

Synthese und Eigenschaften von 2-Deoxy- 2,3-dehydroneuraminsäure sowie neuer N-Acylderivate

Über 2-Deoxy-2,3-dehydro-sialinsäure, 3. Mitt.

Von

P. Meindl und H. Tuppy

Aus dem chemischen Labor der Arzneimittelforschung Ges. m. b. H.* und
dem Institut für Biochemie der Universität Wien, Österreich

(Eingegangen am 26. Juli 1972)

*2-Deoxy-2,3-dehydrosialic acids. III.: Synthesis and properties
of 2-deoxy-2,3-dehydroneuraminic acid and of new N-acyl deriva-
tives*

2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminic acid was obtained in good yield by hydrogenolytic cleavage of 2-deoxy-2,3-dehydro-N-benzyloxycarbonylneuraminic acid. Elemental analysis, UV-, IR- and NMR-spectra of the acid are in full agreement with the proposed structure. The benzhydryl ester of 2-deoxy-2,3-dehydroneuraminic acid was formed by reaction of the acid with diphenyldiazomethane. Both the acid and its ester allowed the synthesis of a series of N-acyl-derivatives which otherwise would be difficult to obtain.

Wurde 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-benzyloxycarbonylneuraminsäure mit H₂ in Gegenwart von Pd/BaSO₄ behandelt, entstand in guter Ausbeute 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure. Elementaranalyse, UV-, IR- und NMR-Spektren der Säure stehen mit der vorgeschlagenen Struktur im Einklang. Mit Diphenyldiazomethan gab 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure den Benzhydrylester. Sowohl die Säure als auch ihr Ester dienten zur Darstellung einer Reihe sonst nur schwer zugänglicher N-Acyl-2-deoxy-2,3-dehydroneuraminsäuren.

Unter den bisher von uns beschriebenen 2-Deoxy-2,3-dehydro-sialinsäuren befanden sich kompetitive Inhibitoren für *Vibrio cholerae*- und Influenzavirus-Neuraminidasen¹⁻⁴. Als besonders wirksam erwies sich 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure. Hingegen waren Derivate mit großen N-Acylresten, wie beispielsweise mit dem Benzoylrest, unwirksam³. Die N-Acyl-derivate der 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure hatten sich aus den entsprechenden N-Acylneuraminsäuren, die

* Laskegasse 5—11, A-1121 Wien.

nach *Kuhn* und *Baschang*⁵ hergestellt worden waren, über deren Acetochlorverbindungen erhalten lassen. Dieser Syntheseweg ist mühsam und eignet sich nicht für die Gewinnung von Verbindungen mit labilen N-Acylresten. In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese der am Stickstoff nicht acylierten 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure (1) und deren Verwendung als vielseitiges Ausgangsmaterial für die Herstellung von N-Acylderivaten beschrieben.

2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure (1) läßt sich aus ihrem N-Benzoyloxycarbonylderivat¹ durch hydrogenolytische Abspaltung des Benzoyloxycarbonylrestes mit Pd/BaSO₄ als Katalysator herstellen. Für die Gewinnung der 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure in hoher Ausbeute (73%) ist ausschlaggebend, daß bei etwa 20°, unter Ausschluß von Feuchtigkeit, gearbeitet und die Hydrogenolyse nicht bis zum (chromatographischen) Verschwinden des Ausgangsmaterials ausgeführt wird. Wenn diese Bedingungen nicht eingehalten wurden, entstanden neben der gewünschten 2,3-ungesättigten wechselnde Mengen der gesättigten Säure, die sich dann weder durch wiederholtes Kristallisieren noch durch chromatographische Verfahren abtrennen ließ.

Es empfahl sich, 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure aus Wasser und Methanol bis zur Konstanz ihrer Extinktion bei 231 nm umzukristallisieren. Präparate mit einem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\text{mol}} = 4500$ waren analysenrein; Schmelzpunkt oder spezifische Drehung waren als Maß für die Reinheit der Aminosäure nicht geeignet. Die Struktur der 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure wurde durch das UV-Spektrum (Maximum 231 nm für die in Konjugation stehende Carboxylatgruppe), IR-Spektrum (C=C bei 1650 cm⁻¹, COO⁻ bei 1580—1600 cm⁻¹) und NMR-Spektrum (ein olefinisches H-Atom bei 5,8 ppm) bestätigt. In der Farbreaktion mit Resorcin nach *Svennerholm*⁶ gab die Aminosäure, ähnlich wie N-Acetylneuraminsäure, eine stahlblaue Färbung, deren Absorptionsmaximum bei 585 nm ($\epsilon_{\text{mol}} = 8300$) lag. Während die am Stickstoff nicht acylierte Neuraminsäure unbeständig ist und bei Versuchen zu ihrer Synthese das Cyclisierungsprodukt, 4-Hydroxy-5-[1,2,3,4-tetrahydroxybutyl]- Δ^1 -pyrrolin-2-carbonsäure, entstand⁷, ist eine solche Labilität bei der 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure nicht gegeben, da ihr eine für den Ringschluß erforderliche Ketogruppe am Kohlenstoffatom 2 fehlt.

2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure erwies sich als brauchbares Zwischenprodukt zur Darstellung einer Reihe sonst nur schwer zugänglicher 2-Deoxy-2,3-dehydrosialinsäuren.

Wurde 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure (1) in wäßriger Lösung bei pH 5,0—5,5 mit überschüssigem Kaliumcyanat behandelt, erhielt man in guter Ausbeute 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-carbamoylneuraminsäure (2), die in Form ihres Methylesters (2 a) charakterisiert wurde.

Kocht man den Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure, aus **1** mit Hilfe von Diazomethan erhältlich, mit Ameisensäuremethylester mehrere Stunden unter Rückfluß, fällt in 20% Ausbeute der Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-formylneuraminsäure (**3 a**) an. Der Formylrest ließ sich sowohl durch Säuren als auch durch Alkali leicht abspalten.

Mehrere N-Acylderivate von **1** wurden nach der Methode von *Staab*^{8, 9} mit Hilfe von Säureimidazoliden dargestellt. Solche Acylierungsreaktionen werden gewöhnlich in Tetrahydrofuran (*THF*), Benzol oder einem Gemisch der beiden Lösungsmittel ausgeführt. Eine direkte Umsetzung der 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure mit Säureimidazoliden war jedoch nicht möglich, da die Säure sowohl in *THF* als auch Benzol nahezu unlöslich ist und überdies mit einer Nebenreaktion, der Bildung eines gemischten Anhydrides durch Acylierung der Carboxylgruppe der 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure bzw. ihres N-Acylderivates, gerechnet werden muß. Geht man jedoch von einem lipophilen Ester der 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure aus, so fallen diese Schwierigkeiten weg; der mit Diphenyldiazomethan aus **1** gewonnene Benzhydrylester (**1 a**) war für die Versuche bestens geeignet.

Wenn man den Benzhydrylester der 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure (**1 a**) mit den Imidazoliden der Fluor-, Difluor- und Trifluoressigsäure umsetzte, wurden außer der Aminogruppe auch Hydroxylgruppen acyliert (chromatographischer Befund). Um zu der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-fluoracetyl- (**4**), 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-difluoracetyl- (**5**) und 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoracetylneuraminsäure (**6**) zu gelangen, mußte man nach beendeter Reaktion nicht nur den Benzhydrylrest von der Carboxylgruppe, sondern auch die O-Acylreste mit verdünntem Alkali entfernen. Besondere Vorsicht war bei der alkalischen Behandlung des Trifluoracetylderivates geboten, da über etwa pH 12 auch der an Stickstoff gebundene Trifluoracetylrest abgespalten wurde. Die Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-fluoracetyl- (**4 a**), 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-difluoracetyl- (**5 a**) und 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoracetylneuraminsäure (**6 a**) wurden aus den Säuren (**4—6**) mit Diazomethan gewonnen.

Auch die Darstellung der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-(β -aminopropionyl)-neuraminsäure (**8**) erfolgte nach der Imidazolidmethode; dabei wurde das Imidazolid des N-Benzoyloxycarbonyl- β -alanins verwendet. Das Benzoyloxycarbonylderivat der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-(β -aminopropionyl)neuraminsäure (**7**) wurde sodann durch Hydrogenolyse in **8** übergeführt. Diese Verbindung ließ sich mit Essigsäureanhydrid und Triäthylamin glatt zu 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-(β -acetylaminopropionyl)-neuraminsäure (**9**) acylieren.

In Dioxan—Wasser gelöste 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure (**1**)

gab mit Chloressigsäureanhydrid in Gegenwart von Triäthylamin 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-chloracetylneuraminsäure (10); für das Gelingen der Reaktion war ein 10facher Überschuß des Säurechlorides erforderlich, weil dieses unter den Reaktionsbedingungen rasch hydrolysiert wurde. Die Reinigung der Säure erfolgte durch Adsorption an einem Anionenaustauscher und nachfolgende Elution mit Essigsäure. Auf ähnliche Weise erhielten wir 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-(β -carboxypropionyl)- (11) und 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-(β -carboxyacryl)neuraminsäure (12) aus 2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure (1) mit Hilfe der entsprechenden Säureanhydride in Gegenwart von NaHCO_3 .

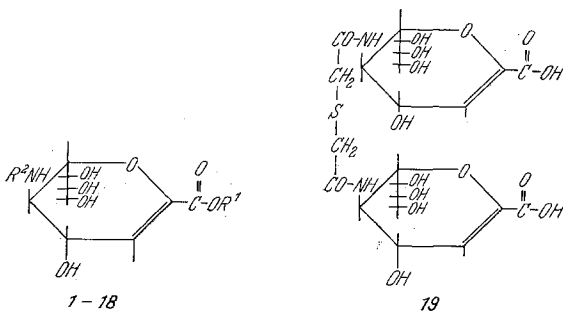
Aus 10 konnten weitere 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acylneuraminsäuren durch Ersatz des Chloratoms dargestellt werden. Ließ man KJ in Dimethylformamid mehrere Tage auf 10 einwirken, erhielt man 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-jodacetylneuraminsäure (13); wurde 10 in wäßr. Lösung mit Kaliumcyanid erwärmt, fiel 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-cyanacetylneuraminsäure (14) in guter Ausbeute an. Die Methylester 10 a, 13 a und 14 a wurden aus den entsprechenden Säuren mittels Diazomethan gewonnen.

Mit wäßr. NH_3 erhielten wir aus 10 die 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-aminoacetylneuraminsäure (15), die mit Hilfe von Essigsäureanhydrid in ihr N-Acetylderivat (16) umgewandelt wurde; 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-dimethylaminoacetylneuraminsäure (17) entstand aus 10 bei Behandlung mit einer wäßr. Lösung von Dimethylamin. Wurde schließlich 10 mit NaHS zur Reaktion gebracht, erhielten wir das Thiol, 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-mercaptoacetylneuraminsäure (18) (in nur 2% Ausbeute), während daneben der Thioäther, N,N'-Thiodiacetyl-bis(2-deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure) (19), in 36% Ausbeute anfiel.

Die in dieser Arbeit beschriebenen 2-Deoxy-2,3-dehydrosialinsäuren und ihre Ester reagieren — mit Ausnahme von 2 a — im Resorcin-Test nach *Svennerholm*⁶ positiv, während sie im Thiobarbitursäuretest nach *Aminoff*¹⁰ keine Farbreaktion geben. Die Spektren der unter den Bedingungen der *Svennerholmschen* Reaktion erhaltenen Farbstoffe zeigen Absorptionsmaxima um 500 nm, $\epsilon_{\text{mol}} \approx 8000$. Die UV-Spektren (Tab. 1) zeigen die für α,β -ungesättigte Säuren typische Absorption bei etwa 240 nm. Über die Beeinflussung verschiedener Neuraminidasen durch solche Verbindungen soll an anderer Stelle berichtet werden.

Für vorzügliche Mitarbeit danken wir Herrn *H. Mahr* und Frl. *J. Hantschel*. Für die Aufnahme und Auswertung der Kernresonanz-, Infrarot- und Ultraviolettpektren sind wir Herrn Dr. *A. Reuter*, Dr. *K. Thomae GmbH*, Chemische Fabrik, Biberach an der Riss (BRD), aufrichtig verbunden.

Formelbild



Nr.	R ¹	R ²	Nr.	R ¹	R ²
1	H	H	10	H	COCH ₂ Cl
1 a	CH(C ₆ H ₅) ₂	H	10 a	CH ₃	COCH ₂ CH ₂ COOH
2 a	CH ₃	CONH ₂	11	H	COCH = CHCOOH
3 a	CH ₃	CHO	12	H	COCH ₂ J
4	H	COCH ₂ F	13	H	COCH ₂ J
4 a	CH ₃	COCHF ₂	13 a	CH ₃	COCH ₂ CN
5	H	COCF ₃	14	H	COCH ₂ NH ₂
5 a	CH ₃	COCF ₃	14 a	CH ₃	COCH ₂ NHCOCH ₃
6	H	COCH ₂ CH ₂ NHCOOCH ₂ C ₆ H ₅	15	H	COCH ₂ N(CH ₃) ₂
6 a	CH ₃	COCH ₂ CH ₂ NH ₂	16	H	COCH ₂ SH
7	H	COCH ₂ CH ₂ NHCOCH ₃	17	H	COCH ₂ SH
8	H	COCH ₂ CH ₂ NH ₂	18	H	COCH ₂ SH
9	H	COCH ₂ CH ₂ NHCOCH ₃			

Experimenteller Teil

Die Methoden zur Charakterisierung der im folgenden angeführten Verbindungen mittels Elementaranalysen, Schmelzpunkt, optischer Drehung, UV-Spektren und Chromatographie waren die gleichen, wie in einer vorhergehenden Arbeit² beschrieben.

2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure (1)

4,05 g 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-benzyloxycarbonylneuraminsäure² wurden in 900 ml Methanol (wasserfr.) gelöst und mit 2,6 g Pd (10%) auf BaSO₄ versetzt. Nun wurde bei Zimmertemp. unter kräftigem Rühren während 1 Stde. Wasserstoffgas (über Magnesiumperchlorat getrocknet) durch die Lösung geleitet. In dieser Zeit wurden etwa 85—95% des Ausgangsmaterials umgewandelt und in der gebildeten 1 α,β-Doppelbindungen nur im geringen Maße hydriert (dünnschichtchromatographischer Befund). Sodann wurde der Katalysator abfiltriert und das Filtrat auf etwa 50 ml im Vak. bei 40° eingengt. Über Nacht kristallisierten aus dieser Lösung 1,55 g **1**. Die Mutterlauge wurde weiter (15 ml) eingengt und weitere 0,53 g **1**

isoliert. Die vereinigten Kristallisate wurden aus 20 ml Wasser und 30 ml Methanol umgelöst. Man erhielt 1,771 g **1**. λ_{\max} 231 nm, $\epsilon_{\text{mol}} = 4660$ (CH_3OH). Schmp.: Zers. ab 270° , $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -12,5^\circ$ ($c = 0,50$; H_2O).

$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_7\text{N} \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$. Ber. C 41,86, H 6,25, N 5,42.
Gef. C 41,59, H 6,53, N 5,49.

Anschließend wurde die Mutterlauge mit Dowex 50×8 (H^+) behandelt. Neben 0,335 g 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-benzyloxycarbonylneuraminsäure, die von dem Austauscherharz nicht zurückgehalten wurde, konnten nach Elution mit viel Wasser (5–6 l) im Resorcin-Test⁶ positiv reagierende Fraktionen erhalten werden, die nach dem Aufarbeiten noch 0,145 g reine **1** ergaben (λ_{\max} 231 nm, $\epsilon_{\text{mol}} = 4760$). Die Gesamtausbeute an **1** betrug demnach 72,8% d. Th.

Das Infrarotspektrum der Substanz wurde in einem KBr-Preßling mit einem Perkin-Elmer Infracord 237 Spektralphotometer aufgenommen. Zur Vermessung der Kernresonanz wurde **1** in D_2O gelöst; Kernresonanzspektrometer Varian A 60.

2-Deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure-benzhydrylester (**1 a**)

6,72 g **1** wurden in 1150 ml Methanol gelöst und mit 14,4 g Diphenyldiazomethan in 300 ml Methanol versetzt. Das Gemisch wurde $2\frac{1}{2}$ Stdn. unter Rückfluß gekocht und darauf 15 Stdn. bei Zimmertemp. stehen gelassen. Der Umsatz war nahezu quantitativ (Dünnschichtchromatogramm). Sodann wurde im Vak. bei 40° eingedampft und der Rückstand zur Entfernung des überschüss. Diphenyldiazomethans mehrere Male mit Petroläther (*PÄ*, Sdp. 40°) digeriert. Der zurückbleibende Benzhydrylester (**1 a**) wurde in Methanol heiß gelöst, die Lösung auf etwa 350 ml eingengt und portionenweise mit insgesamt 1000 ml Äther versetzt. Nach einigen Tagen wurden 7,82 g **1 a**, Schmp. $148\text{--}152^\circ$, isoliert.

Die Mutterlauge wurde eingedampft und der Eindampfrest in 50 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe von 150 ml Äther und 500 ml *PÄ* erhielten wir weitere 1,49 g **1 a**; gesamte Ausb. an **1 a** 86% d. Th., $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -2,4^\circ$ ($c = 0,50$; CH_3OH).

$\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_7\text{N}$. Ber. N 3,37. Gef. N 3,11.

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-carbamoylneuraminsäure-methylester (**2 a**)

Eine Lösung von 0,516 g **1** in 50 ml H_2O wurde mit 1,62 g KO-CN versetzt und der pH-Wert mit 1*N*-Essigsäure auf 4,5 gebracht; während der Reaktion wurde durch wiederholte Zugabe von Essigsäure dieser Wert gehalten. Nach 2 Stdn. wurde nochmals 1,62 g KO-CN hinzugefügt und weitere 4 Stdn. bei pH 4,5 stengelassen.

Sodann wurden zur Entfernung der Kationen 60 ml Dowex 50×8 (H^+) in das Reaktionsgemisch eingerührt, das Austauscherharz nach einigen Minuten abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wurde auf eine mit Dowex 1×8 (Formiat-Form) beschickte Chromatographiesäule aufgetragen. Nachdem mit Wasser ausgewaschen worden war, eluierte man 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-carbamoylneuraminsäure (**2**) mit 0,4*N*-Ameisensäure. Die mit Natriummetaperjodat und Benzidin¹¹ positiv reagierenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vak. bei 40° eingedampft. Der Rückstand wog 0,665 g. **2** ließ sich, obwohl dünnschichtchromatographisch rein, auch nach wiederholten Versuchen nicht zur Kristallisation bringen.

Tabelle 1. 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acylneuraminsäuren

Nr.	N-Acylrest	Summenformel	Elementaranalyse*			Schmp., °C	[α] _D °	λ _{max} (nm) ε _{mcl}	Ausb., %
			Ber. (Gef.)	%C	%H				
4	Fluoracetyl	C ₁₁ H ₁₆ O ₈ NF	42,74 (42,52)	5,22 5,29	4,53 4,71	183—186	+ 33,4° 0,50 (H ₂ O)	240 4950	79 ^a
5	Difluoracetyl	C ₁₁ H ₁₅ O ₈ NF ₂	40,37 (40,30)	4,62 4,55	4,28 4,30	178—181	+ 39,2° 0,50 (H ₂ O)	240 6800	46 ^a
6	Trifluoracetyl	C ₁₁ H ₁₄ O ₈ NF ₃	38,28 (38,10)	4,09 4,02	4,06 4,17	184—186	+ 40,4° 0,50 (H ₂ O)	240 7150	64 ^a
7	β-(N'-Benzylloxycar- bonyl)aminopropionyl	C ₂₀ H ₂₆ O ₁₀ N ₂	52,86 (52,55)	5,76 5,70	6,17 6,08	180—182	—	—	40 ^a
8	β-Aminopropionyl	C ₁₂ H ₂₀ O ₈ N ₂ · 1 H ₂ O	42,60 (42,66)	6,55 6,20	8,28 8,20	Zers. über 300	+ 27,6° 0,25 (H ₂ O)	235 6220	45 ^b
9	β-Acetylamino- propionyl	C ₁₄ H ₂₂ O ₉ N ₂ · ½ H ₂ O	45,29 (45,01)	6,24 5,87	7,55 7,68	159—163	+ 26,4° 0,25 (H ₂ O)	240 5200	70 ^c
10	Chloracetyl	C ₁₁ H ₁₆ O ₈ NCl	40,56 (40,38)	4,95 4,87	4,30 4,28	162—164	+ 33,2° 0,50 (H ₂ O)	240 6630	74 ^d
11	β-Carboxypropionyl	C ₁₃ H ₁₉ O ₁₀ N	44,70 (44,74)	5,48 5,47	4,01 4,03	164—166	+ 44,4° 0,25 (CH ₃ OH)	241 4950	70 ^d
12	β-Carboxyacrylyl	C ₁₃ H ₁₇ O ₁₀ N	44,95 (44,73)	4,92 5,01	4,03 4,00	172—176	—	—	33 ^d

13 Jodacetyl	$C_{11}H_{16}O_8N_2J$	31,67 (31,80)	3,87 3,74	3,36 3,47	158—161	+ 14,6° 0,50 (H ₂ O)	239 8640	31 ^e
14 Cyanacetyl	$C_{12}H_{16}O_8N_2$	45,58 (45,37)	5,10 5,13	8,86 8,87	174—176	+ 42,4° 0,50 (H ₂ O)	240 6410	60 ^e
15 Aminoacetyl	$C_{11}H_{18}O_8N_2$	43,14 (43,09)	5,92 5,87	9,15 9,22	Zers. > 250	+ 35,7° 0,25 (H ₂ O)	232 5460	66 ^e
16 Acetylaminoacetyl	$C_{13}H_{20}O_9N_2 \cdot 1 H_2O$	42,62 (42,66)	6,05 5,91	7,65 7,55)	139—142	+ 27,8° 0,50 (H ₂ O)	241 6000	94 ^f
17 Dimethylaminoacetyl	$C_{13}H_{22}O_8N_2 \cdot 1 H_2O$	44,32 (44,47)	6,87 6,61	7,95 7,68)	180—195	+ 30,0° 0,50 (H ₂ O)	234 5200	83 ^e
18 Mercaptoacetyl	$C_{11}H_{17}O_8NS$	40,86 (40,77)	5,30 5,83	4,33 3,85)	92—100	+ 29,3° 0,15 (H ₂ O)	240 6190	2 ^e
19 Thiodiacetyl	$C_{22}H_{32}O_{16}N_2S$	43,16 (42,80)	5,27 5,47	4,57 4,44)	Zers. > 170	+ 31,2° 0,25 (H ₂ O)	240 11820	36 ^e

* Die für die Elemente Cl, F, J bzw. S der Verbindungen **4**, **5**, **6**, **10**, **13**, **18** und **19** gefundenen Analysenwerte stimmen mit den ber. ebenfalls überein; ^a auf **1 a** bezogen; ^b auf **7** bezogen; ^c auf **8** bezogen; ^d auf **1** bezogen; ^e auf **10** bezogen; ^f auf **15** bezogen.

Zur Darstellung des Methylresters (**2 a**) wurde die Säure (0,665 g) in 66 ml Methanol gelöst mit überschüss. CH_2N_2 in Äther versetzt. Nach Zugabe von 130 ml Äther wurde eine flockige Fällung abgetrennt und das Filtrat nach und nach mit 120 ml Äther versetzt. Es kristallisierten 0,342 g **2 a** (Tab. 2). **2** und **2 a** gaben mit Resorcin⁶ keine Färbung.

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-formylneuraminsäure-methylester (3 a)

0,250 g **1** wurden in 50 ml Methanol suspendiert, mit einem Überschuß CH_2N_2 in Äther versetzt und nach 45 Min. im Vak. bei 40° eingedampft.

Der Eindampfrückstand wurde sodann in 10 ml Methanol gelöst, 25 ml Ameisensäuremethylester hinzugefügt und 6 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Zugabe katalytischer Mengen Triäthylamin wurde wieder 3 Stdn. gekocht. Nun wurde im Vak. bei 40° eingedampft, der Rückstand (0,225 g) in 5 ml Methanol gelöst und langsam 60 ml Äther zugegeben. Eine amorphe, schmierige Fällung wurde abgetrennt und aus dem Filtrat durch portionenweise Zugabe von 22 ml Äther **3 a** zur Kristallisation gebracht. Das Rohkristallisat (0,092 g) wurde für die Elementaranalyse aus Methanol (4 ml) und Äther (5 ml) umkristallisiert (Tab. 2).

3 a ließ sich auch aus **1 a** mittels N-Formylimidazol in Tetrahydrofuran (*THF*) gewinnen. Die Reaktionsbedingungen entsprachen jenen, die für die Darstellung von **4 a** angewandt wurden.

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-fluoracetylneuraminsäure (4)

In eine Suspension von 13,0 g N,N'-Carbonyldiimidazol (8×10^{-2} Mole) in 20 ml Benzol wurde bei 5° unter Rühren 5,6 g Fluoressigsäure (16×10^{-2} Mole), gelöst in 40 ml Benzol, eingetragen. Nach etwa 1 Stde. wurde von dem ausgeschiedenen Salz des Imidazols abgesaugt und das Filtrat tropfenweise zu einer Suspension von 1,70 g **1 a** ($4,1 \times 10^{-3}$ Mole) in *THF* zugegeben. Man ließ 30 Min. nachreagieren und gab dann zur Zersetzung des überschüss. Fluoracetylimidazolides 10 ml Wasser zu. Das Gemisch wurde im Vak. bei 40° eingedampft, der Rückstand in *THF* heiß gelöst und mit dem 3fachen Volumen Äther versetzt. Eine Fällung (das Salz des Imidazols) wurde abgesaugt und mit Äther nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden wieder eingedampft, der Rückstand in 100 ml Methanol und 30 ml Wasser gelöst und mit 1N-NaOH die Lösung auf pH 11,5 gebracht. Zur Verseifung benötigte man 29,5 ml 1N-NaOH. Die Kationen wurden sodann über Dowex 50 \times 8 (H^+ , 50 ml) entfernt und die Säure (**4**) an Dowex 1 \times 8 (Acetat-Form, 200 ml) adsorbiert. Die Elution erfolgte mit 4N-Essigsäure. Die im Resorcin-Test⁶ positiv reagierenden Fraktionen wurden vereinigt und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand, 1,5 g **4**, wurde in 33 ml Wasser—Methanol (1 : 10, *v/v*) gelöst und durch portionenweise Zugabe von 150 ml Äther zur Kristallisation gebracht. Nach dem Absaugen und Trocknen betrug die Ausbeute 1,004 g **4** (Tab. 1).

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-fluoracetylneuraminsäure-methylester (4 a)

Eine Lösung von 500 mg **4** in 20 ml Methanol wurde mit überschüss. in Äther gelöstem CH_2N_2 versetzt. Nach Zugabe von Äther und *PÄ* schied sich **4 a** ab (Tab. 2).

Tabelle 2. Methyltester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acylneuraminsäuren

Nr. N-Acylrest	Summenformel	Elementaranalyse *			Schmp., °C	[α] _D c in H ₂ O	λ _{max} (nm) ε _{mol}	Ausb., %
		Ber. (Gef.)	% C	% H				
2 a Carbamoyl	C ₁₁ H ₁₈ O ₈ N ₂	43,14 (42,94)	5,92 6,08	9,15 9,00	208—210	+ 33,4° 0,5	231 5830	55 ^a
3 a Formyl	C ₁₁ H ₁₇ O ₈ N	45,36 (45,37)	5,88 6,18	4,80 4,79	193—197	+ 27,5° 0,4	244 5000	31 ^a
4 a Fluoracetyl	C ₁₂ H ₁₈ O ₈ NF	44,59 (44,33)	5,61 5,50	4,33 4,28	201—203	+ 39,2° -0,5	244 6820	80 ^b
5 a Difluoracetyl	C ₁₂ H ₁₇ O ₈ NF ₂ · 1 H ₂ O	40,12 (40,22)	5,33 5,06	3,89 3,90	185—187	+ 35,0° 0,5	244 6820	78 ^b
6 a Trifluoracetyl	C ₁₂ H ₁₆ O ₈ NF ₃	40,12 (40,13)	4,49 4,71	3,90 3,81	188—193	+ 33,0° 6,0	243 8250	72 ^b
10 a Chloracetyl	C ₁₂ H ₁₈ O ₈ NCl	42,43 (42,21)	5,34 5,29	4,12 4,09	159—161	+ 29,6° 0,5	244 6580	85 ^b
13 a Jodacetyl	C ₁₂ H ₁₈ O ₈ NJ	38,43 (38,25)	4,21 3,97	3,25 3,17	168—170	+ 20,2° 0,25	245 9220	80 ^b
14 a Cyanacetyl	C ₁₃ H ₁₈ O ₈ N ₂	47,27 (47,25)	5,49 5,61	8,48 8,28	199—203	+ 40,0° 0,5	245 7030	72 ^b

* Die für die Elemente F, Cl und J der Verbindungen **4 a**, **5 a**, **6 a**, **10 a** und **13 a** gefundenen Analysenwerte stimmten mit den ber. ebenfalls überein; ^a auf **1** bezogen; ^b auf die entsprechende Säure bezogen.

Analog wurden aus **1 a** nach der Imidazolid-Methode die folgenden Säuren (und aus diesen mittels CH_2N_2 die entsprechenden Methylester) dargestellt:

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-difluoracetylneuraminsäure (**5**; Methylester **5 a**),
2-Deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoracetylneuraminsäure (**6**; Methylester **6 a**)
sowie 2-Deoxy-2,3-dehydro-N- $[\beta$ -(N'-benzyloxycarbonyl)aminopropionyl]-
neuraminsäure (**7**)* (Tab. 1 und 2).

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-(β -aminopropionyl)-neuraminsäure (8)

Eine Lösung von 0,264 g **7** in 42 ml Methanol wurde über 0,179 g Pd (10%) auf BaSO_4 unter starkem Rühren 30 Min. im Durchstromverfahren hydriert. Nach beendeter Reaktion wurde der Katalysator abgesaugt und das Filtrat im Vak. eingedampft.

Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und die Lösung auf Dowex 50×8 (H^+ , 7 ml) aufgetragen. Sodann wurde mit Wasser eluiert, die im Resorcin-Test⁶ positiv reagierenden Fraktionen vereinigt und im Vak. eingedampft. Der Rückstand wog 0,123 g und wurde aus Wasser—Methanol (1 : 3, v/v) umkristallisiert (Tab. 1).

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-(β -acetylaminopropionyl)-neuraminsäure (9)

0,080 g ($2,35 \times 10^{-4}$ Mole) **8**, 0,66 ml Triäthylamin ($4,69 \times 10^{-3}$ Mole) und 6 ml Wasser wurden bei 0° innerhalb 1 Stde. mit 0,22 ml ($2,35 \times 10^{-3}$ Mole) Essigsäureanhydrid in 3 ml Dioxan versetzt. Man ließ 30 Min. nachreagieren, versetzte dann mit 6 ml 1N-NaOH, erwärmte 10 Min. auf 40°, filtrierte den Ansatz durch eine mit 10 ml Dowex 50×8 (H^+) besetzte Säule und dampfte im Vak. ein. Der Eindampfrückstand (0,097 g) wurde in 4 ml Methanol heiß gelöst und **9** mit 8 ml Äther zur Kristallisation gebracht (Tab. 1).

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-chloracetylneuraminsäure (10)

Unter Eiskühlung und kräftigem Rühren wurden zu einer Lösung von 1,99 g **1** in 50 ml Wasser und 25 ml Dioxan in Gegenwart von 22,4 ml Triäthylamin 13,68 g Chloressigsäureanhydrid in 60 ml Dioxan tropfenweise zugegeben. Man ließ 30 Min. nachreagieren und behandelte sodann die Lösung mit Dowex 50×8 (H^+ , 250 ml) und Dowex 1×8 (Acetat-Form, 650 ml). **10** wurde von dem Anionenaustauscher mit 4N-Essigsäure eluiert; Ausb. 2,5 g. Zur Analyse wurde aus Methanol (73 ml) und Äther (460 ml) umgefällt. Man erhielt 1,86 g **10** (Tab. 1).

Das Elutionsdiagramm zeigte, daß neben **10** auch andere Säuren eluiert wurden, deren UV-Absorption ebenfalls bei 245 nm lag und die eine positive Resorcin-Reaktion⁶ gaben; sie wurden von uns jedoch nicht näher untersucht.

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-chloracetylneuraminsäure-methylester (10 a)

wurde aus **10** mit CH_2N_2 analog **4 a** dargestellt (Tab. 2).

* Das für die Herstellung von **7** erforderliche N-Benzyloxycarbonyl- β -alanin wurde von der Ega-Chemie KG, Keppler und Reif, Steinheim bei Heidenheim, BRD, bezogen.

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-(β -carboxypropionyl)-neuraminsäure (11)

Zu 0,249 g (1×10^{-3} Mole) **1** und 1,09 g (13×10^{-3} Mole) NaHCO_3 in 40 ml Wasser wurden 0,605 g (6×10^{-3} Mole) Bernsteinsäureanhydrid in 40 ml Dioxan während 75 Min. zugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch zur Entfernung der Kationen mit Dowex 50×8 (H^+ , 25 ml) behandelt. Nach dem Eindampfen verblieb ein Rückstand (1,048 g), der aus Methanol (10 ml) und Äther (200 ml) umkristallisiert wurde. Nach dem Absaugen und Trocknen erhielt man 0,236 g **11** (Tab. 1).

Analog **11** wurde aus **1** und Maleinsäureanhydrid die 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-(β -carboxyacrylyl)-neuraminsäure (**12**) hergestellt (Tab. 1).

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-jodacetylneuraminsäure (13)

0,325 g **10** wurden in 0,4 ml Dimethylformamid (*DMF*) gelöst und mit 5 ml einer kalt gesätt. Lösung von KJ in *DMF* versetzt. Man ließ 5 Tge. bei Zimmertemp. stehen. Sodann wurde der Ansatz auf ein mit Dowex 1×8 (Acetat-Form, 105 ml) beschicktes Chromatographierrohr gebracht, das Austauschharz mit Wasser (500 ml) ausgewaschen und **13** mit 4*N*-Essigsäure eluiert. Die bei 254 nm absorbierenden Fraktionen wurden vereinigt und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand (0,357 g) wurde aus Methanol (10 ml) und Äther (130 ml) kristallisiert. Man erhielt 0,199 g **13**, die nochmals aus Methanol (6 ml) und Äther (35 ml) umkristallisiert wurden; Ausb. 0,129 g (Tab. 1).

Der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-jodacetylneuraminsäure-methylester (**13 a**) wurde aus **13** mit CH_2N_2 analog **4 a** dargestellt (Tab. 2).

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-cyanacetylneuraminsäure (14)

0,326 g **10** wurden in 0,5 ml Wasser gelöst und mit 0,084 g NaHCO_3 neutralisiert. Nach Zugabe von 0,098 g KCN ließ man die klare Lösung 75 Min. bei 20° und 1 Stde. bei 50° reagieren. Anschließend wurde mit 5 ml Wasser verdünnt und die Lösung über Dowex 50×8 (H^+ , 6 ml) sowie Dowex 1×8 (Acetat-Form, 20 ml) filtriert. Mit 4*N*-Essigsäure wurde von dem Anionenaustauscher eluiert, die bei 254 nm absorbierenden Fraktionen vereinigt und im Vak. eingedampft. Ein sirupöser Rückstand, 0,289 g **14**, wurde aus Methanol (8 ml) und Äther (70 ml) zur Kristallisation gebracht.

Der Methylester der 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-cyanacetylneuraminsäure (**14 a**) wurde aus **14** mit CH_2N_2 analog **4 a** erhalten (Tab. 2).

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-aminoacetylneuraminsäure (15)

Eine Lösung von 0,972 g (3×10^{-3} Mole) **10** in 90 ml 25proz. NH_3 wurde 2 Stdn. auf 50° erwärmt, sodann im Vak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 120 ml Wasser heiß gelöst. Diese Lösung wurde auf ein mit 30 ml Dowex 50×8 (H^+) beschicktes Chromatographierrohr aufgetragen. Es wurde mit Wasser eluiert und Fraktionen zu 20 ml abgenommen. Die Fraktionen 240—1240, die bei 254 nm hohe Extinktionswerte gaben, wurden vereinigt und im Vak. eingedampft. Man erhielt aus dem Rückstand (0,700 g), der aus Wasser (33 ml) und Methanol (80 ml) umkristallisiert wurde, 0,607 g **15** (Tab. 1).

Aus **15** ließ sich mit Ac_2O in Gegenwart von Triäthylamin 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetyl-aminoacetylneuraminsäure (**16**) unter den gleichen Versuchsbedingungen, wie für **9** schon beschrieben, darstellen (Tab. 1).

2-Deoxy-2,3-dehydro-N-dimethylaminoacetylneuraminsäure (17)

wurde aus **10** und einer 40proz. wäßr. Lösung von Dimethylamin analog **15** hergestellt (Tab. 1).

*2-Deoxy-2,3-dehydro-N-mercaptoacetylneuraminsäure (18)**und N,N'-Thio-diacetyl-bis-(2-deoxy-2,3-dehydroneuraminsäure) (19)*

0,650 g **10** und 0,168 g NaHCO₃ wurden in 1 ml Wasser nach Zugabe von 1,5 ml einer 48proz. wäßr. Lösung von NaHS 45 Min. auf 50° erwärmt. Nach dem Erkalten wurde mit 10 ml Wasser verdünnt und die Lösung durch Dowex 50 × 8 (H⁺, 35 ml) sowie Dowex 1 × 8 (Acetat-Form, 120 ml) filtriert. Vom Anionenaustauscher wurde mit 4N-Essigsäure eluiert und die bei 254 nm absorbierenden Fraktionen (à 15 ml) gesammelt.

Die Fraktionen 40—70 enthielten **18**. Sie wurden im Vak. bei 40° eingedampft und der Rückstand (0,052 g) aus Methanol (4,5 ml), Äther (40 ml) und wenig P₂O₅ kristallisiert. Für die Elementaranalyse wurde **18** aus Methanol und Äther umkristallisiert; Ausb. 0,0147 g (Tab. 1).

Die Fraktionen 240—400 ergaben nach dem Eindampfen im Vak. bei 40° einen Rückstand (0,465 g), der in Methanol (40 ml) gelöst wurde. Auf Zugabe von Äther (170 ml) kristallisierten 0,261 g **19** aus. Dieses wurde zur weiteren Reinigung aus Wasser (3 ml), Methanol (20 ml) und Äther (100 ml) umkristallisiert (Tab. 1).

Literatur

- ¹ P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **100**, 1295 (1969).
- ² P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **101**, 639 (1970).
- ³ P. Meindl und H. Tuppy, Z. physiol. Chem. **350**, 1088 (1969).
- ⁴ P. Meindl, G. Bodo, J. Lindner und P. Palese, Z. Naturforsch. **26 b**, 792 (1971).
- ⁵ R. Kuhn und G. Baschang, Ann. Chem. **659**, 156 (1962).
- ⁶ L. Svennerholm, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **24**, 604 (1957).
- ⁷ W. Gielen, Z. physiol. Chem. **348**, 329 (1967).
- ⁸ H. A. Staab, M. Lüking und F. H. Dürr, Chem. Ber. **95**, 1275 (1962).
- ⁹ H. A. Staab und G. Walther, Chem. Ber. **95**, 2070 (1962).
- ¹⁰ D. Aminoff, Biochem. J. **81**, 384 (1961).
- ¹¹ Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, Reagens **22**, E. Merck AG, Darmstadt.