(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. März 2009 (26.03.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/036754 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C07H 5/06 (2006.01) *A61K 31/7008* (2006.01)
C07H 15/12 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2008/001571

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. September 2008 (20.09.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2007 046 388.1
21. September 2007 (21.09.2007) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **UNIVERSITÄT HAMBURG** [DE/DE]; Edmund-Siemers-Allee 1, 20146 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **SCHEID, Svenja** [DE/DK]; Jyllingevej 7,2 - lejl. 6, DK-2720 Vanløse (DK). **MEYER, Bernd** [DE/DE]; Raamfeld 67, 23397 Hamburg (DE). **KELM, Sörge** [DE/DE]; Am Saatmoor 25A, 28865 Lilienthal (DE).

(74) Anwalt: **LOBEMEIER, Martin, Landolf**; Boehmert & Boehmert, Niemannsweg 133, 24105 Kiel (DE).

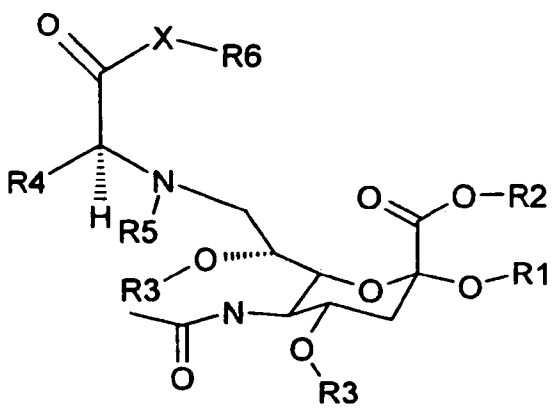
(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*
— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

(54) **Title:** INHIBITORS OF THE MYELIN-ASSOCIATED GLYCOPROTEIN (MAG)

(54) **Bezeichnung:** INHIBITOREN DES MYELIN ASSOZIIERTEN GLYKOPROTEINS (MAG)



(57) Abstract: The invention relates to a composition having the general structure (formula), wherein R1 is a hydrophobic group, R2 is hydrogen (H), a cation or an alkyl ester, R3 is hydrogen (H) or a group that can be converted into the hydroxy group under physiological conditions, R4 is a hydrophobic group, R5 is hydrogen (H) or an alkyl group, an amino acid residue or a peptidyl residue, R6 is hydrogen (H), a cation, a hydrolyzable group, an amino acid residue, or a peptide group, and X is an oxygen atom (O) or an NH group. The invention further relates to a method for producing said composition.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Verbindung als Inhibitor des Myelin assoziierten Glyhoproteins (MAG) mit der allgemeinen Struktur wobei R1 ein hydrophober Rest ist; R2 Wasserstoff (H), ein Kation oder ein Alkylester ist; R3 Wasserstoff (H) oder eine Gruppe ist, die unter physiologischen Bedingungen in die Hydroxygruppe überführbar ist; R4 ein hydrophober Rest ist; R5 Wasserstoff (H) oder ein Alkylrest, ein Aminosäurerest oder ein Peptidylrest ist; R6 Wasserstoff (H), ein Kation, ein hydrolysierbarer Rest, ein Aminosäurerest oder ein Peptidrest ist; und X ein Sauerstoffatom (0) oder eine NH-Gruppe ist. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung dieser Verbindung.

WO 2009/036754 A1

Inhibitoren des Myelin Assoziierten Glykoproteins (MAG)

Die Erfindung betrifft neue Inhibitoren des Myelin-assoziierten Glycoprotein (MAG) und deren Verwendung zur Behandlung von Verletzungen des zentralen Nervensystems.

Kommt es durch Unfälle oder Erkrankungen zu Verletzungen des adulten zentralen Nervensystems, so sind die betroffenen Körperfunktionen im Allgemeinen dauerhaft eingeschränkt oder verloren. Aufgrund der fehlenden Regenerationsfähigkeit der zentralen Nervenbahnen und des Gehirns ist dies in fast allen Fällen irreversibel.

Im Gegensatz zum zentralen Nervensystem (ZNS) ist das periphere Nervensystem (PNS) zur Regeneration nach Verletzungen fähig. Die nervösen Verknüpfungen können hier unter Rückerhalt der Funktionen meist vollständig wiederhergestellt werden. Diese Tatsache kann zur Erforschung genutzt werden, welche Unterschiede des PNS zum ZNS diese Regeneration ermöglichen. Es könnten so Möglichkeiten gefunden werden, Querschnittslähmungen erfolgreich zu behandeln.

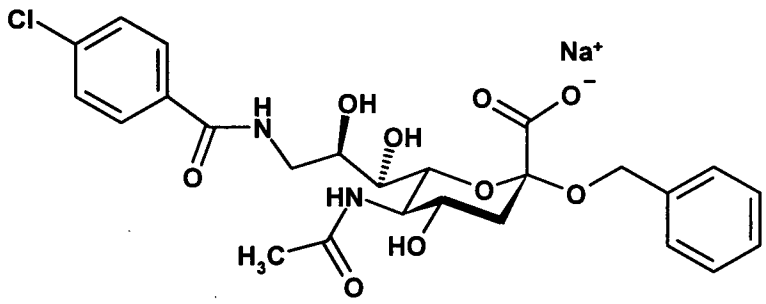
Neuronen des ZNS sind durchaus zur Regeneration fähig In der zellulären Umgebung des PNS können ZNS-Neuronen wachsen.. Hierdurch wurde klar, dass im ZNS eine aktive Inhibierung der Regeneration von Neuronen auftreten muss. Kann diese aktive Inhibierung aufgehoben werden, so würde eine Überwindung von Querschnittslähmungen möglich.

Im adulten ZNS übt das Myelin-assoziierten Glycoprotein (MAG) eine inhibierende Wirkung auf die Axonregeneration aus. Um die Wirkung des MAG zu unterdrücken und eine Regeneration der zerstörten Axone zu ermöglichen, blockierten DeBellard *el al.* das MAG mit Sialinsäure und Sialyllactose. Hierfür verwendeten sie einen Neuritenwachstumsassay, bei dem die Länge der Neuriten in Gegenwart von MAG mit unterschiedlichen Saccharidkonzentrationen gemessen wurden. Dabei war eine Abhängigkeit der Neuritenlänge von der Konzentration der Saccharide zu erkennen. So zeigten Neuriten z. B. ein Wachstum von 64 % bei einer Zugabe von 20 mM Sialinsäure.[DeBellard, M. E., Tang, S., Mukhopadhyay, G., Shen, Y. J. and Filbin, M. T., Myelin-associated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein, *Mol Cell Neurosci*, 1996, 7, 89-101].

Ausgehend von der Struktur der komplexen Ganglioside des Nervensystems wurden bisher mehrere Ansätze zur Entwicklung von Inhibitoren für das MAG durchgeführt.

Strenge *et al.* untersuchten die Glycanspezifität von MAG anhand verschiedener synthetischer Oligosaccharide. Dabei zeigte das MAG eine fünffach höhere Bindungsaffinität an α2,3-verknüpfte N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) als an α2,6-verknüpfte Neu5Ac. Außerdem ergab sich, dass MAG bestimmten Veränderungen der Neu5Ac gegenüber nicht tolerant war. So nahm die Bindungsaffinität stark ab, wenn die Hydroxylgruppen an der 8- oder 9-Position entfernt wurden. Auch die Carboxylgruppe und die *N*-Acetylgruppe zeigten sich in dieser Analyse als wichtige funktionelle Gruppen für die Bindung von Neu5Ac an das MAG.[Strenge, K., Schauer, R., Bovin, N., Hasegawa, A., Ishida, H., Kiso, M. and Kelm, S., Glycan specificity of myelin-associated glycoprotein and sialoadhesin deduced from interactions with synthetic oligosaccharides, *Eur J Biochem*, 1998, 258, 677-85] Allerdings zeigte MAG eine höhere Bindungsaffinität zu Neu5Ac-Derivaten mit halogenierter *N*-Acetylgruppe. Als weiterhin positiv für die Bindungsaffinität wurden Veränderungen der 9-Position gefunden. So zeigten Derivate der Neu5Ac mit Alkylsubstituenten oder aromatischen Substituenten an der 9-Position eine stark erhöhte Bindung an das MAG.

Die bisher erfolgreichsten Inhibitoren für das MAG sind zweifach aromatisch substituierte Neuraminoside, zu denen auch 9-(*p*-Chlorbenzylamid)-2-*O*-benzyl-*N*-acetylneuraminsäure (SH-81) gehört.



Diese zeigten im Hapten-Inhibitionsassay eine um mehr als den Faktor >700 erhöhte Bindungsaffinität an das MAG verglichen mit den Trisaccharid Neu5Ac-α2,3-Gal-β1,3-GalNAc-OSE. Hierbei wies SH-81 als am Benzamidsubstituenten der 9-Position einfach chlorierte Verbindung das höchste Inhibitionspotential mit 1074 verglichen mit dem Trisaccharid auf. Weitere Halogenierungen ließen das Inhibitionspotential sinken.[Shelke, S.

V., Gao, G. P., Mesch, S., Gathje, H., Kelm, S., Schwardt, O. and Ernst, B., Synthesis of sialic acid derivatives as ligands for the myelin-associated glycoprotein (MAG), *Bioorg Med Chem*, 2007, 15, 4951-65].

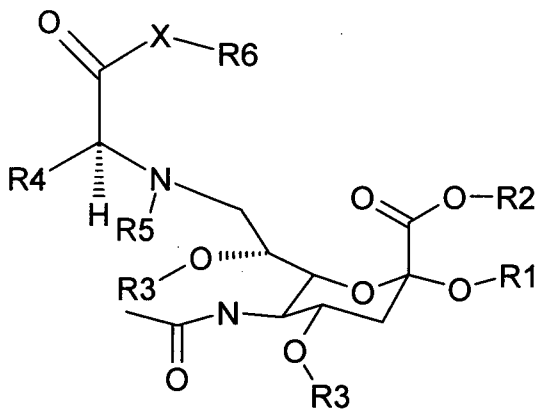
Aufgabe der Erfindung ist es, weitere Inhibitoren zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird gelöst durch die Verbindung mit den Merkmalen von Anspruch 1. Die Unteransprüche geben vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung wieder.

Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung besteht in neuen Aminosäure-Neuraminsäure-Derivaten sowie deren Herstellung.

Die erfindungsgemäße Subtanz hat die Strukturformel

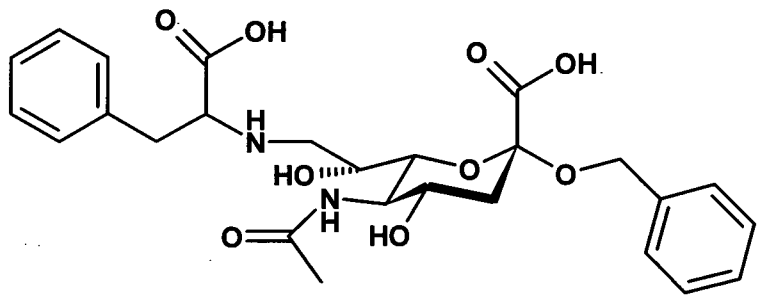


wobei

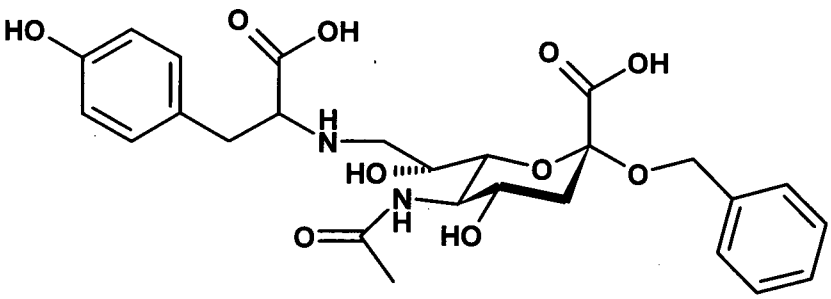
R1	ein hydrophober Rest ist, der Alkylgruppen und aromatische Verbindungen enthalten kann;
R2	ein Rest ist, der Wasserstoff (H), ein Kation oder ein hydrolysierbarer Alkylester ist;
R3	ein Rest ist, der Wasserstoff (H) ist oder unter physiologischen Bedingungen in die Hydroxygruppe überführbar ist, wie z.B. Acetylester;

	R4	Wasserstoff oder ein vorwiegend hydrophober Rest ist, der aromatischer oder aliphatischer Natur ist sowie einzelne hydrophile Gruppen enthalten kann;
	R5	Wasserstoff (H) oder ein Alkylrest oder eine weitere Aminosäure ist, wobei die Aminosäure auch Teil eines Oligopeptids sein kann;
	R6	entweder Wasserstoff (H), ein Kation, ein hydrolysierbarer Rest, der unter physiologischen Bedingungen ganz oder teilweise abgespalten wird, oder eine weitere Aminosäure ist, die alternativ auch Teil eines Peptids sein kann; und
	X	ein Sauerstoffatom (O) oder eine NH-Gruppe ist.

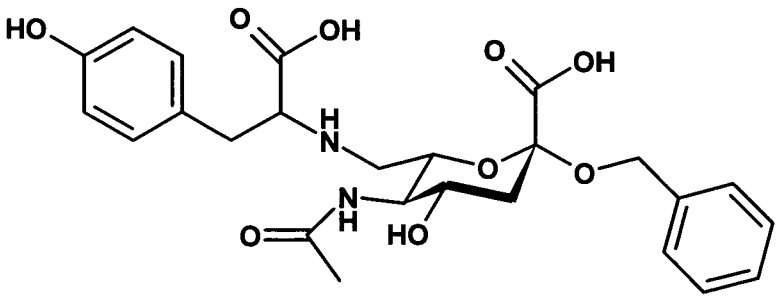
Im Folgenden sind fünf der Inhibitoren des MAG mit ihrer chemischem Formel gezeigt.



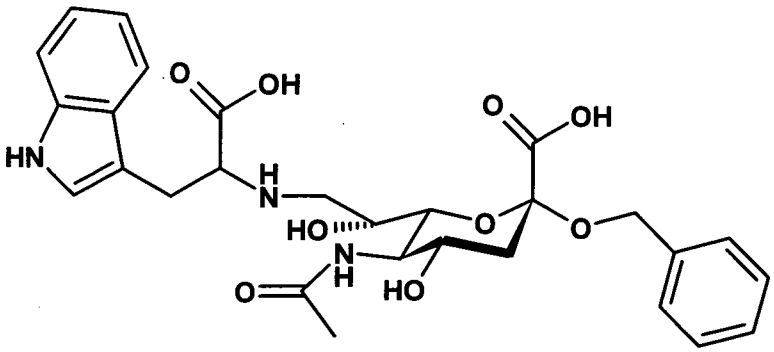
SV-8



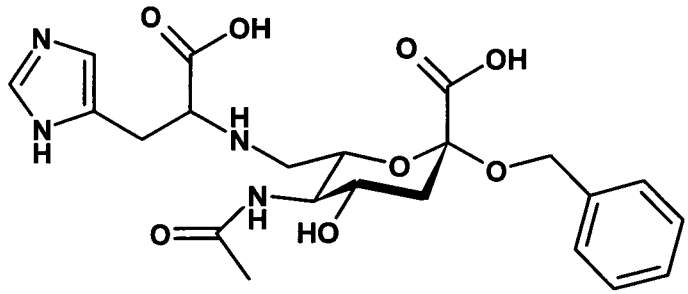
SV-14



SV-18



SV-10



SV-16

Zur Überprüfung der Bindungsaffinität an das MAG werden die mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) gemessenen Dissoziationskonstanten K_D herangezogen. Tabelle 1 zeigt die ermittelten K_D-Werte für die erfindungsgemäßen Inhibitoren sowie die der Vergleichssubstanzen SH-81 und Neu5Ac

Tabelle 1

Verbindung	K_D
Neu5Ac	1,5 ± 0,3 mM
SH-81	2,4 ± 0,9 µM
SV-8	14 ± 2 µM
SV-14	11 ± 5 µM
SV-18	185 ± 54 µM
SV-10	77 ± 7 µM

In Fig. 1 bis 4 sind die zugehörigen Bindungskurven SPR-Analyse zu sehen.

Fig. 1 zeigt die SPR-Messung der Standardsubstanz N-Acetylneuraminsäure: Die Auftragung der RUmax-Werte gegen die Konzentrationen der Neu5Ac von 100 µM bis 2500 µM lässt sich mit Hilfe des one site binding-Modells fitten. Dabei wird eine Dissoziationskonstante von KD = 1.5 ± 0.3 mM für die Bindung von Neu5Ac an das MAG erhalten.

Fig. 2 zeigt die Bindungskurve der Referenzsubstanz SH-81. Es werden Konzentrationen von 1.52 µM bis 50 µM vermessen. Der Fit mit Hilfe des one site binding-Modells führte zu einer Dissoziationskonstanten von KD = 2.4 ± 0.9 µM.

Fig. 3 zeigt die Bindungskurven der Aminosäurekonjugate der einfachtrunkierten Neu5Ac (8er-Spezies) und die KD-Werte der SPR-Analyse. Es werden Konzentrationen von 1.52 µM bis 500 µM vermessen. Der Fit mit Hilfe des one site binding-Modells ergab für den Phenylalaninliganden SV-8 einen KD-Wert von 14 ± 2 µM, für den Tryptophanliganden einen KD-Wert von 77 ± 7 µM und für den Tyrosinliganden einen KD-Wert von 11 ± 5 µM.

Fig. 4 zeigt den Vergleich der SPR-Ergebnisse der 8er-Spezies und der 7er-Spezies der Aminosäure-Neu5Ac-Derivate anhand der Tyrosin-Neu5Ac-Derivate SV-14 und SV-18. Es werden Konzentrationen von 1.52 µM bis 500 µM vermessen. Der Fit nach dem one site binding-Modell ergab einen KD-Wert von 11 ± 5 µM für das Tyrosinkonjugat der einfachtrunkierten Neu5Ac und einen KD-Wert von 185 ± 54 µM für das Tyrosinkonjugat der zweifachtrunkierten Neu5Ac.

Der Fit unter Verwendung des one site binding-Modells ergab für den Phenylalaninliganden SV-8 einen KD-Wert von 14 ± 2 µM. Für den Tyrosinliganden SV-14 wird eine Bindungskonstante von 11 ± 5 µM ermittelt. Der Tryptophanligand SV-10 dagegen zeigte eine Bindungskostante von 77 ± 7 µM. Die geringere Bindungsaffinität dieses Liganden könnte mit dem größeren Raumbedarf des Tryptophansubstituenten erklärt werden.

Alle Aminosäurekonjugate der einfachtrunkierten Neu5Ac zeigten somit in der SPR-Analyse hohe Bindungsaffinitäten. Die zweite Carboxylgruppe, die durch den Aminosäuresubstituenten in das Molekül eingeführt wurde, trug vermutlich durch Salz- oder Wasserstoffbrückenbindung zu dieser hohen Bindungsaffinität bei. Allerdings wird die positive Wirkung der zweiten Carboxylgruppe im Tryptophanliganden durch die Größe des aromatischen Restes anscheinend aufgehoben.

Während das entsprechende Tyrosin-einfachtrunkierte Neu5Ac-Derivat SV-14 mit einem K_D-Wert von 11 ± 5 µM die höchste Bindungsaffinität von allen Derivaten zeigte, nahm diese beim Tyrosin-zweifachtrunkierte Neu5Ac-Derivat SV-18 um den Faktor 17 auf 185 ± 54 µM

ab. Das Fehlen der Hydroxylgruppe an der 7-Position und die verkürzte Molekülstruktur bewirken eine starke Abnahme der Bindungsaffinität an MAG.

Für den Histidinliganden SV-16, der ebenfalls das um zwei Methylengruppe verkürzte Neu5Ac-Grundgerüst besitzt, konnte in der SPR-Analyse keine Bindung an das MAG gezeigt werden. Der Grund hierfür könnte in den unterschiedlichen Ladungen des Histidins im Gegensatz zu den anderen Liganden liegen. Histidin liegt bei dem pH-Wert des Laufpuffers protoniert vor und ist somit positiv geladen. Tyrosin dagegen besitzt einen Aromaten mit Elektronenüberschuss. Dies scheint die Wechselwirkung mit MAG zu erleichtern, während Histidin sich mit seiner positiven Ladung als ungeeignet erweist.

Um eine genauere Analyse der Bindungsspezifitäten der Aminosäurekonjugate der trunkierten Neu5Ac zu erhalten, wurden diese mittels STD NMR-Spektroskopie untersucht. Für alle Verbindungen der einfachtrunkierten Neu5Ac wurden STD-Titrationen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Titrationen sind in Fig. 5 gezeigt.

Fig. 5 zeigt den Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Konzentrationen in µM: Ergebnisse der KD-Titrationen mittels STD NMR für die Aminosäurekonjugate der einfachtrunkierten Neu5Ac [SV-8: (c(FcMAGd1-3) = 13.9 µM, c(SV-8) = 13.9 bis 166.8 µM, 700 MHz, T = 285 K, shaped pulse sp1 = 45 dB, Sättigungsdauer = 2.04 s, Einstrahlfrequenz on resonance-Spektrum = -0.5 ppm)]. [SV-10: (c(FcMAGd1-3) = 11.1 µM, c(SV-10) = 11.2 bis 166.8 µM, 700 MHz, T = 285 K, shaped pulse sp1 = 45 dB, Sättigungsdauer = 2.04 s, Einstrahlfrequenz on resonance-Spektrum = -0.5 ppm)]. [SV-14: (c(FcMAGd1-3) = 11.1 µM, c(SV-14) = 11.1 bis 166.8 µM, 700 MHz, T = 285 K, shaped pulse sp1 = 45 dB, Sättigungsdauer = 2.04 s, Einstrahlfrequenz on resonance-Spektrum = -1.0 ppm)].

Der Phenylalanin-Ligand SV-8 zeigte in der STD-Titration eine Bindungskonstante von 8 ± 3 µM. Diese zeigt eine gute Übereinstimmung mit der Bindungskonstante von 14 ± 2 µM, die die SPR-Analyse für diese Verbindung ergab. Für das Tryptophan-Derivat SV-10 wird hier ein K_D-Wert von 15 ± 6 µM erhalten. Dieser liegt deutlich unter dem K_D-Wert von 77 µM, den diese Verbindung in der SPR-Analyse gezeigt hat. Allerdings ist auch hier die Tendenz zur geringeren Bindungsaffinität im Vergleich zu den Phenylalanin- und Tyrosin-Liganden zu erkennen. Der Tyrosin-Ligand SV-14 zeigte auch in diesem Analyseverfahren

die höchste Bindungaffinität mit einem K_D-Wert von 4 ± 5 µM. Die Bindungskonstanten der SPR-Analyse werden durch die Ergebnisse der STD-Titrationen gestützt. Hier wurden die gleichen Abhängigkeiten der Bindungsaffinität gefunden.

Die höchste Bindungsaffinität zum MAG zeigte das Tyrosin-Konjugat der einfachtrunkierten Neu5Ac SV-14 mit einem K_D = 11 ± 5 µM in der SPR-Affinitätsanalyse sowie einem K_D = 4 ± 5 µM in der STD NMR Analyse. Das Phenylalanin-Konjugat der einfachtrunkierten Neu5Ac SV-8 zeigte mit einem K_D = 14 ± 2 µM in der SPR-Affinitätsanalyse und einem K_D = 8 ± 3 µM in der STD NMR Analyse eine nur geringfügig schwächere Bindungsaffinität zum MAG. Das Tryptophan-Konjugat der einfachtrunkierten Neu5Ac SV-10 zeigte dagegen weniger gute Bindungsaffinitäten zum MAG als die anderen beiden Konjugate. In der SPR-Affinitätsanalyse wird ein K_D = 77 ± 7 µM erhalten. Die STD NMR Analyse zeigte einem K_D = 15 ± 6 µM, der zwar niedriger liegt als die mittels SPR bestimmten Dissoziationskonstanten, aber immer noch um der Faktor 3.8 bzw. 2 schlechter ist als die mittels STD NMR bestimmten Dissoziationskonstanten für die anderen Konjugate. Das Tyrosin-Konjugat der zweifachtrunkierten Neu5Ac SV-18 zeigte in der SPR-Affinitätsanalyse einen K_D = 185 ± 54 µM. Aufgrund der schwächeren Bindungsaffinität ist keine STD NMR Analyse durchgeführt worden. Der Vergleich mit der Dissoziationskonstante des Tyrosin-Konjugats der einfachtrunkierten Neu5Ac zeigte eine um den Faktor 17 bzw. 7 schwächere Bindungsaffinität zu MAG. Die zweifache Verkürzung der Neu5Ac führt vermutlich durch das Fehlen der Hydroxylgruppe an der 7-Position und durch eine ungünstigere Lage in der Bindungstasche zu einer geringeren Bindungsaffinität zum MAG.

Unter Einbezug der unterschiedlichen Bedingungen dieser zwei Analysemethoden stimmen die für die einzelnen Liganden erhaltenen K_D-Werte in guter Näherung überein.

Die Fig. 6, Fig. 7 und Fig. 8 zeigen den Syntheseweg der erfindungsgemäßen Aminosäure-trunkierten Neu5Ac-Derivate, wobei auch das Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen beansprucht wird.

Die Synthese erfolgt in acht Synthesestufen. Im ersten Schritt wird die Carboxylgruppe der Neu5Ac als Methylester geschützt. Hier dient der saure Ionenaustauscher Dowex 50X8(H^+) als Katalysator. Die freien Hydroxylgruppen werden nach Standardmethode als Acetylgruppen geschützt. Die Hydroxylgruppe in 2-Position zeigt aufgrund des –I-Effektes

der benachbarten Carboxylgruppe eine schwächere Reaktivität als die anderen Hydroxylgruppen. Daher entstand ein Produktgemisch aus Penta- und Hexaacetat. Für die weiteren Syntheseschritte spielt dies keine Rolle, so dass das Produktgemisch unaufgereinigt weiter eingesetzt werden kann.

Fig. 6: Syntheseweg der Aminosäurekonjugate der trunkierten Neu5Ac ausgehend von Neu5Ac bis zur um eine Methylengruppe kürzeren Neu5Ac-Spezies nach der Periodatspaltung (Stufe 6).

Zur Aktivierung der 2-Position für die Substitution mit Benzylalkohol wird diese Position chloriert. Hierfür wird Acetylchlorid mit Methanol versetzt, wobei *in situ* HCl entstand. Diese reagierte dann in einer nucleophilen Substitution mit der acetylierten Neu5Ac zum β-Sialylchlorid. Aufgrund der thermodynamischen Kontrolle, der diese Reaktion unterliegt, entsteht das β-Sialylchlorid in guter Ausbeute anomerenrein. In der nächsten Stufe wird das β-Sialylchlorid mit Benzylalkohol und Silbercarbonat umgesetzt, wobei der Benzylalkohol an die 2-Position gekuppelt wird. Anschließend werden die Acetylschutzgruppen durch die Deacetylierung nach Zémplen abgespalten. Die Bindung zwischen der 8- und der 9-Position wird mittels Periodatspaltung gespalten. Zur Minimierung der möglichen Nebenreaktion zur zweifachtrunkierten Neu5Ac wird das Periodat in äquimolaren Mengen eingesetzt.

Die Aminosäure wird in Form ihres Methylesters über eine reduktive Aminierung mit $NaCNBH_3$ an die bei der Periodatspaltung entstandene Aldehydfunktion an Position 8 geknüpft. Im Anschluss werden die Methylester an den beiden Carboxylfunktionen mit 0.1 N Natronlauge verseift. Die Produkte werden mittels Biogel-P2-Säule und *RP*-HPLC mit Acetonitril/Wasser-Gradienten aufgereinigt (Fig. 7).

Fig. 7: Die reduktive Aminierung mit NaCNBH3 und anschließende Kupplung der Aminosäure an die um eine Methylengruppe verkürzte Neu5Ac führte zu den Liganden SV-8, SV-10 und SV-14.

Bei der Periodatspaltung entsteht auch das um zwei Methylengruppen verkürzte *N*-Acetyl-neuraminsäurederivat (Fig. 8). Die Nachbarschaft der Aldehydgruppe zur 7-Position der gewünschten Spezies erlaubt keine säulenchromatographische Aufreinigung mittels Kieselgel, da sonst die Gefahr einer Epimerisierung des asymmetrischen Zentrums an der 7-Position

besteht. So entstehen bei der nachfolgenden Kupplung der Aminosäure zwei Spezies der Aminosäure-Neu5Ac-Derivate mit unterschiedlich langen Glycerolseitenketten.

Fig. 8: Die reduktive Aminierung mit NaCNBH3 und anschließende Kupplung der Aminosäure an die um zwei Methylengruppen verkürzte Neu5Ac führte zu den Liganden SV-16 und SV-18.

Material und Methoden

Oberflächenplasmonenresonanz – SPR

Die Methode besitzt eine hohe Empfindlichkeit und so sind zur Analyse nur geringe Substanzmengen notwendig. Es ist notwendig, einen der Interaktionspartner auf dem Sensorchip zu immobilisieren.

Die Methode beruht auf der Totalreflexion von linear polarisiertem Licht an einer reflektierenden Schicht wodurch eine evaneszierende Welle hinter dieser Schicht entsteht. Durch Wechselwirkung mit einer Metallschicht kommt es zur Feldverstärkung und zur Resonanz mit den Oberflächenplasmonen der Metallschicht. Diese Wechselwirkung ist abhängig vom Reflexionswinkel, der vom Brechungsindex jenseits der Reflexionsebene abhängt. Die Resonanz führt zu einer Intensitätsverringerung des reflektierten Lichts.

An dem Sensorchip wird einer der Bindungspartner immobilisiert, während der andere in Lösung am Sensorchip vorbeigeleitet wird. Kommt es in der Messzelle zu einem Bindungsereignis führt dies zu einer Massenzunahme. Daraus resultiert eine Änderung des Brechungsindexes der Lösung an der Oberfläche. Diese Brechungsindexänderung führt zu einer Wechselwirkung mit der evaneszierenden Welle. Dadurch wird die Lichtintensität bei einem bestimmten Winkel abgeschwächt. Die Änderung dieses Winkels wird in Form von *resonance units* (RU) von der optischen Einheit des Messgerätes detektiert.

Die Empfindlichkeit der Methode erlaubt die Detektion von Massenänderungen von wenigen Pikogramm (1 pg entspricht ca. 1 RU). Das entspricht Winkeländerungen von ca. 0.0001 °. So lassen sich Verbindungen mit Molmassen unter 1000 Da selbst mit Dissoziationskonstanten im mM-Bereich untersuchen.

Je nach Applikation können unterschiedliche Verfahren zur Immobilisierung genutzt werden. Am häufigsten wird der so genannte CM5-Messchip genutzt. Er besteht aus einer Glasschicht mit aufgedampfter Goldschicht. Auf der Goldschicht befindet sich eine über Linker fixierte carboxymethylierte Dextranschicht. Die Aktivierung der Carboxylfunktionen der Dextranschicht geschieht durch Zugabe von *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) und *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid (EDC) als Aktivester. Dies ermöglicht die kovalente Bindung des zu immobilisierenden Bindungspartners unter Ausbildung einer Amidbindung. Alle nicht belegten aber aktivierten Carboxylfunktionen werden danach durch Umsetzung mit Ethanolamin inaktiviert (*Cappen*).

Aus den erhaltenen Sensorgrammen können kinetische und thermodynamische Daten zu den untersuchten Bindungsereignissen gewonnen werden. Durch Anpassen des Sensorgramms an die Langmuir-Funktion lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_{on} und der Dissoziation k_{off} ermitteln. Vorraussetzung hierfür ist, dass es sich um eine spezifische Wechselwirkung handelt und so eine Sättigung erreicht wird. Die Auftragung der Sättigungswerte gegen die untersuchten Ligandkonzentrationen führt zu einer Kurve, die bei Annahme eines *one site binding*-Modells an die Formel 1 angepasst werden kann. Hier stellt [L] die Ligandkonzentration in Lösung und RU_{max} den theoretischen Gleichgewichtswert bei unendlich hoher Ligandkonzentration dar. Aus der gefitteten Kurve kann bei $RU_{max}/2$ die Dissoziationskonstante K_D erhalten werden.

Probleme bei der Bestimmung dieser Bindungsparameter treten z. B. bei Rückbindungseffekten auf, die die beobachtete Dissoziationsrate verringern. Ebenfalls problematisch ist die Untersuchung sehr schneller Kinetiken, da die Datenaufnahmerate der Geräte von 10 Hz für deren Erfassung nicht ausreicht.

$$RU = \frac{RU_{max} \times [L]}{K_D + [L]}$$

Formel 1

Anhand der Formel 2 kann die maximal zu erwartende RU-Antwort bei der erreichten Belegung errechnet werden. Dabei ist MW_A das Molekulargewicht des Liganden, MW_P das Molekulargewicht des Proteins, RU_P die RU-Antwort der Belegung des Chips mit Protein und s die Stöchiometrie der Reaktion.

$$RU_{max} = \frac{MW_A}{MW_P} \cdot RU_P \cdot s$$

Formel 2

Durchführung der SPR-Analysen

Für die SPR-Messungen stand ein Biacore T100 der Firma Biacore AB, Uppsala, Schweden, zur Verfügung. Es wurden CM5-Chips (Biacore AB) verwendet, und die Immobilisierung des Proteins geschah nach der Standard-Amin-Kupplungsmethode. Alle Messungen werden bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Es werden jeweils zwei Flusszellen (Mess- und Referenzflusszelle) 10 min mit einem EDC/NHS-Gemisch (1:1) bei einer Flussrate von 10 µL/min aktiviert. Wird eine niedrigere RU-Antwort als 300 RU erhalten, wird die Aktivierung unter gleichen Bedingungen für 5 min wiederholt. Anschließend wird die Belegung der Messzelle mit dem Protein durchgeführt.

Direkt vor der Belegung wird zu der FcMAGd1-3-Lösung in Acetat-Puffer pH 4.0 (c = 20.9 µM) ein 50facher Überschuss des Liganden SV-8 (K_D (STD) = 8 ± 3 µM) hinzugegeben und gut durchmischt Die Belegung wird für 20 min bei einer Flussrate von 10 µL/min durchgeführt. Dabei wird eine RU-Antwort von 8100 RU erhalten. Das entsprach einer Belegung von 54 fmol FcMAGd1-3. D. h. die maximal zu erwartende RU-Antwort lag für die zu untersuchenden Liganden bei ca. 56 RU.

Danach werden beide Flusszellen mit Ethanolamin-Lösung (1 M, pH 8.5) bei einer Flussrate von 10 µL/min für 10 min abgesättigt (*Cappen*).

Um nicht-kovalent gebundenes MAG vom Chip zu waschen, werden mehrere saure Impulse (Glycin, pH 3.0) über die Messzellen geleitet. Nachdem die Basislinie durch diese Impulse nicht weiter abnahm, wird der Chip für zwei Stunden im *Standby Flow* equilibriert. Mittels einer Probemessung mit reiner Neu5Ac als Standardsubstanz wird die Funktionalität des MAG nachgewiesen.

Die zu untersuchenden Liganden werden bei einer *Flow Rate* von 30 µL/min vermessen. Die Injektionszeit betrug genauso wie die Dissoziationsphase 480 s. Eine Regeneration war nicht notwendig. Innerhalb der Dissoziationsphase wird die Basislinie wieder erreicht.

Die erhaltenen Sensorgramme werden mit Hilfe der Biacore T100 Evaluation Software 1.1 und des *one site binding*-Modells der Software Origin 7.5 ausgewertet. Da die *Blank*-Messungen aufgrund nicht erklärbar hoher RU-Antworten nicht zur Auswertung verwendet werden konnten, wird der Nullpunkt aus den zwei niedrigsten Konzentrationen rückextrapoliert und in den Fit miteinbezogen.

Die kinetische Auswertung der erhaltenen Sensorgramme wird mit der Biacore T100 Evaluation Software 1.1 unter Verwendung der *Kinetics/Affinity*-Funktion (1:1-Binding Modell) durchgeführt.

Pufferlösungen
PBS-H_2O Puffer für Oberflächenplasmonenresonanz
140 mM NaCl
3 mM KCl
8 mM Na_2HPO_4
2 mM NaH_2PO_4 in H_2O gelöst
pH 7.4

Alle weiteren verwendeten Puffer und Reagenzlösungen werden in Form von fertigen Lösungen von der Firma Biacore AB, Uppsala, Schweden, eingesetzt. Alle Puffer und Lösungen werden vor dem Einsatz sterilfiltriert.

Saturation Transfer Difference NMR-Spektroskopie

Das *Saturation Transfer Difference* (STD) NMR-Verfahren kann zum Screening von Substanzbibliotheken, zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten und zur Bestimmung von Bindungsepitopen genutzt werden.

Das Prinzip der STD NMR-Spektroskopie beruht auf zwei Spektren (*on resonance*-Spektrum und *off resonance*-Spektrum), deren Differenz das STD NMR-Spektrum ergibt. Im *on resonance*-Spektrum werden die Resonanzen des Proteins selektiv gesättigt. Diese selektive Sättigung ist bei Proteinen, die größer als 10 kDa sind, aufgrund der Spindiffusion möglich. Diese Sättigung kann durch Einstrahlung außerhalb der Ligandsignale erhalten werden, da es bei Makromolekülen zu starken Linienverbreiterungen kommt. Zusätzlich führen Anisotropieeffekte in geordneten Bereichen zu extremen chemischen Verschiebungen. Das

führt dazu, dass man z. B. mit einem selektiven Gauss-Puls bei -1 ppm Resonanzen des Proteins selektiv sättigen kann, während die scharfen Resonanzen niedermolekularer Verbindungen unbeeinflusst bleiben. Da ab einer Proteingröße von ca. 10 kDa die Spindiffusion, d. h. der Magnetisierungstransfer über das gesamte Molekül innerhalb weniger 100 ms geschieht, kann man durch die so durchgeführte selektive Sättigung einzelner Resonanzen sämtliche Signale eines Proteins sättigen.

Im *off resonance*-Spektrum werden die gleichen Sättigungspulse außerhalb der Proteinresonanzen z.B. bei 40 ppm eingestrahlt. Es werden keine Proteinresonanzen gesättigt und das Spektrum unterscheidet sich nicht von einem Spektrum ohne Sättigungspulse. Die Einstrahlung ist notwendig, um eine unterschiedliche Probenerwärmung in beiden Experimenten zu verhindern. Temperaturschwankungen können sich bei der anschließenden Subtraktion als Artefakte auswirken.

Nun hängt es davon ab, ob ein Molekül mit dem gesättigten Protein wechselwirkt und so Sättigung übernimmt. Wechselwirkt ein Molekül nicht, so finden sich in beiden Spektren die gleichen Signale und Signalintensitäten. Die Differenzbildung führt nicht zu Signalen im STD NMR Spektrum. Im Falle einer Wechselwirkung trägt der Ligand die Sättigung bei Dissoziation vom Protein in die Lösung, wo sie detektiert werden kann und im Differenzspektrum zu Signalen führt. Hier sind die Signalintensitäten der einzelnen Protonen höher, je enger sie im Kontakt zum Protein standen, da sie im *on resonance*-Spektrum einem stärkeren, intermolekularen Sättigungstransfer ausgesetzt waren. Der intermolekulare Sättigungstransfer ist in der sechsten Potenz umgekehrt proportional zum Abstand der an der Kreuzrelaxation beteiligten Protonen.

Zur Unterdrückung der störenden Proteinsignale wird ein $T_{1\rho}$-Filter (Spinlock-Filter) eingesetzt. Dabei wird die Magnetisierung nach dem ersten 90 °-Puls eine Zeit lang in der xy-Ebene gehalten. Durch die erheblich kürzeren T_2-Relaxationszeiten der Makromoleküle klingt ihre Magnetisierung im Vergleich zu der der Liganden sehr schnell ab. Die Dauer des Spinlock-Filters liegt im Bereich von 10 bis 50 ms. Das HDO-Signal wird mittels einer WATERGATE-Puls-Sequenz (*Water Suppression by Gradient Taylored Excitation*) unterdrückt. Dabei wird durch eine Folge von Gradientenpulsen ein Anregungsprofil erzeugt, welches die Region des Wassersignals ausspart.

Außer dem Sättigungstransfer haben noch andere Parameter direkten Einfluss auf die Signalintensitäten: z. B. die Probenzusammensetzung und Aufnahmebedingungen, die kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften der beobachteten Interaktion und die T_1-Relaxationszeiten der beteiligten Protonen.. Daher ist bei Systemen, die lange Sättigungszeiten zur Beobachtung eines STD-Effekts erfordern, eine Abschätzung oder Bestimmungen der T_1-Relaxationszeiten wichtig.

Die Formel 3 zeigt die Dissoziations- und Assoziationsreaktion. Daraus ergibt sich nach dem Massenwirkungsgesetz die Formel 4, welche die Dissoziationskonstante K_D als Quotient aus den Geschwindigkeitskonstanten k_{off} und k_{on} liefert.

$$[PL] \underset{k_{on}}{\overset{k_{off}}{\rightleftharpoons}} [P]+[L]$$

Formel 3

$$K_D = \frac{[P]\times[L]}{[PL]} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Formel 4

Kleine *off rates* bewirken, dass innerhalb der Sättigungszeit nicht genügend Moleküle in die Bindungstasche gelangen und Sättigung aufnehmen. Bei sehr großen *on* und *off rates* dagegen reicht die Verweildauer in der Bindungstasche nicht aus, um Sättigung auf den Liganden zu übertragen.

Zur Bestimmung des Bindungsepitops wird der Quotient aus dem Integral eines Protonensignals im STD NMR-Spektrum (I_0-I_{sat}) und im *off resonance*-Spektrum (I_0) gebildeten (Formel 5). Dies wird für alle detektierten Protonensignale (absolute STD-Prozente) durchgeführt. Zur Vereinfachung kann das Signal mit dem stärksten STD-Effekt auf 100 % normiert und alle anderen STD-Effekte hierzu ins Verhältnis gesetzt werden (relative STD-Prozente).

$$STD\,[\%] = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \times 100$$

Formel 5

Zur Charakterisierung der Kinetik des untersuchten Systems werden mehrere STD NMR-Spektren mit unterschiedlichen Ligandenüberschüssen aufgenommen. Aus den absoluten STD-Prozenten eines ausgewählten Signals berechnet man die STD-Amplifikationsfaktoren (Formel 6). Diese trägt man gegen die Ligandenkonzentration [L] auf. Handelt es sich um ein System, welches sich durch das *one site binding*-Modell beschreiben lässt (Formel 7), kann aus der erhaltenen Bindungskurve die Dissoziationskonstante K_D bestimmt werden.

$$STD\text{ - }Ampl.fakt. = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \times Überschuss$$

Formel 6

$$STD\text{ - }Ampl.fakt. = \frac{STD\text{ - }Ampl.fakt._{max.} \times [L]}{K_D + [L]}$$

Formel 7

Mit dieser Analysemethode erhält man Dissoziationskonstanten, die höher liegen als die tatsächlichen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der STD-Amplifikationsfaktor bei Erhöhung der Ligandkonzentration trotz fast vollständiger Rezeptorbelegung noch weiter ansteigt. Die Gründe hierfür sind bei schneller Dissoziation der hohe Durchsatz an Liganden und die lange Lebensdauer der Sättigung im Liganden nach Verlassen der Bindungstasche. Dadurch kann es vorkommen, dass man höhere Konzentrationen der gebundenen Spezies erhält als Bindungsstellen vorhanden sind. Dies führt bei Auftragung der Messwerte nach Formel 7 im Vergleich zu anderen Assays zum späteren Erreichen des Gleichgewichtplateaus und so zu höheren K_D-Werten.

Das STD NMR-Verfahren lässt Untersuchungen von Bindungen in einem K_D-Wertebereich von pM bis mM zu und kann mit einer Vielzahl von Pulsprogrammen kombiniert werden. Die Methode ist nicht nur auf Messungen mit gelöstem Protein beschränkt.

Durchführung der STD NMR-Messungen

Die FcMAGd1-3-NMR-Proben werden in 600 µL D_2O (99.9 %)-PBS-Puffer angesetzt. Dafür wird das Protein in Ultrazentrifugationseinheiten umgepuffert. Alle Messungen mit Protein-

haltigen Proben werden bei 285 K durchgeführt. Die Konzentrationen des Proteins in den NMR-Proben lagen zwischen 6 und 12 µM. Titrationsserien werden bis zum Erreichen der Sättigung durchgeführt, daher variierten die eingesetzten Ligandkonzentrationen.

Um Proteinhintergrundsignale zu eliminieren, werden alle Spektren mit einem *spinlock* Puls aufgenommen. Die Dauer des *spinlock* Pulses lag am 500 MHz NMR bei 10 ms und am 700 MHz NMR bei 30 ms.

Das Protein wird mit Hilfe einer Serie von 50 *Gauss-shaped* Pulsen von je 50 ms Länge und je einem *Delay* von 1 ms gesättigt. Die Gesamtsättigungsdauer lag bei 2.04 s. Am 500 MHz NMR werden Pulsleistungen von 45 und 55 dB verwendet, am 700 MHz NMR entsprach dies 39 und 49 dB. Die *on resonance*-Einstrahlfrequenz variierte bei den verschiedenen Liganden, die *off resonance*-Einstrahlungsfrequenz lag immer bei 40 ppm. Zur Aufnahme der STD Spektren werden pseudo-2D STD NMR Spektren (stdw5slsp2d.bc mit Spinlock und stdw5sp2d.bc ohne Spinlock) gewählt. Bei diesen Pulsprogrammen werden die *on* und *off resonance*-Spektren abwechselnd aufgenommen.

Im Allgemeinen lag die Anzahl der *Scans* bei 2048 (1024 Scans für das *on resonance*- und 1024 Scans für das *off resonance*-Spektrum) mit 16 *dummy* Scans und einer *sweep width* von 10 ppm.

Alle Spektren werden vor der Prozessierung mit einer exponentiellen *line broadening*-Funktion von 0.5 bis 1.0 Hz multipliziert. Nach Trennen des Datensatzes in *on* und *off resonance*-Spektrum werden diese übereinander gelegt und das *off resonance*- auf das *on resonance*-Spektrum skaliert. Der erhaltene Skalierungsfaktor entsprach dem absoluten STD-Wert, der in die absoluten STD-Prozente und in den STD-Amplifikationsfaktor umgerechnet werden konnte.

Titrationen

Für die Titrationen werden von allen Liganden Stammlösungen mit der Konzentration 10 mg/mL angesetzt. Durch die Wahl dieser hohen Konzentration konnten Verdünnungseffekte beim Hinzutitrieren der Stammlösung vernachlässigbar klein gehalten werden. Nach Zugabe der entsprechenden Stammlösungsmenge wird ein pseudo-2D-STD

NMR-Spektrum aufgenommen. Ausgewertet werden die Titrationen anhand des *N*-Acetylsignals der Neu5Ac bei ca. 1.8 ppm.

Um die Titrationskurven zu erhalten, werden die STD-Amplifikationsfaktoren anschließend gegen die Konzentrationen aufgetragen. Diese werden mit dem *one site binding*-Modell der Software Origin 7.5 gefittet und die entsprechende Bindungskonstante für den Liganden erhalten.

Pufferlösungen

PBS-D_2O (99.9 %)-Puffer für STD NMR Messungen

140 mM NaCl

3 mM KCl

8 mM Na_2HPO_4

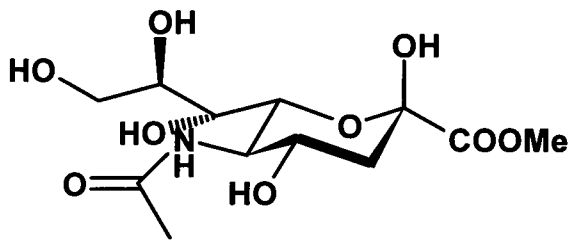
2 mM NaH_2PO_4

6 mM Natriumazid in D_2O (99.9 %) gelöst

pH 7.4 (nicht für D_2O korrigiert)

Synthese und Charakterisierung

Methyl-5-acetamido-3,5-didesoxy-D-*glycero*-β-D-*galacto*-2-nonulopyranosonat (1)



$C_{12}H_{21}NO_9$

M = 323.30 g/mol

R_f (Butanol/Eisessig/H_2O = 5/2/2) = 0.48

$[\alpha]^{20}_D$ = -27 ° (c = 1 in H_2O)

Smp. = 111 °C

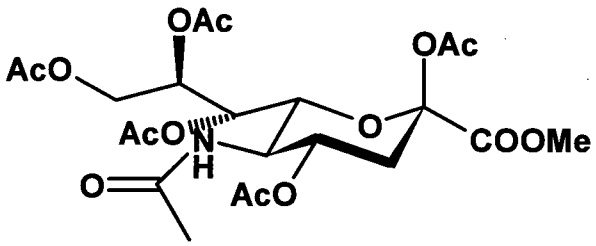
2.00 g (6.46 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure und 2.00 g Dowex 50W-8X (H^+) werden mit 90.0 mL absolutem Methanol versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 20 h bei RT gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Anschließend wird der Ionenaustauscher abfiltriert und mehrmals mit Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum destillativ entfernt. Das erhaltene Produkt wird über Nacht am Ölpumpenvakuum getrocknet.

Als Produkt wird ein beige-weißer Feststoff in einer Auswaage von 1.08 g (5.57 mmol) erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 86 % bezogen auf die eingesetzte Menge *N*-Acetylneuraminsäure.

^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 4.03 (ddd, 1H, $^3J_{3a-4}$ = 4.9 Hz, $^3J_{3b-4}$ =11.4 Hz, $^3J_{4-5}$ = 1.2 Hz, H-4), 3.99 (dd, 1H, $^3J_{5-6}$ = 10.5 Hz, $^3J_{6-7}$ = 1.4 Hz, H-6), 3.83-3.78 (m, 1H, H-9a), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 3.85-3.79 (m, 1H, H-5), 3.73-3.66 (m, 1H, H-8), 3.58 (dd, 1H, H-9b), 3.47 (dd, 1H, $^3J_{6-7}$ = 1.4 Hz, H-7), 2.21 (dd, 1H, $^2J_{3a-3b}$ =12.9 Hz, $^3J_{3b-4}$ =11.4 Hz, H-3b), 1.80 ($NHCOCH_3$), 1.88 (dd, 1H, $^2J_{3a-3b}$ =12.9 Hz, $^3J_{3a-4}$ = 4.9 Hz, H-3a).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, MeOD): δ [ppm] = 174.5 ($NHCOCH_3$), 171.5 (C-1), 96.8 (C-2), 71.8 (C-6), 71.6 (C-5), 71.3 (C-8), 69.9 (C-7), 67.4 (C-4), 64.5 (C-9), 52.9 ($COOCH_3$), 40.3 (C-3), 22.2 ($NHCOCH_3$).

Methyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-*glycero*-β-D-*galacto*-2-nonulopyranosonat (2)



$C_{22}H_{31}NO_{14}$
M = 533.49 g/mol
R_f(DCM/MeOH = 10/1) = 0.87

833 mg (2.58 mmol) 1 werden in 13 mL absolutem Pyridin gelöst. Das Reaktionsgemisch wird bei 0 °C tropfenweise mit 8.4 mL Essigsäureanhydrid versetzt und 16 h bei RT gerührt. Nachdem dünnschichtchromatographisch der Umsatz der Produkte nachgewiesen worden ist, wird das Pyridin codestillativ mit Toluol entfernt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es werden 3.85 g eines beigen Schaums erhalten. Als Nebenprodukt trit die in 2-Position nicht acylierte Spezies auf.

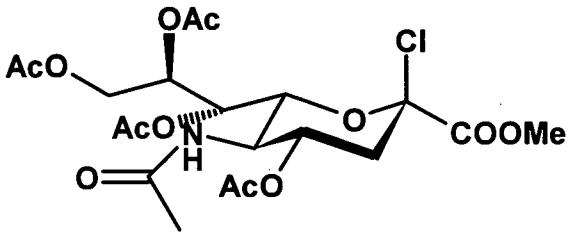
Das erhaltene Produktgemisch wird ohne weitere Aufarbeitung in der nachfolgenden Reaktion umgesetzt.

^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 5.39 (dd, 1H, $^3J_{6-7}$ = 2.3 Hz, $^3J_{7-8}$ = 6.5 Hz, H-7), 5.18 (ddd, 1H, $^3J_{3e-4}$ = 5.0 Hz, H-4), 5.07 (ddd, 1H, $^3J_{7-8}$ = 6.5 Hz, $^3J_{8-9a}$ = 10.6 Hz, H-8), 4.45

(dd, 1H, $^3J_{8\text{-}9a}$ = 10.6 Hz, H-9a), 4.18 (dd, 1H, $^3J_{6\text{-}7}$ = 2.3 Hz, H-6), 4.10-4.00 (m, 2H, H-9b, H-5), 3.75 (s, 3H, $COOCH_3$), 2.52 (dd, 1H, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 5.0 Hz, H-3e), 2.14-1.92 (m, 19H, H-3a, 5*$COCH_3$, $NHCOCH_3$).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, MeOD): δ [ppm] = 197.9 (C-1), 175.0 ($COCH_3$), 171.4 ($COOCH_3$), 98.4 (C-2), 73.0 (C-6), 71.5 (C-8), 69.8 (C-4), 68.5 (C-7), 62.8 (C-9), 53.3 ($COOCH_3$) 49.6 (C-5), 40.9 ($NHCOCH_3$), 37.0 (C-3), 22.2 ($NHCOCH_3$).

Methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-*glycero*-β-D-*galacto*-2-nonulopyranosyl)onat-Chlorid (3)



$C_{20}H_{28}ClNO_{12}$

M = 509.90 g/mol

R_f (Toluol/Aceton = 3/2) = 0.41

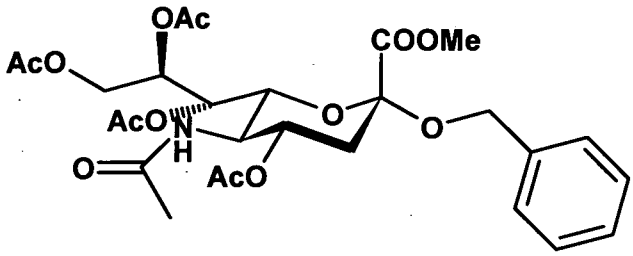
$[\alpha]^{20}_D$ = -57 ° (c = 1 in $CHCl_3$)

3.85 g des Produktgemisches aus 2 werden bei 0 °C in 18.0 mL Acetylchlorid gelöst und langsam mit 282 µL MeOH versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgefäß zügig dicht verschlossen und das Reaktionsgemisch 40 h bei RT gerührt. Das Ende der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch detektiert. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt worden ist, wird das erhaltene Rohprodukt dreimal mit Toluol codestilliert und danach für mehrere Stunden im Ölpumpenvakuum getrocknet. Als Produkt werden 1.17 g (2.29 mmol) eines weißen Schaums erhalten. Als Ausbeute werden 31 % des β-Sialylchlorids bezogen auf die eingesetzte Menge des Zweiproduktgemisches erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 5.40 (dd, 1H, $^3J_{6\text{-}7}$ = 2.3 Hz, $^3J_{7\text{-}8}$ = 7.0 Hz, H-7), 5.35 (dd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ =11.3 Hz, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.6 Hz, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.6 Hz, H-4), 5.11 (ddd, 1H, $^3J_{7\text{-}8}$ = 7.0 Hz, $^3J_{8\text{-}9a}$ = 2.7 Hz, $^3J_{8\text{-}9b}$ = 7.0 Hz, H-8), 4.35 (dd, 1H, $^3J_{8\text{-}9a}$ = 2.7 Hz, $^2J_{9a\text{-}9b}$ = 12.6 Hz, H-9a), 4.29 (dd, 1H, $^3J_{5\text{-}6}$ = 10.7 Hz, $^3J_{6\text{-}7}$ = 2.3 Hz, H-6), 4.14 (dd, 1H, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.6 Hz, $^3J_{5\text{-}6}$ = 10.7 Hz, H-5), 4.00 (dd, 1H, $^3J_{8\text{-}9b}$ = 7.0 Hz, $^2J_{9a\text{-}9b}$ = 12.6 Hz, H-9b), 3.81 (s, 3H, $COOCH_3$), 2.72 (dd, 1H, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.6 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 13.9 Hz, H-3e), 2.15-1.84 (m, 15H, 4*$COCH_3$, $NHCOCH_3$), 1.79 (dd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ =11.3 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 13.9 Hz, H-3a).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, MeOD): δ [ppm] = 169.1 (C-1), 99.3 (C-2), 74.3 (C-6), 70.2 (C-8), 69.1 (C-4), 67.2 (C-7), 62.5 (C-9), 54.2 ($COOCH_3$), 49.3 (C-5), 41.0 (C-3), 21.4 ($NHCOCH_3$).

Methyl-(benzyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-*glycero*-α-D-*galacto*-2-nonulopyranosid)onat (4)



$C_{27}H_{35}NO_{13}$

M = 581.58 g/mol

R_f (EE) = 0.29

$[\alpha]^{20}_D$ = -2 ° (c = 0.4 in MeOH)

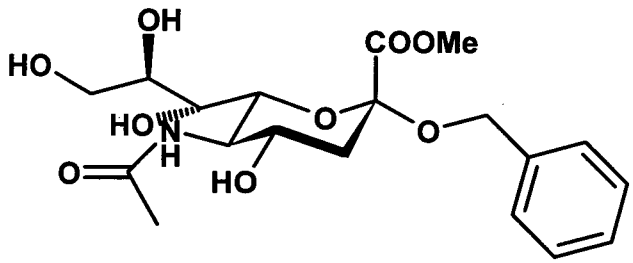
Die folgende Reaktion wird in drei gleichen Ansätzen durchgeführt. Das β-Sialylchlorid 3 wird als Edukt (389 mg, 78 µmol) in 24.0 mL DCM gelöst. In einem weiteren Kolben wird unter Licht- und Feuchtigkeitsausschluss eine Lösung von 3.7 mL Benzylalkohol (39 mmol), 950 mg Silbercarbonat (3.45 mmol) und 3.0 g Molekularsieb 4Å in 30.0 mL CH_2Cl_2 bereitgestellt. Die Lösung des Eduktes wird zu der zweiten Lösung hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 48 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Danach wird das Reaktionsgemisch filtriert, mit je 20 mL 1 M Natriumthiosulfatlösung und bidestilliertem Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Die drei Ansätze werden vereinigt. Der zurückbleibende Benzylalkohol wird mittels Säulenfiltration (Elutionsmittel: Toluol) abgetrennt. Nachdem der Benzylalkohol dünnschichtchromatographisch nicht mehr nachzuweisen ist, wird das Produkt mittels Ethylacetat von der Säule eluiert. Es werden 1.16 g (1.99 mmol) eines weißen Schaums erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 87 % bezogen auf die eingesetzte Menge Produkt 3.

^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 7.35-7.25 (m, 5H, Ar-H), 5.47 (ddd, 1H, $^3J_{7\text{-}8}$ = 8.7 Hz, $^3J_{8\text{-}9a}$ = 2.7 Hz, $^3J_{8\text{-}9b}$ = 5.9 Hz, H-8), 5.35 (dd, 1H, $^3J_{6\text{-}7}$ = 2.2 Hz, $^3J_{7\text{-}8}$ = 8.7 Hz, H-7), 4.84 (ddd, 1H, H-4), 4.78 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 11.9 Hz, Ar-CH_2a), 4.43 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 11.9 Hz, Ar-CH_2b), 4.34 (dd, 1H, $^3J_{8\text{-}9a}$ = 2.7 Hz, $^2J_{9a\text{-}9b}$ = 12.4 Hz, H-9a), 4.21 (dd, 1H, $^3J_{5\text{-}6}$ = 10.5 Hz, $^3J_{6\text{-}7}$ = 2.2 Hz, H-6), 4.07 (dd, 1H, $^3J_{8\text{-}9b}$ = 5.9 Hz, $^2J_{9a\text{-}9b}$ = 12.4 Hz, H-9b), 4.00 (dd, 1H, $^3J_{5\text{-}6}$ = 10.5 Hz, H-5), 3.70 (s, 3H, $COOCH_3$), 2.69 (dd, 1H, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.6 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.7 Hz, H-3e),

2.15-1.84 (m, 15H, 4*$COCH_3$, $NHCOCH_3$), 1.88 (dd, 1H, $^3J_{3a-4}$ = 12.0 Hz, $^2J_{3a-3e}$ = 12.7 Hz, H-3a).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, MeOD): δ [ppm] = 171.1 (4x $COCH_3$, $NHCOCH_3$), 169.1 (C-1), 128.1 (Ar-C), 138.1 (Ar-C), 99.3 (C-2), 73.0 (C-6), 70.6 (C-4), 69.2 (C-8), 68.4 (C-7), 67.4 ($Ar-CH_2$), 63.0 (C-9), 53.1 ($COOCH_3$), 49.8 (C-5), 38.7 (C-3), 22.2 ($NHCOCH_3$).

Methyl-(benzyl-5-acetamido-3,5-didesoxy-D-*glycero*-α-D-*galacto*-2-nonulopyranosid)onat (5)



$C_{19}H_{27}NO_8$
M = 413.43 g/mol
R_f (EE/MeOH = 4/1) = 0.26
$[\alpha]^{20}_D$ = +127 ° (c = 1 in MeOH)

104 mg (18 µmol) Edukt 4 werden in 9.7 mL absolutem MeOH gelöst, eine Spatelspitze Molsieb 4Å hinzugegeben und die Reaktionslösung durch Zugabe von NaOMe auf pH 8 eingestellt. Nach 1 h wird der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch überprüft. Der pH-Wert wird während der Reaktion alle 15 min kontrolliert.

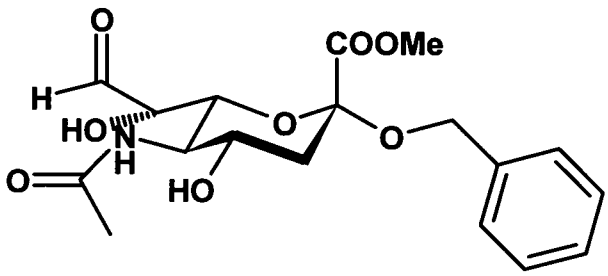
Nach 2 h wird das Reaktionsgemisch durch Zugabe eines kleinen Stückes Trockeneis neutralisiert (pH ca. 5.5). Dann wird das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt. Es wird ein weißer Feststoff in einer Auswaage von 65.7 mg (16 µmol) erhalten. Das entspricht 89 % Ausbeute bezogen auf die eingesetzte Menge 4.

^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 7.39-7.23 (m, 5H, Ar-H), 4.81 (d, 1H, $^2J_{Ar-CH2}$= 11.6 Hz, $Ar-CH_2$a), 4.51 (d, 1H, $^2J_{Ar-CH2}$= 11.6 Hz, $Ar-CH_2$b), 3.91-3.88 (m, 1H, $^3J_{7-8}$ = 10.3 Hz, H-7), 3.87 (dd, 1H, $^3J_{8-9b}$ = 4.8 Hz, H-9b), 3.84-3.82 (m, 1H, H-5), 3.76 (s, 3H, $COOCH_3$), 3.70-3.60 (m, 4H, H-9a, H-6, H-5, H-4), 3.53 (ddd, 1H, $^3J_{7-8}$ = 10.3 Hz, $^3J_{8-9b}$ = 4.8 Hz, H-8), 2.73 (dd, 1H, $^2J_{3a-3e}$ = 12.8 Hz, H-3e), 1.99 (s, 3H, $NHCOCH_3$), 1.81 (dd, 1H, $^2J_{3a-3e}$ = 12.8 Hz, H-3a).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, MeOD): δ [ppm] = 173.5 (NHCOCH3), 169.7 (C-1), 128.8 (Ar-C),

99.3 (C-2), 74.9 (C-6), 72.1 (C-7), 70.2 (C-8), 68.2 (C-4), 67.0 (Ar-CH_2), 64.7 (C-9), 53.5 (C-5), 53.0 ($COOCH_3$), 41.5 (C-3), 22.5 ($NHCOCH_3$).

Methyl-(benzyl-5-acetamido-3,5-didesoxy-8-formyl-D-*glycero*-α-D-*galacto*-2-octulopyranosid)onat (6)



$C_{18}H_{23}NO_8$

M = 381.39 g/mol

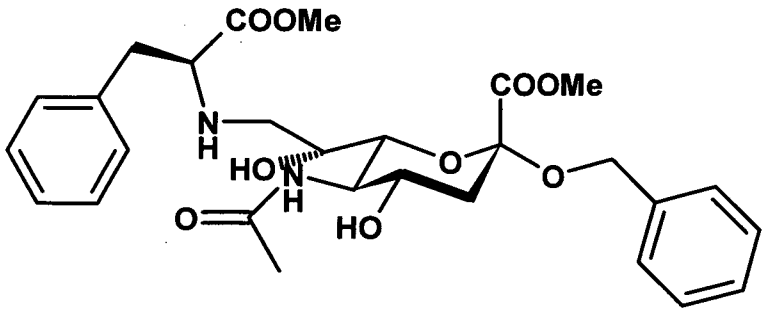
R_f (EE/MeOH = 4/1) = 0.46

38 mg 5 (92 µmol) werden in 4 mL bidest. H_2O gelöst und langsam (ca. 2 min) tropfenweise unter starkem Rühren mit einer Lösung von 20 mg $NaIO_4$ (92 µmol), gelöst in 1 mL bidest. H_2O, versetzt. Der pH-Wert wird während der Reaktion überprüft und auf pH 6 korrigiert. Das Reaktionsgemisch wird 30 min gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (EE/MeOH = 4/1) kontrolliert. Nach Reaktionsende wird die Lösung durch Zugabe von gesättigter Na_2CO_3-Lösung neutralisiert. Das während der Reaktion entstehende Iodat wird durch Zugabe einiger Spatelspitzen Amberlite MB-3 Mixbedionenaustauscher entfernt, der Ionenaustauscher wird nach Ende der Reaktion abfiltriert und das Produkt lyophillisiert. Es werden 36 mg Rohprodukt erhalten. Im Rohprodukt ist als Nebenprodukt auch die um zwei Methylengruppen verkürzte Neu5Ac-Spezies 6a entstanden. Das Rohprodukt wird unaufgereinigt direkt in der nächsten Reaktion eingesetzt. Aufgrund des Vorliegens mehrer Spezies nebeneinander werden in der NMR-Auswertung nur die eindeutig zu identifizierenden Signale erwähnt.

^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 7.42-7.31 (m, 5H, Ar), 4.76 (d, 1H, Ar-CH_2a), 4.55 (d, 1H, Ar-CH_2b), 3.84 (dd, 1H, H-6), 3.69 (ddd, 1H, H-4), 3.52 (dd, 1H, H-5), 2.68 (dd, 1H, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 11.9 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.7 Hz,H-3e), 2.00 (s, 3H, $NHCOCH_3$), 1.79 (dd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 11.3 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.7 Hz, H-3a).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, MeOD): δ [ppm] = 131.9 (Ar-C), 130.1 (Ar-C), 74.5 (C-6), 69.7 (C-5), 68.5 (C-4), 69.3 (Ar-CH_2), 40.8 (C-3), 22.4 ($NHCOCH_3$).

Methyl-*N*-{[methyl-(benzyl-5-acetamido-3,5,8-tridesoxy-4,7-dihydroxy-α-D-*galacto*-2-octulopyranosid)onat]-8-yl}-L-phenylalaninat (7)



$C_{28}H_{36}N_2O_9$

M = 544.59 g/mol

R_f (DCM/MeOH = 4/1) = 0.72

$[\alpha]^{20}_D$ = -22 ° (c = 0.7 in MeOH)

MALDI-TOF-MS:

m/z = 545.1 $[M+H]^+$

m/z = 567.1 $[M+Na]^+$

50.0 mg 6 (0.13 mmol) werden in 6 mL H_2O gelöst. Dazu werden 28.0 mg L-Phenylalaninmethylester (130 µmol) gegeben. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wird auf pH 6 eingestellt.

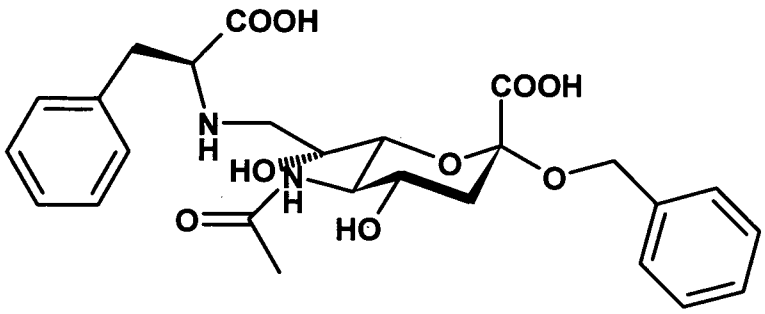
4.0 mg $NaCNBH_3$ (70 µmol) werden in 1.5 mL H_2O gelöst und zur Reaktionslösung hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei RT über Nacht gerührt.

Nachdem der Umsatz der Produkte dünnschichtchromatographisch nachgewiesen worden ist, wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Laufmittel: DCM/MeOH = 9/1) aufgereinigt. Es werden 30.3 mg (60 µmol) eines farblosen Sirups erhalten. Das entspricht 75 % Ausbeute bezogen auf das eingesetzte Produkt 6.

^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.23-7.14 (m, 5H, Ar-H), 7.13-7.01 (m, 5H, Phe-Hδ, Phe-Hδ', Phe-Hε, Phe-Hε', Phe-Hζ), 4.46 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 10.8 Hz, Ar-CH_2a), 4.24 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 10.8 Hz, Ar-CH_2b), 3.82 (s, 3H, $COOCH_3$), 3.80 (ddd, 1H, $^3J_{6\text{-}7}$ = 10.4 Hz, H-7), 3.71 (dd, 1H, Phe-Hα), 3.58 (s, 3H, Phe-$COOCH_3$), 3.57 (dd, 1H, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.1 Hz, $^3J_{5\text{-}6}$= 10.3 Hz, H-5), 3.47 (ddd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 11.9Hz, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.7 Hz, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.1 Hz, H-4), 3.41 (dd, 1H, $^3J_{5\text{-}6}$= 10.3 Hz, $^3J_{6\text{-}7}$ = 10.4 Hz, H-6), 3.10-2.98 (m, 4H, H-8a, H-8b, Phe-Hβa, Phe-Hβb), 2.52 (dd, 1H, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.7 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.2 Hz, H-3e), 1.80 (s, 3H, $NHCOCH_3$), 1.45 (dd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 11.9Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.2 Hz, H-3a).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, D_2O): δ [ppm] = 171.8 (Phe-$COOCH_3$), 175.3 ($NHCOCH_3$), 173.6 (C-1), 129.0 (Ar-C), 128.5 (Phe-Ar-C), 102.0 (C-2), 73.9 (C-6), 67.6 (C-4), 66.9 (Ar-CH_2), 64.3 (C-7), 63.8 (Phe-Cα), 53.0 (Phe-$COOCH_3$), 52.5 ($COOCH_3$), 52.0 (C-5), 50.0 (C-8), 40.0 (C-3), 35.4 (Phe-Cβ), 21.9 ($NHCOCH_3$).

N-[(Benzyl-5-acetamido-3,5,8-tridesoxy-4,7-dihydroxy-α-D-*galacto*-2-octulopyranosid)-8-yl]-L-phenylalanin SV-8 (8)



$C_{26}H_{32}N_2O_9$
M = 516.54 g/mol
R_f ($BuOH/Ac_2O/H_2O$ = 5/2/2) = 0.35
$[\alpha]^{20}_D$ = -20 ° (c = 0.7 in MeOH)
ESI-MS: m/z = 515 $[M-H]^-$

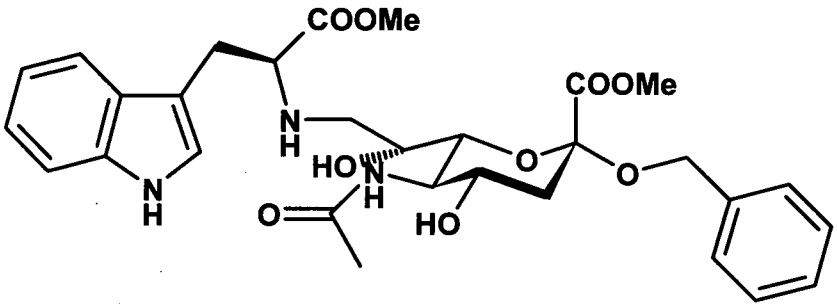
30.3 mg 7 (60 µmol) werden in 5.6 mL 0.1 M NaOH gelöst und bei RT gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt und nach 15 min durch Neutralisation mit Amberlite IR 120 (H^+) abgebrochen. Nachdem der pH-Wert 7 erreicht war, wird der Ionenaustauscher zügig abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen. Das erhaltene Rohprodukt wird an der Lyophylle gefriergetrocknet.

Es wird ein beiger Feststoff in einer Auswaage von 29.9 mg (60 µmol) erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 100 % bezogen auf die eingesetzte Menge 7.

^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.23-7.14 (m, 5H, Ar-H), 7.13-7.01 (m, 5H, Phe-Hδ, Phe-Hδ', Phe-Hε, Phe-Hε', Phe-Hζ), 4.46 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 10.8 Hz, Ar-CH_2a), 4.24 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 10.8 Hz, Ar-CH_2b), 3.80 (ddd, 1H, $^3J_{6\text{-}7}$ = 10.4 Hz, H-7), 3.71 (dd, 1H, Phe-Hα), 3.57 (dd, 1H, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.1 Hz, $^3J_{5\text{-}6}$= 10.3 Hz, H-5), 3.47 (ddd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 11.9 Hz, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.7 Hz, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.1 Hz, H-4), 3.41 (dd, 1H, $^3J_{5\text{-}6}$= 10.3 Hz, $^3J_{6\text{-}7}$ = 10.4 Hz, H-6), 3.10-2.98 (m, 4H, H-8a, H-8b, Phe-Hβ, Phe-Hβ'), 2.52 (dd, 1H, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.7 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.2 Hz, H-3e), 1.80 (s, 3H, $NHCOCH_3$), 1.45 (dd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 11.9 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.2 Hz, H-3a).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, D_2O): δ [ppm] = 171.8 (Phe-COOH), 175.3 ($NHCOCH_3$), 173.6 (C-1), 129.0 (Ar-C), 128.5 (Phe-Ar-C), 102.0 (C-2), 73.9 (C-6), 67.6 (C-4), 66.9 (Ar-CH_2), 64.3 (C-7), 63.8 (Phe-Cα), 52.0 (C-5), 50.0 (C-8), 40.0 (C-3), 35.4 (Phe-Cβ), 21.9 ($NHCOCH_3$).

Methyl-*N*-{[methyl-(benzyl-5-acetamido-3,5,8-tridesoxy-4,7-dihydroxy-α-D-*galacto*-2-octulopyranosid)onat]-8-yl}-L-tryptophanat (9)



$C_{30}H_{37}N_3O_9$
M = 583.63 g/mol
R_f (DCM/MeOH = 4/1) = 0.80
MALDI-TOF-MS:
m/z = 584.4 $[M+H]^+$
m/z = 606.4 $[M+Na]^+$

20.0 mg 6 (50 µmol) werden in 5 mL H_2O gelöst. Dazu werden 12.7 mg L-Tryptophanmethylester (50 µmol) gegeben. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wird auf pH 6 eingestellt und das Reaktionsgemisch 20 min bei 60 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 1.6 mg $NaCNBH_3$ (25 µmol), gelöst in 1 mL H_2O, zur Reaktionslösung hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei RT über Nacht gerührt.

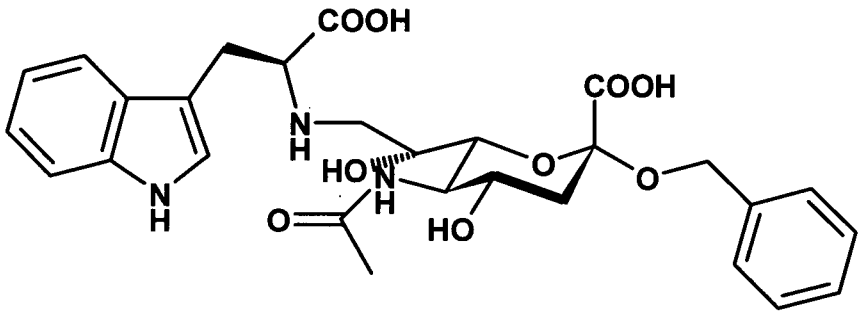
Nachdem dünnschichtchromatographisch keine Edukte mehr nachzuweisen sind, wird das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Laufmittel DCM/MeOH = 15:1) aufgereinigt. Es werden 6.5 mg (10 µmol) eines weißen Feststoffes erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 20 % bezogen auf die eingesetzte Menge 6. Das NMR-Spektrum zeigt geringe Verunreinigungen, so dass auf eine Bestimmung des optischen Drehwertes verzichtet wird. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.36-7.28 (m, 5H, Ar-H), 7.28-7.24 (m, 3H, Indol-H-2, Indol-H-4, Indol-H-7), 7.05-7.15 (m, 2H, Indol-H-5, Indol-H-6), 4.43 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 10.7 Hz, Ar-CH_2a), 4.22 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 10.7 Hz, Ar-CH_2b), 3.99 (dd, 1H, Trp-Hα), 3.95 (s, 3H, $COOCH_3$), 3.92 (ddd, 1H, $^3J_{6\text{-}7}$ = 10.4 Hz, H-7), 3.71 (s, 3H, Phe-$COOCH_3$), 3.70 (dd, 1H, H-5), 3.58 (ddd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 12.6 Hz, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.7 Hz, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.0 Hz, H-4), 3.54 (dd, 1H,

$^3J_{5\text{-}6}$ = 10.2 Hz, $^3J_{6\text{-}7}$ = 10.4 Hz, H-6), 3.50-3.35 (m, 2H, Trp-Hβ, Trp-Hβ'), 3.27-3.14 (m, 2H, H-8a, H-8b), 2.65 (dd, 1H, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.7 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.4 Hz, H-3e), 1.94 (s, 3H, $NHCOCH_3$), 1.58 (dd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 12.6 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.4 Hz, H-3a).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, D_2O): δ [ppm] = 174.7 ($Trp\text{-}COOCH_3$), 174.7 ($NHCOCH_3$), 172.8 (C-1), 128.2 (Trp-Ar-C-3), 128.0 (Ar-C), 124.1 (Trp-Ar-C-4), 121.6 (Trp-Ar-C-5), 119.0 (Trp-Ar-C-6), 111.4 (Trp-Ar-C-7), 101.1 (C-2), 73.7 (C-6), 67.2 (C-4), 66.3 ($Ar\text{-}CH_2$), 63.9 (C-7), 62.8 (Trp-Cα), 53.7 ($Trp\text{-}COOCH_3$), 52.2 ($COOCH_3$), 51.6 (C-5), 49.6 (C-8), 39.7 (C-3), 25.0 (Trp-Cβ), 21.6 ($NHCOCH_3$).

_N_-[(Benzyl-5-acetamido-3,5,8-tridesoxy-4,7-dihydroxy-α-D-*galacto*-2-octulopyranosid)-8-yl]-L-tryptophan SV-10 (10)



$C_{28}H_{33}N_3O_9$
M = 555.59 g/mol
R_f (EE/MeOH/H_2O = 7/2/1) = 0.15
$[\alpha]^{20}_D$ = +39 ° (c = 0.1 in MeOH)
MALDI-TOF-MS:
m/z = 556.6 $[M+H]^+$
m/z = 578.6 $[M+Na]^+$

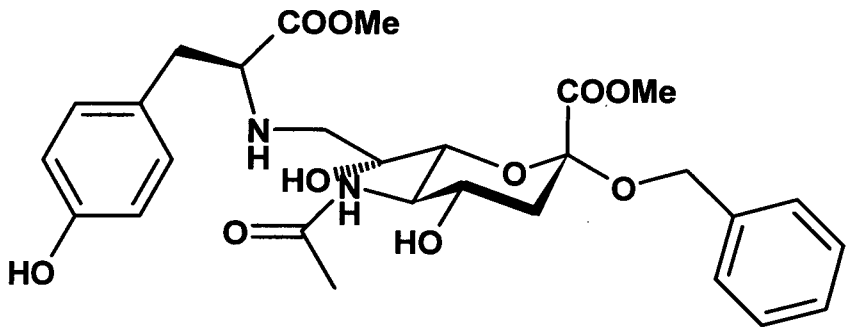
28.0 mg des Tryptophanderivates 9 (50 µmol) werden in 3 mL 0.1 M NaOH gelöst und bei RT gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt und nach 15 min durch Neutralisation mit Amberlite IR 120 (H^+) abgebrochen. Nachdem der pH-Wert 6-7 erreicht ist, wird der Ionenaustauscher zügig abfiltriert und mehrmals mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Die erhaltene Lösung wird gefriergetrocknet. Die erhaltenen 6.5 mg Rohprodukt werden mittels einer Biogel-P2-Säule aufgereinigt. Es wird ein weißer Feststoff in einer Auswaage von 3.3 mg (6 µmol) erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 12 % bezogen auf die eingesetzte Menge 9.

^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.36-7.28 (m, 5H, Ar-H), 7.28-7.24 (m, 3H, Indol-H-2, Indol-H-4, Indol-H-7), 7.05-7.15 (m, 2H, Indol-H-5, Indol-H-6), 4.43 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$=

10.7 Hz, Ar-CH_2a), 4.22 (d, 1 H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 10.7 Hz, Ar-CH_2b), 3.99 (dd, 1H, Trp-Hα), 3.92 (ddd, 1H, $^3J_{6\text{-}7}$ = 10.4 Hz, H-7), 3.70 (dd, 1H, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.0 Hz, $^3J_{5\text{-}6}$ = 10.2 Hz, H-5), 3.58 (ddd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 12.6 Hz, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.7 Hz, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.0 Hz, H-4), 3.54 (dd, 1H, $^3J_{5\text{-}6}$ = 10.2 Hz, $^3J_{6\text{-}7}$ = 10.4 Hz, H-6), 3.50-3.35 (m, 2H, Trp-Hβ, Try-Hβ'), 3.27-3.14 (m, 2H, H-8a, H-8b), 2.65 (dd, 1H, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.7 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.4 Hz, H-3e), 1.94 (s, 3H, $NHCOCH_3$), 1.58 (dd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 12.6 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.4 Hz, H-3a).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, D_2O): δ [ppm] = 174.6 (Trp-COOH), 174.7 ($NHCOCH_3$), 172.8 (C-1), 128.2 (Trp-Ar-C-3), 128.0 (Ar-C), 124.1 (Trp-Ar-C-4), 121.6 (Trp-Ar-C-5), 119.0 (Trp-Ar-C-6), 111.4 (Trp-Ar-C-7), 101.1 (C-2), 73.7 (C-6), 67.2 (C-4), 66.3 (Ar-CH_2), 63.9 (C-7), 62.8 (Trp-Cα), 51.6 (C-5), 49.6 (C-8), 39.7 (C-3), 25.0 (Trp-Cβ), 21.6 ($NHCOCH_3$).

Methyl-*N*-{[methyl-(benzyl-5-acetamido-3,5,8-tridesoxy-4,7-dihydroxy-α-D-*galacto*-2-octulopyranosid)onat]-8-yl}-L-tyrosinat (13)



$C_{28}H_{36}N_2O_{10}$
M = 560.61 g/mol
R_f (DCM/MeOH = 4/1) = 0.47
MALDI-TOF-MS:
m/z = 561.6 $[M+H]^+$
m/z = 583.6 $[M+Na]^+$

40.0 mg 6 (100 µmol) werden in 6 mL H_2O gelöst. Dazu werden 19.5 mg L-Tyrosinmethylester (100 µmol) gegeben. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wird geprüft und auf pH 6 korrigiert. Das Reaktionsgemisch wird für 20 min bei 60 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 3.1 mg $NaCNBH_3$ (50 µmol), in 1 mL H_2O gelöst, zur Reaktionslösung hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei RT über Nacht gerührt.

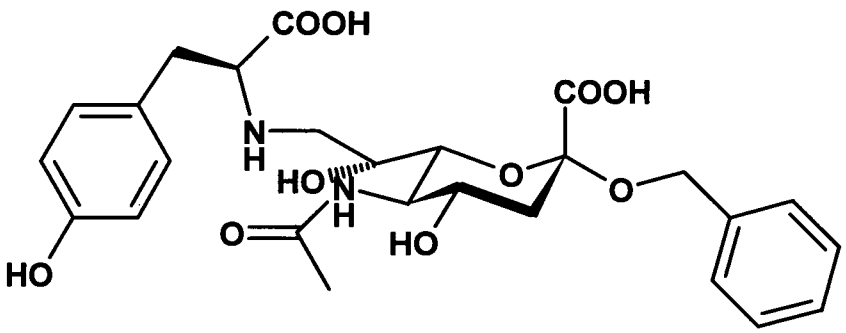
Nachdem die vollständige Umsetzung der Edukte dünnschichtchromatographisch nachgewiesen worden ist, wird das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Laufmittel DCM/MeOH = 8:2) aufgereinigt. Es werden 8.9 mg (20 µmol) eines weißen Feststoffes erhalten. Das entspricht einer Ausbeute

von 20 % bezogen auf die eingesetzte Menge 6. Das NMR-Spektrum zeigt eine geringe Verunreinigung, so dass auf eine Bestimmung der optischen Drehung verzichtet wird. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.40-7.31 (m, 5H, Ar-H), 7.12 (d, 2H, Tyr-Hε, Tyr-Hε'), 6.73 (d, 2H, Tyr-Hδ, Tyr-Hδ'), 4.60 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 11.2 Hz, Ar-CH_2a), 4.39 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 11.2 Hz, Ar-CH_2b), 3.97 (ddd, 1H, $^3J_{6\text{-}7}$ = 10.7 Hz, H-7), 3.93 (dd, 1H, Tyr-Hα), 3.74 (dd, 1H, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.0 Hz, $^3J_{5\text{-}6}$ = 10.2 Hz, H-5), 3.65 (s, 3H, $COOCH_3$), 3.64 (ddd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 11.9 Hz, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.6 Hz, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.0 Hz, H-4), 3.58 (dd, 1H, $^3J_{5\text{-}6}$ = 10.2 Hz, $^3J_{6\text{-}7}$ = 10.7 Hz, H-6), 3.25 (s, 3H, Tyr-$COOCH_3$), 3.22 (dd, 2H, H-8a, H-8b), 3.15 (m, 2H, Tyr-Hβ, Tyr-Hβ'), 2.68 (dd, 1H, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.6 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.5 Hz, H-3e), 1.98 (s, 3H, $NHCOCH_3$), 1.65 (dd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 11.9 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.5 Hz, H-3a).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, D_2O): δ [ppm] = 175.1 ($NHCOCH_3$), 172.3 (C-1), 171.8 (Tyr-COOH), 130.2 (Tyr-Cε, Tyr-Cε'), 128.1 (Ar-C), 115.2 (Tyr-Cδ, Tyr-C δ'), 100.6 (C-2), 73.7 (C-6), 67.2 (C-4), 66.9 (Ar-CH_2), 64.0 (C-7), 63.4 (Tyr-Cα), 52.8 (Tyr-$COOCH_3$), 52.2 ($COOCH_3$), 51.6 (C-5), 49.5 (C-8), 39.8 (C-3), 34.2 (Tyr-Cβ), 21.7 ($NHCOCH_3$).

_N_-[(Benzyl-5-acetamido-3,5,8-tridesoxy-4,7-dihydroxy-α-D-*galacto*-2-octulopyranosid)-8-yl]-L-tyrosin SV-14 (14)



$C_{26}H_{32}N_2O_{10}$
M = 532.55 g/mol
R_f (EE/MeOH/H_2O = 7/2/1) = 0.15
$[\alpha]^{20}_D$ = -10 ° (c = 0.15 in MeOH)
MALDI-TOF-MS:
m/z = 533.6 $[M+H]^+$
m/z = 555.6 $[M+Na]^+$

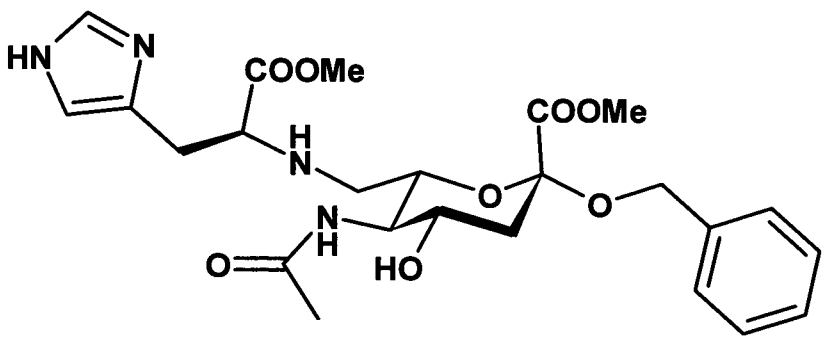
8.9 mg des Tyrosin-Derivates 13 (56 µmol) werden in 3 mL 0.1 M NaOH gelöst und bei RT gerührt. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie untersucht und nach 15 min

durch Neutralisation mit Amberlite IR 120 (H^+) abgebrochen. Nachdem der pH-Wert 6-7 erreicht ist, wird der Ionenaustauscher zügig abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen. Das erhaltene Produkt wird gefriergetrocknet. Nach Aufreinigung mit Hilfe der Biogel-P-2-Säule werden 2.5 mg des Rohproduktes erhalten. Die Aufreinigung erfolgt mittels HPLC (AVV5). Es wird ein weißer Feststoff in einer Auswaage von 0.6 mg (1 µmol) erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 2 % bezogen auf die eingesetzte Menge 13.

^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.40-7.31 (m, 5H, Ar-H), 7.12 (d, 2H, Tyr-Hε, Tyr-Hε'), 6.73 (d, 2H, Tyr-Hδ, Tyr-Hδ'), 4.60 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 11.2 Hz, Ar-CH_2a), 4.39 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 11.2 Hz, Ar-CH_2b), 3.97 (ddd, 1H, $^3J_{6\text{-}7}$ = 9.0 Hz, H-7), 3.93 (dd, 1H, Tyr-Hα), 3.74 (dd, 1H, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.0 Hz, $^3J_{5\text{-}6}$ = 10.2 Hz, H-5), 3.64 (ddd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 11.9 Hz, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.6 Hz, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.0 Hz, H-4), 3.58 (dd, 1H, $^3J_{5\text{-}6}$ = 10.2 Hz, $^3J_{6\text{-}7}$ = 9.0 Hz, H-6), 3.24-3.20 (m, 2H, H-8a, H-8b), 3.14-3.09 (m, 2H, Tyr-Hβ, Tyr-Hβ'), 2.68 (dd, 1H, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.6 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.5 Hz, H-3e), 1.98 (s, 3H, $NHCOCH_3$), 1.65 (dd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 11.9 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.5 Hz, H-3a).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, D_2O): δ [ppm] = 175.1 ($NHCOCH_3$), 172.3 (C-1), 171.8 (Tyr-COOH), 130.2 (Tyr-Cε, Tyr-Cε'), 128.1 (Ar-C), 115.2 (Tyr-Cδ, Tyr-Cδ'), 100.6 (C-2), 73.7 (C-6), 67.2 (C-4), 66.9 (Ar-CH_2), 64.0 (C-7), 63.4 (Tyr-Cα), 51.6 (C-5), 49.5 (C-8), 39.8 (C-3), 34.2 (Tyr-Cβ), 21.7 ($NHCOCH_3$).

Methyl-*N*-{[methyl-(benzyl-5-acetamido-3,5,8-tridesoxy-4,7-dihydroxy-α-L-*arabino*-2-heptulopyranosid)onat)-7-yl]-L-histidinat (15)



$C_{24}H_{32}N_4O_8$

M = 504.54 g/mol

R_f (DCM/MeOH = 4/1) = 0.32

$[\alpha]^{20}_D$ = -9 ° (c = 0.3 in MeOH)

MALDI-TOF-MS:

m/z = 505.5 $[M+H]^+$

m/z = 527.5 $[M+Na]^+$

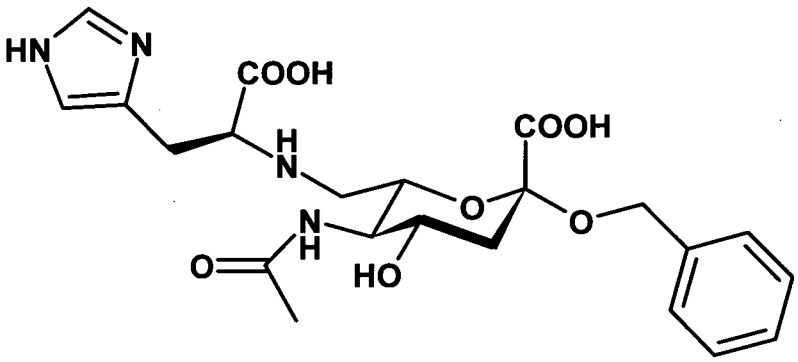
Bei der Periodatspaltung zu Produkt 6 wird als Nebenprodukt auch das zwischen Position 8 und 7 oxidativ gespaltene *N*-Acetylneuraminsäurederivat 6a erhalten. Da eine säulenchromatographische Aufreinigung nicht möglich ist, werden 15.0 mg Rohprodukt 6 und 6a (40 µmol) in 4 mL H_2O gelöst. Dazu werden 9.7 mg L-Histidinmethylester (40 µmol) gegeben. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wird auf pH 6 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wird für 20 min bei 60 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 0.5 mg $NaCNBH_3$ (7 µmol), in 1 mL H_2O gelöst, zur Reaktionslösung hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei RT über Nacht gerührt.

Nach Reaktionsende (DC-Kontrolle) wird das Lösungsmittel im Vakuum destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Laufmittel DCM/MeOH = 4/1) und anschließend nochmals mittels Biogel-P2-Säule aufgereinigt. Es werden 2.6 mg (5 µmol) eines weißen Feststoffes erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 13 % bezogen auf die eingesetzte Menge Rohprodukt 6 und 6a.

^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.56 (s, 1H, Imidazol-H-2), 7.34-7.14 (m, 5H, Ar-H), 6.89 (s, 1H, Imidazol-H-5), 4.49 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 10.4 Hz, Ar-CH_2a), 4.22 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 10.4 Hz, Ar-CH_2b), 3.89-3.81 (m, 2H, His-Hα, H-6), 3.60 ($COOCH_3$), 3.49 (His-$COOCH_3$), 3.49-3.41 (ddd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 12.5 Hz, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.4 Hz, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.3 Hz, H-4), 3.34 (dd, 1H, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.3 Hz, H-5), 3.08-2.93 (m, 4H, H-7a, H-7b, His-Hβ, His-Hβ'), 2.49 (dd, 1H, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.4 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.1 Hz, H-3e), 1.80 (s, 3H, $NHCOCH_3$), 1.47 (dd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 12.5 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.1 Hz, H-3a).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, D_2O): δ [ppm] = 174.9 ($NHCOCH_3$), 173.3 (C-1), 173.2 (His-COOH), 131.8 (Imidazol-C-2), 135.9 (Imidazol-C-5), 128.0 (Ar-C), 101.0 (C-2), 70.0 (C-6), 67.2 (C-4), 66.4 (Ar-CH_2), 61.0 (His-Cα), 53.2 ($COOCH_3$), 53.1 (His-$COOCH_3$), 52.8 (C-5), 46.9 (C-7), 40.0 (C-3), 26.3 (His-Cβ), 21.1 ($NHCOCH_3$).

***N*-[(Benzyl-5-acetamido-3,5,8-tridesoxy-4,7-dihydroxy-α-L-*arabino*-2-heptulopyranosid)-7-yl]-L-histidinat SV-16 (16)**



$C_{22}H_{28}N_4O_8$

M = 476.49 g/mol

R_f (EE/MeOH/H_2O = 7/2/1) = 0.07

$[\alpha]^{20}_D$ = -7 ° (c = 0.3 in MeOH)

MALDI-TOF-MS:

m/z = 477.5 $[M+H]^+$

m/z = 499.7 $[M+Na]^+$

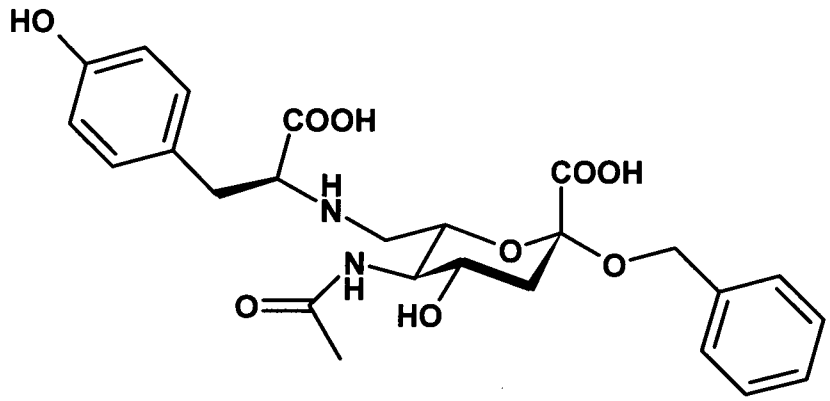
2.6 mg des Histidin-Derivates 15 (5 µmol) werden in 2 mL 0.1 M NaOH gelöst und bei RT gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt und nach 15 min durch Neutralisation mit Amberlite IR 120 (H^+) abgebrochen. Nachdem der pH 6-7 erreicht ist, wird der Ionenaustauscher zügig abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen. Das erhaltene Produkt wird an der Lyophylle gefriergetrocknet.

Es wird ein weißer Feststoff in einer Auswaage von 2.4 mg (0.005 mmol) erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 100 % bezogen auf die eingesetzte Menge 15.

^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.56 (s, 1H, Imidazol-H-2), 7.34-7.14 (m, 5H, Ar-H), 6.89 (s, 1H, Imidazol-H-5), 4.49 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 10.4 Hz, Ar-CH_2a), 4.22 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 10.4 Hz, Ar-CH_2b), 3.89-3.81 (m, 2H, His-Hα, H-6), 3.49-3.41 (ddd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 12.5 Hz, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.4 Hz, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.3 Hz, H-4), 3.34 (dd, 1H, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.3 Hz, H-5), 3.08-2.93 (m, 4H, H-7a, H-7b, His-Hβ, His-Hβ'), 2.49 (dd, 1H, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.4 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.1 Hz, H-3e), 1.80 (s, 3H, $NHCOCH_3$), 1.47 (dd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 12.5 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.1 Hz, H-3a).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, D_2O): δ [ppm] = 174.9 ($NHCOCH_3$), 173.3 (C-1), 173.2 (His-COOH), 135.9 (Imidazol-C-2), 131.8 (Imidazol-C-5), 128.0 (Ar-C), 101.0 (C-2), 70.0 (C-6), 67.2 (C-4), 66.4 (Ar-CH_2), 61.0 (His-Cα), 52.8 (C-5), 46.9 (C-7), 40.0 (C-3), 26.3 (His-Cβ), 21.1 ($NHCOCH_3$).

***N*-[(Benzyl-5-acetamido-3,5,8-tridesoxy-4,7-dihydroxy-α-L-*arabino*-2-heptulopyranosid)-7-yl]-L-tyrosin SV-18 (18)**



$C_{25}H_{30}N_2O_9$

M = 502.53 g/mol

Rf (EE/MeOH/H2O = 7/2/1) = 0.24

$[\alpha]^{20}_D$ = -70 ° (c = 0.03 in MeOH)

MALDI-TOF-MS:

m/z = 503.5 $[M+H]^+$

m/z = 525.5 $[M+Na]^+$

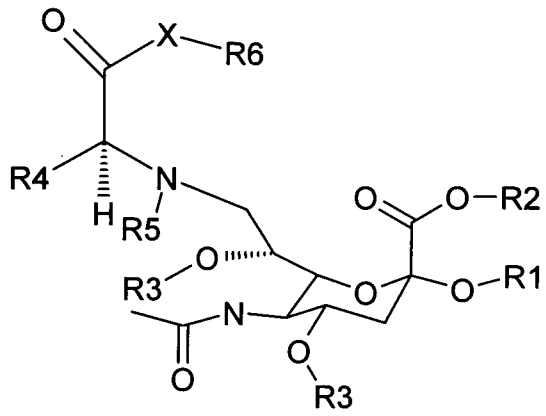
Bei der Aufreinigung der Zielverbindung 14 mittels HPLC (AVV5) konnten 0.7 mg (1µmol) der Verbindung 18 als weißer Feststoff isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 1 % bezogen auf die eingesetzte Menge 6.

^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.41-7.27 (m, 5H, Ar-H), 7.17 (d, 2H, Tyr-Hε, Tyr-Hε'), 6.74 (d, 2H, Tyr-Hδ, Tyr-Hδ'), 4.40 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 11.2 Hz, Ar-CH_2a), 4.27 (d, 1H, $^2J_{Ar\text{-}CH2}$= 11.2 Hz, Ar-CH_2b), 4.16 (dd, 1H, $^3J_{Tyr\text{-}α\text{-}βa}$= 6.0 Hz, $^3J_{Tyr\text{-}α\text{-}βb}$= 6.7 Hz, Tyr-Hα), 4.02 (ddd, 1H, $^3J_{5\text{-}6}$ = 10.2 Hz, $^3J_{6\text{-}7a}$ = 10.0 Hz, H-6), 3.57 (ddd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 11.9 Hz, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.6 Hz, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.0 Hz, H-4), 3.40 (dd, 1H, $^3J_{4\text{-}5}$ = 10.0 Hz, $^3J_{5\text{-}6}$ = 10.2 Hz, H-5), 3.25 (dd, 1H, $^3J_{Tyr\text{-}α\text{-}β}$ = 6.0 Hz, $^2J_{Tyr\text{-}β\text{-}β'}$ = 8.5 Hz, Tyr-Hβ), 3.14 (dd, 1H, $^3J_{6\text{-}7a}$ = 10.0 Hz, $^2J_{7a\text{-}7b}$= 12.7 Hz, H-7a), 3.10 (dd, 1H, $^3J_{6\text{-}7b}$= 11.0 Hz, $^2J_{7a\text{-}7b}$= 12.7 Hz, H-7b), 3.01 (dd, 1H, $^3J_{Tyr\text{-}α\text{-}β'}$= 6.7 Hz, $^2J_{Tyr\text{-}β\text{-}β'}$= 8.5 Hz, Tyr-Hβ'), 2.62 (dd, 1H, $^3J_{3e\text{-}4}$ = 4.6 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.5 Hz, H-3e), 1.95 (s, 3H, $NHCOCH_3$), 1.56 (dd, 1H, $^3J_{3a\text{-}4}$ = 11.9 Hz, $^2J_{3a\text{-}3e}$ = 12.5 Hz, H-3a).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, D_2O): δ [ppm] = 130.3 (Tyr-Ar-C-3, Tyr-Ar-C-5), 128.3 (Ar-C), 115.4 (Tyr-Ar-C-2, Tyr-Ar-C-6), 69.2 (C-6), 66.5 (Ar-CH_2), 65.9 (C-4), 62.5 (Tyr-C-1), 53.4 (C-5), 47.4 (C-7), 39.2 (C-3), 34.1 (Tyr-CH_2), 21.5 ($NHCOCH_3$).

ANSPRÜCHE

1. Verbindung mit der allgemeinen Struktur



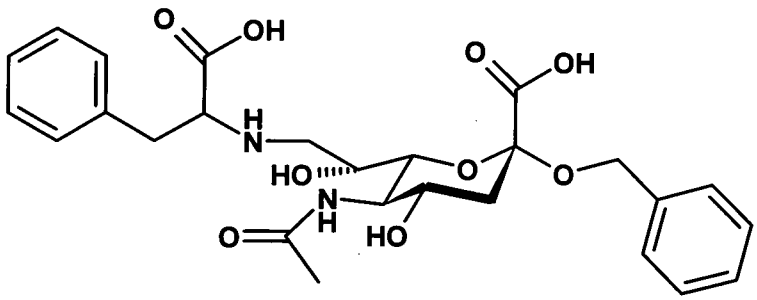
wobei

R1	ein hydrophober Rest ist;
R2	Wasserstoff (H), ein Kation oder ein Alkylester ist;
R3	Wasserstoff (H) oder eine Gruppe ist, die unter physiologischen Bedingungen in die Hydroxygruppe überführbar ist;
R4	ein hydrophober Rest ist;
R5	Wasserstoff (H) oder ein Alkylrest, ein Aminosäurerest oder ein Peptidylrest ist;
R6	Wasserstoff (H), ein Kation, ein hydrolysierbarer Rest, ein Aminosäurerest oder ein Peptidrest ist; und
X	ein Sauerstoffatom (O) oder eine NH-Gruppe ist.

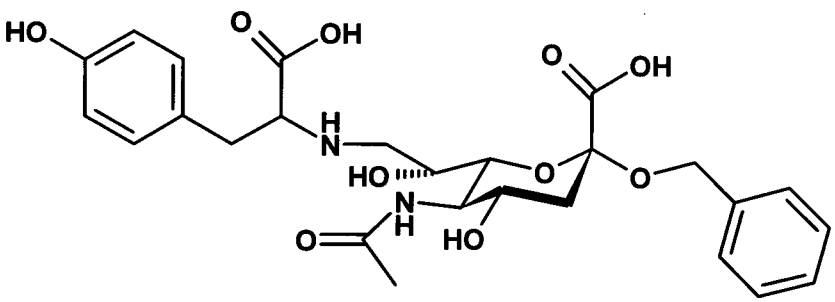
2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass

R1	eine Alkylgruppe oder ein aromatischer Rest ist; und/oder
R2	ein hydrolisierbarer Alkylester ist; und/oder
R3	ein Acetylester ist; und/oder
R4	Wasserstoff, ein aromatischer oder aliphatischer Rest ist.

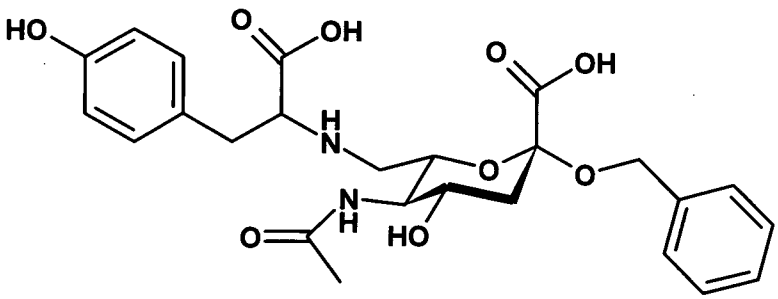
3. Verbindung nach Anspruch 1 mit einer der folgenden Strukturformeln SV-8, SV-14, SV-18, SV-10 oder SV-16:



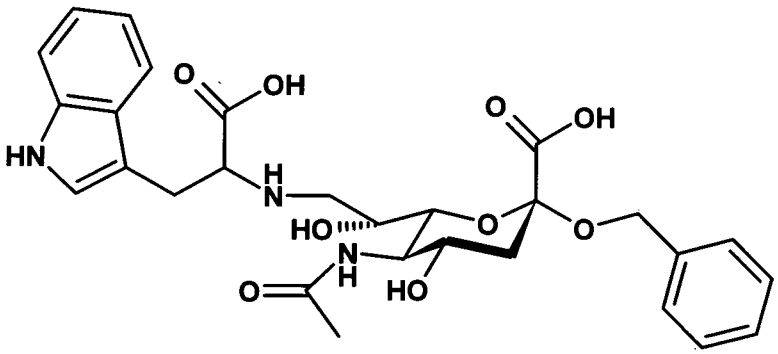
SV-8



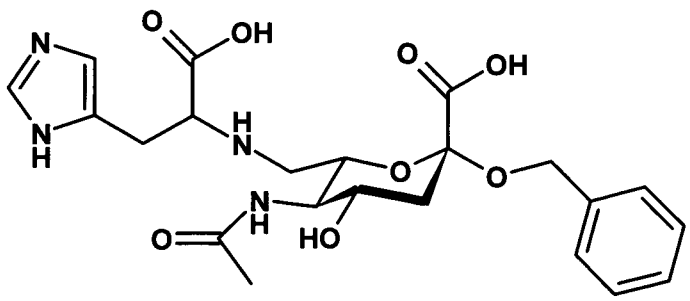
SV-14



SV-18



SV-10



SV-16

4. Verwendung einer der Verbindungen nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention und/oder Behandlung degenerativer neuronaler Erkrankungen.

5. Verwendung einer der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Verletzungen des zentralen Nervensystems.

6. Verwendung einer der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Querschnittslähmung.

7. Verfahren zur Herstellung einer der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch die Schritte:
   - Schützen der Carboylgruppen von Neuraminsäurederivaten als Alkylester;
   - Schützen der Hydroxylgruppen als Acetylgruppen;
   - Chlorieren der 2-Position unter Entstehen eines β-Sialylchlorids;
   - Anfügen eines aromatischen Alkohols durch Umsatz mit Benzylalkohol und Silbercarbonat;
   - Abspalten der Acetylschutzgruppen,
   - Spalten der Bindung zwischen der 8-Position und der 9-Position unter Entstehen einer Aldehydgruppe;
   - Anknüpfen einer Aminosäure an die Aldehydgruppe durch reduktive Aminierung; und
   - Umsetzen der Methylester zu einer Carbonsäure.

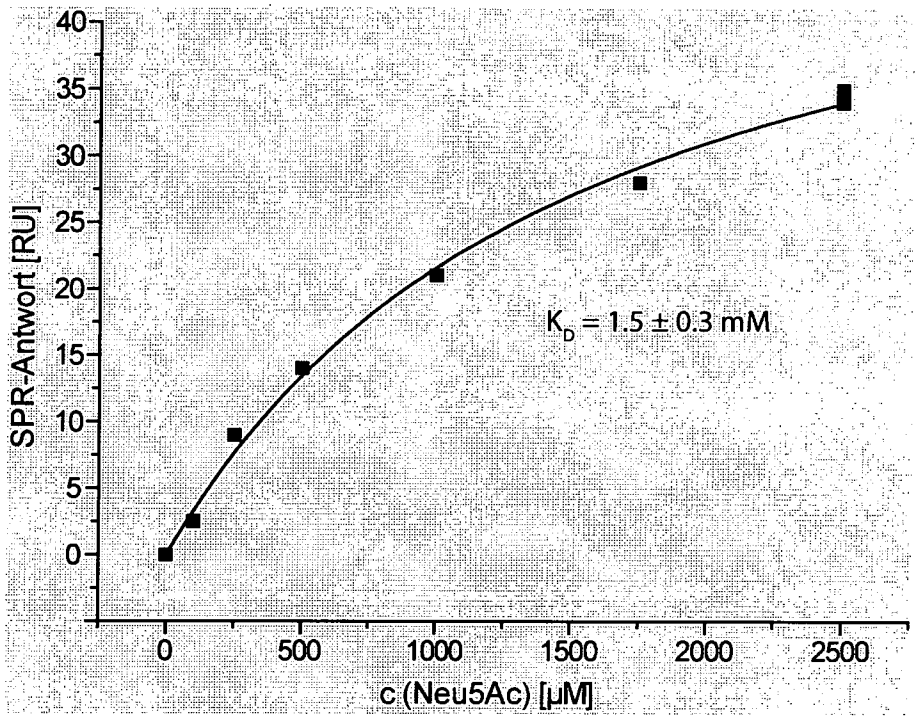

SPR-Antwort [RU]
c (Neu5Ac) [µM]
$K_D = 1.5 \pm 0.3$ mM
0
5
10
15
20
25
30
35
40
0
500
1000
1500
2000
2500

FIG. 1

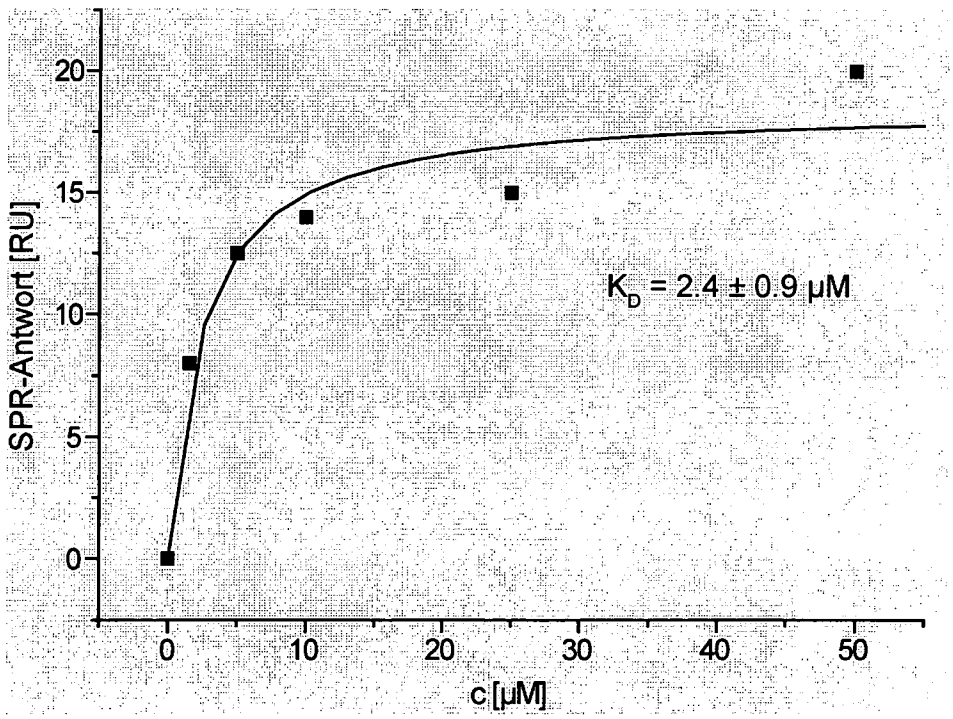

SPR-Antwort [RU]
c [µM]
$K_D = 2.4 \pm 0.9$ µM
0
5
10
15
20
0
10
20
30
40
50

FIG. 2

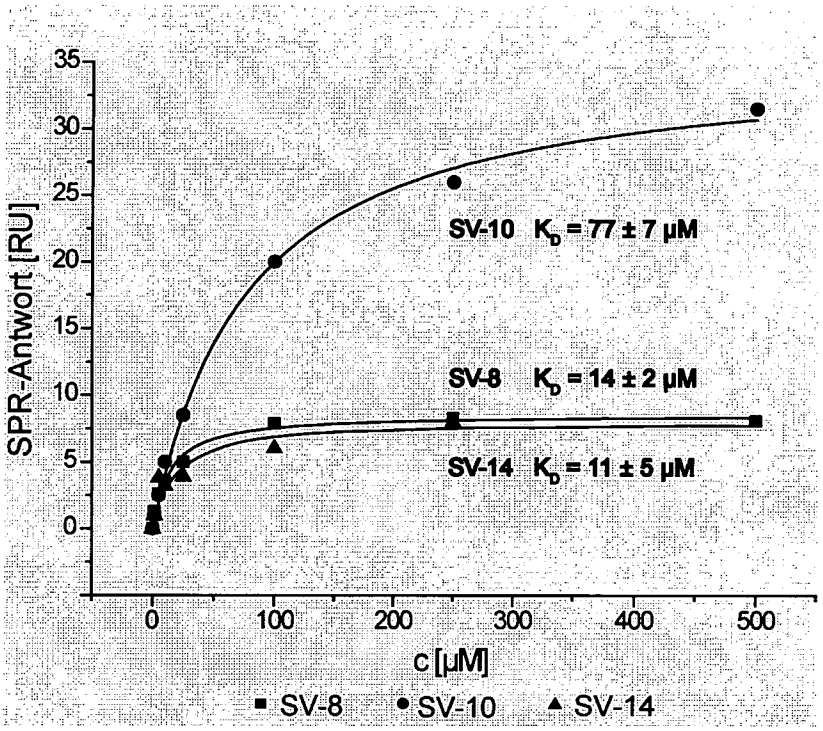

SPR-Antwort [RU]
35
30
25
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
500
c [µM]
SV-10 K_D = 77 ± 7 µM
SV-8 K_D = 14 ± 2 µM
SV-14 K_D = 11 ± 5 µM
SV-8
SV-10
SV-14

FIG. 3

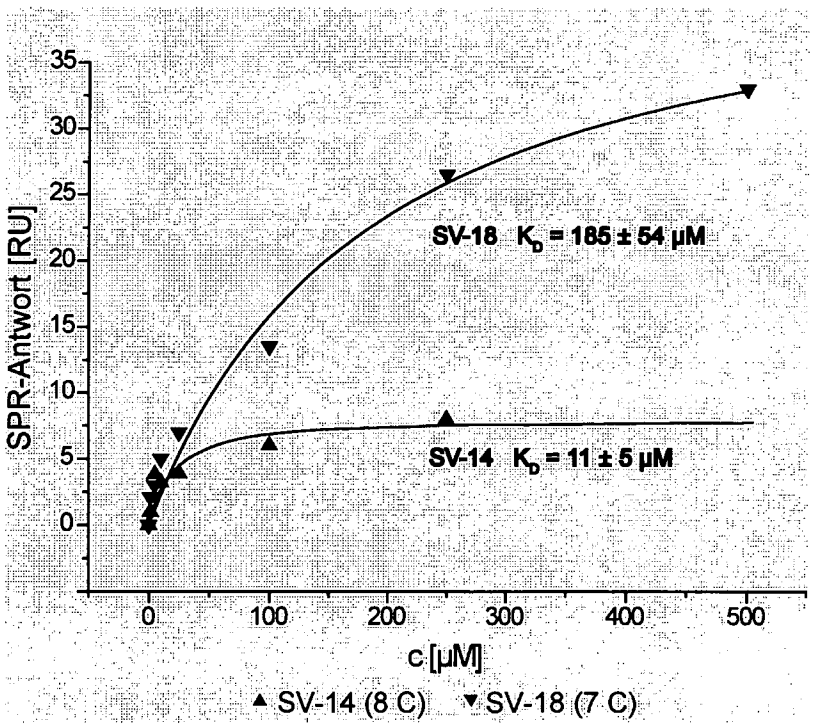

SPR-Antwort [RU]
35
30
25
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
500
c [µM]
SV-18 K_D = 185 ± 54 µM
SV-14 K_D = 11 ± 5 µM
SV-14 (8 C)
SV-18 (7 C)

FIG. 4

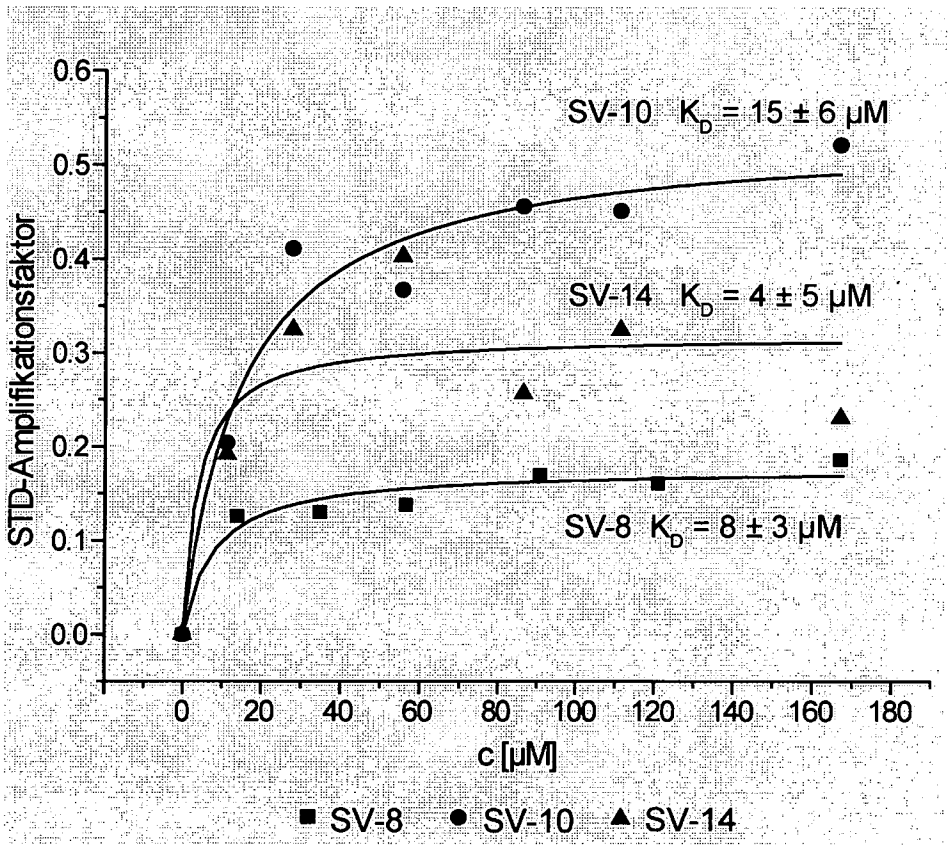

STD-Amplifikationsfaktor
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
c [µM]
SV-10 K_D = 15 ± 6 µM
SV-14 K_D = 4 ± 5 µM
SV-8 K_D = 8 ± 3 µM
SV-8
SV-10
SV-14

FIG. 5

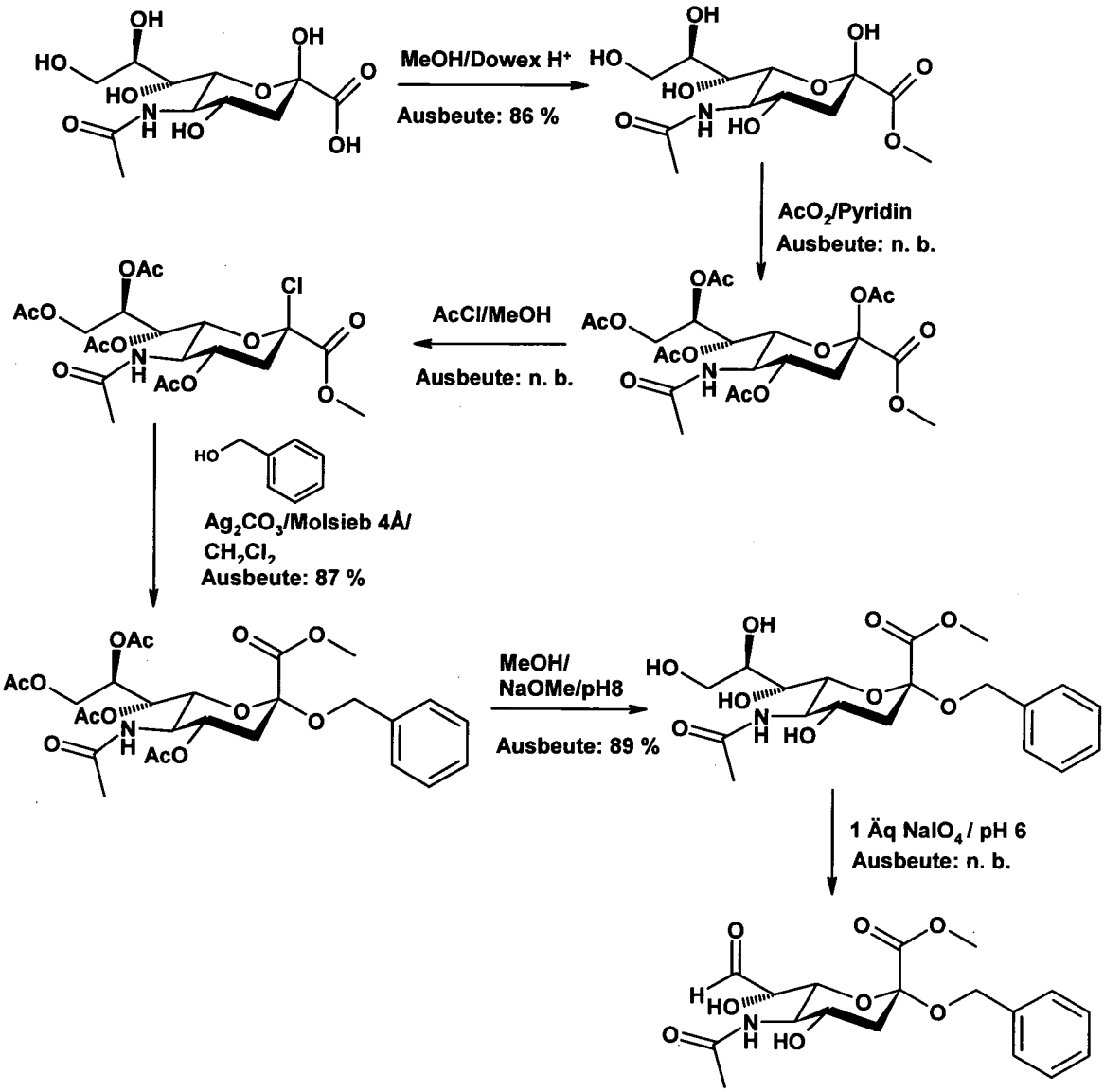

MeOH/Dowex H+
Ausbeute: 86 %
Ac2O/Pyridin
Ausbeute: n. b.
AcCl/MeOH
Ausbeute: n. b.
Ag2CO3/Molsieb 4Å/
CH2Cl2
Ausbeute: 87 %
MeOH/
NaOMe/pH8
Ausbeute: 89 %
1 Äq NaIO4 / pH 6
Ausbeute: n. b.

FIG. 6

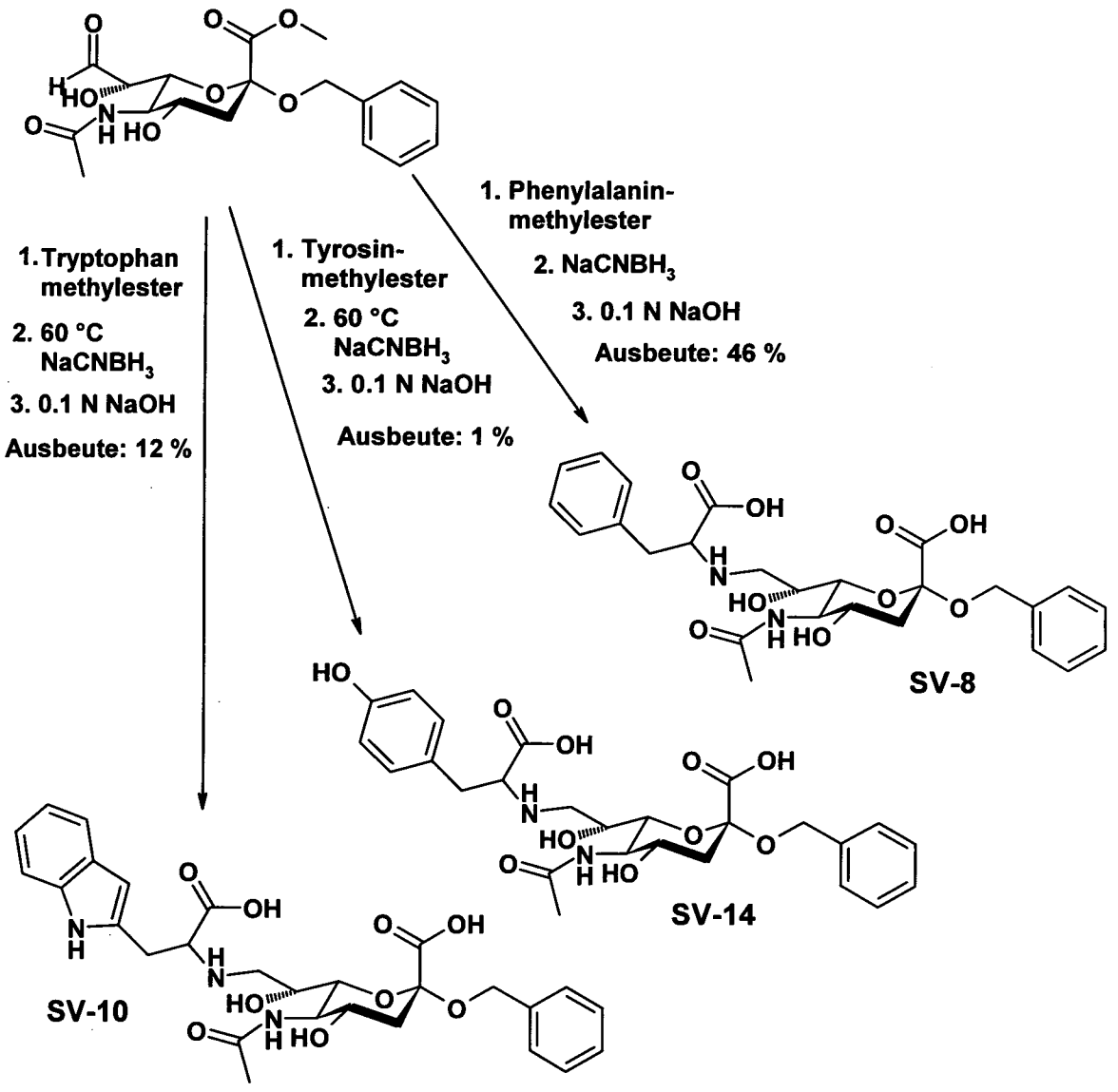

1. Phenylalanin-methylester
2. NaCNBH3
3. 0.1 N NaOH
Ausbeute: 46 %
1. Tryptophan methylester
2. 60 °C NaCNBH3
3. 0.1 N NaOH
Ausbeute: 12 %
1. Tyrosin-methylester
2. 60 °C NaCNBH3
3. 0.1 N NaOH
Ausbeute: 1 %
SV-8
SV-14
SV-10

FIG. 7

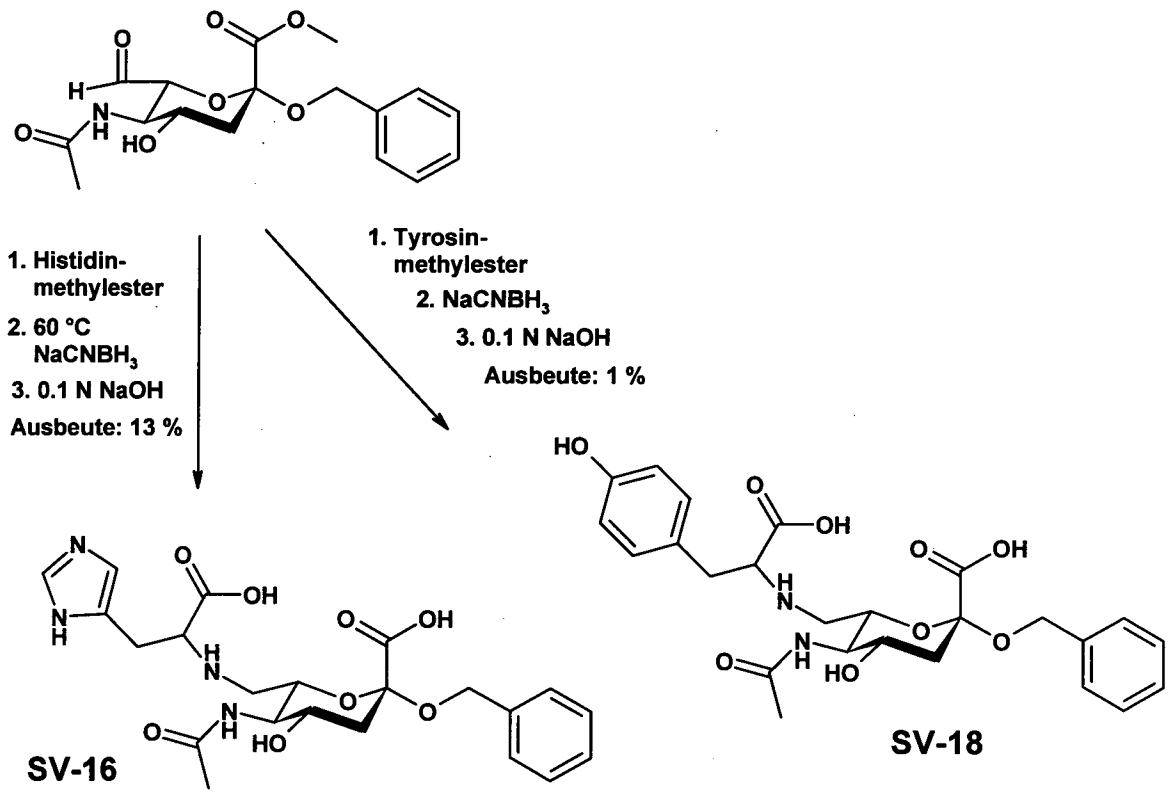

1. Histidin-methylester
2. 60 °C NaCNBH3
3. 0.1 N NaOH
Ausbeute: 13 %
1. Tyrosin-methylester
2. NaCNBH3
3. 0.1 N NaOH
Ausbeute: 1 %
SV-16
SV-18

FIG. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2008/001571

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07H5/06 C07H15/12 A61K31/7008 A61P25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KELM S ET AL: "FUNCTIONAL GROUPS OF SIALIC ACIDS INVOLVED IN BINDING TO SIGLECS (SIALOADHESINS) DEDUCED FROM INTERACTIONS WITH SYNTHETIC ANALOGUES" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN; DE, vol. 255, no. 3, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 663-672, XP000913907 ISSN: 0014-2956 cited in the application the whole document	1-7

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 Februar 2009	03/03/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Nikolai, Joachim

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2008/001571

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHELKE ET AL: "Synthesis of sialic acid derivatives as ligands for the myelin-associated glycoprotein (MAG)" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 15, no. 14, 2 June 2007 (2007-06-02), pages 4951-4965, XP022103883 ISSN: 0968-0896 cited in the application the whole document	1-7
A	WO 03/000709 A (KELM SORGE [DE]; BROSSMER REINHARD [DE]) 3 January 2003 (2003-01-03) the whole document	1-7
P,X	SVENJA SCHEID: "Konjugate von Aminosäuren mit Derivaten der Neuraminsäure als Inhibitoren des Myelin-assoziierten Glycoproteins - Synthese und Charakterisierung der Bindung" November 2007 (2007-11), VERLAG GÖRICH & WEIERSHÄUSER , MARBURG , XP002515918 Seiten 42,47,56,74,75	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/DE2008/001571

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03000709 A	03-01-2003	CA 2451051 A1	03-01-2003
		CN 1656113 A	17-08-2005
		EP 1397374 A2	17-03-2004
		JP 2004534085 T	11-11-2004
		US 2004176309 A1	09-09-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2008/001571

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C07H5/06 C07H15/12 A61K31/7008 A61P25/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C07H

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	KELM S ET AL: "FUNCTIONAL GROUPS OF SIALIC ACIDS INVOLVED IN BINDING TO SIGLECS (SIALOADHESINS) DEDUCED FROM INTERACTIONS WITH SYNTHETIC ANALOGUES" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN; DE, Bd. 255, Nr. 3, 1. Januar 1998 (1998-01-01), Seiten 663-672, XP000913907 ISSN: 0014-2956 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----- -/--	1-7

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
19. Februar 2009	03/03/2009

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Nikolai, Joachim

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2008/001571

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SHELKE ET AL: "Synthesis of sialic acid derivatives as ligands for the myelin-associated glycoprotein (MAG)" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, Bd. 15, Nr. 14, 2. Juni 2007 (2007-06-02), Seiten 4951-4965, XP022103883 ISSN: 0968-0896 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-7
A	WO 03/000709 A (KELM SORGE [DE]; BROSSMER REINHARD [DE]) 3. Januar 2003 (2003-01-03) das ganze Dokument	1-7
P,X	SVENJA SCHEID: "Konjugate von Aminosäuren mit Derivaten der Neuraminsäure als Inhibitoren des Myelin-assoziierten Glycoproteins - Synthese und Charakterisierung der Bindung" November 2007 (2007-11), VERLAG GÖRICH & WEIERSHÄUSER , MARBURG , XP002515918 Seiten 42,47,56,74,75	1-7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2008/001571

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03000709 A	03-01-2003	CA 2451051 A1	03-01-2003
		CN 1656113 A	17-08-2005
		EP 1397374 A2	17-03-2004
		JP 2004534085 T	11-11-2004
		US 2004176309 A1	09-09-2004