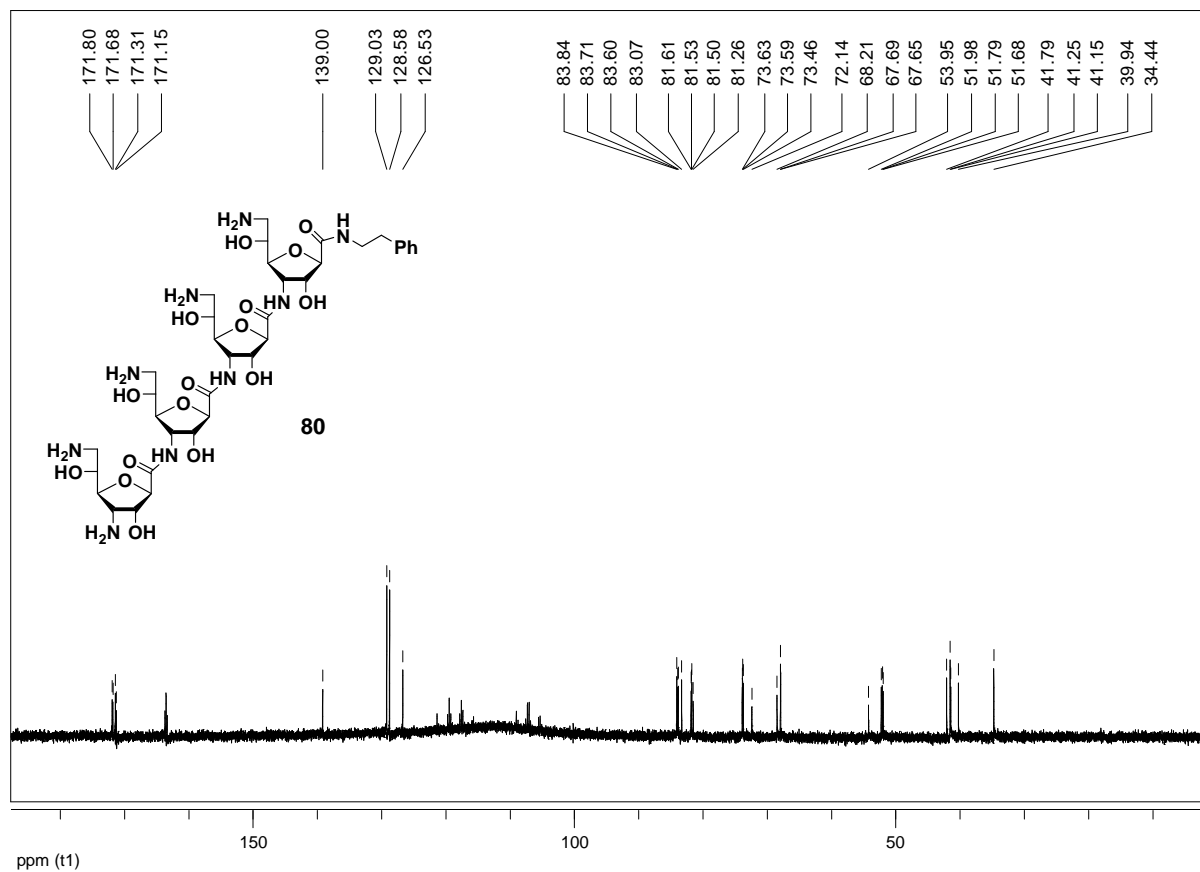


Abb. 13.49:  $^{13}\text{C}$ -NMR von Verbindung **80** (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

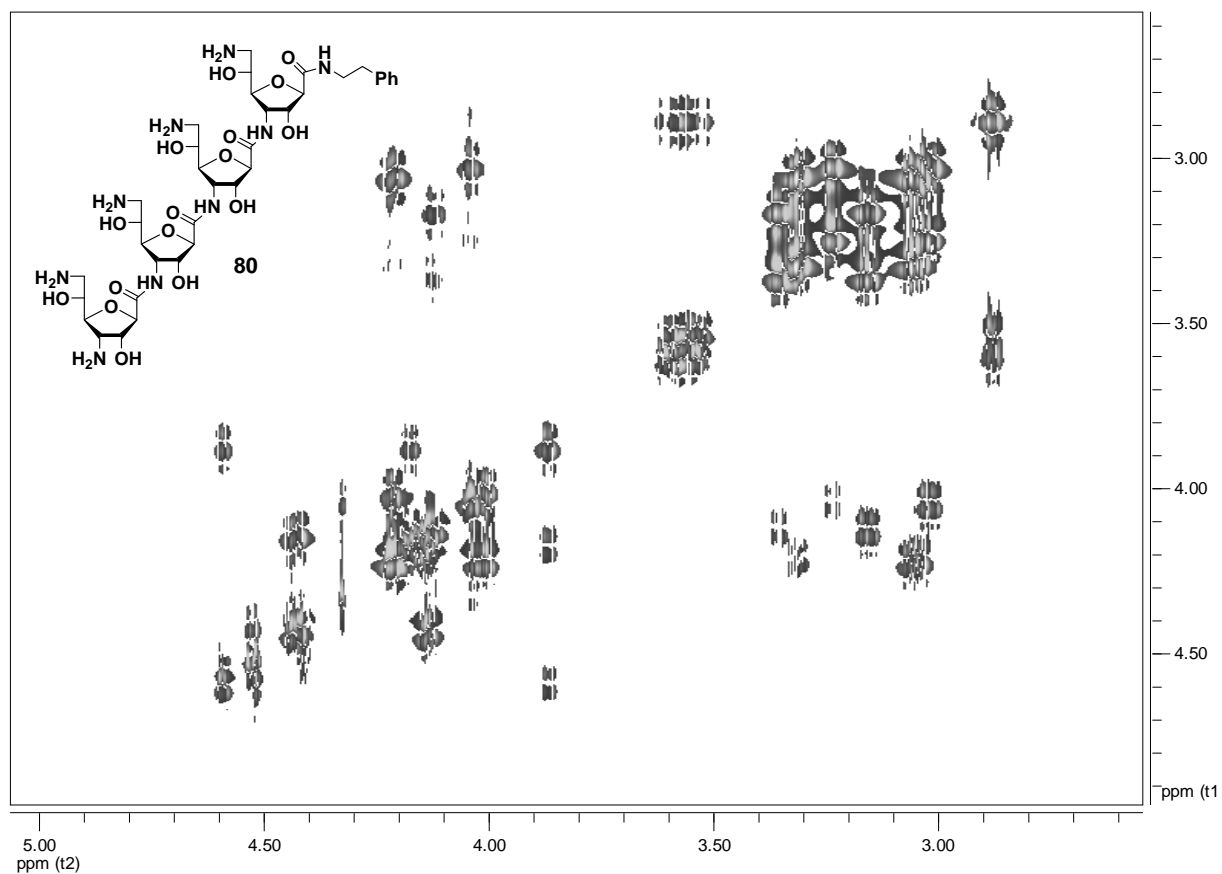


Abb. 13.50: Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von Verbindung **80** (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

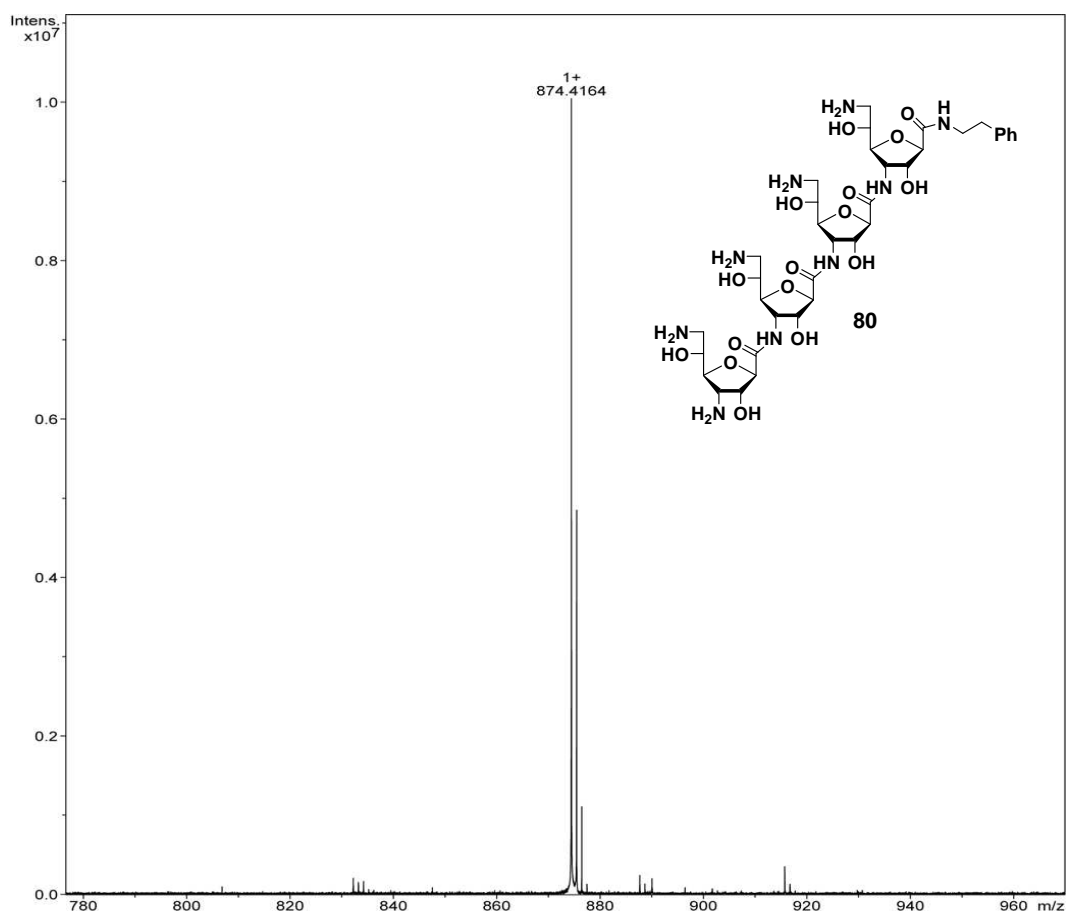


Abb. 13.51: Hochaufgelöstes ESI-Spektrum von Verbindung **80** (pos. Mode,  $H_2O$ ).

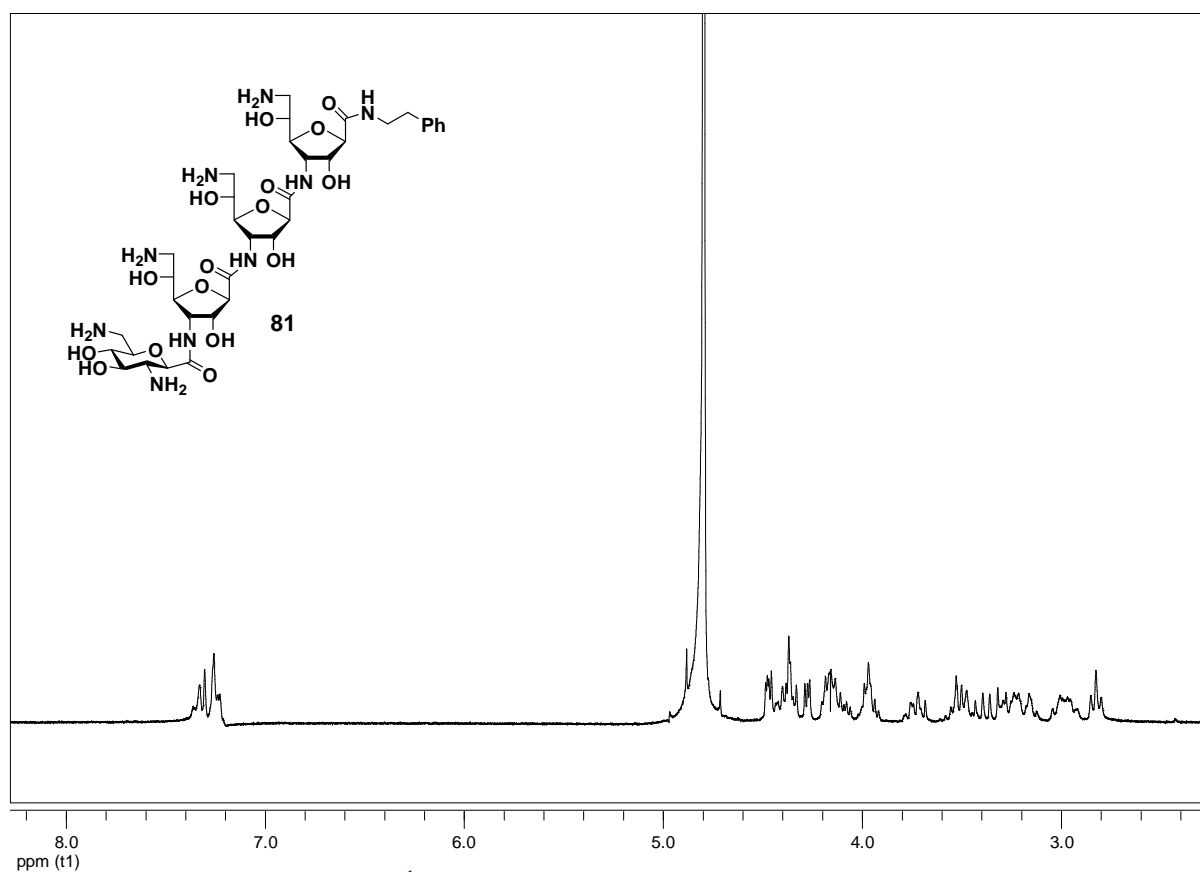


Abb. 13.52:  $^1H$ -Spektrum von Verbindung **81** (250 MHz,  $D_2O$ ).

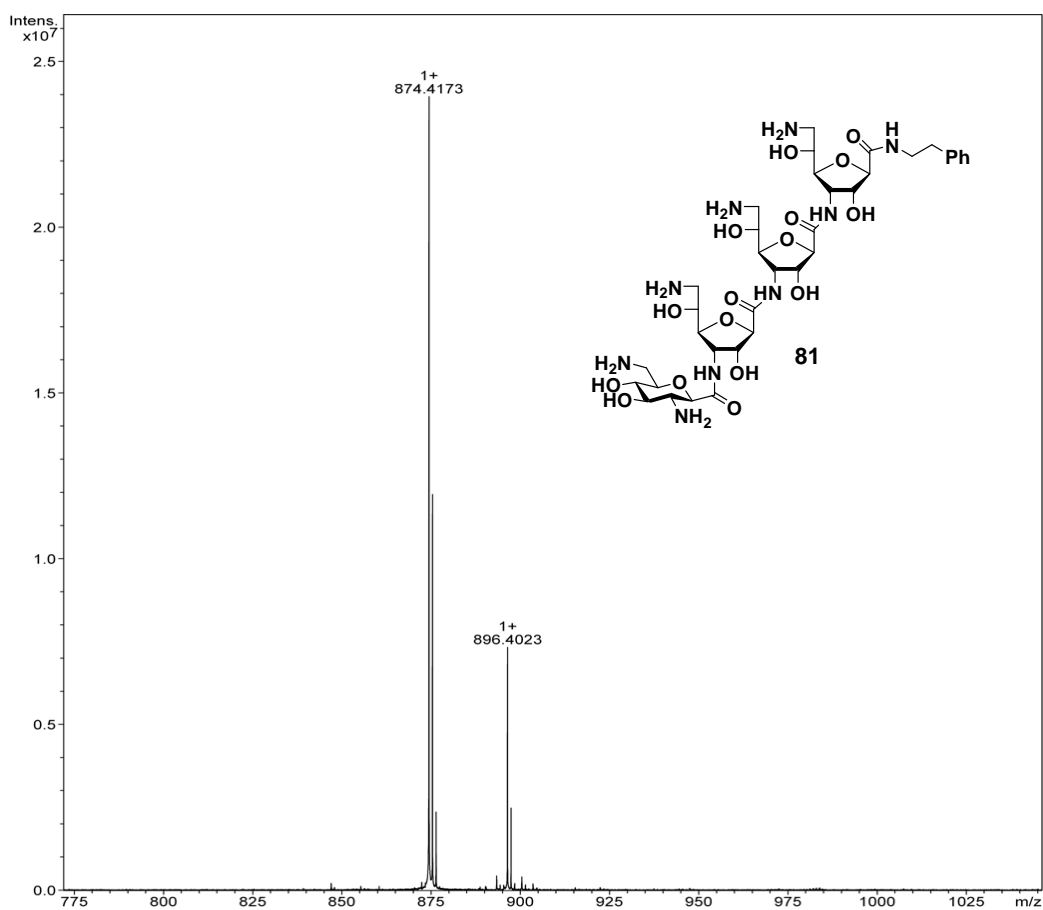


Abb. 13.53: Hochaufgelöstes ESI-Spektrum von Verbindung **81** (pos. Mode,  $H_2O$ ).

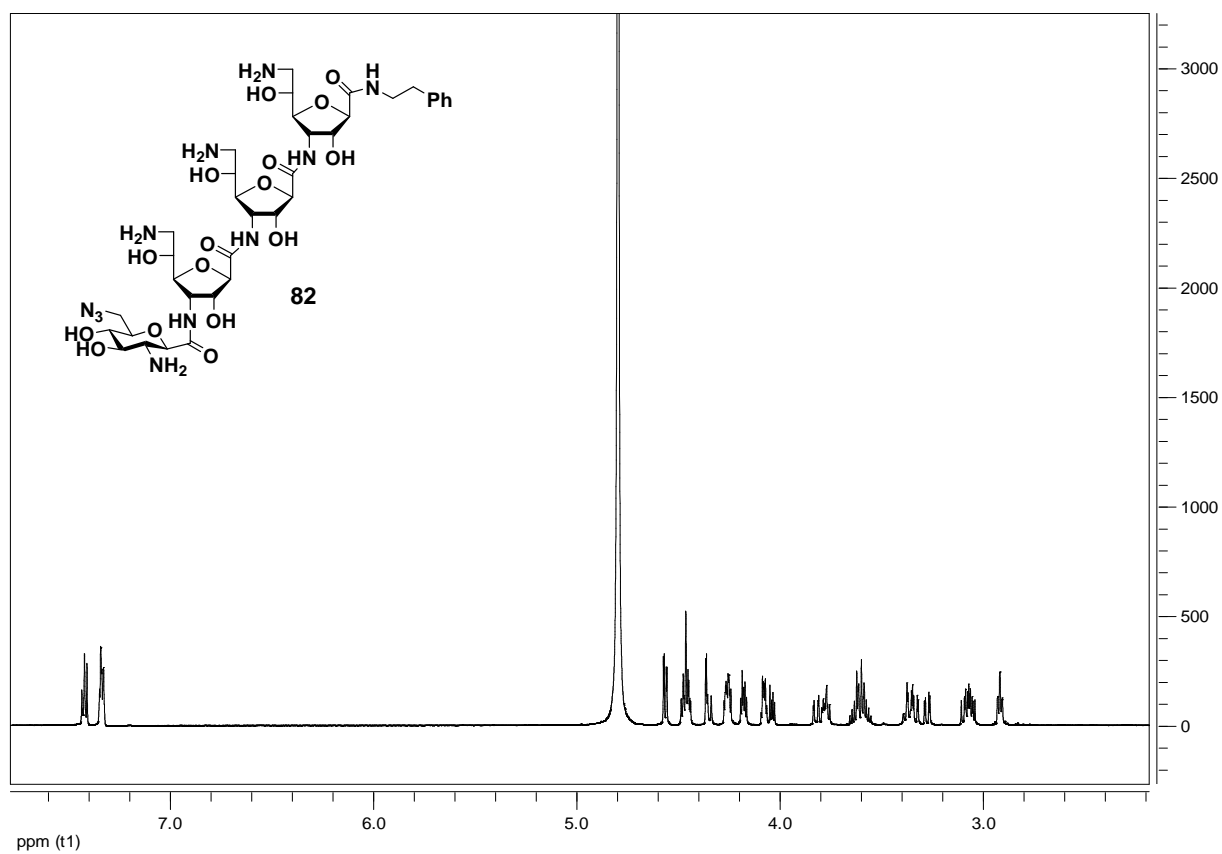


Abb. 13.54:  $^1H$ -Spektrum von Verbindung **82** (600 MHz,  $D_2O$ ).

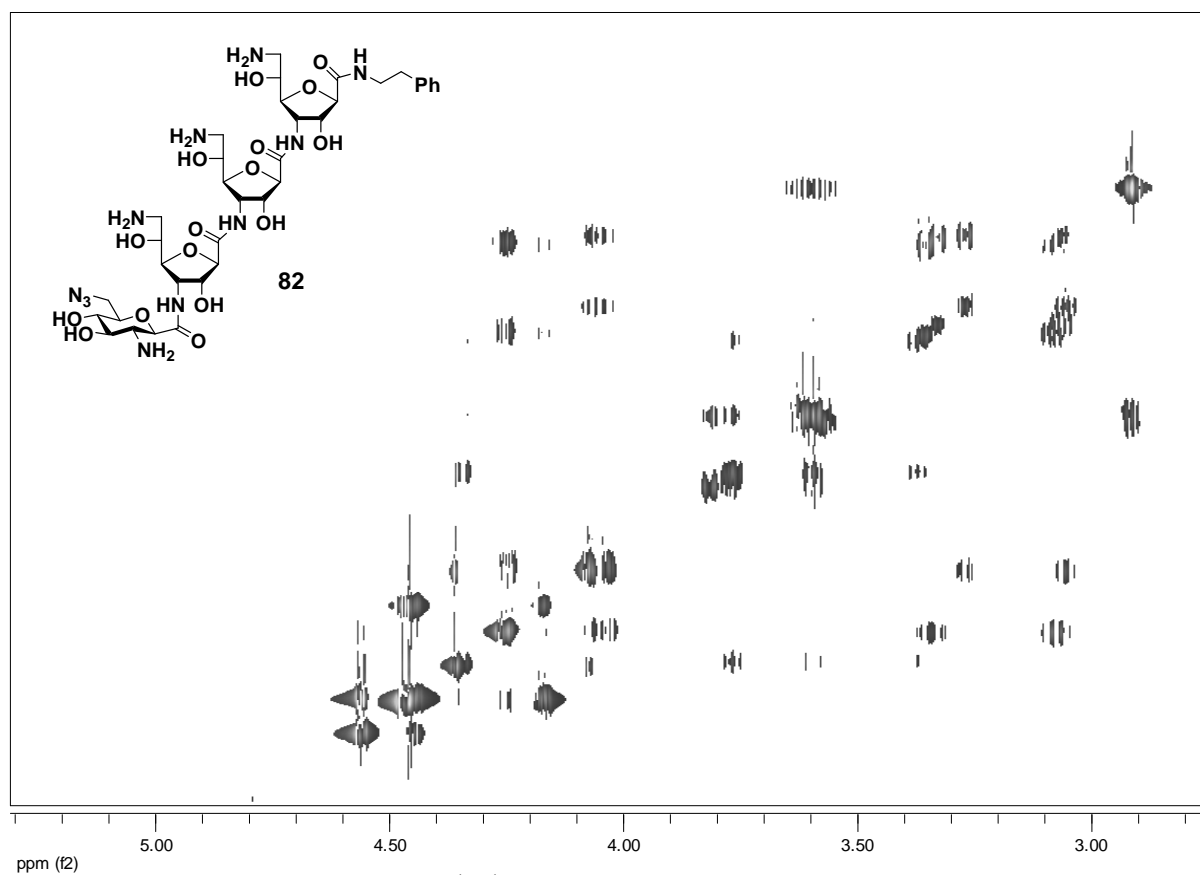


Abb. 13.55: Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von Verbindung **82** (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

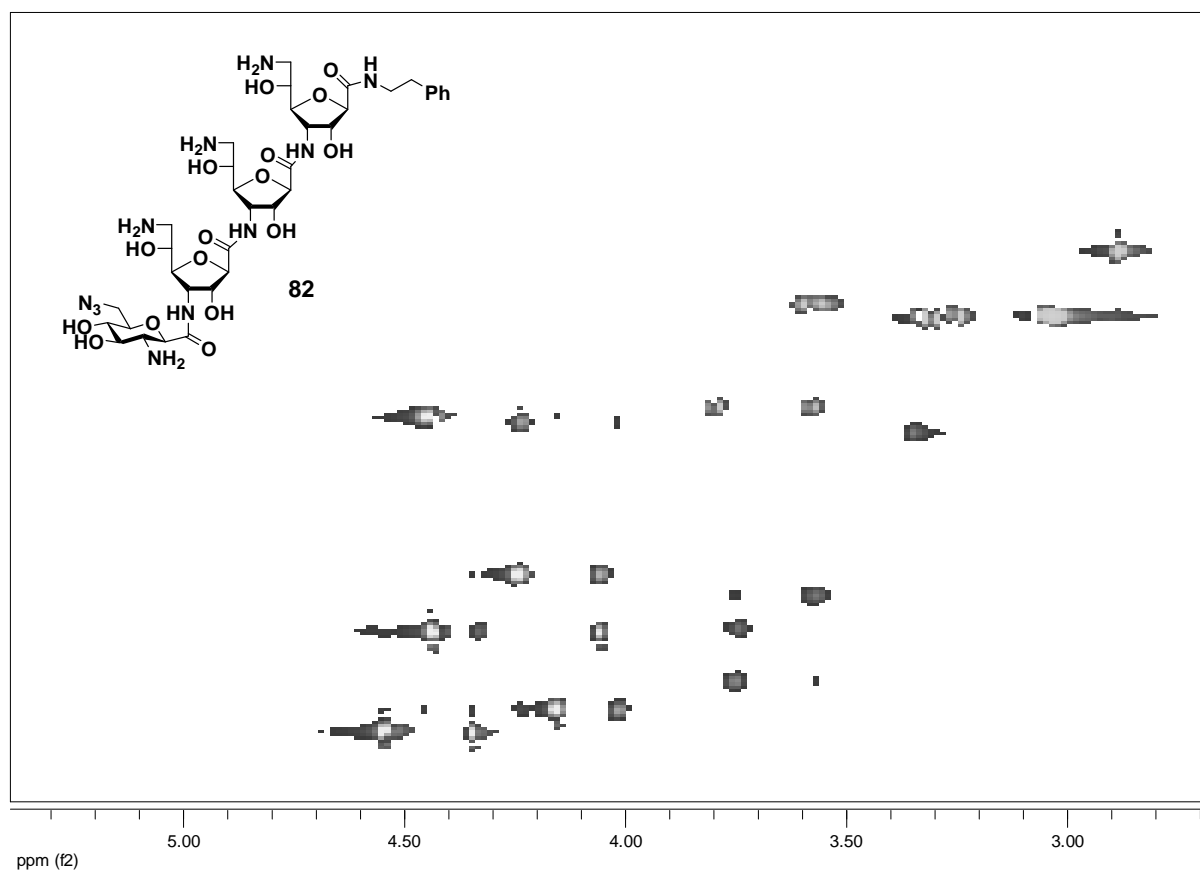


Abb. 13.56: Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Verbindung **82** (600/150 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

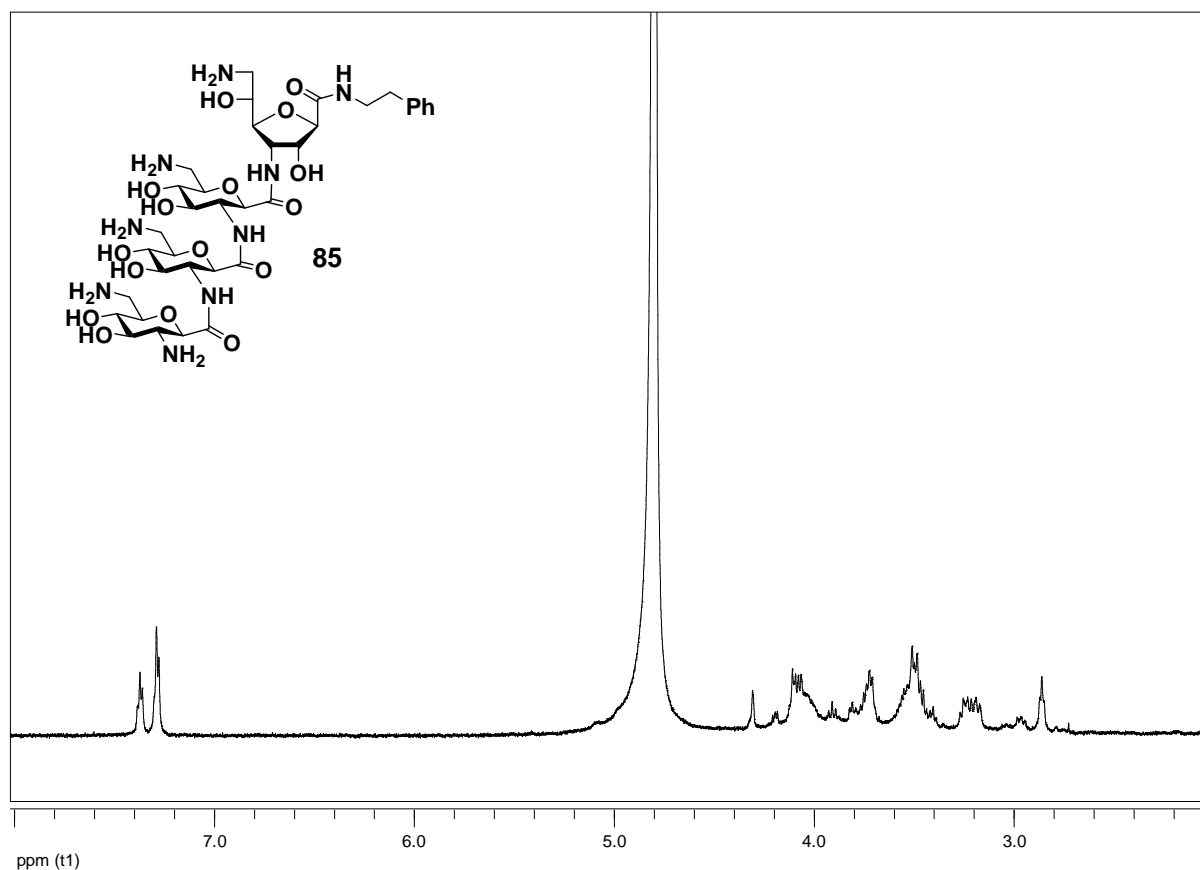


Abb. 13.57:  $^1\text{H}$ -Spektrum von Verbindung **85** (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

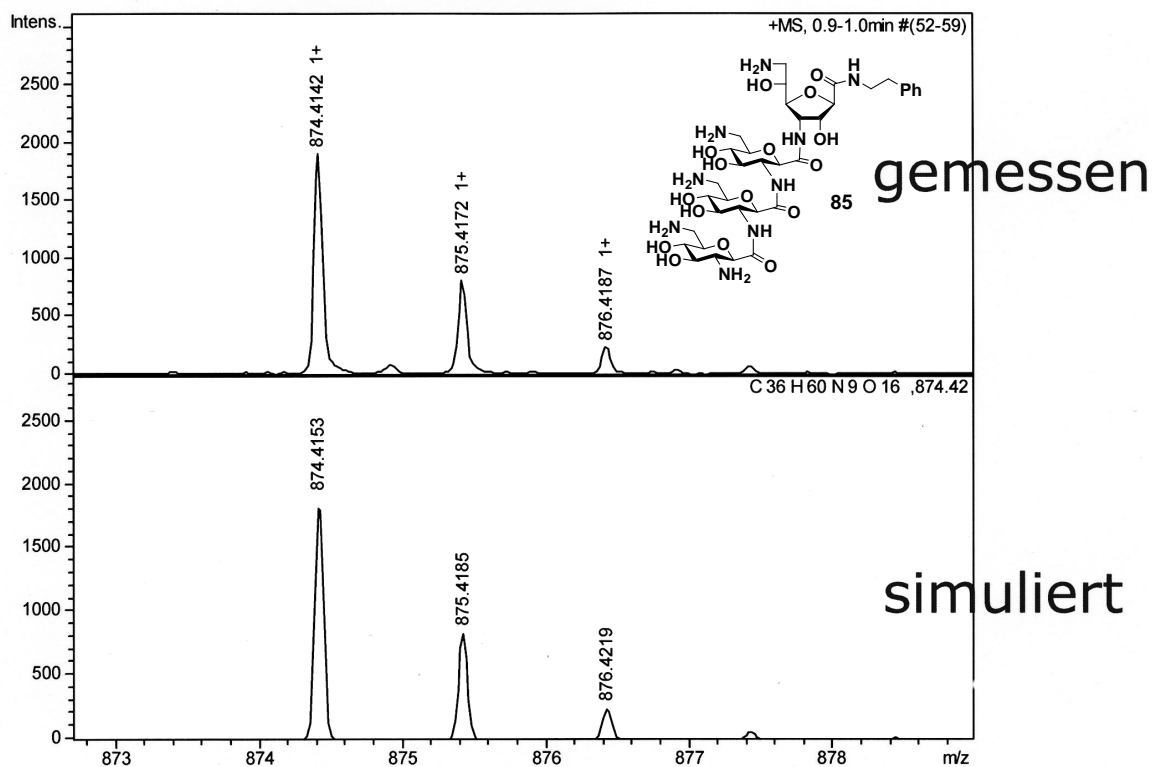


Abb. 13.58: Hochaufgelöstes ESI-Spektrum von Verbindung **85** (pos. Mode,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

## 14 Literaturverzeichnis

1. K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, *31*, 147-157
2. T. R. Cech, *Ann. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 543-568
3. C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **1983**, *35*, 849-857
4. J. A. Doudna, T. R. Cech, *Nature* **2002**, *418*, 222-228
5. R. H. Griffey, E. E. Swayze, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2002**, *12*
6. T. Ohtsu, A. Ogura, T. Kozu, *Jikken Igaku* **2002**, *20*
7. M. J. Drysdale, G. Lentzen, N. Matassova, A. I. H. Murchie, F. Aboul-Ela, M. Afshar, *Prog. Med. Chem.* **2002**, *39*, 73-119
8. N. D. Pearson, C. D. Prescott, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 409-414
9. D. J. Ecker, R. H. Griffey, *Drug Discovery Today* **1999**, *4*, 420-429
10. Y. Tor, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 998-1007
11. R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 212-235
12. D. T. Elmore, *Amino Acids, Peptides, and Proteins* **2003**, *34*, 1-53
13. F. Schweizer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 230-253
14. Y. Suhara, Y. Yamaguchi, B. Collins, R. L. Schnaar, M. Yanagishita, J. E. K. Hildreth, I. Shimada, Y. Ichikawa, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1999-2013
15. F. Sicherl, V. Wittmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2096-2099
16. T. K. Chakraborty, P. Srinivasu, S. Tapadar, B. K. Mohan, *J. Chem. Sci.* **2004**, *116*, 187-207
17. S. A. W. Gruner, E. Locardi, E. Lohof, H. Kessler, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 491-514
18. M. Chastain, I. Tinoco, *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **1991**, *41*, 131-177
19. R. T. Batey, R. P. Rambo, J. A. Doudna, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2472-2491
20. D. R. Groebe, O. C. Uhlenbeck, *Nucl. Acid Res.* **1988**, *16*, 11725-11735
21. H. F. Noller, *Ann. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 119-162
22. M. W. Kalnik, D. G. Norman, B. F. Li, P. F. Swann, D. J. Patel, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 636-647
23. A. Bhattacharyya, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, *Nature* **1990**, *343*, 484-487
24. A. Bhattacharyya, D. M. J. Lilley, *J. Mol. Biol.* **1989**, *209*, 583-597
25. S. A. White, D. E. Draper, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1892-1897
26. S. J. Schroeder, M. E. Burkard, D. H. Turner, *Biopolymers* **2001**, *52*, 157-167
27. J. F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Witherell, O. C. Uhlenbeck, *Nucl. Acid Res.* **1987**, *15*, 8783-8798
28. S. R. Holbrook in *RNA structure and function*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, **1998**, 147-174.
29. E. V. Puglisi, J. D. Puglisi in *RNA structure and function*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, **1998**, 117-146.
30. E. Westhof, F. Michel in *RNA-Protein Interactions*, IRL Press, Oxford, **1994**, 25-51.
31. W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure.*, Springer Verlag, New York, **1984**.
32. S.-H. Kim, *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **1976**, *17*, 181-185
33. H. W. Pley, K. M. Flaherty, D. B. McKay, *Nature* **1994**, *372*, 68-74
34. W. G. Scott, J. T. Finch, A. Klug, *Cell* **1995**, *81*, 991-1002
35. J. B. Murray, D. P. Terwey, L. Maloney, A. Karpeisky, N. Usman, L. Beigelman, W. G. Scott, *Cell* **1998**, *92*, 665-673
36. G. S. Bassi, N.-E. Moellegaard, A. I. H. Murchie, E. von Kitzing, D. M. J. Lilley, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 45-55
37. G. S. Bassi, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, *RNA* **1996**, *2*, 756-768

38. L. Jaeger, F. Michel, E. Westhof, *J. Mol. Biol.* **1994**, 236, 1271-1276
39. F. L. Murphy, T. R. Cech, *J. Mol. Biol.* **1994**, 236, 49-63
40. M. Costa, F. Michel, *EMBO J.* **1995**, 14, 1276-1285
41. H. W. Pley, K. M. Flaherty, D. B. McKay, *Nature* **1994**, 372, 111-113
42. J. A. Ippolito, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, 95, 9819-9824
43. P. E. Cole, D. M. Crothers, *Biochemistry* **1972**, 11, 4368-4374
44. D. M. Crothers, P. E. Cole, C. W. Hilbers, R. G. Shulman, *J. Mol. Biol.* **1974**, 87, 63-88
45. C. W. Hilbers, G. T. Robillard, R. G. Shulman, R. D. Blake, P. K. Webb, R. Fresco, D. Riesner, *Biochemistry* **1976**, 15, 1874-1882
46. E. R. Hawkins, S. H. Chang, W. L. Mattice, *Biopolymers* **1977**, 16, 1557-1566
47. R. Knippers, *Molekulare Genetik, 9. Auflage*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2006**.
48. D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Lehrbuch der Biochemie, 21. Auflage*, Wiley VCH Verlag, Weinheim, **2002**.
49. A. Serganov, D. J. Patel, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, 8, 776-790
50. W. G. Scott, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, 17, 280-286
51. M. J. Fedor, J. R. Williamson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, 6, 399-412
52. S. A. Strobel, J. C. Cochrane, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 636-643
53. E. A. Doherty, J. A. Doudna, *Ann. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 597-615
54. W. G. Scott, A. Klug, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, 21, 220-224
55. A. Serganov, S. Keiper, L. Malinina, V. Tereshko, E. Skripkin, C. Hoebartner, A. Polonskaia, A. T. Phan, R. Wombacher, R. Micura, Z. Dauter, A. Jaeschke, D. J. Patel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, 12, 218-224
56. M. V. Rodnina, M. Beringer, W. Wintermeyer, *Trends Biochem. Sci.* **2007**, 32, 20-26
57. P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, 289, 920-930
58. Q. Vicens, E. Westhof, *ChemBioChem* **2003**, 4, 1018-1023
59. T. Hermann, E. Westhof, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, 9, 66-73
60. T. Hermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1891-1905
61. Y. Tor, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1579-1582
62. J. Gallego, G. Varani, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 836-843
63. B. J. Tucker, R. R. Breaker, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, 15, 342-348
64. H. Schwalbe, J. Buck, B. Furtig, J. Noeske, J. Wöhnert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1212-1219
65. T. Hermann, E. Westhof, *J. Mol. Biol.* **1998**, 276, 903-912
66. Y. Tor, T. Hermann, E. Westhof, *Chem. Biol.* **1998**, 5, R277-R283
67. J. G. Silva, I. Carvalho, *Curr. Med. Chem.* **2007**, 14, 1101-1119
68. D. P. Arya, *Top. Curr. Chem.* **2005**, 253, 149-178
69. D. S. Pilch, M. Kaul, C. M. Barbieri, *Top. Curr. Chem.* **2005**, 253, 179-204
70. L. P. Kotra, J. Haddad, S. Mobashery, *Antimicrob. Agents Chemoth.* **2000**, 44, 3249-3256
71. A. Schatz, E. Bugie, S. A. Waksman, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1944**, 55, 66-69
72. S. Magnet, J. S. Blanchard, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 477-497
73. M. Kaul, C. M. Barbieri, J. E. Kerrigan, D. S. Pilch, *J. Mol. Biol.* **2003**, 326, 1373-1387
74. E. Gaggelli, N. Gaggelli, A. Maccotta, G. Valensin, D. Marini, E. Di Cocco, M. Delfini, *Spectrochim. Acta Part A* **1995**, 51A, 1959-1963
75. R. S. Kane, P. T. Glink, R. G. Chapman, J. C. McDonald, P. K. Jensen, H. Gao, L. Pasa-Tolic, R. D. Smith, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4028-4036
76. R. E. Botto, B. Coxon, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 1021-1028
77. D. E. Dorman, J. W. Paschal, K. E. Merkel, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 7864-7865
78. Q. Vicens, E. Westhof, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 747-755

79. Q. Vicens, E. Westhof, *Structure* **2001**, *9*, 647-658
80. Q. Vicens, E. Westhof, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 1175-1188
81. B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vonnrhein, T. Hartsch, V. Ramakrishnan, *Nature* **2000**, *407*, 327-339
82. J. M. Ogle, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., M. J. Tarry, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, *Science* **2001**, *292*, 897-902
83. J. M. Ogle, F. V. Murphy, IV, M. J. Tarry, V. Ramakrishnan, *Cell* **2002**, *111*, 721-732
84. J. M. Ogle, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *28*, 259-266
85. D. Fourmy, M. I. Recht, J. D. Puglisi, *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 347-362
86. D. Fourmy, M. I. Recht, S. C. Blanchard, J. D. Puglisi, *Science* **1996**, *274*, 1367-1371
87. S. Yoshizawa, D. Fourmy, J. D. Puglisi, *EMBO J.* **1998**, *17*, 6437-6448
88. M. I. Recht, D. Fourmy, S. C. Blanchard, K. D. Dahlquist, J. D. Puglisi, *J. Mol. Biol.* **1996**, *262*, 421-436
89. M. L. Zapp, S. Stern, M. R. Green, *Cell* **1993**, *74*, 969-978
90. U. von Ahsen, J. Davies, R. Schroeder, *Nature* **1991**, *353*, 368-370
91. U. von Ahsen, J. Davies, R. Schroeder, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 935-941
92. D. J. Earnshaw, M. J. Gait, *Nucl. Acid Res.* **1998**, *26*, 5551-5561
93. T. K. Stage, K. J. Hertel, O. C. Uhlenbeck, *RNA* **1995**, *1*, 95-101
94. B. Clouet-d'Orval, T. K. Stage, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1995**, *34*, 11186-11190
95. J. Rogers, A. H. Chang, U. von Ahsen, R. Schroeder, J. Davies, *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 916-925
96. J. S. Chia, W. H. L., H. W. Wang, D. S. Chen, P. J. Chen, *J. Biomed. Sci.* **1997**, *4*, 208-216
97. E. Cundliffe, *Annu. Rev. Microbiol.* **1989**, *43*, 207-233
98. P. A. Skeggs, J. Thompson, E. Cundliffe, *Mol. Gen. Genet.* **1985**, *200*, 415-421
99. J. Thompson, P. A. Skeggs, E. Cundliffe, *Mol. Gen. Genet.* **1985**, *201*, 168-173
100. H. W. Taber, J. P. Mueller, P. F. Miller, A. S. Arrow, *Microbiol. Rev.* **1987**, *51*, 439-457
101. R. E. W. Hancock, *Annu. Rev. Microbiol.* **1984**, *38*, 237-264
102. J. L. Kadurugamuwa, J. S. Lam, T. J. Beveridge, *Antimicrob. Agents Chemoth.* **1993**, *37*, 715-721
103. L. E. Bryan, S. K. Kowand, H. M. Van Den Elzen, *Antimicrob. Agents Chemoth.* **1979**, *15*, 7-13
104. M. H. Miller, S. C. Edberg, L. J. Mandel, C. F. Behar, N. H. Steigbigel, *Antimicrob. Agents Chemoth.* **1980**, *18*, 722-729
105. R. A. Hatch, N. L. Schiller, *Antimicrob. Agents Chemoth.* **1998**, *42*, 974-977
106. E. Durante-Mangoni, A. Grammatikos, R. Utili, M. E. Falagas, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *33*, 201-205
107. T. Koeda, K. Umemura, M. Yokota, *Aminoglycoside Antibiotics*, Springer **1982**, 293-356
108. O. W. Guthrie, *Toxicology* **2008**, *249*, 91-96
109. S. J. Sucheck, A. L. Wong, K. M. Koeller, D. D. Boehr, K.-A. Draker, P. Sears, G. D. Wright, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5230-5231
110. J. Haddad, S. Vakulenko, S. Mobashery, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11922-11923
111. C. Kim, J. Haddad, S. B. Vakulenko, S. O. Meroueh, Y. Wu, H. Yan, S. Mobashery, *Biochemistry* **2004**, *43*, 2373-2383
112. J. Haddad, L. P. Kotra, B. Llano-Sotelo, C. Kim, E. F. J. Azucena, M. Liu, S. B. Vakulenko, C. S. Chow, S. Mobashery, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3229-3237
113. P. Sears, C.-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2301-2324
114. P. Sears, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2446-2471

115. C. M. Timmers, J. J. Turner, C. M. Ward, G. A. van der Marel, M. L. C. E. Kouwijzer, P. D. J. Grootenhuis, J. H. van Boom, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 920-929
116. M. Ménand, J.-C. Blais, L. Hamon, J.-M. Valéry, J. Xie, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4423-4430
117. A. Dondoni, A. Marra, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4395-4421
118. A. Malik, W. Voelter, *Chemiker Zeitung* **1989**, *113*, 153
119. M. D. P. Risseeuw, M. Overhand, G. W. J. Fleet, M. I. Simone, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2001-2010
120. S. A. W. Gruner, V. Truffault, G. Voll, E. Locardi, M. Stockle, H. Kessler, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4365-4376
121. F. Sicherl, *Doktorarbeit*, Universität Konstanz **2006**, 180
122. F. John, *Doktorarbeit*, Universität Konstanz **2007**
123. P. Beylis, A. S. Howard, G. W. Perold, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, *11*
124. J. Christensen, J. W. Jaroszewski, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2193-2195
125. A. Misaki, Y. Tsuburaya, M. Kakuta, H. Takemoto, T. Igarashi, T. Hashimoto, *Toyo Soda Kenkyu Hokoku* **1979**, *23*, 89-96
126. A. Neef, *Bachelorarbeit*, Universität Konstanz **2006**
127. P. J. Beynon, P. M. Collins, W. G. Overend, *Proc. Chem. Soc.* **1964**, 342-343
128. K. Onodera, S. Hirano, N. Kashimura, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4651-4652
129. W. Sowa, G. H. S. Thomas, *Can. J. Chem.* **1966**, *44*, 836-838
130. T. Netscher, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 455-458
131. C. W. Liang, M. J. Kim, L. S. Jeong, M. W. Chun, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 2039-2048
132. J. M. Garcia Fernandez, C. Ortiz Mellet, J. L. Jimenez Blanco, J. Fuentes, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5565-5572
133. H. H. Baer, Y. Gan, *Carbohydr. Res.* **1991**, *210*, 233-245
134. M. Boldt, C. Messmer, *Persönliche Mitteilung*, Universität Konstanz **2007**
135. W. L. Glen, G. S. Myers, G. A. Grant, *J. Chem. Soc.* **1951**, 2568-2572
136. M. H. D. Postema, *C-Glycoside synthesis*, CRC Press, Boca Raton, **1995**.
137. M. Worch, V. Wittmann, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 2118-2129
138. H. H. Jensen, C. M. Pedersen, M. Bols, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 7576-7582
139. C. Vogel, G. Morales Torres, H. Reinke, D. Michalik, A. Voss, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 520-528
140. V. I. Betaneli, M. V. Ovchinnikov, L. V. Bachkinovskii, N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.* **1979**, *76*, 252-256
141. V. I. Betaneli, M. V. Ovchinnikov, L. V. Bakinovskii, N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.* **1979**, *68*, C11-C13
142. A. F. Bochkov, N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.* **1975**, *39*, 355-357
143. N. K. Kochetkov, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 2389-2436
144. K. Utimoto, Y. Wakabayashi, T. Horie, M. Inoue, Y. Shishiyama, M. Obayashi, H. Nozaki, *Tetrahedron* **1983**, *39*, 967-973.
145. J. Herzig, A. Nudelman, H. E. Gottlieb, B. Fischer, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 727-730
146. P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, Thieme, Stuttgart, **1994**.
147. D. R. Mootoo, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2363-2366
148. P. L. Durette, E. P. Meitzner, T. Y. Shen, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *42*, 4013-4016
149. M. Kuriyama, Y. Inoue, K. Kitagawa, *Synthesis* **1990**, 735
150. T. Sasaki, K. Minamoto, H. Itoh, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2320-2325
151. J. O. Osby, M. G. Martin, B. Ganem, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2093-2096
152. T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th ed., Wiley, New York, **2006**.
153. M. Worch, *Diplomarbeit*, Universität Konstanz **2003**

154. B. Neisses, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *17*, 522-524
155. R. W. Myers, Y. C. Lee, *Carbohydr. Res.* **1986**, *152*, 143-158
156. Z. J. Witczak, *J. Carbohydr. Chem.* **1984**, *3*, 359-380
157. F. G. De las Heras, P. Fernandez-Resa, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, *4*, 903-907
158. P. A. S. Smith, J. M. Clegg, J. H. Hall, *J. Org. Chem.* **1958**, *23*, 524-529
159. R. Fusco, L. Garanti, G. Zecchi, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1906-1909
160. L. Garanti, G. Zecchi, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4767-4769
161. D. Korakas, A. Kimbaris, G. Varvounis, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 10751-10760
162. T. C. Porter, R. K. Smalley, M. Teguche, B. Purwono, *Synthesis* **1997**, 773-777
163. B. G. Davis, T. W. Brandstetter, L. Hackett, B. G. Winchester, R. J. Nash, A. A. Watson, R. C. Griffiths, C. Smith, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4489-4500
164. H. E. Master, S. I. Khan, K. A. Poojari, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4891-4899
165. R. J. Herr, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3379-3393
166. T. Kimura, Y. Hamada, M. Stochaj, H. Ikari, A. Nagamine, H. Abdel-Rahman, N. Igawa, K. Hidaka, J.-T. Nguyen, K. Saito, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2380-2386
167. Y. Hamada, N. Igawa, H. Ikari, Z. Ziora, J.-T. Nguyen, A. Yamani, K. Hidaka, T. Kimura, K. Saito, Y. Hayashi, M. Ebina, S. Ishiura, Y. Kiso, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4354-4359
168. S. Wu, A. Fluxe, J. Sheffer, J. M. Janusz, B. E. Blass, R. White, C. Jackson, R. Hedges, M. Murawsky, B. Fang, G. M. Fadayel, M. Hare, L. Djandjighian, Discovery and in vitro/in vivo studies of tetrazole derivatives as Kv1.5 blockers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2006), 6213-6218., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 6213-6218
169. C. E. Burgos-Lepley, L. R. Thompson, C. O. Kneen, S. A. Osborne, J. S. Bryans, T. Capiris, N. Suman-Chauhan, D. J. Dooley, C. M. Donovan, M. J. Field, M. G. Vartanian, J. J. Kinsora, S. M. Lotarski, A. El-Kattan, K. Walters, M. Cherukury, C. P. Taylor, D. J. Wustrow, J. B. Schwarz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2333-2336
170. J. B. Schwarz, N. L. Colbry, Z. Zhu, B. Nichelson, N. S. Barta, K. Lin, R. A. Hudack, S. E. Gibbons, P. Galatsis, R. J. DeOrazio, D. D. Manning, M. G. Vartanian, J. J. Kinsora, S. M. Lotarski, Z. Li, D. M. R., A. El-Kattan, A. J. Thorpe, S. D. Donevan, C. P. Taylor, D. J. Wustrow, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3559-3563
171. W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1-5
172. V. V. Semenov, V. S. Bogdanov, B. S. El'yanov, L. G. Mel'nikova, S. A. Shevelev, V. M. Zhulin, A. A. Fainzil'berg, *Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1982**, 1118-1124
173. M. Narisada, Y. Terui, M. Yamakawa, F. Watanabe, M. Ohtani, H. Miyazaki, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2794-2796
174. R. U. Lemieux, A. R. Morgan, *Can. J. Chem.* **1965**, *43*, 2199-2204
175. R. Hirschmann, K. C. Nicolaou, S. Pietranico, J. Salvino, E. M. Leahy, P. A. Sprengeler, G. Furst, A. B. Smith, C. D. Strader, M. A. Cascieri, M. R. Candelore, C. Donaldson, W. Vale, L. Maechler, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9217-9218
176. H. Paulsen, J. P. Lorentzen, W. Kutschker, *Carbohydr. Res.* **1985**, *136*, 153-176
177. E. D. Soli, A. S. Manoso, M. C. Patterson, P. DeShong, F. D. A., R. Hirschmann, A. B. Smith, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3171-3177
178. E. D. Soli, P. DeShong, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9724-9726
179. F. Gao, X. Yan, O. M. Baettig, A. M. Berghuis, K. Auclair, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6859-6862
180. P. T. Nyffeler, C.-H. Liang, K. M. Koeller, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10773-10778

181. R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244-1251
182. A. F. G. Bongat, A. V. Demchenko, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 374-406
183. M. Zierke, *Bachelorarbeit*, Universität Konstanz **2007**
184. C.-H. Wong, M. Hendrix, D. D. Manning, C. Rosenbohm, W. A. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8319-8327
185. S. A. Kates, F. Albericio, *Solid phase synthesis: a practical guide*, Marcel Dekker Inc., New York, **2000**.
186. J. Jones, *Amino Acid and Peptide Synthesis*, 2nd ed., Oxford University Press, Oxford, New York, **2002**.
187. N. L. Benoiton, *Chemistry of Peptide Synthesis*, CRC Press, Boca Raton, **2006**.
188. S. K. Shannon, G. Barany, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4586-4594
189. E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598
190. W. Baehr, H. Theobald, *Organische Stereochemie*, Springer, Berlin; Heidelberg, **1973**.
191. S. Hauptmann, G. Mann, *Stereochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin; Oxford, **1996**.
192. D. Vourloumis, G. C. Winters, S. K. B., M. Takahashi, A. B. K., S. Shandrick, Q. Zhao, Q. Han, T. Hermann, *Chembiochem* **2005**, *6*, 58-65
193. E. Atherton, R. C. Sheppard, *The Peptides, Vol. 9*, Academic Press, New York, **1987**.
194. I. Kudyba, D. Perez Fernandez, E. C. Boettger, A. Vasella, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 499-519
195. P. B. Alper, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6029-6032
196. N. Knouzi, M. Vaultier, R. Carrié, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1985**, *5*, 815-819
197. I. Grapsas, I. Massova, S. Mobashery, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7705-7720
198. W. L. F. Armarego, D. D. Perrin, **1997**, *4*
199. H. G. O. Becker, G. Domschke, W. Berger, *Organikum*, 20 ed., Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
200. W. S. Hancock, J. E. Battersby, *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 260-264
201. B. Helferich, E. N. Mulcahy, H. Ziegler, *Chem. Ber.* **1954**, *87*, 23-237
202. E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893-14902