

Strukturelle Abwandlungen an N-Acetylneuraminsäure, 25. Mitt. [1]: Synthese von Methyl-2- α -glycosiden von 4-epi-, 7-epi-, 8-epi- und 7,8-bis-epi-N-Acetylneuraminsäure**

B. P. Bandgar* und E. Zbiral***

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

Structural Transformations of N-Acetylneuraminic Acid, XXV: Synthesis of Methyl-2- α -glycosides of 4-Epi-, 7-Epi-, 8-Epi-, and 7,8-Bis-epi-N-acetylneuraminic Acid

Abstract. The α -methylketoside of N-acetylneuraminic acid methylester (**4**) is transformed via the deacetylated compound **5** into the 9,8-O-isopropylidenderivative **6** which could be oxidized regioselectively by RuO₄ to the corresponding 4-oxo-sialic acid analogue **7**. Reduction with the borane-ammonia complex produces a 1 : 1 mixture of **6** and the desired α -methylketoside of 9,8-O-isopropyliden-4-epi-N-acetylneuraminic acid methylester (**8**). Removing of the isopropylidene group gives the α -methylketoside of 4-epi-N-acetylneuraminic acid methylester (**9**), which was further transformed to the ammonium salt of 4-epi-N-acetylneuraminic acid α -methylketoside (**10**). On the other hand compound **5** was turned into the 4,8,9-tri-O-t-butylidimethylsilyl derivative **11 a** from which the corresponding 7-oxo-compound **12** by oxidation with RuO₄ derives. The reduction of **12** with BH₃ – NH₃ yielded a 1 : 1 mixture of the starting material **11 a** and the desired 7-epi-derivative **13 a** which gives either via the purified peracetylated α -methylketosid of 7-epi-N-acetylneuraminic acid methylester (**14**) or a direct saponification the sodium salt of 7-epi-N-acetylneuraminic acid- α -methylketoside (**15**).

Applying the Königs-Knorr procedure to the peracetylated 8-epi-N-acetylneuraminic acid methylester (**16**) gives rise to the formation of a 1 : 1 mixture of the corresponding α - and β -methylketosides **17** and **18** besides traces of the corresponding 2,3-dideoxy-2,3-dideohydro-sialic acid derivative **19**. After chromatographic separation of **17** further saponification leads to the sodium salt of 8-epi-N-acetylneuraminic acid- α -methylketoside (**20**). In an analogous procedure the sodium salt of 7,8-di-epi-N-acetylneuraminic acid- α -methylketoside (**25**) was prepared starting from the peracetylated 7,8-di-epi-N-acetylneuraminic acid methylester (**21**), whereby a mixture of the α - and β -methylketosides **22** and **23** was formed in a ratio 95 : 5 besides traces of the peracetylated 2,3-dideoxy-2,3-dideohydro-sialic acid methylester (**24**).

Keywords. Sialic acid analogues; Methyl- α -ketosides of sialic acid analogues.

** Herrn Prof. Fleischhacker mit den besten Wünschen zum 60. Geburtstag gewidmet

*** On study leave from the Department of Chemistry, Postgraduate and Research Center, R.B.N.B. College, Shrirampur-413709 (MS), India

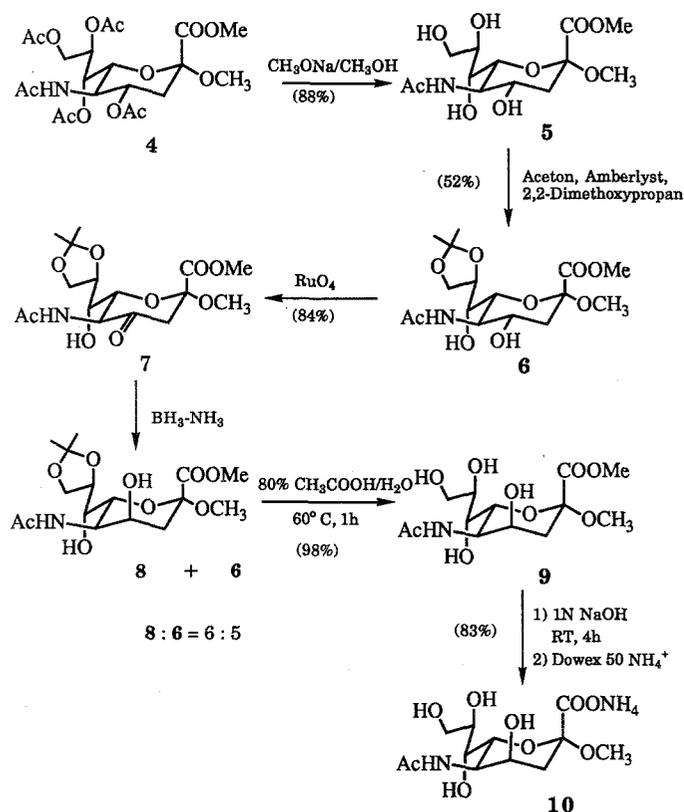
Einleitung

Neu5Ac und viele verschiedenartigste, natürlich vorkommende Derivate, die sogenannten Sialinsäuren, spielen als terminale Komponenten von Glykoproteinen und Glykolipiden eine überragende Rolle bei vielen biochemisch und biologischen Prozessen [2, 3]. Diese Erkenntnis hat in den letzten Jahren dazu geführt, viele artifizielle, zu Neu5Ac analoge Strukturen herzustellen und ihr Verhalten gegenüber den Enzymen des Sialinsäuremetabolismus zu studieren. Dabei konnte eine Reihe wichtiger und funktioneller Parameter der Struktur-Wechselwirkungsbeziehungen für CMP-Sialatsynthase [4–7], Acylneuraminatlyase [8–11] und Sialidasen [12] ermittelt werden. Unter den pathobiochemischen Erscheinungsbildern hat vor allem eine erhöhte Aufmerksamkeit erfahren: die erste Kontaktnahme von Influenza-Viren mittels ihrer Hämagglutinin-Hüllproteine mit den terminalen Sialinsäureestern von attackierten Wirtszellen [13, 14]. Hier wurden in jüngster Zeit anhand einer wesentlichen Modellstudie, nämlich einer Röntgenstruktur-Analyse des 2- α -Syalosyllactose-Hämagglutinin (HX31)-Komplexes interessante Detailinformationen über die Positionen und Abstände der einzelnen funktionellen Gruppen der Sialinsäurekomponente gewonnen [15, 16]. Sie waren der Anlaß, verschiedene Sialinsäureanaloge herzustellen, um weitere Einblicke in die Art der Sialinsäure-Hämagglutinin-Interaktion zu gewinnen. Die Tatsache, daß die Struktur des α -glykosidisch gebundenen Restes eher unbedeutend für den Erkennungsprozeß ist, wird durch eine Serie von vermessenen Inhibitionskonstanten inklusive dem Methyl-2- α -Sialosylglykosid illustriert [17]. Sogar der Austausch des α -glykosidischen Restes durch Wasserstoff behindert den Erkennungsprozeß nicht merklich [18].

Ergebnisse und Diskussion

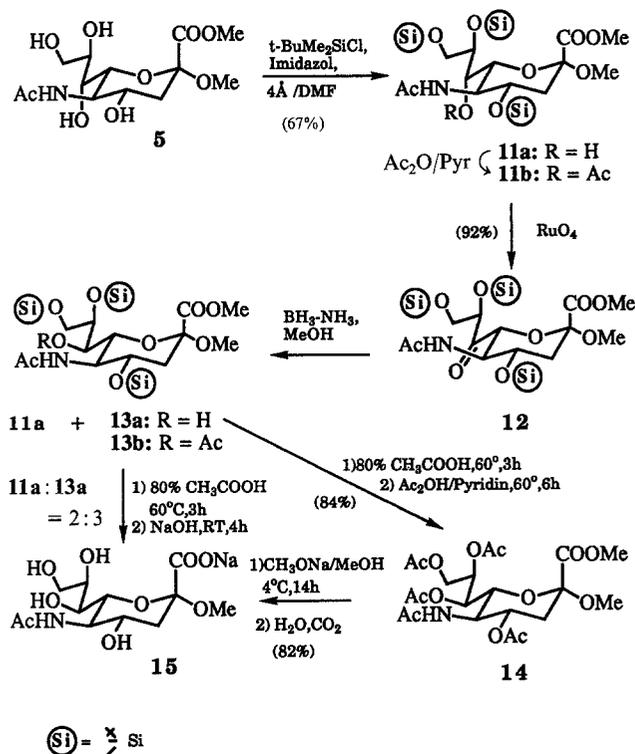
Wir beschlossen daher in Verfolgung des oben erwähnten Programms sowohl verschiedene Stereo- und Deoxy-Analoge zu 2-Desoxy-2H_{eq}-N-acetylneuraminsäure als auch entsprechende 2- α -Methylglykoside herzustellen. Erst kürzlich berichteten wir über Synthesen der ersten Gruppe [19]. In der nun vorliegenden Arbeit berichten wir über die Darstellung der dem Titel zu entnehmenden Analogen zu 2- α -Methyl-N-acetylneuraminsäure [20]. Es stellte sich im Verlauf dieses Vorhabens alsbald heraus, daß für die Herstellung dieser Verbindungen das Königs-Knorr-Verfahren, wie es für die Darstellung von 2- α -Me-Neu5Ac erfolgreich angewendet wurde [19], nicht immer die Methode der Wahl ist. Man muß hier sogar 2- α -Me-Neu5Ac als Startmaterial für mehrstufige Sequenzen zu den Zielverbindungen einsetzen. Einige interessante zusätzliche Beobachtungen, die wir dabei machten, sollen ebenso in diesem Beitrag berichtet werden.

Im Schema 1 sind die einzelnen Schritte zur Herstellung des Ammoniumsalzes des 2- α -Methylglycosids von 4-epi-N-acetylneuraminsäure (**10**) zusammengefaßt. Zunächst wird über die Sequenz N-Acetylneuraminsäure (**1**) (aus Schwalbennestern [20] → N-Acetylneuraminsäuremethylester (**2**) [21] → Neu(4,5,7,8,9)Ac₅-2 Cl-Neuraminsäuremethylester (**3**) [18] → (4,5,7,8,9)Ac₅-Neuraminsäuremethylester-2- α -methylglycosid (**4**) [22] in der abschließenden Zemplen Verseifung das Startmaterial **5** erreicht. Daraus wird das 9,8-O-Isopropylidenderivat in Analogie zum Herstellungsverfahren für das anomere β -Methylketosid [24] hergestellt. Die selektive an der Position **4** stattfindende, zum Derivat **7** führende Oxidation konnte aufgrund



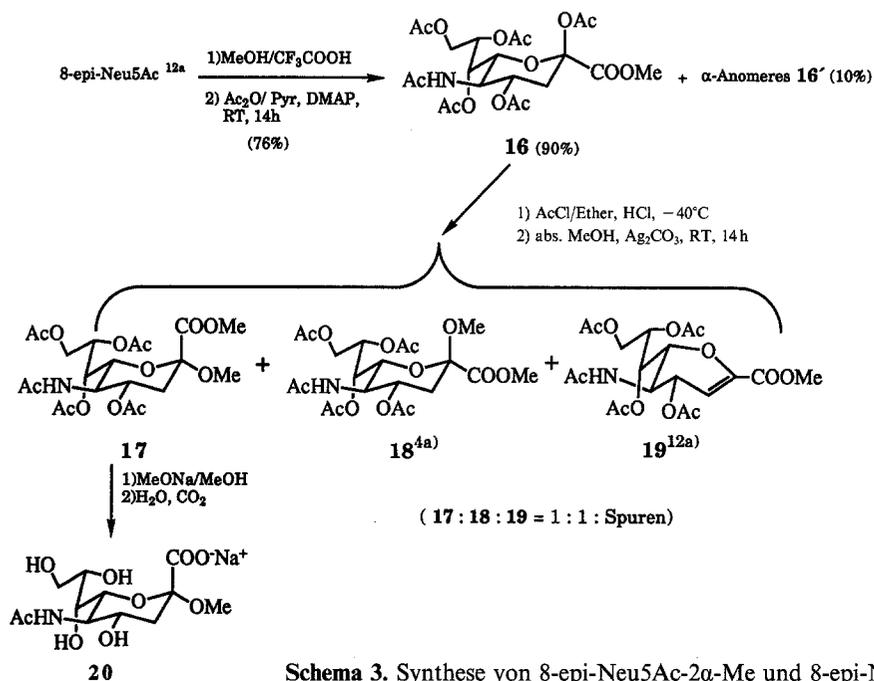
Schema 1. a) Synthese von 4-epi-Neu5Ac-2 α -Me. b) Die, von N-Acetylneuraminsäure 1 ausgehend, zu 4 führenden Schritte sind übersichtlich im exp. Teil beschrieben

der Kenntnis über die starke Behinderung [24, 25] der Position 7 erwartet werden. Bemerkenswert wenig stereoselektiv gesteuert verläuft die Reduktion mit $\text{BH}_3 \cdot \text{NH}_3$. Dabei wird die Vorstufe 6 und das gewünschte 4-epi-Derivat 8 in vergleichbaren Mengen gebildet. Nach chromatographischer Abtrennung von 8 erfolgte zunächst unter Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppe die zu 9 führende Weiterreaktion und in der abschließenden Verseifungsreaktion die Umwandlung zum Endprodukt 10. Im Gegensatz zur eben referierten Umsetzung mit $\text{BH}_3 \cdot \text{NH}_3$ führt die Reduktion des zu 7 analogen β -Methylketosids fast ausschließlich zum entsprechenden 4-epi-Derivat [26]. Weitere Erörterungen sollen weiter unten bei der Zusammenschau mit anderen vergleichbaren Befunden angestellt werden. Beim Versuch, das 2-Chlorderivat aus peracetylierter 7-epi-Neuraminsäure [12 a, 27] via Königs-Knorr-Reaktion in das entsprechende Methyl-2- α -glykosid umzuwandeln, entstand nur ein Gemisch beider anomeren Methylglykoside (1 : 1) plus Spuren des entsprechenden 2,3-Dideoxy-2,3-Dedehydro-7-S-epi-sialinsäurederivats. Selbst mittels HPLC-Chromatographie konnte keine Auftrennung erreicht werden. Die erfolgreiche Darstellung des Methyl-2- α -glykosids der 7-epi-N-Acetylneuraminsäure in Form des Na-Salzes 15 wurde erst gemäß der dem Schema 2 zu entnehmenden Stufenfolge möglich. Zunächst wird aus 5 das 4,8,9-tri-O-t-butylidimethylsilylderivat 11 a mit freier 7-OH-Gruppe hergestellt, das zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung in das 7-O-Acetylderivat 11 b umgewandelt



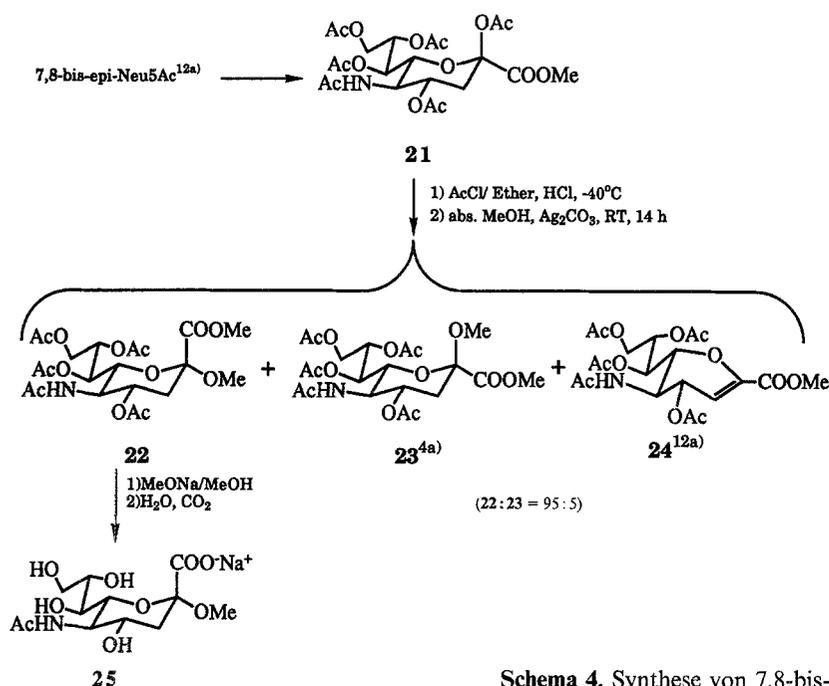
Schema 2. a) Synthese von 7-epi-Neu5Ac-2 α -Me; b) Si \equiv *t*-Butyldimethylsilyl

wurde. Die Oxidation von **11 a** mit RuO₄ zum 7-Oxo-derivat **12** ist trotz starker sterischer Behinderung in homogener Phase in hoher Ausbeute möglich. Die anschließende Reduktion mit BH₃·NH₃ liefert wiederum nur unter geringer diastereoselektiver Steuerung ein Gemisch aus dem gewünschten 7-epi-Derivat **13 a** und der Vorstufe **11 a** im Verhältnis 3 : 2. Die von **13 a** aus zum Endprodukt **15** führenden Schritte liegen auf der Hand.



Schema 3. Synthese von 8-epi-Neu5Ac-2 α -Me und 8-epi-Neu5Ac-2 β -Me

Für die Darstellung des Methyl-2- α -glykosid-Na-Salzes der 8-epi-N-acetylneuraminsäure (**20**) (Schema 3) wurde die Königs-Knorr-Reaktion, analog zum Verfahren von Ogura [23] ausgehend von peracetylierter 8-epi-Neuraminsäuremethylester-1-Me (**14**) [27, 12 a] herangezogen. Aus dem dabei entstehenden Gemisch der Anomeren **17** und **18** [4 a] (1 : 1) plus Spuren von **19** [12 a] ließ sich chromatographisch **17** in reiner Form abtrennen, das schließlich in das gewünschte Endprodukt **20** umgewandelt wurde. Die Herstellung des Na-Salzes des Methyl-2- α -glykosids von 7,8-bis-epi-N-acetylneuraminsäure (**25**) erfolgte, ausgehend von peracetylierter 7,8-bis-epi-N-acetylneuraminsäure [12 a] (7,8-bis-pi-Neu 2,4,5,7,8,9 Ac₆) [4 a] (**21**) (Schema 4). Die Königs-Knorr-Reaktion des daraus hergestellten 2-Cl-Derivats [27] liefert hier dominierend (95%) das entsprechende Methyl-2- α -glykosid **22**, in geringer Menge das Methyl-2 β -glykosid **23** [4 a] (5%) und in Spuren das 2,3-Dideoxy-2,3-dideohydro-7,8-bis-epi-sialinsäurederivat **23** [12 a]. Bei den weiteren Verseifungsreaktionen wurde **21** in **24** umgewandelt.



Schema 4. Synthese von 7,8-bis-epi-Neu5Ac-2 α -Me

Zu der schon oben erwähnten, wenig ausgeprägten diastereoselektiven Reduktion der 4- und 7-Oxogruppe in **4** und **10** seien noch vergleichbare, erst kürzlich publizierte Ergebnisse [19] angeführt. Dort wird ebenso über die nicht diastereoselektive Reduktion von 7- und 8-Oxogruppe in die entsprechenden 2-Deoxy-2 H_{eq}-sialinsäurederivaten mit dem BH₃·NH₃-Komplex berichtet. Dasselbe Verhalten wurde auch für ein entsprechendes 2-Desoxy-2 H_{eq}-4-Oxosialinsäurederivat registriert [29]. Im Gegensatz dazu sei die ausgeprägte selektive Reduktion der 4- [26], 7- [28], und 8-Oxofunktion [26] von Methyl-2 β -Sialinsäurederivaten (mit äquatorial orientierter Estergruppe) in Erinnerung gebracht. Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten bei axial- bzw. äquatorial orientierter Estergruppe dürfte eine koordinative Fixierung von BH₃·NH₃ sein. Im Falle der äquatorialen Ester-

gruppe ist dann der Hydridangriff auf die besagten Carbonylzentren von der α -Seite her vorprogrammiert; er führt jeweils zum Konfigurationswechsel. Bei einem β -orientierten Ester $\cdot\text{BH}_3 \cdot\text{NH}_3$ template wird dann auch der zu den stereochemischen Ausgangsstrukturen zurückführende Hydridtransfer verständlich, zu dem nun offensichtlich auch konkurrierend von der α -Seite her eine Reaktion mit anderen $\text{BH}_3 \cdot\text{NH}_3$ -Molekülen erfolgen kann.

Über die eingangs erwähnten Interaktionen der hier dargestellten 2 α -Methylketoside mit dem Hämagglutinin HX-31 wird demnächst an anderer Stelle berichtet.

Dank

Der Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung (A-1040 Wien, Weyringergasse 35) ermöglichte diese Arbeit im Rahmen der Projekte 6805 und 6537 C. Für die Mitarbeit von Frau Silvia Kotzinger wird bestens gedankt.

Experimenteller Teil

Sämtliche Lösungsmittel wurden unmittelbar vor Gebrauch destilliert. Alle Reaktionen wurden unter Argonschutzgas in mit Gummi-Septa verschlossenen Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Reagenzienzugabe und die Kontrolle des Reaktionsverlaufs erfolgte mittels Injektionsspritzen. Die Reaktionslösungen wurden jeweils im Rotationsverdampfer bei Wasserstrahlvakuum unter 40° eingengt. Imidazol wurde bei 0.01 Torr bei 80° Badtemperatur sublimiert. Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Fertigplatten mit Kieselgel 60F₂₅₄ der Fa. Merck verwendet. Die Detektion erfolgte einerseits durch Fluoreszenzlöschung unter der UV-Lampe bei 254 nm, andererseits durch Besprühen mit 2% Cer-IV-nitrat-Lösung in 2 N-Schwefelsäure und anschließender Verkohlung auf einer Heizplatte. Für die Flash-Chromatographie [30] wurde Kieselgel der Korngröße 0.040–0.063 mm verwendet. Die 250-MHz-¹H-Spektren und 62.9-MHz-¹³C-Spektren wurden mit einem WM-Gerät der Fa. Bruker aufgenommen. Als interner Standard diente Tetramethylsilan, bei silylierten Verbindungen Chloroform. Im Falle von Lösungen in D₂O wurde das Natrium-4,4-dimethyl-4-silapentansulfonat (DDS) als innerer Standard verwendet; oder die Spektren wurden mit dem HDO-Signal ($\delta = 4.80$ ppm) korreliert. Allgemeines Verfahren zur Acetylierung [28]: Ungefähr 100 mg des jeweiligen Sialinsäurederivats wurden in 1 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid gelöst. Dazu gab man 5 mg 4-Dimethylaminopyridin (DMAP). Nach 14 h wurde i. Vak. eingedampft und das Rohprodukt, wie jeweils im konkreten Fall angegeben, weiter gereinigt. Zur Herstellung der Lösung von RuO₄ in CHCl₃ gemäß Lit. [31]: Aus Chloroform ca. 100 ml wurde durch zweimaliges Filtrieren über 20 g Al₂O₃ (Merck, 0.063–0.200 mm, Aktivität 1) Ethanol entfernt; RuO₂ · H₂O wurde zusammen mit KIO₄ und K₂CO₃ in Wasser solange gerührt, bis die Farbe sich von schwarz nach tiefgelb umgeschlagen und das ganze Präzipitat verschwunden war. Diese Lösung wurde dreimal mit obigem CHCl₃ extrahiert und zu der kräftig gerührten Lösung des jeweiligen Startmaterials, gelöst in CHCl₃, hinzugefügt.

N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) (1) wurde aus „edible bird's nest“ Glycoprotein (Schwalbenester) hergestellt [21].

Daraus wurde gemäß Lit. [22] der Methylester 2 hergestellt. Die direkte Umwandlung unter Umgehung der bisher üblichen Vorschriften in den peracetylierten 2 Cl-N-Acetylneuraminsäureester (3) erfolgte gemäß Lit. [19]. Daran schloß sich die zum 2 α -Methylketosid führende Königs-Knorr-Reaktion einer Version von Ogura [23] folgend an. Anschließend sei das im g-Maßstab durchgeführte Verfahren wiedergegeben.

Methyl-(methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nomulopyranosid)onat (4)

2.4 g von sorgfältig getrocknetem 2 (2 h, 0.001 Torr, 40°C) wurden mit 37 ml frisch destilliertem Acetylchlorid versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Acetylchlorids i.

Vak. wurde zweimal mit je 20 ml Essigester versetzt und i. Vak. abgedampft. Das resultierende Rohprodukt **3** wurde in 50 ml abs. Methanol gelöst und mit 4.25 g frisch hergestelltem und bei 50° (4 h, 0.001 Torr) getrocknetem Ag_2CO_3 und 3 g fein vermahlenem Molekularsieb (3 Å) versetzt. Unter Lichtausschluß wurde 18 h bei R.T. gerührt. Danach wurde über Celit filtriert und dreimal mit 20 ml CHCl_3 gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. und Flash-Chromatographie [30] resultierten 2.8 g (5.5 mmol, 77%) **4**. Eine kleine Beimengung von peracetylierter 2,3-didehydro-N-acetylneuraminsäure wurde bei der Flash-Chromatographie entfernt. Die NMR-Daten von **4** waren identisch mit den in Lit. [23] angegebenen.

Methyl-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-nonulopyranosid)onat (5)

2.8 g (5.5 mmol) **4** wurde in 30 ml abs. MeOH und 1.66 mmol frisch hergestelltem CH_3ONa in 30 ml Methanol bei 0° vereinigt. Die Reaktionsmischung wurde 14 h bei 0° belassen. Das Ende der Reaktion wurde mittels DC festgestellt (Essigester, R_f von **4**=0.33, R_f von **5**=0.17). Nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. wurde der Rückstand zweimal mit 30 ml abs. Methanol aufgenommen und i. Vak. abgedampft. Dann löste man in 10 ml H_2O und fügte 3 g Amberlyst 15 H^+ zu. Nach Abfiltrieren des Harzes und mehrmaligem Waschen mit H_2O wurde auf 10 ml eingengt und über 10 g Amberlyst 15 H^+ an einer Kolonne (\varnothing = 1 cm) mit 200 ml H_2O weitergereinigt. Nach Entfernung des H_2O i. Vak. wurde der Rückstand 3× mit 10 ml abs. MeOH versetzt, i. Vak. abgedampft und bei 0.01 Torr und bei 40° 2 h getrocknet. Ausbeute an **5** = 1.635 g (4.85 mmol, 88%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$): δ = 1.8 (dd, 1 H, 3- H_{ax}), 2.04 (s, 3 H, N-Ac), 2.68 (dd, 1 H, 3- H_{eq}), 3.38 (s, 3 H, - OCH_3), 3.53–3.85 (s, 7 H, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9 a-, 9 b-H); $J(3_{\text{ax}}, 3_{\text{eq}}) = -13.1$ Hz, $J(3_{\text{ax}}, 4) = 12.1$, $J(3_{\text{eq}}, 4) = 4.1$. $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DDS}$): δ = 26.61 (CO CH_3), 43.35 (3-C), 56.86 (COO CH_3), 67.63 (9-C), 71.66, 72.77, 75.06, 77.35 (4-C, 6-C, 7-C, 8-C), 103.75 (2-C), 174.42 (N-CO- CH_3), 179.48 (-CO- CH_3). MS (70 eV, 140°C): m/z (%) = 322 (1.21) = [M^+ -15]. $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_9$ (337.3). Ber. C 46.25, H 6.82, N 4.14; gef. C 46.27, H 6.79, N 4.11.

Methyl-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-8,9-O-methylethyliden-D-glycero- α -D-galacto-nonulopyranosid)onat (6)

1.45 g (4.3 mmol) **5** in 300 ml abs. Aceton, 10 ml 2,2-Dimethoxypropan und 1.5 g Amberlyst 15 H^+ wurden 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Ende der Reaktion wird mittels DC (Essigester: MeOH; 9 : 1, R_f von **6** = 0.4) festgestellt. Das Harz wird abfiltriert und mehrere Male mit abs. Aceton gewaschen. Entfernung des Lösungsmittels i. Vak., gefolgt von einer Flash-Chromatographie (90 g Kieselgel, Essigester: MeOH, 9 : 1) lieferte 0.84 g (2.23 mmol, 52%) **6**.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3/TMS): δ = 1.37, 1.38 [2 s, 2×3 H, C(CH_3) $_2$], 1.82 (dd, 1 H, 3- H_{ax}), 2.06 (s, 3 H, N-Ac), 2.68 (dd, 1 H, 3- H_{eq}), 3.25 (m, 1 H, 4-OH), 3.38 (s, 3 H, O- CH_3), 3.50 (dd, 1 H, 6-H), 3.59 (ddd, 1 H, 7-H), 3.72 (m, 1 H, 4-H), 3.80 (s, 3 H, -COO CH_3), 3.85 (ddd, 1 H, 5-H), 4.06 (dd, 1 H, 9- H_a), 4.08 (d, 1 H, 7-OH), 4.11 (dd, 1 H, 9- H_b), 4.29 (ddd, 1 H, 8-H), 6.01 (d, 1 H, N-H); $J(e_{\text{ax}}, 3_{\text{eq}}) = -13.0$ Hz, $J(3_{\text{ax}}, 4) = 11.3$, $J(3_{\text{eq}}, 4) = 4.5$, $J(4, \text{OH}) = \text{n.d.}$, $J(4,5) = 10.0$, $J(5, \text{NH}) = 8.0$, $J(5,6) = 10.0$, $J(6, 7) = 1.2$, $J(7,8) = 6.3$, $J(7, \text{OH}) = 6.5$, $J(8, 9_a) = 6.1$, $J(8, 9_b) = 6.5$, $J(9_a, 9_b) = -8.5$. MS (70 eV, 130°C): m/z (%) = 362 (2.18) = [M^+ -15]. $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_9$ (377.3): Ber. C 50.88, H 7.15, N 3.71; gef. C 50.85, H 7.16, N 3.70.

Methyl-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-8,9-O-methylethyliden- α -D-manno-2,4-mondiulopyranosid)onat (7)

1.206 g KIO_4 (5.24 mmol), 0.069 g K_2CO_3 (0.5 mmol) und 0.363 g $\text{RuO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.73 mmol) wurden in 20 ml Wasser aufgelöst. Dann wurde RuO_4 mit 5×10 ml CHCl_3 , gemäß der oben angeführten allgemeinen Prozedur, extrahiert und zu der kräftig gerührten Lösung von 0.792 g (2.1 mmol) **6** in 20 ml CHCl_3 hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde 10 min bei R.T. gerührt und der Fortgang mittels DC (Essigester: MeOH, 9 : 1) registriert. R_f von **6** = 0.4, R_f von **7** = 0.67. Die Entfernung des über-

schüssigen Oxidationsmittels erfolgte durch Zusatz von 0.5 ml Isopropanol unter Fortsetzung des Rührens durch 10 min. Der Niederschlag wurde über Celit filtriert, dreimal mit 20 ml CHCl_3 gewaschen und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Flash-Chromatographie mit Essigester: *MeOH* (9:1) über 60 g Kieselgel lieferte 0.662 g reines **7** (1.76 mmol, 84%) als farblosen Schaum.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3/TMS): $\delta = 1.36, 1.37$ [2 s, 2×3 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1.90 (d, 1 H, 3- H_{ax}), 2.12 (s, 3 H, N-Ac), 2.9 (d, 1 H, 3- H_{eq}), 3.48 (dd, 1 H, 7-H), 3.56 (s, 3 H, OCH_3), 3.66 (dd, 1 H, 6-H), 3.80 (s, 3 H, $-\text{COOCH}_3$), 4.11 (dd, 1 H, 9- H_a), 4.18 (dd, 1 H, 9- H_b), 4.38 (ddd, 1 H, 8-H), 4.78 (dd, 1 H, 5-H), 6.42 (d, 1 H, N-H); $J(3_{\text{ax}}, 3_{\text{eq}}) = -15.5 \text{ Hz}$, $J(8, 9_a) = 5.5$, $J(9_a, 9_b) = -9.0$. MS (70 eV, 130°C): m/z (%) = 375 (0.45) = $[\text{M}^+]$. $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_9$ (375.3). Ber. C 51.16, H 6.66, N 3.73; gef. C 51.18, H 6.65, N 3.70.

Methyl-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-8,9-O-methylethyliden-D-glycero-a-D-talo-nonulopyranosid)onat (8)

Zu 0.662 g (1.76 mmol) **7** in 15 ml abs. *MeOH* (0°C) gab man im Verlauf von 30 min von 111 mg (3.6 mmol) $\text{BH}_3 - \text{NH}_3$. Nach weiteren 20 min Rühren war die Reaktion beendet. (DC, CHCl_3 : Aceton (1:1) R_f von **7** = 0.31, R_f von **8** = 0.24). Nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. wurde mittels Flash-Chromatographie über 40 g Kieselgel gereinigt, Chloroform: Aceton (7:3). Es wurden Fraktionen zu 5 ml gesammelt. Ausbeute: 355 mg **6** (0.94 mmol, 53.4%) und 300 mg **8** (0.80 mmol, 45%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$): $\delta = 1.36, 1.39$ [s, 2×3 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 1.88 (dd, 1 H, 3- H_{ax}), 1.96 (s, 3 H, N-Ac), 2.52 (dd, 1 H, 3- H_{eq}), 3.30 (s, 3 H, $-\text{OCH}_3$), 3.70 (dd, 1 H, 7-H), 3.77 (s, 3 H, $-\text{COOCH}_3$), 3.79 (ddd, 1 H, 8-H), 4.01 (dd, 1 H, 9- H_a), 4.08 (ddd, 1 H, 4-H), 4.13 (dd, 1 H, 9- H_b), 4.22 (dd, 1 H, 6-H), 4.35 (dd, 1 H, 5-H); $J(3_{\text{ax}}, 3_{\text{eq}}) = -14.0 \text{ Hz}$, $J(3_{\text{ax}}, 4) = 2.5$, $J(3_{\text{eq}}, 4) = 3.8$, $J(4, 5) = 5.4$, $J(5, 6) = 11.0$, $J(6, 7) = 1.0$, $J(7, 8) = 5.3$, $J(8, 9_a) = 2.0$, $J(8, 9_b) = 6.1$, $J(9_a, 9_b) = 9.0$. MS (70 eV, 130°C): m/z (%) = 362(2.75) = $[\text{M}^+ - \text{CH}_3]$. $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_9$ (377.3). Ber. C 50.89, H 7.16, N 3.71; gef. C 50.86, H 7.17, N 3.73.

Methyl-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-a-D-talo-nonulopyranosid)onat (9)

40 mg (0.11 mmol) **8** wurden 1 h bei 60° in 4 ml 80% CH_3COOH gerührt. Detektion erfolgte mittels DC (Essigester: *MeOH* (9:1), R_f von **9** = 0.25). Nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. wurde der Rückstand dreimal mit 15 ml abs. *MeOH* aufgenommen und i. Vak. zur Trockene gebracht. Nach weiterem Trocknen (15 min) bei 40° , 0.1 Torr lag die Ausbeute bei 35 mg (0.1 mmol, 97.8%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$): $\delta = 2.04$ (dd, 1 H, 3- H_{ax}), 2.1 (s, 3 H, N-Ac), 2.67 (dd, 1 H, 3- H_{eq}), 3.39 (s, 3 H, $\text{O}-\text{CH}_3$), 3.65 (dd, 1 H, 7-H), 3.75 (ddd, 1 H, 8-H), 3.88–4.04 (m, 5 H, COOCH_3 , 9- H_a , 9- H_b), 4.12 (dd, 1 H, N-H), 4.26 (ddd, 1 H, 4-H), 4.44 (dd, 1 H, 6-H). $J(3_{\text{ax}}, 3_{\text{eq}}) = -14.0 \text{ Hz}$, $J(3_{\text{ax}}, 4) = 2.0$, $J(3_{\text{eq}}, 4) = 3.8$, $J(4, 5) = 2.5$, $J(5, 6) = 11.0$, $J(6, 7) = 2.5$, $J(7, 8) = 6.1$, $J(8, 9_a) = 5.9$, $J(8, 9_b) = 6.0$, $J(9_a, 9_b) = \text{n.d.}$. MS (70 eV, 130°C): m/z (%) = 337 (0.34) = $[\text{M}^+]$. $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_9$ (337.3). Ber. C 46.25, H 6.82, N 4.15; gef. C 46.24, H 6.80, N 4.16.

Ammonium-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-a-D-talo-2-nonulo-pyranosid)onat (10)

35 mg (0.1 mmol) **9** wurden in 3 ml 1 N NaOH 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Fortgang der Reaktion wurde mittels DC verfolgt (1-Propanol: H_2O : Essigsäure = 15:4:0.5, R_f von **11** = 0.1). Die Reaktionsmischung wurde mit Trockeneis neutralisiert und über 5 g Dowex 50 in der NH_4^+ Form in einer Kolonne filtriert. Nach mehrmaligem Waschen mit H_2O wurde i. Vak. auf 5 ml eingengt und lyophilisiert. 30 mg **10** (0.09 mmol, 83.3%).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{HOD}$): $\delta = 1.91$ (dd, 1 H, 3- H_{ax}), 2.1 (s, 3 H, N-Ac), 2.69 (dd, 1 H, 3- H_{eq}), 3.35 (s, 3 H, OCH_3), 3.67 (dd, 1 H, 9- H_a), 3.75 (ddd, 1 H, 8-H), 3.95 (dd, 1 H, 7-H), 4.01 (dd, 1 H, 9- H_b), 4.10 (ddd, 1 H, 5-H), 4.24 (ddd, 1 H, 4-H), 4.44 (dd, 1 H, 6-H); $J(3_{\text{ax}}, 3_{\text{eq}}) = -14.5 \text{ Hz}$, $J(3_{\text{ax}}, 4) = 3.0$, $J(3_{\text{eq}}, 4) = 3.5$, $J(4, 5) = 3.0$, $J(5, 6) = 10.8$, $J(6, 7) = 2.3$, $J(7, 8) = 6.0$, $J(8, 9_a) = 2.0$, $J(8, 9_b) = 2.5$, $J(9_a, 9_b) = 9.0$. $^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DSS}$): $\delta = 24.60$ (COCH_3), 41.59 (3-C),

51.02 (O-CH₃), 53.65 (5-C), 65.39 (9-C), 68.52, 71.35, 72.05, 74.43 (4-C, 6-C, 7-C, 8-C), 101.98 (2-C), 177.08, 177.42 (1-C, N-COCH₃).

Methyl-(methyl-5-acetamido-4,8,9-tri-O-t-butyltrimethylsilyl-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)onat (11 a)

1.045 g (3.1 mmol) **5**, 2.0 g Molekularsieb (4 Å), 2.259 g (3.2 mmol) frisch sublimiertes Imidazol wurden zusammen bei 50° und 0.1 Torr 2 h getrocknet. Dann gab man 30 ml frisch destilliertes abs. DMF mittels Injektionsspritze dazu und rührte die Lösung 30 min bei 0°C. Dann gab man 2.845 g (18.6 mmol) *t*-Butyl-dimethylsilyl-chlorid dazu und hielt die Reaktionsmischung 16 h bei Raumtemperatur. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC verfolgt. Dazu entnahm man mit der Injektionsspritze 0.1 ml Probe, evakuierte bei 50° 15 min lang bei 0.1 Torr, nahm mit 0.1 ml MeOH auf, und prüfte davon die DC. (Petrolether : Essigester = 6 : 1, *R_f* von **11 a** = 0.29). Das Molekularsieb wurde abfiltriert und mit abs. DMF nachgewaschen. Dann entfernte man das DMF i. Vak. (0.1 Torr) und extrahierte 5mal mit 20 ml Ether gegen 10 ml Wasser. Die vereinigten Etherphasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie (PE : EE, 6 : 1) über einer Kieselgelsäule gereinigt. Ausbeute 1.4 g (2.06 mmol, 66.5%) **11 a** als farbloser Schaum.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS): δ = -0.003 (s, 3 × 3 H, 3 × Si-CH₃), 0.010, 0.033, 0.044 (3 s, 3 × 3 H, 3 × Si-CH₃), 0.81, 0.83, 0.84 [3 s, 3 × 9 H, 3 × Si-C(CH₃)₃], 1.76 (dd, 1 H, 3-H_{ax}), 1.93 (s, 3 H, N-Ac), 2.40 (dd, 1 H, 3-H_{eq}), 3.32 (s, 3 H, O-CH₃), 3.74 (s, 3 H, COOCH₃), 3.75-3.87 (m, 7 H, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-H_a, 9-H_b), 5.19 (d, 1 H, N-H); *J* (3_{ax}, 3_{eq}) = -13.1 Hz, *J* (3_{ax}, 4) = 10.6, *J* (3_{eq}, 4) = 4.6, *J* (5, NH) = 8.0. C₃₁H₆₅NO₉Si₃ (679.7). Ber. C 54.73, H 9.56, N 2.06; gef. C 54.75, H 9.52, N 2.07.

Methyl-(methyl-5-acetamido-4,8,9-tri-O-t-butyltrimethylsilyl-7-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero-a-D-galacto-2-nonulopyranosid)onat (11 b)

68 mg (0.1 mmol) **11 a** wurden in 2 ml abs. Pyridin und 2 ml Acetanhydrid plus 10 mg DMAP 6 h bei 60°C gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. (1 Torr) wurde der Rückstand dreimal mit 5 ml Toluol koevaporiert. Danach wurde der Rückstand einer Flash-Chromatographie an Kieselgel (PE : EE, 6 : 1) unterworfen. Ausbeute: 65 mg **11 b** (0.09 mmol, 90%) als farbloser Schaum.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS): δ = -0.038, -0.003, 0.000, 0.011, 0.040, 0.053 (6 s, 6 × 3 H, 6 × Si-CH₃), 0.81, 0.83, 0.85 [3 s, 3 × 9 H, 3 × Si-C(CH₃)₃], 1.60 (dd, 1 H, 3-H_{ax}), 1.88, 2.10 (2 s, 2 × 3 H, 2 × CH₃CO), 2.48 (dd, 1 H, 3-H_{eq}), 2.87 (ddd, 1 H, 5-H), 3.30 (s, 1 H, O-CH₃), 3.55 (dd, 1 H, 9-H_a), 3.80 (s, 3 H, COOCH₃), 3.92 (dd, 1 H, 9-H_b), 4.01 (ddd, 1 H, 8-H), 4.28 (ddd, 1 H, 4-H), 4.35 (dd, 1 H, 6-H), 5.12 (dd, 1 H, 7-H), 5.60 (d, 1 H, N-H). *J* (3_{ax}, 3_{eq}) = -12.6 Hz, *J* (3_{ax}, 4) = 11.2, *J* (3_{eq}, 4) = 4.6, *J* (4, 5) = 10.9, *J* (5, NH) = 7.8, *J* (5, 6) = 10.9, *J* (6, 7) = 1.4, *J* (7, 8) = 4.2, *J* (8, 9_a) = 6.2, *J* (8, 9_b) = 3.6, *J* (9_a, 9_b) = -10.8. C₃₃H₆₇NO₁₀Si₃ (721.7). Ber. C 54.87, H 9.28, N 1.94; gef. C 54.85, H 9.22, N 1.97.

Methyl-(methyl-5-acetamido-4,8,9-tri-O-t-butyltrimethylsilyl-3,5-dideoxy-D-glycero-a-D-galacto-2,7-di-nonulopyranosid)onat (12)

266 mg (2 mmol) RuO₂·H₂O, 25 mg (0.19 mmol) K₂CO₃ und 920 mg (4 mmol) KIO₄ wurden in Wasser bis zur Entstehung einer homogenen gelb gefärbten Phase gerührt, dann 5mal mit 10 ml abs. CHCl₃ extrahiert. Diese Lösung wurde zu der kräftig gerührten Lösung von 680 mg (1 mmol) **11 a** in 10 ml abs. CHCl₃ zugefügt und bis zur Beendigung der Oxidation bei R.T. weitergerührt (1 h). DC (PE : EE, 6 : 1, *R_f* von **12** = 0.19). Dann stoppte man die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Isopropanol unter Fortsetzung des Rührens durch 10 min. Der Niederschlag wurde über Celit abfiltriert und mehrere Male mit CHCl₃ gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer wurde mittels Flash-Chromatographie (Kieselgel, PE : EE, 6 : 1) gereinigt. Ausbeute: 620 mg **12** (0.92 mmol, 91.5%) als farbloser Schaum.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3/TMS): $\delta = -0.008, 0.032, 0.056, 0.064, 0.072, 0.100$ (6 s, $6 \times 3\text{H}$, $6 \times \text{Si}-\text{CH}_3$), 0.84, 0.87, 0.89 [3 s, $3 \times 9\text{H}$, $3 \times \text{Si}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.73 (dd, 1 H, 3- H_{ax}), 1.87 (s, 3 H, N-Ac), 2.56 (dd, 1 H, 3- H_{eq}), 3.35 (s, 3 H, O- CH_3), 3.43 (ddd, 1 H, 5-H), 3.78 (dd, 1 H, 9- H_a), 3.84 (s, 3 H, COOCH_3), 4.04 (dd, 1 H, 9- H_b), 4.19 (ddd, 1 H, 4-H), 4.65 (dd, 1 H, 8-H), 4.78 (d, 1 H, 6-H), 5.49 (d, 1 H, N-H); $J(3_{\text{ax}}, 3_{\text{eq}}) = -12.9\text{ Hz}$, $J(3_{\text{ax}}, 4) = 11.4$, $J(3_{\text{eq}}, 4) = 4.9$, $J(4, 5) = 10.2$, $J(5, \text{NH}) = 7.6$, $J(5, 6) = 10.8$, $J(8, 9_a) = 6.0$, $J(8, 9_b) = 3.6$, $J(9_a, 9_b) = -10.9$. $\text{C}_{31}\text{H}_{63}\text{NO}_9\text{Si}_3$ (677.7). Ber. C 54.89, H 9.30, N 2.07; gef. C 54.87, H 9.31, N 2.02.

Methyl-(methyl-5-acetamido-4,8,9-tri-O-t-butyltrimethylsilyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -L-altro-2-nonulopyranosid)onat (13a)

Zu 154 mg (0.23 mmol) **12** in 5 ml abs. MeOH (0 °C) gab man unter Rühren während 20 min 15.4 mg (0.5 mmol) $\text{BH}_3 \cdot \text{NH}_3$ und setzte nach 30 min das Rühren bis zur Beendigung der Reaktion fort. DC (PE:EE, 6:1, R_f von **12** = 0.19, R_f von **11a** = 0.29, R_f von **13a** = 0.15). Das Methanol wurde i. Vak. bei 0 °C abgedampft. Der Rückstand ergab nach der Flash-Chromatographie (Kieselgel, PE:EE, 6:1) 85 mg **13a** (0.25 mmol, 55%) und 57 mg **11a** (0.08 mmol, 36.9%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3/TMS): $\delta = -0.040, -0.026$ (2 s, $2 \times 3\text{H}$, $2 \times \text{Si}-\text{CH}_3$), 0.003 (s, 6 H, $2 \times \text{Si}-\text{CH}_3$), 0.045, 0.068 (2 s, $2 \times 3\text{H}$, $2 \times \text{Si}-\text{CH}_3$), 0.79, 0.82, 0.82 [3 s, $3 \times 9\text{H}$, $3 \times \text{Si}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.73 (dd, 1 H, 3- H_{ax}), 1.85 (s, 3 H, N-Ac), 2.38 (dd, 1 H, 3- H_{eq}), 3.24 (s, 3 H, O- CH_3), 3.48 (dd, 1 H, 9- H_a), 3.57 (dd, 1 H, 9- H_b), 3.66 (m, 1 H, 5-H), 3.75 (s, 3 H, COOCH_3), 3.80–3.91 (m, 4 H, 4-, 6-, 7-, 8-H), 5.50 (d, 1 H, N-H); $J(3_{\text{ax}}, 3_{\text{eq}}) = -12.9\text{ Hz}$, $J(3_{\text{ax}}, 4) = 10.8$, $J(3_{\text{eq}}, 4) = 4.4$, $J(4, 5) = \text{n.d.}$, $J(5, 6) = \text{n.d.}$, $J(5, \text{NH}) = 8.5$, $J(6, 7) = \text{n.d.}$, $J(7, 8) = \text{n.d.}$, $J(8, 9_a) = 5.1$, $J(8, 9_b) = 6.8$, $J(9_a, 9_b) = -10.1$. $\text{C}_{31}\text{H}_{65}\text{NO}_9\text{Si}_3$ (679.7). Ber. C 54.73, H 9.56, N 2.06; gef. C 54.71, H 9.55, N 2.03.

Methyl-(methyl-5-acetamido-4,8,9-tri-O-t-butyltrimethylsilyl-7-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -L-altro-2-nonulopyranosid)onat (13b)

20 mg (0.029 mmol) **13a** wurden in 1 ml abs. Pyridin und 1 ml Acetanhydrid plus 5 mg DMAP gelöst und 6 h bei 60 °C gerührt. Die übliche Aufarbeitung erfolgte analog zu **11b**. Ausbeute: 18 mg **13b** (0.025 mmol, 84%) als farbloser Schaum.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3/TMS): $\delta = 0.015, 0.043$ (2 s, $2 \times 3\text{H}$, $2 \times \text{Si}-\text{CH}_3$), 0.055 (s, 6 H, $2 \times \text{Si}-\text{CH}_3$), 0.121, 0.136 (2 s, $2 \times 3\text{H}$, $2 \times \text{Si}-\text{CH}_3$), 0.84, 0.85, 0.92 [3 s, $3 \times 9\text{H}$, $3 \times \text{Si}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.76 (dd, 1 H, 3- H_{ax}), 1.94, 2.09 (2 s, $2 \times 3\text{H}$, $2 \times \text{CH}_3\text{CO}$), 2.47 (dd, 1 H, 3- H_{eq}), 3.28 (s, 3 H, O- CH_3), 3.53 (ddd, 1 H, 4-H), 3.76 (s, 3 H, COOCH_3), 3.88–3.98 (m, 4 H, 5-, 8-, 9- H_a , 9- H_b), 4.11 (dd, 1 H, 6-H), 5.24 (dd, 1 H, 7-H), 5.83 (d, 1 H, N-H); $J(3_{\text{ax}}, 3_{\text{eq}}) = -12.9\text{ Hz}$, $J(3_{\text{ax}}, 4) = 11.8$, $J(3_{\text{eq}}, 4) = 4.2$, $J(4, 5) = 9.6$, $J(5, \text{NH}) = 9.0$, $J(5, 6) = 10.9$, $J(6, 7) = 1.5$, $J(7, 8) = 0.7$, $J(8, 9_a) = \text{n.d.}$, $J(8, 9_b) = \text{n.d.}$, $J(9_a, 9_b) = \text{n.d.}$. $\text{C}_{33}\text{H}_{67}\text{NO}_{10}\text{Si}_3$ (721.7). Ber. C 54.87, H 9.28, N 1.94; gef. C 54.82, H 9.27, N 1.95.

Methyl-(methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -L-altro-2-nonulopyranosid)onat (14)

40 mg (0.059 mmol) **13a** wurden 3 h mit 3 ml Essigsäure/Wasser (4:1) auf 60 °C erhitzt. DC (Isopropanol:Wasser:Essigsäure, 15:4:0.5). Dann wurde das Lösungsmittel i. Vak. abgedampft und der Rückstand dreimal mit je 5 ml MeOH versetzt und wieder i. Vak. zur Trockene gebracht. Nach dem Trocknen i. Vak. erfolgte die Acetylierung und weitere Bearbeitung so wie für **11b** und **13b** beschrieben. Ausbeute: 25 mg **14** (0.05 mmol, 83.6%) als farbloser Schaum.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3/TMS): $\delta = 1.75$ (m, 1 H, 3- H_{ax}), 1.94 (s, 3 H, N-Ac), 2.05 (s, 6 H, $2 \times \text{CH}_3\text{CO}$), 2.12, 2.14 (2 s, $2 \times 3\text{H}$, $2 \times \text{CH}_3\text{CO}$), 2.51 (dd, 1 H, 3- H_{eq}), 3.35 (s, 3 H, O- CH_3), 3.80 (s, 3 H, COOCH_3), 3.92 (dd, 1 H, 9- H_a), 4.10–4.23 (m, 2 H, 5-H, 6-H), 4.28 (dd, 1 H, 9- H_b), 4.79 (ddd, 1 H, 4-H), 5.13 (dd, 1 H, 7-H), 5.49 (d, 1 H, N-H), 5.78 (ddd, 1 H, 8-H); $J(3_{\text{ax}}, 3_{\text{eq}}) = -13.1\text{ Hz}$, $J(3_{\text{ax}}, 4) = 12.1$, $J(3_{\text{eq}}, 4) = 4.3$, $J(4, 5) = 10.0$, $J(5, \text{NH}) = 8.9$, $J(5, 6) = \text{n.d.}$, $J(6, 7) = 3.3$, $J(7, 8) = 3.5$,

$J(8, 9_a) = 4.0$, $J(8, 9_b) = 4.9$, $J(9_a, 9_b) = -12.0$. $C_{21}H_{31}NO_{13}$ (506). Ber. C 49.90, H 6.18, N 2.77; gef. C 50.02, H 6.13, N 2.84.

Natrium-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -L-altro-2-nonulopyranosid)onat (15)

Weg A: 30 mg (0.044 mmol) **13a** wurden in 3 ml 80% Essigsäure gelöst und 3 h unter Rühren auf 60° erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. wurde dreimal mit 3 ml abs. MeOH aufgenommen und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml 1 N NaOH gelöst und bei R.T. bis zum Verschwinden des Startmaterials gerührt. (4 h, DC-Test). Nach Neutralisation mit Trockeneis wurde das H₂O i. Vak. bis auf 1 ml entfernt und anschließend lyophilisiert. Ausbeute: 15 mg **15**.

Weg B: 25 mg (0.05 mmol) **14** löste man in 2 ml abs. MeOH, fügte 0.055 ml (55 μ l) frisch hergestelltes CH₃ONa in abs. MeOH (0.1 M) zu und ließ 16 h bei 0° stehen. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde noch dreimal mit je 5 ml abs. MeOH aufgenommen und i. Vak. zur Trockene eingedampft. Dann nahm man in 2 ml H₂O auf und rührte 4 h bei Raumtemperatur. Die weitere Bearbeitung erfolgte so wie unter Weg A. Ausbeute: 14 mg **15** (0.04 mmol, 82.4%).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O/HOD): $\delta = 1.63$ (dd, 1 H, 3-H_{ax}), 1.90 (s, 3 H, N-Ac), 2.70 (dd, 1 H, 3-H_{eq}), 3.33 (s, 3 H, O-CH₃), 3.59–3.81 (m, 6 H, 4-, 5-, 6-, 7-, 9-H_a, 9-H_b), 4.06 (ddd, 1 H, 8-H); $J(3_{ax}, 3_{eq}) = -12.0$ Hz, $J(3_{ax}, 4) = 11.5$, $J(3_{eq}, 4) = 4.9$, $J(4, 5) = \text{n.d.}$, $J(5, 6) = \text{n.d.}$, $J(6, 7) = \text{n.d.}$, $J(7, 8) = 2.6$, $J(8, 9_a) = 5.4$, $J(8, 9_b) = 7.8$. ¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O/1,4-Dioxan): $\delta = 26.69$ (1 C, COCH₃), 44.41 (1 C, 3-C), 56.23 (1 C, 5-C), 58.82 (1 C, O-CH₃), 66.87 (1 C, 9-C), 72.40, 75.79, 76.32, 78.45 (4 C, 4-, 6-, 7-, 8-C), 177.64, 179.15 (2 C, 1-C, COCH₃).

Methyl-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-L-glycero- β -D-galacto-2-nonulopyranosidonat (16)

402.8 mg (1.3 mmol) 8-epi-Neu5Ac [12 a] wurden zunächst dreimal mit je 10 ml MeOH aufgenommen und i. Vak. eingedampft. Dann nahm man mit 12 ml abs. Methanol auf, fügte 120–130 ξ l CF₃COOH zu und rührte 3 Tage bei Raumtemperatur. Der Fortgang der Reaktion wurde mittels DC überprüft. (Isopropanol : Wasser : Essigsäure = 15 : 4 : 0.5, $R_f = 0.4$). Nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. dampfte man noch dreimal mit je 10 ml abs. Methanol i. Vak. ab. Dann erfolgte die Acetylierung mit 5 ml abs. Pyridin/5 ml Acetanhydrid und 20 mg DMAP (14 h). Nach der im allgemeinen Teil angegebenen Aufarbeitung resultierten nach Flash-Chromatographie 529 mg **16** (0.99 mmol, 76%) als Hauptprodukt [12 a] plus etwa 10% des β -Anomeren, erkennbar am charakteristischen NMR-Signal des 3 H_{eq} (dd) bei 2.6 ppm. Das NMR-Signal des 3 H_{eq} (dd) für das β -Anomere von **16** liegt bei 2.42 ppm.

Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-L-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (17)

100 mg (0.19 mmol) des oben erhaltenen Anomerengemisches **16** (90%) und **16'** (10%) wurden in 15 ml abs. Ether gelöst und auf –40 °C gebracht. Dazu gab man 0.6 ml frisch dest. Acetylchlorid und leitete einen trockenen HCl-Strom ein, bis die Lösung nach etwa 1 h klar wurde. Dann ließ man während 5 h auf 0 °C erwärmen. Nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. erfolgte noch dreimaliges Aufnehmen mit 10 ml abs. Essigester und Eindampfen i. Vak. Der verbleibende farblose Schaum wurde in 15 ml abs. MeOH aufgenommen, 300 mg zerriebenes Molekularsieb (3 Å) und 300 mg frisch präpariertes Ag₂CO₃ (vgl. allg. Teil) zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde unter Lichtausschluß 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann filtrierte man über Celit ab und wusch mit Chloroform nach. Das UV aktivierte 2,3-Didehydro-Sialinsäurederivat **19** wurde mit etwas Br₂ in CH₃CN bei Raumtemperatur (10 min) in die entsprechende 2,3-Dibromverbindung umgewandelt. Diese Spuren verschwanden bei der anschließenden Flash-Chromatographie bei der Auftrennung von 8-epi- α -Me-Neu5Ac **17** und 8-epi- β -Me-Neu5Ac **18** [4 a] (Kieselgel, Essigester : Petrolether, 1 : 1). Die rascher

wandernde Komponente ist **18** und die langsamer wandernde **17**. Ausbeute: 30 mg **17** (0.06 mmol, 32%) und 30 mg **18** (32%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS): δ = 1.883, 2.030, 2.035, 2.100, 2.110 (5 s, 5 × 3 H, 5 × CH₃CO), 2.60 (dd, 1 H, 3-H_{eq}), 3.39 (s, 3 H, O-CH₃), 3.85 (s, 3 H, COOCH₃), 4.03 (ddd, 1 H, 5-H), 4.52 (d, 1 H, 9-H_a), 4.61 (dd, 1 H, 9-H_b), 4.93 (ddd, 1 H, 4-H), 5.27 (d, 1 H, NH), 5.33 (dd, 1 H, 6-H), 5.40–5.45 (m, 2 H, 7-, 8-H); $J(3_{ax}, 3_{eq}) = -13.2$ Hz, $J(3_{ax}, 4) = 11.2$, $J(3_{eq}, 4) = 4.7$, $J(4, 5) = 9.8$, $J(5, NH) = 9.0$, $J(5, 6) = 9.0$, $J(6, 7) = 1.5$, $J(8, 9_a) = 4.6$, $J(8, 9_b) = 2.5$, $J(9_a, 9_b) = -13.0$. C₂₁H₃₁NO₁₃ (506). Ber. C 49.90, H 6.18, N 2.77; gef. C 49.92, H 6.15, N 2.71.

Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-L-glycero-L-galacto-β-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (18)

Die spektroskopischen Daten von **18** waren identisch mit den in Lit. [4 a] angegebenen.

Natrium-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-L-glycero-α-D-galacto-2-nonulopyranosid)onat (20)

25 mg (0.05 mmol) **17** wurden analog der zu **15** führenden Prozedur (Weg B) behandelt. Ausbeute: 12 mg **20** (0.034 mmol, 71%).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O/HOD): δ = 1.58 (dd, 1 H, 3 H_{ax}), 1.85 (s, 3 H, N-Ac), 2.64 (dd, 1 H, 3-H_{eq}), 3.28 (s, 3 H, O-CH₃), 3.55–4.04 (m, 7 H, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-H_a, 9-H_b); $J(3_{ax}, 3_{eq}) = -12.5$ Hz, $J(3_{ax}, 4) = 12.5$, $J(3_{eq}, 4) = 4.5$. ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O/HDO): δ = 26.66 (1 C, COCH₃), 44.48 (1 C, 3-C), 56.22 (1 C, 5-C), 58.86 (1 C, O-CH₃), 66.86 (1 C, 9-C), 72.43, 75.81, 76.39, 78.43 (4 C, 4-, 6-, 7-, 8-C), 165.5 (1 C, 2-C), 177.7, 179.2 (2 C, 1-C, COCH₃).

Methyl-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-5-(acetylamino-3,5-dideoxy-L-glycero-β-L-altro-2-nonulopyranosidonat (21)

Die Darstellung von **21** erfolgte gemäß Lit. [12 a]. 80 mg 7,8-bis-epi-Neu5Ac (0.26 mmol) ergaben 135 mg **21** (0.25 mmol, 97%). Die spektroskopischen Daten stimmten mit Lit. [12 a] überein.

Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-L-glycero-α-L-altro-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (22)

Verbindung **22** wurde entsprechend dem für die Gewinnung von **17** angegebenen Verfahren hergestellt. 135 mg (0.25 mmol) gaben ein Gemisch aus dominierendem α-Anomeren plus Spuren des UV-aktiven 2,3-Di-dehydroderivats **24**. Die Auftrennung erfolgte mittels präparativer HPLC-Chromatographie mit Essigester. Als Gerät wurde Water Delta Prep 3000 verwendet. Frisch destillierter Essigester wurde über einem 0.45 μ Filter filtriert. Als stationäre Phase wurde μ-Por silTM verwendet. Ausbeute: 112 mg **22** (0.23 mmol, 87%) und 5.0 mg **23** (0.01 mmol, 4.7%) [4 a].

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃/TMS): δ = 1.88 (dd, 1 H, 3-H_{ax}), 1.95 (s, 3 H, N-Ac), 2.016 (s, 9 H, 3 × CH₃CO), 2.06 (s, 3 H, CH₃CO), 2.54 (dd, 1 H, 3-H_{eq}), 3.33 (s, 3 H, O-CH₃), 3.79 (s, 3 H, COOCH₃), 3.89 (dd, 1 H, 6-H), 4.08 (ddd, 1 H, 5-H), 4.48 (dd, 1 H, 9-H_a), 4.82 (ddd, 1 H, 9-H_b), 5.21 (dd, 1 H, 7-H), 5.48 (ddd, 1 H, 8-H), 5.50 (d, 1 H, NH); $J(3_{ax}, 3_{eq}) = -12.2$ Hz, $J(3_{ax}, 4) = 11.4$, $J(3_{eq}, 4) = 4.3$, $J(4, 5) = 10.0$, $J(5, 6) = 10.0$, $J(5, NH) = 10.0$, $J(6, 7) = 2.1$, $J(7, 8) = 5.7$, $J(8, 9_a) = 5.7$, $J(8, 9_b) = 2.8$, $J(9_a, 9_b) = -12.8$. C₂₁H₃₁NO₁₃ (505.5). Ber. C 49.90, H 6.18, N 2.77; gef. C 49.87, H 6.15, N 2.78.

Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-L-glycero-L-altro-β-2-nonulopyranosidonsäuremethylester (23)

Die spektroskopischen Daten stimmten mit den in Lit. [4 a] angegebenen überein.

Natrium-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-L-glycero- α -L-altro-2-nonulopyranosid)onat (25)

50 mg (0.1 mmol) **22** wurden analog der zu **15** führenden Prozedur verseift und aufgearbeitet. Ausbeute: 30 mg **25** (80.09 mmol, 88%).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DSS}$): δ = 1.63 (dd, 1 H, 3- H_{ax}), 2.02 (s, 3 H, N-Ac), 2.64 (dd, 1 H, 3- H_{eq}), 3.33 (s, 3 H, O- CH_3), 3.49–4.03 (m, 8 H, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- H_{a} , 9- H_{b}); $J(3_{\text{ax}}, 3_{\text{eq}}) = -12.5$ Hz, $J(3_{\text{ax}}, 4) = 12.0$, $J(3_{\text{eq}}, 4) = 4.5$. $^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, $\text{D}_2\text{O}/1,4\text{-Dioxan}$): δ = 41.34 (COCH₃), 48.29 (3-C), 54.19, 55.75 (5-C, O- CH_3), 65.89 (9-C), 70.79, 74.25, 74.68, 75.14 (4-, 6-, 7-, 8-C), 77.50 (2-C), 163.02 (1-C), 177.30 (CH₃C=O).

Literatur

- [1] 24. Mitt.: Hartmann M., Zbiral E. (1991) *Monatsh. Chem.* **122**: 995
- [2] Schauer R. (ed.) (1982) *Cell Biology Monographs*, Vol. 10. Springer, Wien New York
- [3] Schauer R. (1982) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **40**: 132
- [4] a) Zbiral E., Brandstetter H. H. (1985) *Monatsh. Chem.* **116**: 87; b) Schmid W., Christian R., Zbiral E. (1988) *Tetrahedron Lett.* **29**: 3643; c) Christian R., Schulz G., Brandstetter H. H., Zbiral E. (1987) *Carbohydr. Res.* **162**: 1
- [5] a) Brossmer R., Rose U., Kasper D., Smith T. L., Grasmuk H., Unger F. M. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**: 1282; b) Petrie C. R., Korytnyk W. (1981) *Anal. Biochem.* **131**: 153; c) Higa H. H., Paulson J. C. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**: 8838
- [6] a) Simon E. S., Bednarski M. D., Whitesides G. M. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**: 7159; b) Christian R., Schreiner E., Zbiral E., Schulz G. (1989) *Carbohydr. Res.* **194**: 49; c) Zbiral E., Schreiner E., Christian R. (1989) *Carbohydr. Res.* **194**: C 15
- [7] a) Hartmann M., Christian R., Zbiral E. (1990) *Liebigs Ann. Chem.*: 83; b) Schreiner E., Christian R., Zbiral E. (1990) *Liebigs Ann. Chem.*: 93
- [8] a) Schauer R., Wember M. (1971) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**: 1517; b) Schauer R., Wember M., Wirtz-Peitz F., Ferreira do Amaral C. (1971) *Hoppe Seiler's Physiol. Chem.* **352**: 1073; c) Shukla A. K., Schauer R. (1986) *Anal. Biochem.* **158**: 158; d) Beau J. M., Schauer R. (1980) *Eur. J. Biochem.* **106**: 531
- [9] a) Suttajit M., Winzler, R. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**: 3398; b) Suttajit M., Urban C., McLean R. L. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**: 810
- [10] a) Schauer R., Stoll S., Zbiral E., Schreiner E., Brandstetter H. H., Vasella A., Baumberger F. (1987) *Glycoconjugate J.* **4**: 361; b) Zbiral E., Kleineidam R. G., Schreiner E., Hartmann M., Christian R., Schauer R. (1991) *Biochem. J.* (in press)
- [11] Kim M.-J., Hennen W. J., Sweets H. M., Wong C.-H. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**: 6481
- [12] a) Zbiral E., Brandstetter H. H., Christian R., Schauer R. (1987) *Liebigs Ann. Chem.*: 781; b) Zbiral E., Schreiner E., Christian R., Kleineidam R. G., Schauer R. (1989) *Liebigs Ann. Chem.*: 159; c) Schreiner E., Zbiral E., Kleineidam R. G., Schauer R. (1991) *Liebigs Ann. Chem.*: 129; d) Schreiner E., Zbiral E., Kleineidam R. G., Schauer R. (1991) *Carbohydr. Res.* **216**: 61
- [13] Rogers G. N., Paulson J. C., Daniels R. S., Skehel J. J., Wilson I. A., Wiley D. C. (1983) *Nature (London)* **304**: 76
- [14] Wiley D. C., Skehel J. J. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 365
- [15] Weis W., Brown J. H., Cusack S., Paulson J. C., Skehel J. J., Wiley D. C. (1988) *Nature (London)* **333**: 426
- [16] Sauter N. K., Bednarski M. D., Wurzburg B. A., Hanson J. E., Whitesides C. M., Skehel J. J., Wiley D. C. (1989) *Biochemistry* **28**: 8388
- [17] Pritchett T. J., Brossmer R., Rose U., Paulson J. C. (1987) *Virology* **160**: 502
- [18] 2-Desoxy-2 H_{eq} -N-acetylneuraminsäure^{4b}) weist 75% der Inhibition von Methyl-2- α -N-acetylneuraminsäure auf; Kelm S., Paulson J. C., Schmid W., Zbiral E. (unpublizierte Ergebnisse)
- [19] Bandgar B. P., Hartmann M., Schmid W., Zbiral E. (1990) *Liebigs Ann. Chem.*: 1185
- [20] Meindl P., Tuppy H. (1965) *Monatsh. Chem.* **96**: 802

- [21] Czarniecki M. F., Thornton E. R. (1971) *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 8273
- [22] Baumberger F., Vasella A., Schauer R. (1986) *Helv. Chim. Acta* **69**: 1927
- [23] Ogura H., Furuhata K. (1986) *Carbohydr. Res.* **158**: 37
- [24] Brandstetter H. H., Zbiral E. (1983) *Liebigs Ann. Chem.*: 2055
- [25] Brandstetter H. H., Zbiral E., Schulz G. (1982) *Liebigs Ann. Chem.*: 1
- [26] Hartmann M., Zbiral E. (1989) *Monatsh. Chem.* **120**: 899
- [27] Zbiral E., Schreiner E., Salunkhe M. M., Schulz G., Kleineidam R. G., Schauer R. (1989) *Liebigs Ann. Chem.*: 519
- [28] Salunkhe M., Hartmann M., Schmid W., Zbiral E. (1988) *Liebigs Ann. Chem.*: 187
- [29] Bandgar B. P. (1991) Dissertation. Universität Wien
- [30] Still W. C., Kalm M., Mitra A. (1978) *J. Org. Chem.* **43**: 2923
- [31] Courtney J. L. (1986) In: Mijs W. J., de Jonge C. R. H. I. (eds.) *Organic Synthesis by Oxidation with Metal Compounds*. Plenum Press, New York, p. 464

Eingegangen 10. Mai 1991. Angenommen 3. Juni 1991