

Strukturelle Abwandlungen an *N*-Acetylneuraminsäure, 3¹ Synthese von 7-*epi*-, 8-*epi*- und 7,8-Bis-*epi*-*N*-Acetylneuramin- säure — ihr Verhalten gegenüber Cytidin-Monophosphat- Sialinsäuresynthetase

Erich Zbiral* und Hannelore H. Brandstetter

Institut für Organische Chemie, Universität Wien, A-1090 Wien, Österreich

(Eingegangen 20. September 1984. Angenommen 2. Oktober 1984)

*Transformations with N-Acetylneuraminic Acid, 3¹.
Synthesis of 7-epi-, 8-epi- and 7,8-bis-epi-N-Acetylneuraminic Acid and their
Behaviour Towards the Cytidin Monophosphate Sialic Acid Synthetase*

From methyl-5-acetylamino-7,8-anhydro-4,9-*O*-bis-(*t*-butyldimethylsilyl)-3,5-dideoxy- β -*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosidonic acid methylester (**1**) the derivatives **1 a** and **1 b** were obtained by removing the 9-*O*-(*t*-butyldimethylsilyl)group with Bu_4NF , followed by acetylation. Treatment of **1 b** with 80% acetic acid and acetanhydride/pyridine yields the 8-*epi*-*N*-acetylneuraminic acid derivative **2 a** and the 7-*epi*-*N*-acetylneuraminic acid derivative **3 a** in a ratio of 3:1 (Scheme 1). The structure elucidation of **2 b** was achieved by converting **2 b** via the 4,9-bis-*O*-(*t**B**D**M**S**i*)-8-*O*-tosyl-derivative **2 d** into the epoxide **1** (Scheme 2). Using the same sequence the epoxides **4** and **5** were transformed into the *N*-acetylneuraminic acid derivative **6 a** and the 7,8-bis-*epi*-*N*-acetylneuraminic acid derivative **7 a** (Scheme 3). After treatment with sodium hydroxide and 0.025 *m* HCl and Dowex 50 H⁺ the 8-*epi*-, 7-*epi*- and 7,8-bis-*epi*-*N*-acetylneuraminic acids **2**, **3**, and **7** were obtained. These three compounds were tested with *CMP-N*-acetylneuraminic acid synthetase.

[*Keywords: Acetolysis of methyl-9-O-acetyl-5-acetylamino-7,8-anhydro-4-O-(tBDMSi)-3,5-dideoxy- β -D-(and L)-glycero-D-galacto-2-nonulosidonic acid methylester, methyl-9-O-acetyl-5-acetylamino-7,8-anhydro-4-O-(tBDMSi)-3,5-dideoxy- β -D-glycero-L-altro-2-nonulosidonic acid methylester; Configurational changes of sialic acid*]

Einleitung

N-Acetylneuraminsäure und seine verschiedenartigsten Acylderivate, die sogenannten Sialinsäuren, stellen wichtige terminale Einheiten vieler

* Herrn Kollegen *K. Schlögl* mit den besten Wünschen zum 60. Geburtstag.

bedeutsamer Oligosaccharidsequenzen in biologischen Matrizen dar. Über die vielfältigen Funktionen, die mit diesen Verbindungen in Zusammenhang gebracht werden können, findet man ausführliche Informationen in zwei kürzlich erschienenen Monographien^{2,3}. Eine bemerkenswerte Rolle bei der Verwirklichung verschiedenster biologischer Funktionen fällt nicht nur der Carboxylgruppe sondern auch der „Glycerin“-Seitenkette zu, die ihrerseits etwa für das Zustandekommen intramolekularer H-Brücken mit dem pyranoiden Ring benötigt wird. Bei der Koordination mit dem Ca-Ion, welche im Verlauf der elektrischen Impulsübertragung eine Rolle spielt⁴, sind gleichzeitig Carboxylfunktion, der pyranoiden Sauerstoff und die beiden Hydroxylgruppen von C-7 und C-8 involviert. Bemerkenswerterweise scheint hingegen der OH-Gruppe am C-9 nicht eine derart bedeutsame Rolle zuzukommen. So konnte sogar die *N*-Acetyl-9-azido-9-desoxyneuraminsäure enzymatisch ohne Schwierigkeit aus Phosphoenolpyruvat und 2-Acetamido-2,6-dideoxy-*D*-mannose aufgebaut werden⁵. Kürzlich wurde zudem festgestellt, daß die verschiedenartigsten *N*-Acetyl-9-*X*-9-desoxyneuraminsäurederivate ($X = F^{6,7}, NH_2^7, NHCOCH_3^7$) sowie *NANA* selbst mit Cytidin-Monophosphat-Sialinsäure-synthetase aktiviert werden können. Dies ist zwar eine notwendige aber keine hinreichende Voraussetzung für eine Einbringung in biologische Matrizen.

Vor diesem Hintergrund ergab sich für uns die interessante Frage nach einer übersichtlichen spezifischen Umkehr der Konfigurationen von *N*-Acetylneuraminsäure an C-7, C-8 sowie des gleichzeitigen Konfigurationswechsels von C-7 und C-8. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über einen einfachen Zugang zu den drei unten angeführten Stereoanalogen.

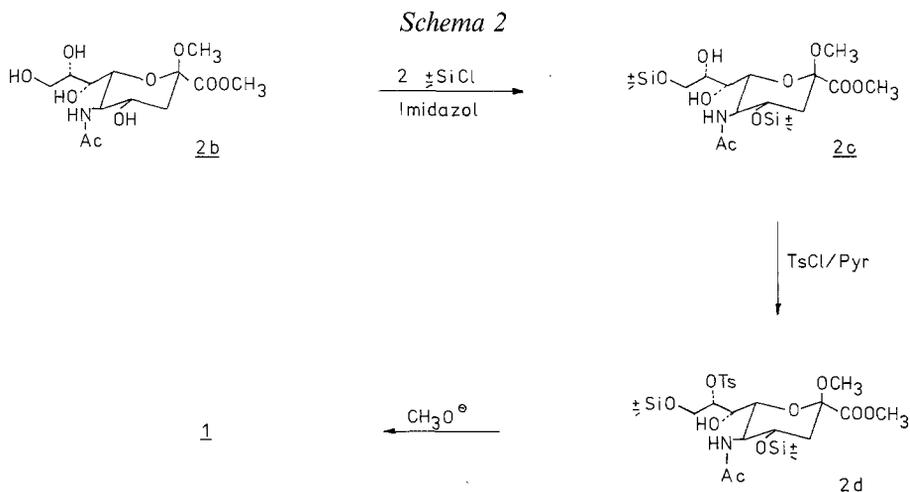
Ergebnisse und Diskussion

Bei 7-epi-*N*-Acetylneuraminsäure handelt es sich demnach um die *D*-glycero-*L*-altro-nonulosonsäure, die 8-epi-Form repräsentiert die *L*-glycero-*D*-galacto-nonulosonsäure und die 7,8-„bis-epi“-Form stellt die *L*-glycero-*L*-altro-nonulosonsäure dar. Für die Synthese der beiden erstgenannten Epimeren von *N*-Acetylneuraminsäure griffen wir auf das erst kürzlich von uns aus *NANA* dargestellte¹ *cis*-konfigurierte 7,8-Epoxyneuraminsäurederivat **1** (Schema 1) zurück.

Der ursprünglich ins Auge gefaßte Plan, nach einer selektiven Deblockierung, bei der **1** in **1a** überführt wird, die freie C-9 OH-Gruppe über das Payne-Gleichgewicht⁸ (7,8-Epoxy-*NANA* \rightleftharpoons 8,9-Epoxy-8-epi-*NANA*) in das terminale Oxiran umzuwandeln und mit OH-Ionen am C-9-Terminus ausschließlich zum 8-epi-*NANA*-Derivat zu öffnen, ließ sich nicht verwirklichen, obwohl eine derartige Strategie im Bereich der N-freien Zucker von *Sharpless* mit großem Erfolg angewendet wurde⁹.

Wir wandelten daher **1 a** zunächst in das 9-*O*-Acetylderivat **1 b** um, um auf diese Weise den Nachbargruppeneffekt der Acetoxygruppe bei der Acetolyse ausnützen zu können. Eine analoge Strategie wurde übrigens erst kürzlich auch von einem anderen Arbeitskreis publiziert^{9a}. Wir erhielten nach Solvolyse mit 80%iger Essigsäure und Acetylierung ein Gemisch der peracetylierten Derivate **2 a** und **3 a** im Verhältnis 3:1 (Schema 1). Dem Hauptprodukt **2 a** ordneten wir zunächst die aus einer 5-Ring-Acetoxoniumionzwischenstufe resultierende 8-*epi*-Struktur zu, während dann das in geringerer Menge vorliegende 7-*epi*-*NANA*-Derivat aus einer 6-Ringacetoxoniumionzwischenstufe entstanden sein mußte. Beide epimeren *NANA*-Derivate ließen sich leicht chromatographisch trennen. Die NMR-Spektren beider Verbindungen zeichnen sich durch charakteristische Unterschiede aus (Abb. 1). Zum Vergleich wurde in die Abb. 1 auch das Spektrum von peracetyliertem *NANA*-methylester- β -methylketosid **6 a** aufgenommen.

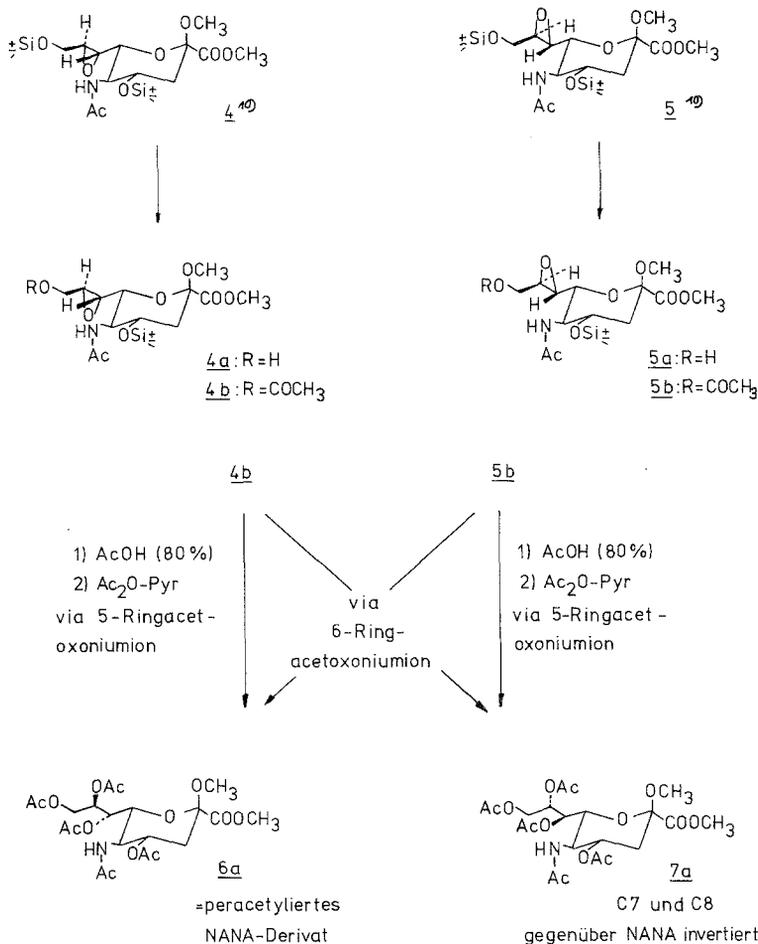
Daß die eben erwähnte Zuordnung tatsächlich auch zutrifft, konnten wir mit Hilfe der im Schema 2 aufgezeigten Sequenz beweisen.



Aus **2 a** wurde via *Zemplen*-Verseifung das 8-*epi*-*N*-Acetylneuraminsäuremethylester- β -methylketosid **2 b** hergestellt und in das entsprechende 4,9-bis-*O*-*t*-butyldimethylsilyletherderivat **2 c** umgewandelt. Daraus ließ sich — allerdings in schlechter Ausbeute — das entsprechende 4,9-bis-*O*-*t*-butyldimethylsilyl-8-*O*-tosylderivat **2 d** herstellen, dessen 8-*O*-Tosylfunktion aus dem NMR-Spektrum eindeutig abgelesen werden konnte. Daraus folgt aber auch die Struktur des Oxirans, welches bei der Methoxydioneinwirkung gebildet wird. Sie entspricht nämlich derjenigen des eingesetzten Ausgangsmaterials **1**.

Wären hingegen die Zuordnungen von **2a** und **3a** zu vertauschen gewesen, dann hätte bei der aufgezeigten Reaktionsfolge das zweite mögliche, *cis*-konfigurierte diastereomere Oxiran entstehen müssen.

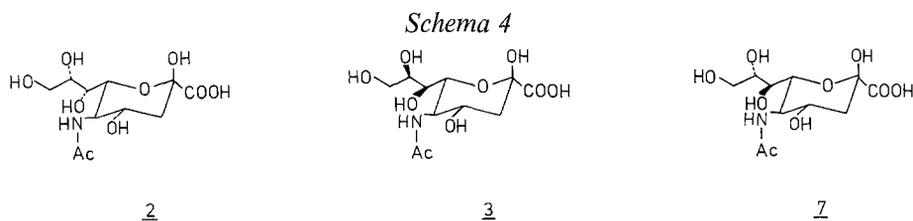
Schema 3



Die eben referierten Acetolyseergebnisse von **1b** waren auch der Anlaß dafür, die beiden schon früher¹⁰ dargestellten *trans*-konfigurierten diastereomeren 7,8-Epoxynonulosonesterderivate **4** und **5** (Schema 3) derselben Reaktionsfolge zu unterwerfen.

Das Oxiran **4** weist sich gegenüber *NANA* durch eine Konfigurationsumkehr am C-8 aus, während das Oxiran **5** am C-7 die umgekehrte Konfiguration besitzt. Dementsprechend führt die Übertragung dieser

Reaktionsfolge auf **4** bei der über das 5-Ringacetoxoniumion verlaufenden Acetolyse unter Inversion am C-8 erwartungsgemäß zum peracetylierten *N*-Acetylneuraminsäurederivat **6 a**, während aus **5** das Nonulosensäurederivat **7 a** gebildet wird, das nun bezüglich C-7 und C-8 gegenüber *NANA* umgekehrte Konfiguration aufweist. Es handelt sich also um das peracetylierte *L*-glycero-*L*-altro-nonulosensäuremethylester- β -methylketosid. Zum Vergleich wurde auch das 250 PMR-Spektrum von **7 a** (in der Abb. 1 neben **2 a** und **3 a**) aufgenommen. Bemerkenswert erscheint, daß **4 b** fast ausschließlich über die 5-Ringacetoxoniumionzwischenstufe unter Inversion am C-8 in die stereochemische Ausgangsposition, nämlich das peracetylierte *NANA*-Derivat **6 a** zurückgeführt wird. Nur in geringfügigen Spuren wird hier — wie man es gerade noch dem 250 PMR-Spektrum entnehmen kann — via 6-Ringacetoxoniumionzwischenstufe das andere Stereoisomere **7 a** gebildet. Bei der Umwandlung von **5 b** in **7 a** wird hingegen in deutlich stärkerem Ausmaß auch die 6-Ringacetoxoniumionzwischenstufe durchlaufen, wie man es aus einer Beimengung von bis zu 25% an **6 a** entnehmen kann. Beide Isomeren **6 a** und **7 a** ließen sich jedoch chromatographisch gut voneinander trennen. Die Überführung von **2 a**, **3 a** und **7 a** in die freien Nonulosensäuren **2** (8-epi-*NANA*), **3** (7-epi-*NANA*) und **7** (7,8-,bis-epi“-*NANA*) (Schema 4) wurde in Analogie zu einer von *R. Schauer* für *N*-Acetylneuraminsäuremethylester- β -methylketosid angeführten Verseifung und p_H -Gradientenelution durchgeführt¹¹. Eine weitere Reinigung wurde durch Mitteldruckchromatographie über Cellulose erreicht.



Alle Stereoisomeren zeigen fast gleiche R_F -Werte wie *NANA* und geben erwartungsgemäß die gleichen Farbreaktionen (*Bial's* Test², Thiobarbitursäuretest²). Wir werden an anderer Stelle ausführlich über die CMR- und PMR-Spektren von **2**, **3** und **7** sowie auch über die daraus ableitbaren Konformationen und Anomerenverhältnisse berichten.

Um eine erste Information über das biochemische Verhalten dieser neuen bezüglich der Seitenkette stereochemischen Varianten zu *NANA* zu erhalten, untersuchten wir die Möglichkeit der biochemischen Aktivierung mit Hilfe von Cytidin-Monophosphat-Sialinsäure-Synthetase aus Rattenleber, also jener Reaktion, welche die Voraussetzung für die

terminale Aufpfropfung auf Oligosaccharidsequenzen darstellt^{2a,6}. Ein interessanter Aspekt dieser Aktivierung ist, daß dieses Enzym in der Lage ist, sehr unspezifisch *NANA*-Derivate mit den verschiedenartigsten Substituenten (vgl. oben) am C-9 zu aktivieren^{6,7}. Wir registrierten jedoch bei unseren Stereoanalogen **2**, **3** und **7** eine markante Substratspezifität. Zu unserer Überraschung stellten wir fest, daß **2** (8-epi-*NANA*) überhaupt nicht aktiviert wird, während **3** (7-epi-*NANA*) und **7** (7,8-,bis-epi“-*NANA*) im Vergleich zu *NANA* selbst in einem Ausmaß bis zu etwa 50% aktivierbar sind. Wie ein Blick auf die entsprechenden Tabellen im exp. Teil zeigt, verläuft die Aktivierung bei **3** (7-epi-*NANA*) eher langsamer und in geringerem Ausmaß als diejenige von **7** (7,8-,bis-epi“-*NANA*). Bemerkenswert erscheint, daß bei steigender Enzymmenge die Aktivierung von **3** diejenige von **7** einholt. Sehr interessant ist auch die Tatsache, daß – obwohl 8-epi-*NANA* der Aktivierung nicht zugänglich ist – die zusätzliche Umkehr am C-7 in der 7,8-,bis-epi“-*NANA* eine bessere Aktivierbarkeit ermöglicht. Eine mögliche Erklärung für diesen interessanten Effekt bietet sich bei genauerer Betrachtung der internen H-Brücken in **7** und bei einem Vergleich derselben mit denen von *NANA* an. Bekanntlich kommt es durch diese zu einer ausgeprägten konformationellen Determinierung von *NANA* und möglicherweise spielt dies eine nicht unbedeutende Rolle bei der Kontaktnahme mit dem Enzym. Man kann an Hand von *Dreiding*-Modellen leicht feststellen, daß bei Verbindung **7** mit ihren beiden umgekehrten Chiralitätszentren C-7 und C-8 durch eine einfache Rotation um die Bindungen C-6—C-7 und C-7—C-8 eine Anordnung der Seitenkette verwirklicht werden kann, bei welcher nahezu dieselben internen H-Brücken zustandekommen können, wie bei *NANA* selbst.

Dank

Der Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (A-1090 Wien) ermöglichte diese Arbeit im Rahmen des Projektes 5202. Dem Fonds danken wir auch für die Förderung im Rahmen des Projektes 4009. Für die Überlassung von Meconium sind wir der I. Universitäts-Frauenklinik (Vorstand: Prof. Dr. E. Gitsch) und der II. Universitäts-Frauenklinik (Vorstand: Prof. Dr. H. Janisch), sowie der Ignaz-Semmelweis-Frauenklinik (Vorstand: Prim. Dr. A. Rockenschaub) zu Dank verpflichtet.

Für die Beratung und Hilfe bei der Mitteldruckchromatographie sowie bei den enzymatischen Untersuchungen danken wir Herrn R. Christian (Sandoz-Forschungsinstitut, 1230 Wien) aufrichtig.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden auf einem *Kofler*-Apparat (Thermometerablesung) bestimmt und sind unkorrigiert. Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Fertigplatten mit Kieselgel 60 F₂₅₄ der Fa. Merck verwendet. Die

Sichtbarmachung der Substanzen erfolgte unter der UV-Lampe (254 nm) und durch Besprühen mit 2% $\text{Ce}(\text{NO}_3)_4$ -Lösung in $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ und anschließendes Verkohlen auf einer Heizplatte. Die Säulenchromatographie unter Normaldruck wurde mit Kieselgel (Korngröße 0,063 – 0,200 nm) durchgeführt. Die 250-MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden mit einem WM-250-Gerät der Fa. Bruker aufgenommen; als Lösungsmittel diente CDCl_3 , als innerer Standard *TMS*. Die chemischen Verschiebungen werden in ppm, die Kopplungskonstanten (*J*) in Hertz angegeben. Die Massenspektren wurden auf einem Spektrometer Varian CH-7 aufgenommen.

N-Acetyl-*D*-neuraminsäure wurde nach leicht modifizierten Angaben nach Lit.¹² aus Meconium isoliert und aus Wasser-Methanol-Ethylether (10 : 110 : 380) umkristallisiert.

Darstellung der Verbindungen **2 a** und **3 a**

0,1 mmol Epoxid **1 b** (Lit.¹) wurde mit 5 ml 80% Essigsäure 1 h auf 100 °C erhitzt. Anschließend wurde i. Vak. das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand mit 1 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid 16 h bei Raumtemp. belassen. Das überschüssige Acetanhydrid und Pyridin wurde im Hg-Vakuum unter Vorschaltung einer Kältefalle entfernt. Das Reaktionsgemisch wurde durch Chromatographie über Kieselgel mit Essigester/Dichlormethan 3 : 1 getrennt. **2 a**: $R_F = 0,24$, **3 a**: $R_F = 0,34$.

Methyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-5-acetylamino-3,5-didesoxy-β-L-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (2 a)

Ausb. 34,5 mg (68,4%). $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 1,9, 2,05, 2,06, 2,11$ und $2,18$ (5 s, je 3 H, COCH_3), 1,91 (dd, 1 H, 3- H_{ax}), 2,64 (dd, 1 H, 3- H_{eq}), 3,35 (s, 3 H, OCH_3), 3,84 (s, 3 H, COOCH_3), 3,91 (dd, 1 H, 6-H), 4,20 (ddd, 1 H, 5-H), 4,46 (ABX-System, 2 H, 9-H), 5,26 (dd, 1 H, 7-H), 5,27 (ddd, 1 H, 4-H), 5,37 (d, 1 H, NH), 5,47 (ddd, 1 H, 8-H). $J_{3ax,3eq} = 13,4$ Hz, $J_{3ax,4} = 10,5$ Hz, $J_{3eq,4} = 5$ Hz, $J_{4,5} = 10,5$ Hz, $J_{5,NH} = 9,5$ Hz, $J_{5,6} = 10$ Hz, $J_{6,7} = 2$ Hz, $J_{7,8} = 6,7$ Hz, $J_{8,9} = 4,2$ Hz, $J_{8,9'} = 6,5$ Hz.

$\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{NO}_{13}$ (505,47). Ber. C 49,90 H 6,18 N 2,77.
Gef. C 50,33 H 6,19 N 2,74.

Methyl-5-acetylamino-3,5-didesoxy-β-L-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (2 b)

(Zemplen-Verseifung von **2 a**):

83 mg (0,16 mmol) **2 a** wurden mit 0,04 mmol CH_3ONa in 5 ml CH_3OH 1 h bei Raumtemp. gerührt, danach wurde etwas festes CO_2 zugegeben, der Niederschlag abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Die Substanz wurde 6 h im Hg-Vakuum bei 45 °C getrocknet. Ausb. 54 mg (98%).

Methyl-5-acetylamino-4,9-bis-O-(t-butylidimethylsilyl)-3,5-didesoxy-β-L-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (2 c)

54 mg (0,16 mmol) **2 b** wurden analog Lit.¹⁰ bei 0 °C mit 1,2 ml einer Lösung von 409 mg (6 mmol) Imidazol und 452 mg (3 mmol) *t*-Butyldimethylchlorsilan in 10 ml *DMF* versetzt. Die Lösung wurde 16 h gerührt und dabei auf Raumtemp. gebracht. Nach Entfernen des *DMF* im Hg-Vakuum wurde der Rückstand über 10 g Kieselgel mit Petrolether/Essigester 2 : 1 ($R_F = 0,14$) chromatographiert. Ausb. 47 mg (52%).

Methyl-5-acetylamino-4,9-bis-O-(t-butyl dimethylsilyl)-3,5-didesoxy-8-O-tosyl-β-L-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (2d)

Zu einer Lösung von 47 mg (0,09 mmol) **2c** in 0,5 ml Pyridin und Molsieb 4 Å wurde unter Eiskühlung 0,25 ml einer Lösung von 64 mg Toluolsulfonsäurechlorid in 2 ml Pyridin, welche 3 h über Molsieb 4 Å gerührt wurde, zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 4 Tage bei + 4 °C belassen. Dann wurde das Pyridin unter Vorschaltung einer Kältefalle bei 0,01 Torr entfernt und der Rückstand über 4 g Kieselgel mit Petrolether/Essigester 3 : 1 als Laufmittel chromatographiert. DC: Petrolether/Essigester 2 : 1. **2c**: $R_F = 0,14$, **2d**: $R_F = 0,55$. Ausb. 3 mg (5%). ¹H-NMR: $\delta = -0,90$, $-0,94$, $0,08$ und $0,14$ (4 s, je 3 H, SiCH₃), $0,76$ und $0,87$ [2 s, je 9 H, SiC(CH₃)₃], $1,75$ (dd, 1 H, 3-H_{ax}), $2,05$ (s, 3 H, COCH₃), $2,35$ (dd, 1 H, 3-H_{eq}), $2,45$ (s, 3 H, CH₃-Ar), $3,29$ (s, 3 H, OCH₃), $3,78$ (s, 3 H, COOCH₃), $3,83$ (dd, 1 H, 6-H), $3,87$ (ddd, 1 H, 5-H), $4,05$ (ABX-System, 2 H, 9-H), $4,14$ (ddd, 1 H, 4-H), $4,67$ (dd, 1 H, 7-H), $4,73$ (ddd, 1 H, 8-H), $5,32$ (d, 1 H, N-H), $7,29$ (m, 3 H, Ar), $7,81$ (d, 2 H, Ar). $J_{3ax,3eq} = -12,5$ Hz, $J_{3ax,4} = 10,5$ Hz, $J_{3eq,4} = 4,2$ Hz, $J_{4,5} = 10,5$ Hz, $J_{5NH} = 9,5$ Hz, $J_{5,6} = 10,5$ Hz, $J_{6,7} = 1,5$ Hz, $J_{7,8} = 6,2$ Hz, $J_{8,9} = 6,5$ Hz, $J_{8,9'} = 2$ Hz. MS (150°, 70 eV) gef.: 662 [719-57 = (M⁺-tert. Butyl)].

Verbindung **2d** konnte nun durch Umsetzen mit CH₃ONa in Methanol bei Raumtemp. in einer Stunde quantitativ in **1** übergeführt werden. Dies folgt aus der Identität der 250-MHz-PMR-Spektren.

Methyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-5-acetylamino-3,5-didesoxy-β-D-glycero-L-altro-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (3a)

Ausb. 11,6 mg (23%). DC (Essigester/Dichlormethan 3 : 1. **2a**: $R_F = 0,24$, **3a**: $R_F = 0,34$. Schmp. 120–123 °C (aus Petrolether). ¹H-NMR: $\delta = 1,90$ (dd, 1 H, 3-H_{ax}), $1,98$, $2,02$, $2,05$, $2,11$ und $2,13$ (5 s, je 3 H, COCH₃), $2,35$ (dd, 1 H, 3-H_{eq}), $3,19$ (s, 3 H, OCH₃), $3,72$ (dd, 1 H, 6-H), $3,82$ (s, 3 H, COOCH₃), $4,24$ (ddd, 1 H, 5-H), $4,29$ (d, 2 H, 9-H), $5,13$ (dd, 1 H, 7-H), $5,19$ (ddd, 1 H, 4-H), $5,68$ (d, 1 H, N-H), $5,79$ (ddd, 1 H, 8-H). $J_{3ax,3eq} > -12,6$ Hz, $J_{3ax,4} = 10,8$ Hz, $J_{3eq,4} = 4,8$ Hz, $J_{4,5} = 10$ Hz, $J_{5NH} = 9$ Hz, $J_{5,6} = 10$ Hz, $J_{6,7} = 1,8$ Hz, $J_{7,8} = 3,6$ Hz, $J_{8,9} = 5,4$ Hz, $J_{8,9'} = 5,4$ Hz, $J_{9,9'}$ nicht bestimmbar.

C₂₁H₃₁NO₁₃ (505,47). Ber. C 49,90 H 6,18 N 2,77.

Gef. C 49,30 H 6,41 N 2,86.

Die Darstellung von 4a, 4b bzw. 5a und 5b

erfolgte analog Lit.¹ **4a** und **5a** wurden nicht isoliert, sondern gleich in **4b** und **5b** umgewandelt.

Methyl-9-O-acetyl-5-acetylamino-7,8-anhydro-4-O-(tert.-butyl dimethylsilyl)-3,5-didesoxy-β-L-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (4b)

Aus 150 mg (0,27 mmol) **4** erhält man 90 mg (71%) **4b**. ¹H-NMR: $\delta = 0,02$ [s, 6 H, Si(CH₃)₂], $0,82$ [s, 9 H, SiC(CH₃)₃], $1,72$ (dd, 1 H, 3-H_{ax}), $1,98$ und $2,06$ (2 s, je 3 H, COCH₃), $2,23$ (dd, 1 H, 3-H_{eq}), $3,07$ – $3,25$ (m, 3 H, 6-H, 7-H, 8-H), $3,16$ (s, 3 H, OCH₃), $3,7$ (ddd und dd, 2 H, 5-H und 9-H), $3,75$ (s, 3 H, COOCH₃), $4,0$ (ddd, 1 H, 4-H), $4,41$ (dd, 1 H, 9-H), $5,54$ (d, 1 H, H-N). $J_{3ax,3eq} = -12,6$ Hz, $J_{3ax,4} = 10,8$ Hz, $J_{3eq,4} = 5,4$ Hz, $J_{4,5} = 9$ Hz, $J_{5NH} = 8$ Hz, $J_{5,6} = 9$ Hz, $J_{6,7}$ und $J_{7,8} =$ nicht meßbar, $J_{8,9} = 1,8$ Hz, $J_{8,9'} = 6,5$ Hz, $J_{9,9'} = -12$ Hz.

Die Acetolyse von **4b** führte zu **6a**, dem in ganz geringer Menge **7a** beigemischt war. Die Identität von **6a** ergab sich aus dem Vergleich des 250-MHz-

PMR-Spektrums mit dem des Methyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-5-acetylamino-3,5-didesoxy-*D*-glycero- β -*D*-galacto-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (**6a**).

¹H-NMR: $\delta = 1,82, 2,01, 2,04, 2,07$ und $2,15$ (5 s, je 3 H, COCH₃), $1,82$ (dd, 1 H, 3-H_{ax}), $2,40$ (dd, 1 H, 3-H_{eq}), $3,24$ (s, 3 H, OCH₃), $3,75$ (s, 3 H, COOCH₃), $3,93$ (dd, 1 H, 6-H), $4,14$ (ddd, 1 H, 5-H), $4,12$ (dd, 1 H, 9-H), $4,81$ (dd, 1 H, 9-H), $5,23$ (ddd, 1 H, 8-H), $5,25$ (ddd, 1 H, 4-H), $5,34$ (d, 1 H, N-H), $5,41$ (dd, 1 H, 7-H). $J_{3ax,3eq} = -12,6$ Hz, $J_{3ax,4} = 10,6$ Hz, $J_{3eq,4} = 5,3$ Hz, $J_{4,5} = 10,0$ Hz, $J_{5,NH} = 10,0$ Hz, $J_{5,6} = 10,6$ Hz, $J_{6,7} = 2,6$ Hz, $J_{7,8} = 4,0$ Hz, $J_{8,9} = 8,0$ Hz, $J_{8,9'} = 2,7$ Hz, $J_{9,9'} = -12,7$ Hz.

Methyl-9-O-acetyl-5-acetylamino-7,8-anhydro-4-O-(tert. butyldimethylsilyl)-3,5-didesoxy- β -D-glycero-L-alto-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (5b)

Aus 170 mg (0,3 mmol) **5** erhält man 101 mg (71%) **5b**. ¹H-NMR: $\delta = 0,03$ [s, 6 H, Si(CH₃)₂], $0,83$ [s, 9 H, SiC(CH₃)₃], $1,77$ (dd, 1 H, 3-H_{ax}), $2,0$ und $2,07$ (2 s, je 3 H, COCH₃), $2,24$ (dd, 1 H, 3-H_{eq}), $3,13$ (dd, 1 H, 7-H), $3,17$ (s, 3 H, OCH₃), $3,20-3,33$ (m, 2 H, 6-H, 8-H), $3,78$ (s, 3 H, COOCH₃), $3,83$ (dd, 1 H, 9-H), $3,87-4,0$ (m, 2 H, 4-H, 5-H), $4,52$ (dd, 1 H, 9-H), $5,19$ (d, 1 H, N-H). $J_{3ax,3eq} = -12,7$ Hz, $J_{3ax,4} = 10$ Hz, $J_{3eq,4} = 4,1$ Hz, $J_{5,NH} = 8,3$ Hz, $J_{5,6}$ = nicht meßbar, $J_{6,7} = 4,5$ Hz, $J_{7,8} = 2,2$ Hz, $J_{8,9} = 6,8$ Hz, $J_{8,9'} = 2,7$ Hz, $J_{9,9'} = -11,3$ Hz.

Die Acetolyse (analog zu **2b**) von **5b** ergab als Hauptmenge **7a** und als Nebenprodukt **6a***. **6a** und **7a** konnten durch Chromatographie über die 150fache Menge Kieselgel mit Ameisensäureethylester/Dichlormethan 2:1 getrennt werden. Die R_F -Werte der beiden Verbindungen unterscheiden sich kaum! **6a**: $R_F = 0,29$, **7a**: $R_F = 0,31$.

Methyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-5-acetylamino-3,5-didesoxy- β -L-glycero-L-alto-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (7a)

¹H-NMR: $\delta = 1,89$ (dd, 1 H, 3-H_{ax}), $2,0, 2,03, 2,06, 2,10$ und $2,13$ (5 s, je 3 H, COCH₃), $2,36$ (dd, 1 H, 3-H_{eq}), $3,23$ (s, 3 H, OCH₃), $3,74$ (dd, 1 H, 6-H), $3,80$ (s, 3 H, COOCH₃), $4,14$ (ddd, 1 H, 5-H), $4,24$ (dd, 1 H, 9-H), $4,66$ (dd, 1 H, 9-H), $5,23$ (ddd, 1 H, 4-H), $5,30$ (dd, 1 H, 7-H), $5,47$ (ddd, 1 H, 8-H), $5,76$ (d, 1 H, N-H). $J_{3ax,3eq} = -12,8$ Hz, $J_{3ax,4} = 10,5$ Hz, $J_{3eq,4} = 4,9$ Hz, $J_{4,5} = 10$ Hz, $J_{5,NH} = 9,5$ Hz, $J_{5,6} = 11$ Hz, $J_{6,7} = 1,8$ Hz, $J_{7,8} = 5,2$ Hz, $J_{8,9} = 2,2$ Hz, $J_{8,9'} = 7,0$ Hz, $J_{9,9'} = -12,2$ Hz.

C₂₁H₃₁NO₁₃ (505,47). Ber. C 49,90 H 6,18 N 2,77.
Gef. C 49,42 H 6,12 N 2,93.

Die Darstellung der freien N-Acetylneuraminsäure-Stereoanalogen 2, 3 und 7

15–30 mg Verbindung **2a**, **3a** oder **7a** wurden mit 0,5 ml 1N NaOH 2 h bei 40 °C gerührt, anschließend entfernt man die Na⁺ Ionen mit einem Kationenaustauscher (Dowex 50H⁺) und bringt die Lösung i. Vak. zur Trockene. Der Rückstand wurde in 15 ml 0,025 ml HCl aufgenommen und in Gegenwart von 0,12 g Dowex 50H⁺ 100 min auf 80 °C erhitzt. Nachdem man den Austauscher abfiltriert hat, wurde die Lösung auf ca. 10 g Dowex 2 \times 8 (100 mesh, in HCOO⁻form, Säule 300 mm \times 10 mm) aufgetragen und mit einem Gradienten von 0–2N HCOOH eluiert. (Eventuell noch vorhandenes Methylketosid kommt

* In einem Fall isolierten wir fast ausschließlich **7a**, in einem weiteren Fall traten ungefähr 25% Nebenprodukt **6a** auf.

nach den gewünschten Verbindungen **2**, **3** und **7** aus der Säule.) DC: Kieselgelplatten mit *n*-Propanol/Wasser/Eisessig = 15 : 4 : 0,5. Anfärben mit *Bial*'s Reagens/Ethanol 3 : 1 und Erwärmen auf 140°, wobei die DC-Platte mit einer Glasplatte abgedeckt wurde. Die freien Verbindungen zeigen einen R_F -Wert bei ca. 0,1; während die entsprechenden nichtgespaltenen Methylketoside ungefähr bei R_F = 0,2 liegen. Ausb. ca. 80%.

Aktivierungsversuche an 7-epi-, 8-epi-, 7,8-, bis-epi''-NANA

(vgl. Übersicht über Aktivierung von *NANA* in Lit.^{2a} 203 ff.).

Die Preparation der CMP-Neu Ac-Synthetase erfolgte nach Lit.¹³ aus Rattenleber. Die Chromatographie über *DEAE*-Cellulose entfiel.

Die Aktivitätstests erfolgten analog Lit.¹⁴. Es wurde sowohl die Abhängigkeit der *CMP-Neu Ac*-Bildung von der Enzymkonzentration (Serie a) als auch von der Inkubationszeit (Serie b) bestimmt.

Serie a) 20 μ l 1 *M* Tris(hydroxymethyl)aminomethan · HCl *pH* = 8,5; 20 μ l 0,25 *M* Mg(CH₃COO)₂; 20 μ l 0,125 *M* 2-Mercaptoethanol; 20 μ l 25 mmol *CTP*; 100 μ l 5 mmol *N*-Acetylneuraminsäure bzw. das Na-Salz von Verbindung **3** oder **7** und 20 μ l, 40 μ l, 60 μ l und 80 μ l Enzym. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C wurde auf 0°C abgekühlt und 20 min mit 100 μ l (1,6 *M* NaBH₄ in 1 mmol NaOH) belassen; 10 min bei 37°C mit 10 μ l 20 *NH*₃PO₄; 10 min bei 20°C mit 100 μ l (0,2 *M* NaIO₃ in 9 *M* H₃PO₄), diese Zeit und Temp. muß genau eingehalten werden; 3 min bei 37°C mit 1 ml (0,19 *M* Na-Arsenit, 0,56 *M* Na₂SO₄ in 2,3 *N* H₂SO₄); 1,5 ml 1 *M* Na₂SO₄-Lösung und 15 min bei 100°C mit 1,5 ml (1,2% Thiobarbitursäure in 80 mmol NaOH) behandelt. Nach dem Abkühlen wurde jeweils 2 ml Cyclohexanon zugegeben, 2mal in einer Schüttelapparatur (Vortex) geschüttelt und dann 3 min bei 2 000 vpm zentrifugiert. Die Cyclohexanonphase wurde nun bei 550 nm vermessen.

Serie b) wurde analog durchgeführt: 100 μ l *N*-acetylneuraminsäure, bzw. das Na-Salz von **3** oder **7** wurden mit 50 μ l Enzym 20, 40, 60 bzw. 120 min inkubiert.

μ l Enzym	OD <i>NANA</i>	OD 3	OD 7
20	0,298	0,087	0,108
40	0,374	0,133	0,121
60	0,610	0,164	0,182
80	0,541	0,179	—
Zeit (min)			
20	0,255	0,088	0,118
40	0,259	0,099	0,132
60	0,420	0,122	0,248
120	1,040	0,208	0,261

Die Blindwerte enthielten alle Komponenten jedoch ohne *NANA*, **3** oder **7**. Verbindung **2** gab keinen positiven Test. Meßgenauigkeit \pm 20%.

Literatur

- ¹ 2. Mitt.: *Brandstetter H., Zbiral E.*, Liebigs Ann. Chem. **1983**, 2055.
- ² Cell Biology Monographs, Vol. 10; Sialic Acids, Chemistry, Metabolism and Functions (*Schauer R.*, Hrsg.). Wien-New York: Springer. 1982. 2 a) *ibid.* S. 203 ff.
- ³ *Schauer R.*, Advances in Carbohydr. Chem. Biochem. **40**, 132 (1982).
- ⁴ *Svennerholm L.*, in: Structure and Functions of Gangliosides (*Svennerholm L., Mandel P., Dreyfus H., Urban P. F.*, Hrsg.), 533–544. New York: Plenum Press. 1980.
- ⁵ *Brossmer R., Rose U., Kasper D., Smith T. L., Grasmuck H., Unger F. M.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. **1980**, 1282.
- ⁶ *Sharma M., Korytnyk W.*, J. Carbohydr. Chem. **1**, 311 (1982–1983).
- ⁷ *Gross H. J., Bunsch A., Brossmer R.*, in: Carbohydrates 1984, Abstracts of the XIIth International Carbohydrate Symposium, Utrecht, NL, S. 223.
- ⁸ *Payne G. B.*, J. Org. Chem. **1926**, 27, 3819.
- ⁹ *Katsuki T., Lee A. W. M., Ma P., Morten V. S., Masamune S., Sharpless K. B., Tuddenham D., Walker F. J.*, J. Org. Chem. **47**, 1373 (1982).
- ^{9a} *Roush W. R., Brown J. R., DiMare M.*, J. Org. Chem. **48**, 5083 (1983).
- ¹⁰ *Brandstetter H. H., Zbiral E.*, Liebigs Ann. Chem. **1982**, 1.
- ¹¹ *Schauer R., Buscher H. P.*, Biochim. Biophys. Acta **338**, 369 (1974).
- ¹² *Zilliken F., O'Brien P. J.*, Biochem. Prep. **7**, 1 (1960).
- ¹³ a) *Hickman J., Ashwell G., Morell A. G., Van den Jamer C. J. A., Scheinberg J. H.*, J. Biol. Chem. **245**, 759 (1970); b) *Liu C. K., Schmied R., Greenspan E. M., Waksman S.*, Biochim. Biophys. Acta **522**, 375 (1978).
- ¹⁴ a) *Warren L., Blacklow R. S.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **7**, 433 (1962); b) *Warren L., Blacklow R. S.*, J. Biol. Chem. **237**, 3527 (1962); c) *ibid.* **234**, 1971 (1959).