



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Azido-Derivate von Glucose und Cellobiose:
Glycosyl-Donatoren und Biomimetische Spacer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Nicola Schmiedel
Matrikel-Nummer:	0209819
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Pharmazie
Betreuer:	O.Univ.-Prof.Mag.Dr. Helmut Viernstein

Wien, im Mai 2009

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Univ. Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein und Univ. Prof. Dr. Frank Michael Unger für Ihre tatkräftige Unterstützung bei der Vollendung meiner Diplomarbeit.

Mein Dank gilt insbesondere auch Mag. pharm. Yasser Saber für seine kompetente und freundliche Unterstützung bei der praktischen Arbeit.

Bei meinen Eltern und meinen Geschwistern bedanke ich mich dafür, dass sie immer zu mir gehalten und mich in dem Wunsch, in Wien zu studieren, unterstützt haben.

Schließlich gilt mein Dank auch Michael, der mir die ganze Zeit beigestanden hat, auch wenn es nicht immer so einfach für ihn war.

Inhaltsverzeichnis

1	Zielsetzung	1
2	Methoden	5
2.1	Chromatographische Verfahren	5
2.1.1	Einführung	5
2.1.2	Dünnschichtchromatographie (DC)	6
2.1.3	Säulenchromatographie (SC)	8
2.2	Optische Analyseverfahren	9
2.2.1	Polarimetrie	9
2.3	Schmelzpunktbestimmung	11
3	Materialien	12
4	Überblick über die Synthesen	14
4.1	Gesamtübersicht	14
4.2	Kopplung 1	15
4.3	Kopplung 2	15
5	Experimenteller Teil	16
5.1	Syntheseschritte	16
5.1.1	Schritt 1: (1) β -D-Glucose wird zu (2) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- β -D-glucopyranose	16
5.1.2	Schritt 2: (2) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- β -D-glucopyranose wird zu (3) 2,3,4,6-Tetra- O-acetyl- α -D-glucopyranosylbromid	18
5.1.3	Schritt 3: Allylierung zu Komponente (4) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-allyl- β -D- glucopyranose	19
5.1.4	Schritt 4: Verseifung zu Komponente (5) Allyl- β -D-glucopyranose	21
5.1.5	Schritt 5: Komponente (5) zu (6) Allyl-6-O-methylsulfonyl- β -D-glucopyranosid	22
5.1.6	Schritt 6: Komponente (6) zu (7) Allyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-methylsulfonyl - β - glucopyranosid	23
5.1.7	Schritt 7: Komponente (7) zu (8) Allyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-desoxy- β - glucopyranosid	24
5.1.8	Schritt 8: Komponente (8) zu (9) 2,3,4-tri-O-acetyl-6-azido-6-desoxy- α,β -D- glucopyranose	25
5.1.9	Schritt 9: Komponente (9) zu (10) 6-Azido-6-desoxy- α,β -D-glucose verseifen	26
5.2	Alkin-Azid Kopplung	27
5.2.1	Kopplung 1 von (10) 6-Azido-6-desoxy- α,β -D-glucose mit Ethylpropionat	27
5.2.2	Kopplung 2 von (8) Allyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-desoxy- β -glucopyranosid mit Ethylpropionat	28
5.3	Experiment zur Herstellung von 6-Azido-6-desoxy-cellobiose	29
5.3.1	Enzymkatalysierte Synthese von 6-Azido-6-desoxy-cellobiose aus Komponente (10) 6-Azido-6-desoxy-D-glucose und Glucose-1-phosphat:	29

6	Zusammenfassung	31
7	Summary.....	33
8	Literaturverzeichnis.....	34
9	Abbildungsverzeichnis:	35
10	Lebenslauf	36

1 Zielsetzung

Azido-Derivate von Glucose lassen sich auf organisch-chemischem Wege aus Glucose herstellen. Im Gegensatz zu bestimmten niedermolekularen Azidoverbindungen oder Schwermetallaziden sind die bisher bekannten Azidozucker stabile, im Labor unproblematisch handhabbare Verbindungen. Am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Wien werden Azidozucker z. B. als Zwischenprodukte für kombiniert organisch-chemische und enzymkatalysierte Synthesen von künstlichen Aminopolysacchariden verwendet. In der vorliegenden Arbeit sind sie als Linker-Moleküle vorgesehen, mit deren Hilfe kleine Mengen pflanzlicher Glycopeptide an Mikrotiterplatten gebunden werden können.

Pflanzliche Glycoprotein-Glycane als Allergene

Bestimmte Glycan- (Zucker-) ketten pflanzlicher Glycoproteine fungieren als Allergene, d. h. sie binden IgE-Antikörper, wodurch in der Folge eine allergische Reaktion ausgelöst wird. Um die Neigung zu derartigen Allergien im Menschen zu bestimmen, misst man das Vorhandensein und die Menge glykanspezifischer IgE-Antikörper im Blut von ProbandInnen. Zur Messung verwendet man Mikrotiterplatten, welche in den einzelnen Schälchen die allergenen Glycane in Form von Glycopeptiden gebunden enthalten. Im Blutserum vorhandene spezifische IgE-Antikörper binden an die Glycopeptide, während unspezifische Antikörper und Serumproteine in einem speziellen Waschvorgang gewaschen werden. Die so gebundenen IgE-Antikörper werden mit einem weiteren Antikörper inkubiert, welcher gegen gemeinsame Determinanten der menschlichen IgE-Antikörper gerichtet ist und ein Enzym gebunden enthält, welches aus farblosen Substraten Farbstoffe bilden kann (meist Meerrettich-Peroxidase). Das Ausmaß der Farbbildung ist der Menge an ursprünglich gebundenem IgE-Antikörper proportional.

Konventionelle Reaktionen zur Bindung von Glycopeptiden an Mikrotiterplatten

Zur Bindung von Glycopeptiden an Mikrotiterplatten kann man sich konventioneller Bindungsreaktionen bedienen, bei denen z. B. die Aminogruppe des Glycopeptids amidartig mit einer aktivierten Carboxylgruppe auf der Mikrotiterplatte verknüpft wird. Auch kann die Aminogruppe mit einer Carbonylfunktion (z. B. einer Aldehydgruppe) auf der Mikrotiterplatte eine Schiff'sche Base bilden. Diese Verfahren haben den Nachteil, dass zur vollständigen Beladung von Oberflächen jeweils ein Überschuss

des Liganden eingesetzt werden muss. Dies bedeutet, dass bei Anwendung derartiger konventioneller Bindungsreaktionen insbesondere kleine oder präparativ schwer zugängliche Glycopeptid-Mengen zwangsläufig vergeudet werden.

Lösungsansatz „Click“-Chemie

Aus der vorangehend beschriebenen Problemstellung folgt, dass es zur vollständigen Kopplung kleiner Mengen von Liganden einer Kopplungsreaktion bedarf, welche ohne Überschuss eines der Reaktionspartner quantitativ verläuft. Eine solche Reaktion ist die Bildung von Triazolen durch 1,3-dipolare Addition von Aziden an Alkine. Diese von Huisgen [3] erstmals beschriebene Reaktion wurde später von Sharpless [15] und Mitarbeitern weiterentwickelt und in einer Arbeit von Bryan und Mitarbeitern zur Kopplung von Kohlenhydrat-Antigenen an feste Träger angewandt. In den Untersuchungen von Bryan [16], et al. wurde die Azidfunktion durch Derivierung der zu koppelnden Antigene mit einem Azidoessigsäureester eingeführt. Die Synthese und Handhabung derartiger niedermolekularer Azidoverbindungen ist nicht völlig gefahrlos und erfordert organisch-chemische Erfahrung, die nicht in allen immunologisch tätigen Arbeitsgruppen vorausgesetzt werden kann.

Azidozucker als praktische, allgemein handhabbare Linker-Moleküle

Der am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie entworfene Lösungsansatz sieht vor, Azidoessigsäureester bei der Kopplung von Glycopeptiden an feste Träger durch Azidozucker zu ersetzen. Zusätzlich zur Azidogruppe enthalten Azidozucker in Form der Aldehydgruppe oder, nach Oxidation, der Laktongruppe eine weitere Funktionalität, welche mit der Aminogruppe des Glycopeptids eine Schiff-Base oder eine Amidbindung bilden kann.

Die Durchführung der Kopplung ist daher wie folgt geplant: Die Mikrotiterplatte mit an der Oberfläche der Schälchen exponierten Aminogruppen (käuflich erhältlich) wird mit dem Alkinderivat Propiolsäureethylester umgesetzt, sodass sie exponierte Propiolsäureamidgruppen enthält.

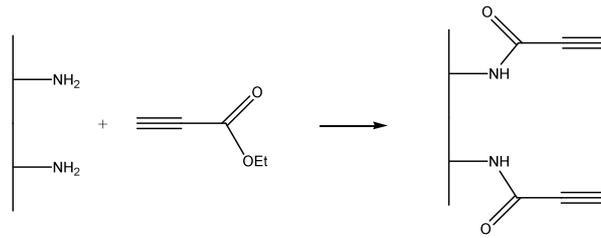


Abbildung 1-1: Umsetzung der Aminogruppen-hältigen Mikrotiterplatte mit Propionsäureethylester

Das zu koppelnde Glycopeptid soll zunächst mit überschüssigem 6-Azido-6-deoxy-D-gluconolacton vollständig in das Azidogluconsäureamid übergeführt werden.

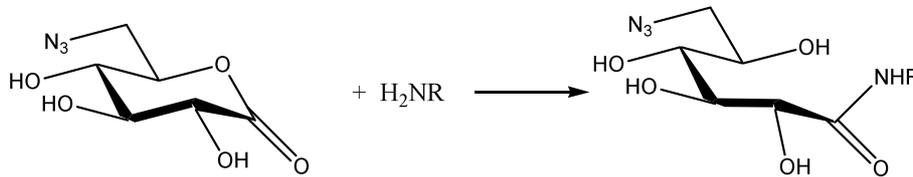


Abbildung 1-2: Umsetzung des Azidogluconsäurelactons mit dem Glycopeptid

Schließlich soll das gebildete Glycopeptid-Azidogluconsäureamid über die Triazolbildung and den Träger gekoppelt werden.

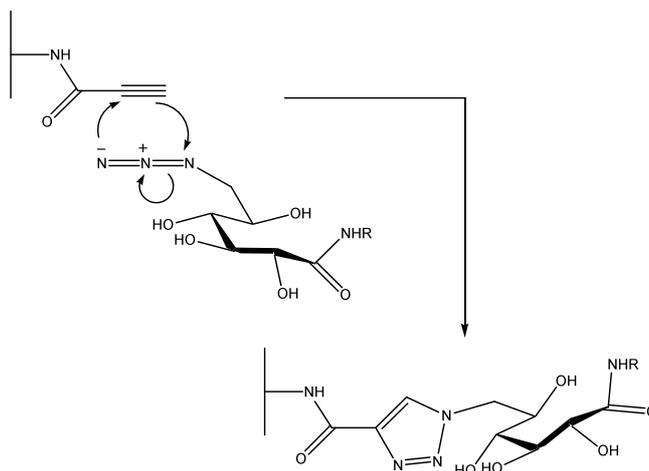


Abbildung 1-3: Triazolbildung aus dem Glycopeptid-Azidogluconsäureamid und den an die Mikrotiterplatte gebundenen Propionsäureresten

Nachweis der Triazolbildung aus Azidoglucose und Propiolsäureethylester

In der vorliegenden Diplomarbeit wird die Synthese von 6-Azido-6-desoxyglucose beschrieben und der Nachweis der Reaktion mit Propiolsäureethylester erbracht. Weiters wird die Bildung von 6-Azido-6-desoxycellobiose aus Glucose-1-phosphat und 6-Azido-6-desoxyglucose unter Katalyse durch Cellobiosephosphorylase gezeigt.

2 Methoden

2.1 Chromatographische Verfahren

2.1.1 Einführung

Chromatographische Methoden sind Verfahren zur Trennung von Stoffgemischen und zum Nachweis bzw. zur quantitativen Bestimmung von Einzelkomponenten. Die Trennung erfolgt durch Verteilungs- und/oder Adsorptionsvorgänge. Es werden dafür zwei nicht miteinander mischbare Stoffe, die auch als Phasen bezeichnet werden, benötigt. Es gibt eine stationäre Phase, die fest mit einem Trägermaterial verbunden ist und eine mobile Phase, mit der das zu trennende Gemisch über die stationäre Phase transportiert wird. [11],[12],[13]

In der pharmazeutischen Analytik spielen chromatographische Methoden eine große Rolle.

Man verwendet laut DAB folgende Methoden:

- Papierchromatographie
- Dünnschichtchromatographie
- Gaschromatographie
- Flüssigchromatographie (Säulenchromatographie, Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Ausschlusschromatographie)

Diese Verfahren gehören zur **Adsorptionschromatographie**, die auf dem Prinzip der unterschiedlichen Adsorption der zu untersuchenden Substanz an der stationären Phase beruht. Dies geschieht über spezifische Wechselwirkungen der polaren Gruppen des Sorbens und dem zu adsorbierenden Stoff. Wie stark und mit welchen Mengen eine Substanz gebunden wird hängt von der Umgebungstemperatur, von der Größe der Oberfläche und von der Polarität des zu adsorbierenden Stoffes ab.[11],[13]

In dieser Arbeit wurden zur Beurteilung der vollständigen Umsetzung der einzelnen experimentellen Schritte die Dünnschichtchromatographie eingesetzt, die Säulenchromatographie diente zur Trennung von eventuell vorhandenen nicht vollständig umgesetzten Substanzen von den fertigen Produkten oder aber auch zur Abtrennung von Verunreinigungen.

2.1.1.1 Ablauf der Adsorptionschromatographie

Unter Adsorption wird die Bindung oder Anreicherung eines Stoffes an die Oberfläche eines zweiten Stoffes verstanden. Dies beruht auf spezifischen Wechselwirkungen zwischen der polaren Oberfläche des Sorbens und polaren Gruppen des adsorbierten Stoffes. Die Stärke der Bindung nennt sich Aktivität. Die zu untersuchende Substanz wird an der stationären Phase gebunden. Mit Hilfe eines Elutionsmittels (Lösungsmittelgemisch) werden die adsorbierten Substanzen von der stationären Phase verdrängt. Die zu trennenden Substanzen haben unterschiedliche Polaritäten und werden somit verschieden stark adsorbiert und desorbiert, dieser Vorgang wiederholt sich, dadurch kommt es zur Trennung der Substanzen. [11],[13]

2.1.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Bei der Dünnschichtchromatographie kommt es zu einer Stofftrennung, die Dünnschichtchromatographie kann zu qualitativen und quantitativen Analysen verwendet werden. Die stationäre Phase besteht aus Feststoffen oder an Feststoffe adsorbierte Flüssigkeiten, die in einer dünnen Schicht auf einen Träger aufgebracht werden. Die zu untersuchenden Substanzen werden in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und auf die Startlinie punktförmig aufgebracht.

Die so präparierte Platte wird in eine Entwicklungskammer, in der sich das Elutionsmittel (mobile Phase) befindet, gebracht. Für die qualitative Analyse werden neben den zu prüfenden Substanzen auch so genannte Referenzsubstanzen aufgetragen. Die DC Platten werden nach dem aufsteigenden Verfahren entwickelt. [11],[12],[13]

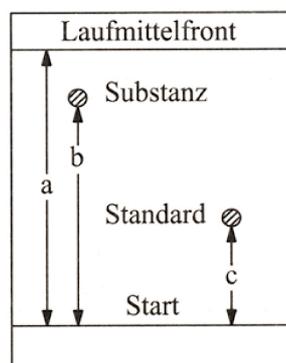


Abbildung 2-1: DC-Platte [13]

Der R_f - Wert (Retentionsfaktor) beschreibt die Position der Substanz auf der DC Platte und definiert das Maß für die Wanderungsgeschwindigkeit. Der R_f -Wert ist bei gleicher mobiler und stationärer Phase und gleicher Temperatur für einzelne Substanzen spezifisch.

Die Wanderung der Substanzflecke lässt sich durch den R_f -Wert charakterisieren. Dieser Wert stellt den Quotient aus der Entfernung der Substanz vom Start und der Entfernung der Fließmittelfront vom Start dar. Dieses wird auch als Trennstrecke bezeichnet.

$$R_f = \frac{\text{Entfernung Start - Substanzfleckmittel}}{\text{Entfernung Start - Lösungsmittelfront}} = \frac{b}{a}$$

Formel 2-1: Retentionsfaktor

Die Durchführung der Dünnschichtchromatographie erfolgt in verschiedenen Schritten:

- Auswahl des Trennsystems
- Auftragen der Substanz
- Entwickeln der DC Platte
- Auswertung / Detektion

Die Detektion/Auswertung erfolgt visuell. Zum einen gibt es Substanzen, die gefärbt sind. In diesem Falle kann man die Lage der Substanzen mit bloßem Auge erkennen. Andere Substanzen absorbieren im UV-Bereich. Dafür verwendet man DC-Platten die mit einem Fluoreszenzindikator imprägniert sind. So zeigt sich unter UV-Licht an der Stelle an der die Substanz adsorbiert ist eine Fluoreszenzminderung (dunkler Fleck). Als weitere Möglichkeit können Substanzen direkt oder durch besprühen mit entsprechenden Reagentien zur Fluoreszenz angeregt werden. Substanzen, die keine von den bis hierher beschriebenen Detektionsmöglichkeiten zeigen, kann man mit Hilfe von Sprühreagenzien und eventuell Wärme sichtbar machen. Im Falle der in dieser Arbeit hergestellten Zucker werden diese durch Aufsprühen eines Detektionsmittels (5ml Anisaldehyd, 90ml Ethanol, 5ml Schwefelsäure konz. und 1ml Eisessig). Beim Besprühen verfärbt sich der Substanzfleck nach dem Erwärmen dunkel.[11],[12],[13]

2.1.3 Säulenchromatographie (SC)

Kieselgel wird als Sorptionsmittel in eine senkrecht stehende Säule gebracht. Das zu untersuchende Stoffgemisch, wird auf die Säule in gelöster Form aufgebracht und dann mit einem geeigneten Eluationsmittel durch die Säule gespült. Die einzelnen Substanzen kommen nach unterschiedlichen Zeiten (Volumina) aus der Säule heraus und werden aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen werden mit Hilfe anderer chromatographischer Verfahren, z.B. Dünnschichtchromatographie untersucht. Es kommt zur Trennung und Reinigung von Substanzgemischen.

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde aus diesem Verfahren entwickelt.[11],[13]

2.2 Optische Analyseverfahren

2.2.1 Polarimetrie

Die optischen Analyseverfahren beruhen auf der Wechselwirkung von Licht mit Materie. In der Polarimetrie misst man die Drehung der Schwingungsebene des linear polarisierten Lichtes durch optisch aktive Substanzen (optische Drehung). Dies wird zur Analyse herangezogen.

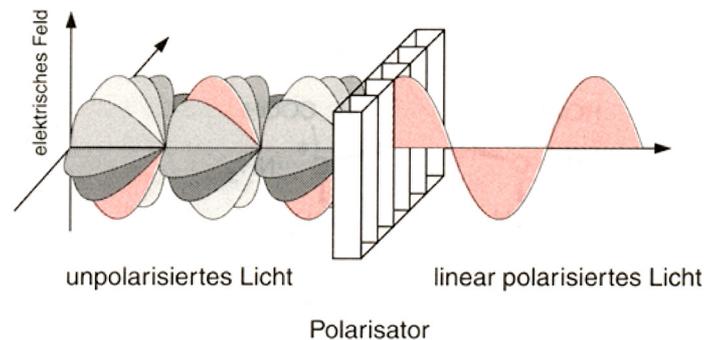


Abbildung 2-2: Polarisator [12]

Lichtstrahlen sind transversale elektromagnetische Wellen, deren elektromagnetisches Feld senkrecht zur Fortpflanzungsrichtung schwingt. Licht, welches nur in einer Ebene schwingt, nennt man linear polarisiert. Natürliches Licht ist ein nicht polarisiertes Licht. Als optische Drehung werden die Eigenschaften von Substanzen bezeichnet, die in der Lage sind, die Ebene des linear polarisierten Lichtes um einen bestimmten Winkel zu drehen. Die optische Aktivität einer Substanz setzt ihre Chiralität voraus, die durch Symmetriebetrachtung bestimmt werden kann. Ein Molekül wird als chiral bezeichnet, wenn es zwei Isomere gibt, die wie Bild und Spiegelbild sind. Chiral bedeutet auf griechisch *händig*, die Moleküle verhalten sich zueinander wie die linke und die rechte Hand beim Menschen. Das bedeutet, dass jeder Gegenstand, der mit seinem Spiegelbild nicht zur Deckung gebracht werden kann, chiral ist. Die optische Drehung wird in Grad [°] angegeben. Das Messgerät für die optische Drehung nennt man Polarimeter. [11],[13]

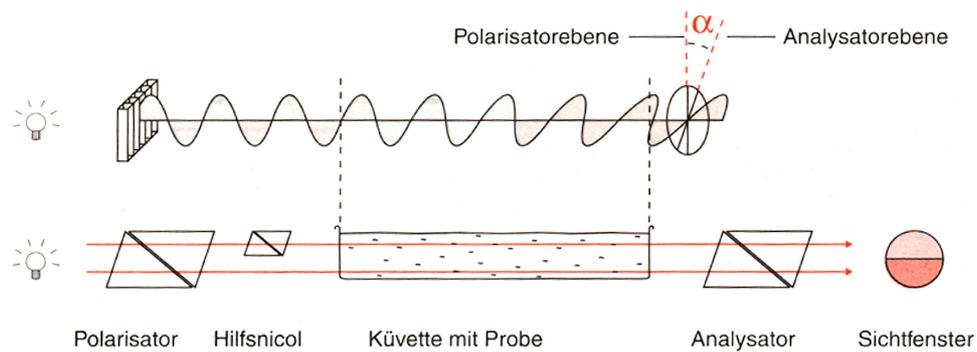


Abbildung 2-3: Schematischer Aufbau eines Polarimeters [12]

Das Polarimeter besteht aus einer Lichtquelle, dem Polarisator, der Kuvette und dem Analysator. Als Polarisator und Analysator dient ein Nicolsches-Prisma. Dieses besteht aus Kalkspat und kann Licht in unterschiedliche Richtungen brechen. Die Richtung wird durch elektrische und magnetische Felder vorgegeben. Unpolarisiertes Licht wird in das Nicolsche-Prisma eingeleitet und kommt als polarisiertes Licht wieder heraus.

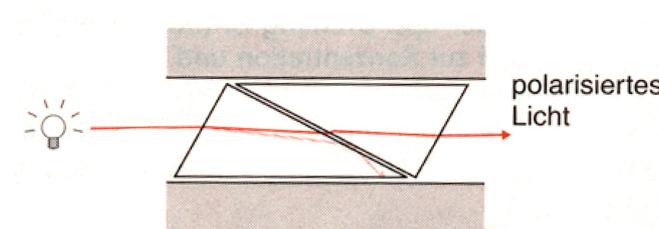


Abbildung 2-4: Nicolsches-Prisma [12]

Wenn keine Analysensubstanz in der Kuvette ist und beide Prismen parallel stehen, geht ein Maximum an Licht hindurch. Mit der Probe wird die Polarisationssebene des Lichtes gedreht; um den Drehwinkel zu bestimmen wird der Analysator soweit gedreht, bis die Helligkeit im Okular am geringsten ist. Der so gemessene Winkel entspricht dann dem Drehwert der zu analysierenden Substanz.[13] Die Polarimetrie wird in der Pharmazie für Identitäts- und Reinheits-, und Gehaltsprüfungen herangezogen. Die optische Drehung ist dabei eine charakteristische Konstante.

Die optische Drehung einer Substanz ist abhängig von:

- der Wellenlänge des polarisierten Lichts
- von der Temperatur (20°C)
- vom Lösungsmittel
- von der Schichtdicke der durchstrahlten Lösung
- von der Konzentration

Alle diese Einflüsse werden bei der Definition der Spezifischen Drehung berücksichtigt.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{a}{c * l}$$

a = gemessener Drehwinkel (Grad)

c = Konzentration der Lösung (g+ml-1)

l = Schichtdicke; Länge des Polarimeterrohres (dm)

2.3 Schmelzpunktbestimmung

Durch Schmelzen lassen sich organische und anorganische Substanzen charakterisieren. Reine und kristalline Stoffe schmelzen bei definierten Temperaturen. In manchen Fällen ist es besser, einen Schmelzbereich anzugeben als eine definierte Temperatur. Mit dem Schmelzpunkt lässt sich herausfinden, ob es sich um eine reine Substanz handelt oder ob sie noch Verunreinigungen enthält. In diesem Falle liegt der Schmelzpunkt unter dem Schmelzpunkt der Reinsubstanz.[13]

3 Materialien

- β -D-Glucose (GLYCON Biochemicals GmbH, Biotechnology, Luckenwalde)
- Allylalkohol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)
- Bromwasserstoff – gelöst in Salzsäure (Sigma-Aldrich)
- Chloroform (Sigma-Aldrich)
- N,N-Dimethylformamid (trocken): N,N-Dimethylformamid wurde 48h über DrieriteR getrocknet (Sigma-Aldrich)
- DrieriteR mit und ohne Indikator (Sigma-Aldrich)
- Essigsäureethylester (Sigma-Aldrich)
- Essigsäureanhydrid (Sigma-Aldrich)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich)
- Kupfer-II-sulfat (Sigma-Aldrich)
- Magnesiumsulfat (Sigma-Aldrich)
- Natriumazid (Sigma-Aldrich)
- Palladium(II)chlorid (Sigma-Aldrich)
- Propanol (Sigma-Aldrich)
- Pyridin (trocken): Pyridin wurde 6h unter Rückfluss über Calciumhydrid erhitzt und anschließend unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit destilliert. (Sigma-Aldrich)
- Quecksilber(II)cyanid (Sigma-Aldrich)
- (+)-Sodium L-ascorbat (Sigma-Aldrich)
- Tert. Butanol (Sigma-Aldrich)
- Toluol (Sigma-Aldrich)
- Trifluoressigsäure (Sigma-Aldrich)
- Trifluormethansulfonsäureanhydrid (Sigma-Aldrich)
- Natriumbicarbonat (Sigma-Aldrich)
- Dichlormethan (Sigma-Aldrich)

- Dichlormethan (trocken): 4h unter Rückfluss über Calciumhydrid erhitzt und anschließend unter Ausschluss von Feuchtigkeit destilliert (Sigma-Aldrich)
- Essigsäure 100% (Sigma-Aldrich)
- Ethanol absolut (Sigma-Aldrich)
- Methanol (Sigma-Aldrich)
- Methanol (Trocken) wurde 4 Stunden unter Rückfluss über Magnesium erhitzt und anschließend destilliert (Sigma-Aldrich)
- Natriummethanolat (Sigma-Aldrich)
- Celite 545 (Merck KgaA, Darmstadt,D)
- Tris Puffer (Sigma-Aldrich)
- Clostridium thermocellum NCIMB 10682 Zellen
- Cellobiose Phosphorylase (wurde in unser Laboratorium extrahiert)

4 Überblick über die Synthesen

4.1 Gesamtübersicht

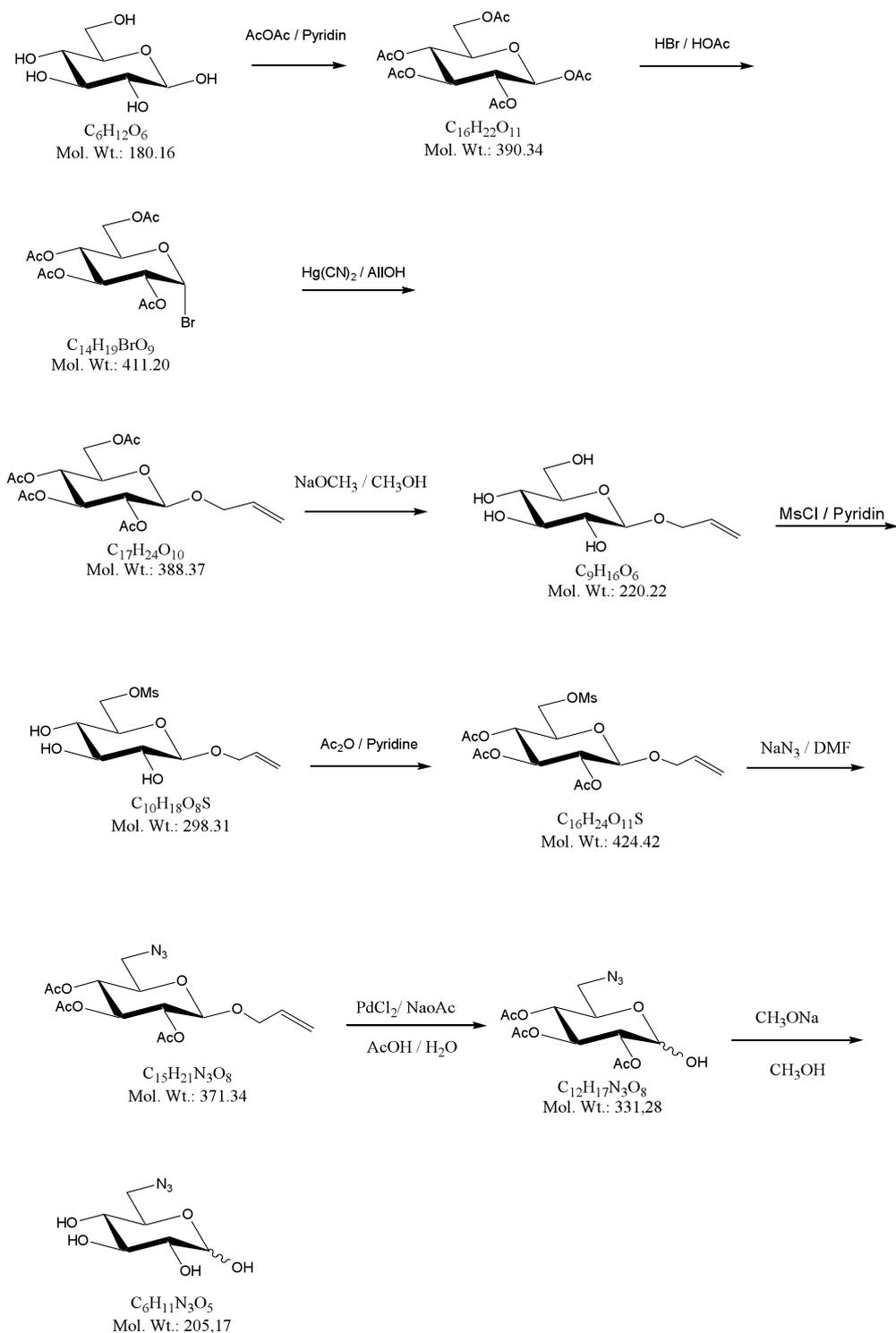


Abbildung 4-1: Übersicht der chemischen Reaktionen

4.2 Kopplung 1

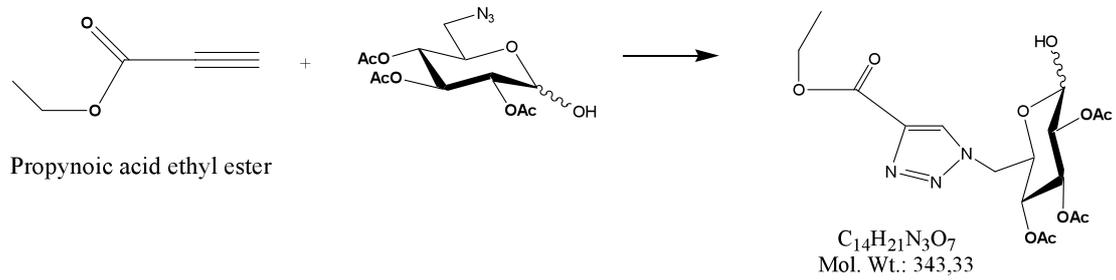


Abbildung 4-2: Umsetzung 6-Azido-6-desoxy- α,β -Dglucose mit Ethylpropiolat

4.3 Kopplung 2

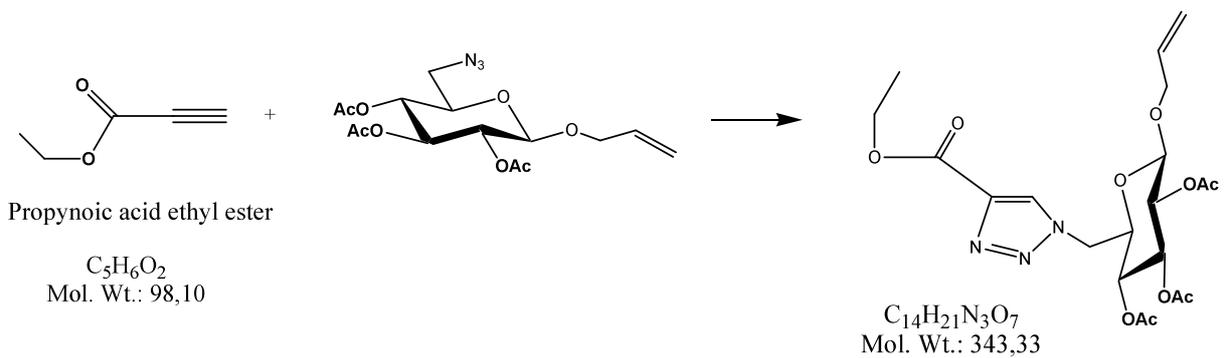


Abbildung 4-3: Umsetzung Allyl-6-azido-desoxy-2,3,4-tri-O- β -glucopyranosid mit Ethylpropiolat

5 Experimenteller Teil

5.1 Syntheseschritte

5.1.1 Schritt 1: (1) β -D-Glucose wird zu (2) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- β -D-glucopyranose

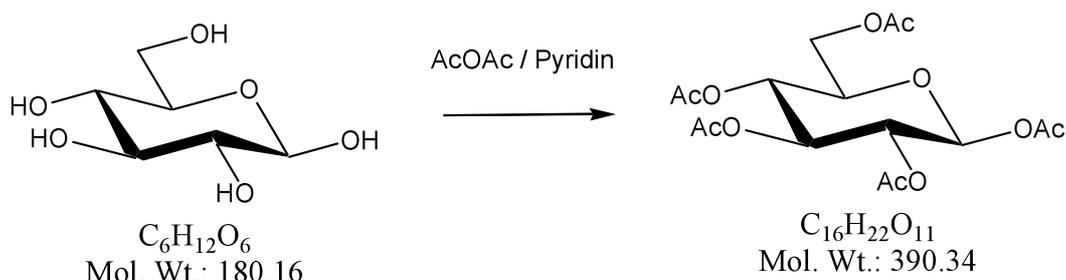


Abbildung 5-1: Syntheseschritt 1

β -D-Glucose (14 g, 0,08 mol) wird in getrocknetem Pyridin (50 ml) gelöst und mit Essigsäureanhydrid (50 ml) versetzt. Das Gemisch wird zunächst auf einem Eisbad gerührt, bis zum Ende der Reaktion wird ca. 24h gerührt. Die Reaktion muss unter Ausschluss von Feuchtigkeit ablaufen. Mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie (Fließmittel Essigsäureethylester: Toluol 3:2) wird das Ende der Reaktion angezeigt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Gemisch auf Eis gegossen und gerührt bis das Eis geschmolzen ist. Die entstandenen Kristalle werden mit Vakuum abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Pyridin muss vollständig entfernt werden, da es sonst die weitere Reaktion behindern würde. Eine Möglichkeit bietet hier die Extraktion im Schütteltrichter. Dafür werden die Kristalle in Chloroform gelöst und die Chloroformphase erst mit Wasser, dann mit NaHSO_4 , schließlich mit NaHCO_3 gewaschen. Wenn die organische Phase neutralen pH-Wert erreicht hat wird wasserfreies MgSO_4 hinzu gegeben und eine halbe Stunde getrocknet. Das MgSO_4 wird abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotavapor eingedampft. Es entstehen Kristalle von 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- β -D-glucopyranose (29,7g, 99%). Für den nächsten Schritt müssen diese noch unter Vakuum vollständig getrocknet werden.

Charakterisierung Schritt 1:

DC (Essigsäureethylester/Toluol 3:2): $R_f(1) = 0,00$

$R_f(2) = 0,64$

Schmelzpunkt Komponente (2) : $85^{\circ}\text{-}87^{\circ}\text{C}$

Spezifische Drehung (2) $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +30,5^{\circ}$ (CHCl₃; 0.41g/100ml)

5.1.2 Schritt 2: (2) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- β -D-glucopyranose wird zu (3) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosylbromid

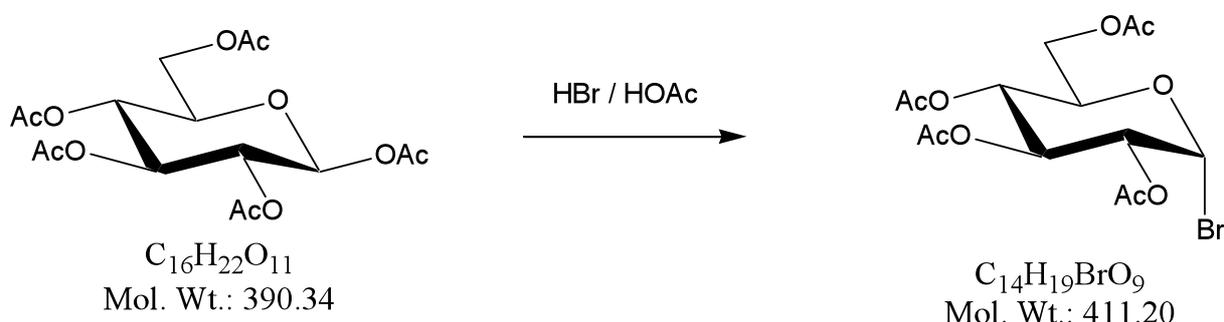


Abbildung 5-2: Syntheseschritt 2

29,52g (0,076 mol) der getrockneten Komponente (2) werden in einen Rundkolben gegeben und in trockenem Chloroform (50-70ml) gelöst. Über einen mit Trockenrohr verschlossenen Tropftrichter wird HBr (33% in Essigsäure) langsam zugetropft (1ml/Stunde). Die Reaktion dauert etwa 4-5 Stunden, kontrolliert wird der Verlauf mittels DC (Essigsäureethylester/Toluol 3:2). Das Gemisch wird auf Eiswasser gegossen und die Reaktion dadurch beendet. Das Produkt/Wasser Gemisch wird mit Chloroform ausgeschüttelt und die Chloroformphase mit $NaHSO_4$ oder H_2SO_4 und $NaHCO_3$ gewaschen. Wenn die organische Phase neutralen pH-Wert erreicht hat wird sie über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet. Anschließend wird das Trocknungsmittel abfiltriert und das Chloroform am Rotavapor eingedampft. Es entstehen 25,45g (0,06 mol, 100%) der Komponente (3) nach vollständiger Trocknung im Vakuum.

Charakterisierung Schritt 2

DC (Essigsäureethylester/Toluol 3:2): $R_f(2) = 0,64$

$R_f(3) = 0,63$

Schmelzpunkt Komponente (3): $89^\circ C$

Spezifische Drehung (3): $[\alpha]_D^{20} = +194^\circ$ ($CHCl_3$; 1.00g/100ml)

5.1.3 Schritt 3: Alkylierung zu Komponente (4) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-allyl- β -D-glucopyranose

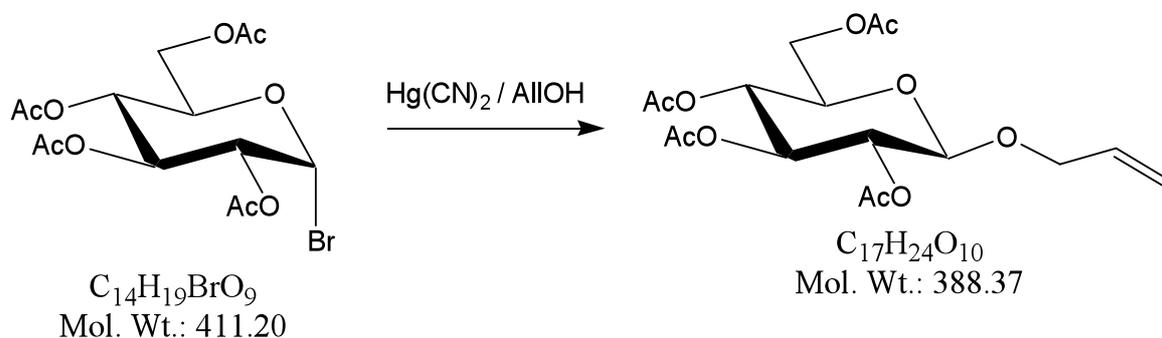


Abbildung 5-3: Syntheseschritt 3

25,45g (0.06mol) der Komponente (3) in trockenem Dichlormethan lösen (ca.80ml) und, um eventuelle eintretende Feuchtigkeit auf zu fangen, Molekularsieb 4A hinzufügen, welches vorher im Trockenschrank eine halbe Stunde bei 250°C getrocknet wurde. Die Reaktion muss unter vollständigem Ausschluss von Feuchtigkeit ablaufen. Es werden 5,5g Quecksilber(II)cyanid zugesetzt und 4ml trockener Allylalkohol zur Lösung gegeben. Das ganze wird mit einem Trockenrohr verschlossen und bei Raumtemperatur 36 Stunden gerührt. Die vollständige Umsetzung wird durch DC (Essigsäureethylester/Toluol 3:2) ermittelt. Ist das Edukt vollständig umgesetzt, wird das Produkt samt Lösungsmittel über eine Celitmasse gegeben und mit wenig Vakuum abfiltriert. Die Celitmasse wird noch 4-5mal mit etwas Dichlormethan gespült um Verluste zu vermeiden. In der Cellitmasse wird das überschüssige Quecksilber(II)-cyanid auf gefangen. Eventuell vorhandene Celitreste können durch Säulenchromatographie von der organischen Phase getrennt werden. Als Fließmittel verwendet man das gleiche wie für die DC. Nach Entfernung der organischen Phase und anschließender Trocknung ergeben sich nach Reinigung durch Umkristallisierung (in 50ml Isopropanol) als Ausbeute 36,23g (0.09mol, 100 %) der Komponente (4).

Charakterisierung Schritt 3:

DC (Essigsäureethylester/Toluol 3:2): $R_f(3) = 0,63$

$R_f(4) = 0,69$

Schmelzpunkt Komponente (4): 89°C

Spezifische Drehung (4): $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -1,7^{\circ}$ (CHCl_3 ; 0.03g/100ml)

5.1.4 Schritt4: Verseifung zu Komponente (5) Allyl- β -D-glucopyranose

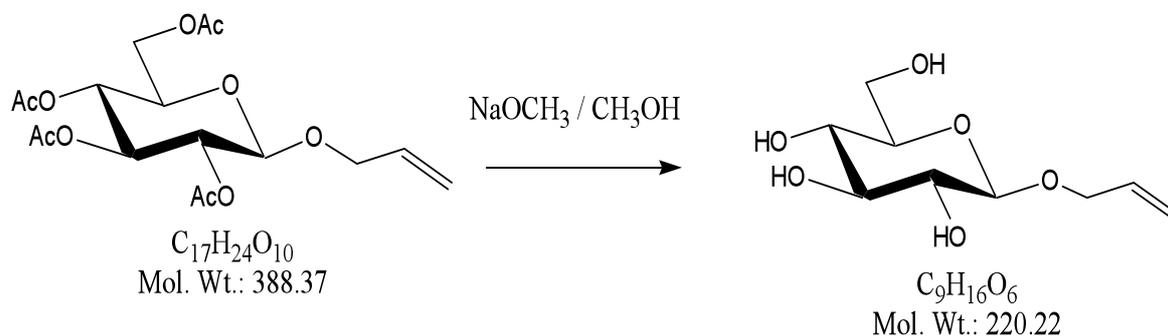


Abbildung 5-4: Syntheseschritt 4

Es werden 1,82g (0.005mol) der Komponente (4) eingewogen und in 20ml trockenem Methanol gelöst. Nach dem Zusatz von 5ml Natriummethanolat wird ca. 2 Stunden gerührt. Dieser Vorgang sollte unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit geschehen, damit er vollständig abläuft. Der Verlauf der Reaktion bis zum vollständigen Umsetzen des Edukts wird mit Hilfe der DC (1-Propanol/H₂O 17:8) kontrolliert. Wenn das Edukt vollständig zur Komponente (5) umgesetzt wurde, wird das Gemisch mit einem Ionenaustauscherharz neutralisiert, dafür wird etwas Harz in die Lösung gegeben und solange gerührt bis die Lösung neutral ist. Das Ionenaustauscherharz wird durch Filtration vom Gemisch getrennt und das Lösungsmittel entfernt. Nach Trocknung erhält man als Ausbeute 0,95g (0.004mol, 55,6 %) der Komponente (5).

Charakterisierung Schritt 4:

DC (1-Propanol/H₂O 17:3): $R_f(4) = 0,00$

$R_f(5) = 0,71$

Schmelzpunkt Komponente (5): 99°C

Spezifische Drehung (5): $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ$ (H₂O; 1.00g/100ml)

5.1.5 Schritt 5: Komponente (5) zu (6) Allyl-6-O-methylsulfonyl- β -D-glucopyranosid

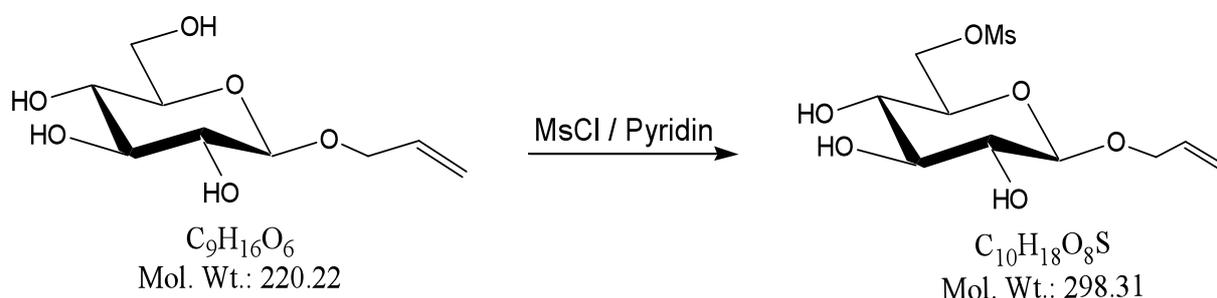


Abbildung 5-5: Syntheseschritt 5

2,42g (0.01mol) der Komponente (5) wird in 25ml trockenem Pyridin durch unter Rühren gelöst. Wenn das Edukt vollständig gelöst ist, wird der Kolben mit einem Tropftrichter verschlossen und langsam eine Lösung von 0,93ml Mesylchlorid in 10ml trockenem Dichlormethan hinzu tropfen gelassen. Wichtig ist es, die Reaktion langsam durchzuführen, da es sonst auch an weiteren OH-Gruppen zu einer Mesylierung kommt. Die Reaktion erfolgt gekühlt mit Trockeneis (-18 bis -30°C), um die Bildung von Nebenprodukten so gering wie möglich zu halten. Zur Kontrolle über den Verlauf der Reaktion werden in kurzen Abständen DC's (Essigsäureethylester/Isopropanol 10:1) angefertigt. Nach vollständigem Ablauf der Reaktion gibt man das Gemisch auf Eis, um die Reaktion zu stoppen. Zur Extraktion wird das Gemisch mit Chloroform versetzt. Da das Produkt sowohl in der wässrigen wie auch in der organischen Phase vorhanden ist, werden beide Phasen (organische und wässrige) eingedampft und vereint direkt zur Komponente (7) acetyliert. Ausbeute an Komponente 6, wässrige Phase 6,45g (0.02mol) und organische Phase 1,53g (0.005mol, 27,27%).

Charakterisierung Schritt 5:

DC (Essigsäureethylester/Isopropanol 10:1): $R_f(5) = 0,29$
 $R_f(6) = 0,50$

5.1.6 Schritt 6: Komponente (6) zu (7) Allyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-methylsulfonyl - β -glucopyranosid

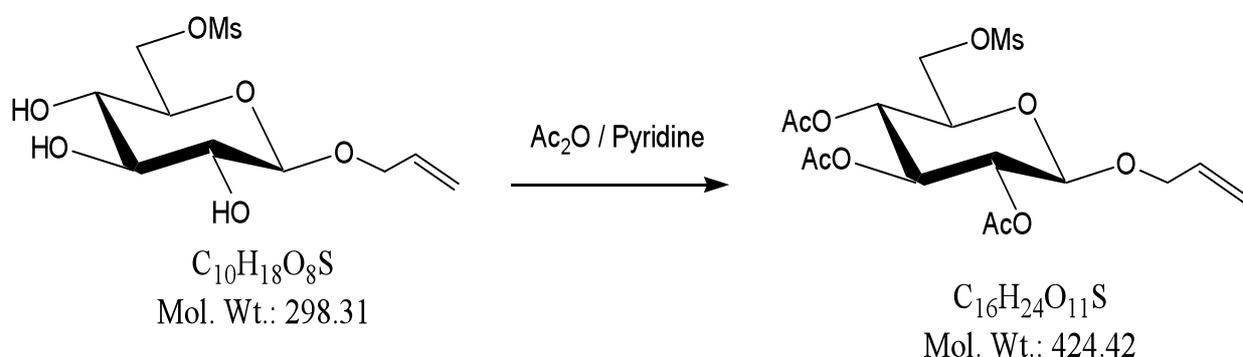


Abbildung 5-6: Syntheseschritt 6

In diesem Schritt wird die Komponente (6) acetyliert. Einwaage 6,45g (0,02mol) Komponente (6), diese wird in 25ml Pyridin gelöst und anschließend mit 25ml Essigsäureanhydrid versehen. Unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit wird das Gemisch auf einem Eisbad ca. 36 Stunden gerührt. Nach der vollständigen Umsetzung, welche mittels DC (Essigsäureethylester/Toluol 1:1) überprüft wird, gibt man das Gemisch auf Eis. Nach Schmelzen des Eises fallen Kristalle der Komponente (7) aus, diese werden von der flüssigen Phase getrennt und zur Reinigung in Ethanol 50% umkristallisiert. Ausbeute 2,39g (0,006mol, 100%) nach Trocknung. Im Falle, dass bei zu viel Lösungsmittel die Kristalle nicht direkt ausfallen, wird extrahiert. Extraktionsmittel ist Chloroform. Das Produkt geht in die Chloroform Phase über. Die organische Phase wird mit NaHSO₄ neutralisiert. Wenn neutral dann über MgSO₄ trocknen, MgSO₄ entfernen und die organische Phase entfernen. Man erhält ein Produkt welches in Ethanol 50% umkristallisiert wird.

Charakterisierung Schritt 6:

DC (Essigsäureethylester/Toluol 1:1): $R_f(6) = 0,00$

$R_f(7) = 0,53$

Schmelzpunkt Komponente (7): 115-116°C

Spezifische Drehung (7): $[\alpha]_D^{20} = -2,8^\circ$ (CHCl₃; 21,4mg/10ml)

5.1.7 Schritt 7: Komponente (7) zu (8) Allyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-desoxy- β -glucopyranosid

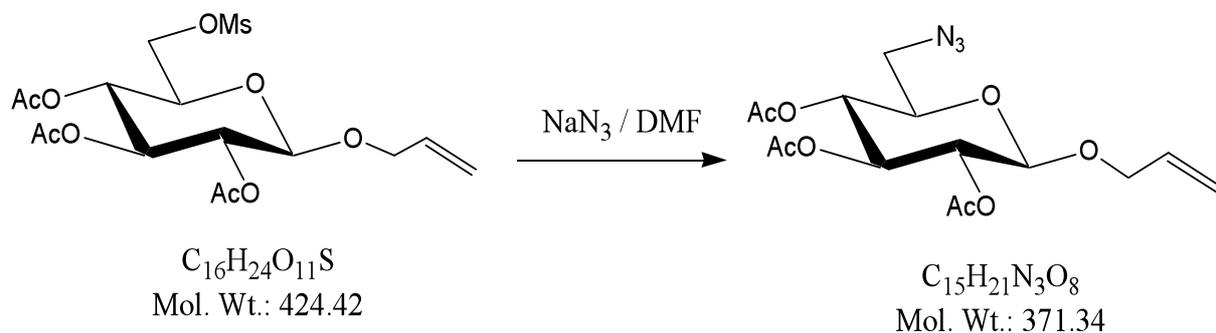


Abbildung 5-7: Syntheseschritt 7

1,69g (0.004mol) Komponente (7) werden in 40ml DMF gelöst und mit 1,82g NaN_3 versetzt. Das Gemisch bei $100^\circ C$ auf dem Ölbad 2 Stunden rühren. Nach Ablauf der 2 Stunden wird der Verlauf der Reaktion mit DC (Essigsäureethylester/Toluol 3:2) kontrolliert. Wenn die Reaktion vollständig abgelaufen ist, das DMF durch Eindampfen am Rotavapor entfernen. Der Rückstand wird in ca. 50ml Chloroform gelöst. Die Chloroformphase wird 3-4mal mit Wasser gewaschen, um restliches DMF zu entfernen. Anschließend zur Trocknung Magnesiumsulfat hinzu geben, nach 30 Minuten filtrieren und das Chloroform am Rotavapor entfernen. Es bilden sich Kristalle der Komponente (8). Zum Reinigen des Produktes kristallisiert man in Isopropanol um. Ausbeute nach dem umkristallisieren 1,46g (0.004mol, 76%).

Charakterisierung Schritt 7:

DC (Essigsäureethylester/Toluol 3:2): $R_f(7) = 0,56$

$R_f(8) = 0,77$

Schmelzpunkt Komponente (8): $119^\circ C$

Spezifische Drehung (8): $[\alpha]_D^{20} = -13,2^\circ$ ($CHCl_3$; 27,5mg/10ml)

5.1.8 Schritt 8: Komponente (8) zu (9) 2,3,4-tri-O-acetyl-6-azido-6-desoxy- α,β -D-glucopyranose

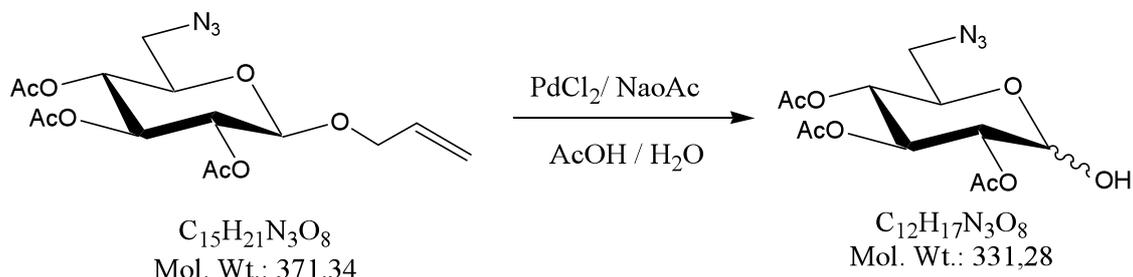


Abbildung 5-8: Syntheseschritt 8

Es werden 0,83g (2.2 mmol) der Komponente (8) in einem passenden Gefäß mit 400mg Palladiumchlorid, 400mg Natriumacetat, 9,3ml Eisessig und 1,2ml Wasser versetzt und 48 Stunden gerührt. Nach Ablauf der Zeit mit DC (Essigsäureethylester/Toluol 1:1) testen. Wenn die Reaktion noch nicht ganz abgeschlossen ist weiter rühren. Nach der vollständigen Umsetzung wird das Produkt extrahiert. Am Ende der Extraktion vorsichtig mit $NaHCO_3$ neutralisieren und über Celit unter Vakuum filtriert und mit Chloroform waschen. Die Phasen voneinander trennen und die Chloroform Phase 2-3mal mit Wasser waschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration das Chloroform entfernen. Es entstehen 0,74g (100%) 2,3,4-tri-O-acetyl-6-azido-6-desoxy- α,β -D-glucopyranose.

Charakterisierung Schritt 8:

DC (Essigsäureethylester/Toluol 1:1): $R_f(8) = 0,79$

$R_f(9) = 0,63$

5.1.9 Schritt 9: Komponente (9) zu (10) 6-Azido-6-desoxy- α,β -D-glucose verseifen

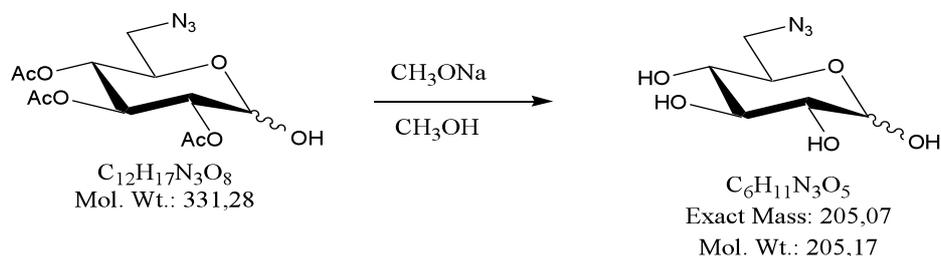


Abbildung 5-9: Syntheseschritt 9

0,39g (1,2mmol) werden in 3 ml Methanol (trocken) gelöst, mit 1,5ml Na-Methanolat versetzt und unter Ausschluss von Feuchtigkeit gerührt. Nach ca. 2 Stunden wird mittels Dünnschichtchromatographie (Essigsäureethylester/Toluol 1:1) der Verlauf getestet. Nach dem vollständigen Umsatz des Ausgangsproduktes (9) wird das Gemisch mit einem sauren Ionenaustauscherharz (H^+ -Form) neutralisiert und dann filtriert. Das Methanol wird am Rotavapor entfernt und die entstandenen Kristalle im Vakuum getrocknet. Ausbeute Komponente (10) 0,52g (2,5mmol, 11,7%)

Charakterisierung Schritt 9:

DC (Essigsäureethylester/Toluol 1:1):

R_f (9) = 0,61

R_f (10) = 0,32

5.2 Alkin-Azid Kopplung

5.2.1 Kopplung 1 von (10) 6-Azido-6-desoxy- α,β -D-glucose mit Ethylpropiolat

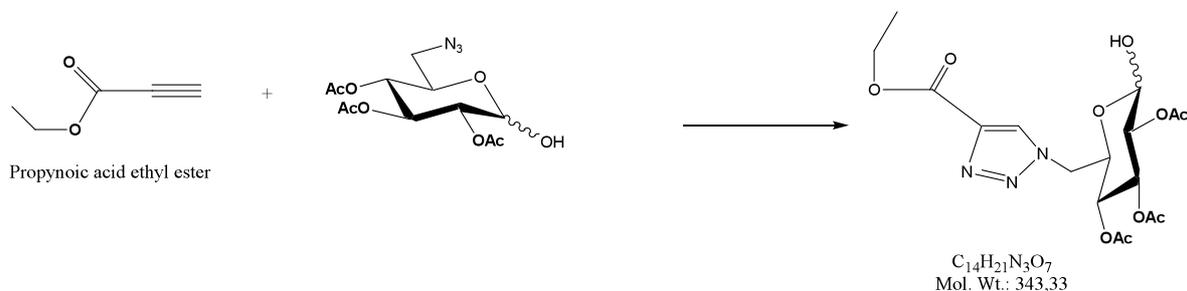


Abbildung 5-10: Alkin-Azid Kopplung 1

0,08g Produkt (10) (0,23mmol) werden in einem Kolben in 10ml tert. Butanol/Wasser (1:1) gelöst, dann mit 22,71 mg Na-ascorbat und 640 μ l Ethylpropiolat versetzt. Zum Schluss werden noch 11,97 mg CuSO₄ zugesetzt, dass ganze wird bei Zimmertemperatur gerührt. Nach 12 Stunden Kontrolle Mittels DC (Essigsäureethylester/Toluol 3:2). Wenn die Reaktion noch nicht vollständig abgelaufen ist, werden noch kleine Mengen von den Reagentien hin zu gegeben. Aus diesem Ansatz konnte kein definiertes Produkt erhalten werden.

Charakterisierung Kopplung1:

DC (Essigsäureethylester/Toluol 3:2):

$R_f = 0,14$

5.2.2 Kopplung 2 von (8) Allyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-desoxy- β -glucopyranosid mit Ethylpropionat

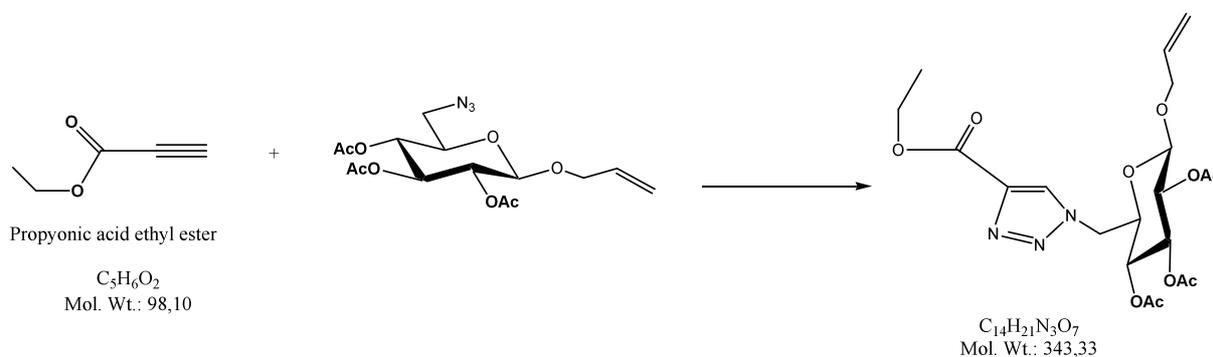


Abbildung 5-11: Alkin.Azid Kopplung 2

45,08mg (0,12mmol) Komponente (8) werden in tert. Butanol/Wasser (1:1) gelöst und mit 8,71 mg Na-Ascorbat, 112 μ l Ethylpropionat und 13,8 mg $CuSO_4$ versetzt. Bei Raumtemperatur wird das Gemisch über Nacht gerührt und am Morgen Mittels DC (Essigsäureethylester/Toluol 3:2) kontrolliert. Nach vollständigem Umsatz der Komponente (8) zum Produkt mit 10ml Wasser vermischen und das Ganze in einem Eisbad weiterrühren. Es wird ein Niederschlag sichtbar, der nach einer Nacht im Kühlraum kristallisierte.

Charakterisierung Kopplung 2:

DC (Essigsäureethylester/Toluol 3:2): $R_f = 0,56$

5.3 Experiment zur Herstellung von 6-Azido-6-desoxy-cellobiose

5.3.1 Enzymkatalysierte Synthese von 6-Azido-6-desoxy-cellobiose aus Komponente (10) 6-Azido-6-desoxy-D-glucose und Glucose-1-phosphat:

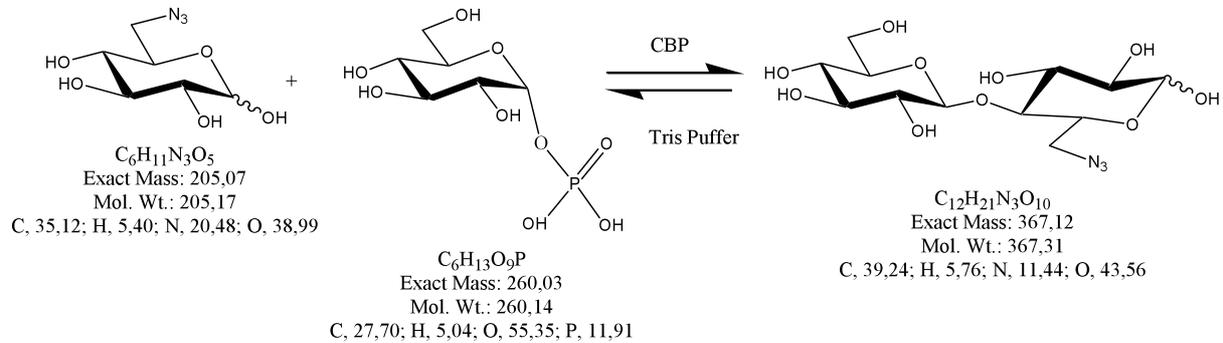


Abbildung 5-12: Enzymatische Synthese 6-Azido-6-desoxy-cellobiose

6-Azido-6-desoxy-D-glucose dient als Ausgangssubstanz zur Herstellung von Cellobiose-Analogen mit Hilfe der Cellobiose Phosphorylase (CBP). Dafür wird 6-Azido-6-desoxy-D-glucose zusammen mit Glucose-1-phosphat, dem Enzym Cellobiose Phosphorylase in Tris Puffer pH = 7 (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan) bei 37°C im Brutschrank 24 Stunden inkubiert. Der Abschluss der Reaktion wird mit Hilfe der DC ermittelt.

Cellobiose Phosphorylase ist ein Phosphorylaseenzym, welches in der Natur die Phosphorolyse der Cellobiose unter Bildung von D-Glucose und D-Glucose-1-phosphat katalysiert. In Umkehr der natürlichen Funktion katalysiert das Enzym die Bildung von Cellobiose aus D-Glucose und D-Glucose-1-phosphat. Die verwendete CBP stammt aus *Clostridium thermocellum*.

Charakterisierung enzymatische Kopplung:

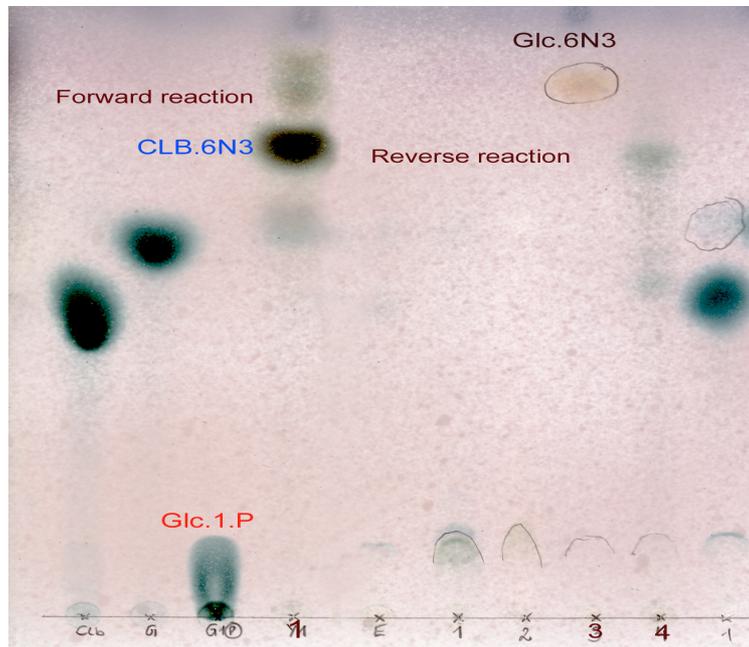


Abbildung 5-13: DC von Enzymatischer Synthese

Spaltung von 6-Azido-6-deoxy-cellobiose zu Glucose 6-azid und Glucose-1-phosphat (forward reaction) und Synthese von 6-Azido-6-desoxy-cellobiose aus Glucose-6-azid und Glucose-1-phosphat (reverse reaction). Bahn 1: Cellobiose. Bahn 2: Glucose. Bahn 3: Glucose-1-phosphat. Bahn 4: Spaltung von 6-Azido-6-desoxy-cellobiose. Bahn 8 (3): Glucose-6-azid. Bahn 9. Synthesereaktion, Bildung von 6-Azido-6-desoxy-cellobiose.

Charakterisierung:

$$R_f (\text{Bahn 1}) = 0,52$$

$$R_f (\text{Bahn 2}) = 0,65$$

$$R_f (\text{Bahn 3}) = 0,13$$

$$R_f (\text{Bahn 4}) = 0,81$$

$$R_f (\text{Bahn 8}) = 0,94$$

$$R_f (\text{Bahn 9}) = 0,78$$

6 Zusammenfassung

Für die Erreichung des in der Zielsetzung der Arbeit genannten 1. Teilaspekts wird als Ausgangsmaterial β -D-Glucose in getrocknetem Pyridin mit Essigsäureanhydrid acyliert. Es entsteht eine Pentaacetylglucopyranose. An dieser Substanz wird an C-1 mit Hilfe von Bromwasserstoff (HBr) Brom substituiert. Da Brom die Reaktivität der Glucose erhöht, ist die Mischung jetzt so reaktiv, dass mit Hilfe von Quecksilber-II-cyanid als Katalysator ein Allylglykosid gebildet wird. Es entsteht Tetra-O-acetyl-allyl- β -D-glucopyranose. Mit Hilfe von Natriummethanolat kommt es zur Verseifung der acetylierten Verbindung. Es entsteht Allyl- β -D-glucopyranose. Anschließend wird die Allyl- β -D-glucopyranose an C-6 mit Mesylat mesyliert, und es entsteht Allyl-6-O-methylsulfonyl- β -D-glucopyranosid. Diese wird für die weiteren Schritte wieder acetyliert. Die Acetyl Reste schützen das Glucopyranosid, damit im nächsten Reaktionschritt nicht andere C-Atome außer C-6 verändert werden. Jetzt wird an C-6 die Methylsulfonylgruppe durch eine Azidogruppe ersetzt. Dies geschieht mit NaN_3 in Dimethylformamid (DMF). Es entsteht Allyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-desoxy- β -glucopyranosid. Im nächsten Schritt wird der Allyl-Rest am C-1 entfernt, dafür kommt Palladium zum Einsatz. Allyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-azido-6--desoxy- β -glucopyranosid wird im Säuren mit Palladiumchlorid umgesetzt. Es entsteht eine Glucopyranose, die im weiterem verseift wird zu 6-Azido-6-desoxy- α,β -D-glucose.

6-Azido-6-desoxy- α,β -D-glucose und Allyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-azido-6-desoxy- β -glucopyranosid dienen als Ausgangsmaterial für die Alkin-Azid Kopplung nach V.V. Rostovtsev. Dieser hat in einer Arbeitsvorschrift 2002 die 1,3-Cycloaddition von Huisgen mit Cu(II)-Salz als Katalysator durchgeführt. Bei dieser Reaktion entsteht ein Triazol. Azidokomponente und Alkin werden mit Cu(II)-sulfat als Katalysator und Natriumsorbat als Reduktionsmittel versetzt. Bei der Durchführung der Alkin-Azid Kopplung unter realer Bedingung war die Reaktion nach zwei Tagen abgeschlossen, nachdem zwischendurch etwas von Cu(II)-sulfat, Natriumsorbat und Ethylenpropiolat hinzu gegeben werden musste. Die vollständige Umsetzung der beiden Ausgangskomponenten konnte mit Hilfe der DC ermittelt werden. Allyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-desoxy- β -glucopyranosid als Ausgangsmaterial für die Kopplung ergab das erhoffte Triazol in kristalliner Form nach einer Nacht im Kühlraum. Damit kann man die in dieser Reaktion entstanden Triazole als Modell für die weitere

Entwicklung von Diagnostiksystemen für IgE verwenden. Dabei dient dann das Alkin-Azid Kopplungssystem als Verbindungsarm zwischen den Glycopeptiden und einer Mikrotiterplatte.[2],[3],[4],[5],[6],[16]

Im Rahmen des in der Zielsetzung genannten 2. Teilaspekts dieser Arbeit wird, wie im experimentellen Teil beschrieben, 6-Azido-6-deoxycellobiose hergestellt. Dafür wird Cellobiose Phosphorylase aus *Clostridium thermocellum* verwendet.

Der Versuch sieht wie folgt aus: 6-Azido-6-deoxy-D-glucose und Glucose-1-phosphat werden eingesetzt und bei 37°C für 12 Stunden unter Katalyse durch CBP umgesetzt. Es entsteht ein Heterodisaccharid, in diesem Fall 6-Azido-6-deoxycellobiose. Die Azido-Gruppe an C-6 wird von der CBP toleriert. Die auf der DC Platte (s.o. 5.3. im experimentellen Teil) abgebildeten anderen Azido-Derivate, in denen die Azido-Gruppe an C-3 sitzt, werden nicht umgesetzt.[8],[9],[10]

7 Summary

In this work an azido sugar was synthesized to act on one hand as a Linking arm and on the other hand as substrate for the enzymatic synthesis of cellobiose analogue. Firstly β -D-glucose was acetylated in dry pyridine and acetic anhydride to the corresponding glucose pentaacetate. Activation of the anomeric position is achieved by bromination with hydrogen bromide to get the α -bromo glucoside, which was then converted into the allyl glucoside. After Zemplen deacetylation with sodium methoxide in methanol allyl- β -D-glucopyranoside was formed. Subsequently the 6-mesyl derivative was prepared by reacting with methane sulfonyl chloride in dry pyridine and at -30°C . This mesylation reaction serves for activation of the six position of glucose. After acetylation of the 6-mesyl derivative a nucleophilic substitution reaction was performed in which the formed allyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-mesyl-glucopyranoside reacted with sodium azide in dimethyl formamide at 120°C . After deprotection of the anomeric position using palladium chloride and sodium acetate the allyl group was removed followed by deacetylation to the free azido sugar, 6-azido-6-deoxy-d-glucose. Both 6-azido-6-deoxy-D-glucose and allyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-azido-6-deoxy- β -D-glucopyranoside were used for alkyne-azide coupling reaction according to V.V. Rostovtsev, who has used the 1,3-cycloaddition of Huisgen under the catalysis of Cu(II) salts. Under the same reaction conditions we have coupled ethylpropiolate as an alkyne with above mentioned azidoglucose as azido component under catalysis of Cu(II)sulphate and sodium ascorbate as reducing agent. The resulting triazole was obtained after 2 days which was proven by TLC. The formed crystalline triazole can be used as a model for the successive development of a diagnostic system for IgE, in which the alkyne-azide couple system acts as a linking arm between a glycopeptides and a microtitre plate.

As a second part of this work 6-azido-6-deoxy-d-cellobiose was enzymatically synthesized under the catalysis of cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermocellum*. As starting materials for this enzyme synthesis 6-azido-6-deoxy-D-glucose and glucose-1-phosphate were incubated with the enzyme at 37°C for 12 hours. As TLC has shown the substitution of hydroxyl group with the azido group in the six position of glucose was tolerated by the enzyme and as a result, a heterodisaccharide was formed.[3],[4],[5],[6],[8],[9],[10],[16]

8 Literaturverzeichnis

- [1] Synthesis of Sugar Arrays in Microtiter Plate, Fabio Fazio, Mariau C. Bryan, Ola Blixt, James C. Paulson and Chi-Huey Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 14397-14402, 2002.
- [2] Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes
V. V. Rostovtsev, Luke G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless,
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 114, 2002
- [3] R. Huisgen, in: *Dipolar Cycloaddition Chemistry* (Ed.: A. Padwa), Wiley, New York, 1984, pp. 1ff.; b) A. Padwa, in: *Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4* (Ed.: B. M. Trost), Pergamon, Oxford, 1991; p. 1069 ff. c) For a review of asymmetric 1,3-dipolar cycloaddition reactions, see K. V. Gothelf, K. A. Jorgensen, *Chem. Rev.* 1998, 98, 863; d) For a review of synthetic applications, see J. Mulzer, *Org. Synth. Highlights*, 77, 1991.
- [4] a) W.-Q. Fan, A. R. Katritzky, in: *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II, Vol. 4* (Eds.: A. R. Katritzky, C. W. Rees, E. F. V. Scriven), Pergamon, Oxford, 1996, pp. 101-126; b) R. N. Buttler, in: *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II, Vol. 4* (Eds.: A. R. Katritzky, C. W. Rees, E. F. V. Scriven), Pergamon, Oxford, 1996, pp. 621-678; c) K. Banert, *Chem. Ber.*, 122, 911, 1989.
- [5] a) R. Huisgen, *Pure Appl. Chem.*, 61, 613, 1989; b) R. Huisgen, G. Szeimies, L. Moebius, *Chem. Ber.*, 100, 2492, 1967; c) W. Lwowski in *1,3-dipolar Cycloaddition Chemistry, Vol. 1* (Ed.: A. Padwa), Wiley, New York, Chap. 5, 1984; d) J. Bastide, J. Hamelin, F. Texier, V. Q. Ven, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2555, 1973; J. Bastide, J. Hamelin, F. Texier, V. Q. Ven, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2871, 1973.
- [6] Support Information, F. Fazio, M. C. Brayn, O. Blixt, J. C. Paulson and C.-H. Wong, *J. Amer. Chem. Soc.*, 124, 14397, 2002.
- [7] Alexander 1958, Studies on a purified cellobiose phosphorylase; *Bacteriol. Proc.*, 1958, 125.
- [8] Characteristics of cellobiose phosphorylase, J. K. Alexander (Received for publication, Nov. 22, 1960), *J. Bacteriol.* 1961 June; 81(6):903-910
- [9] Purification and Properties of Cellobiose Phosphorylase from *Clostridium thermocellum*, K. Tanaka, T. Kawaguchi, Y. Imada, T. Ooi and M. Arai, *Journal of Fermentation and Bioengineering* Vol. 79, No. 3, 212-216, 1995.
- [10] Acceptor specificity of cellobiose phosphorylase from *Cellvibrio gilvus*: synthesis of three branched trisaccharides, A. Percy, et al. *Carbohydr. Res.* 308 (1998) 423-429.
- [11] G. Rücker, M. Neugebauer, G. G. Willmes; *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1992
- [12] A. Dominik, D. Steinhilber, *Instrumentelle Analytik für Pharmazeuten*, Jungjohann Verlag, 1996
- [13] E. Ehlers, *Analytik II*, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 1999
- [14] Synthesis and structural analysis of disaccharides, M. A. Tariq, K. Hayashi, K. Tokuyasu, T. Nagata, *Carbohydr. Res.* 275, 67-72, 1995.
- [15] Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; and Finn, M. G., *J. Amer. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3192-3193.
- [16] Fazio, F.; Bryan, M. C.; Blixt, O.; Paulson, J. C.; and Wong, C.-H. *J. Amer. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14397-14402.

9 **Abbildungsverzeichnis:**

Abbildung 1-1:Umsetzung der Aminogruppen-hältigen Mikrotiterplatte mit Propiolsäureethylester	3
Abbildung 1-2:Umsetzung des Azidogluconsäurelactons mit dem Glycopeptid	3
Abbildung 1-3: Triazolbildung aus dem Glycopeptid-Azidogluconsäureamid und den an die Mikrotiterplatte gebundenen Propiolsäureresten	3
Abbildung 2-1: DC-Platte [13]	6
Abbildung 2-2: Polarisator [12].....	9
Abbildung 2-3: Schematischer Aufbau eines Polarisators [12]	10
Abbildung 2-4: Nicolsches-Prisma [12]	10
Abbildung 4-1: Übersicht der chemischen Reaktionen	14
Abbildung 4-2: Umsetzung 6-Azido-6-desoxy- α,β -Dglucose mit Etylpropiolat.....	15
Abbildung 4-3: Umsetzung Allyl-6-azido-desoxy-2,3,4-tri-O- β -glucopyranosid mit Ethylpropiolat	15
Abbildung 5-1: Syntheseschritt 1	16
Abbildung 5-2: Syntheseschritt 2	18
Abbildung 5-3: Syntheseschritt 3	19
Abbildung 5-4: Syntheseschritt 4	21
Abbildung 5-5: Syntheseschritt 5	22
Abbildung 5-6: Syntheseschritt 6	23
Abbildung 5-7: Syntheseschritt 7	24
Abbildung 5-8: Syntheseschritt 8	25
Abbildung 5-9: Syntheseschritt 9	26
Abbildung 5-10: Alkin-Azid Kopplung 1	27
Abbildung 5-11: Alkin.Azid Kopplung 2	28
Abbildung 5-12: Enzymatische Synthese 6-Azido-6-desoxy-cellobiose	29
Abbildung 5-13: DC von Enzymatischer Synthese	30

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

10 Lebenslauf

Name: Nicola Schmiedel

Geburtsdatum: 18. Oktober 1973

Geburtsort: Köln, Deutschland

Schulische Ausbildung: Grundschule 1980 – 1984
Erich-Kästner Schule Erftstadt
Gymnasium 1984 – 1993
Ville - Gymnasium Erftstadt
Deutschland

Auslandsaufenthalt: USA August 1993 – Januar 1994

Berufliche Ausbildung: August 1994 – August 1996
theoretische Ausbildung zur
Pharmazeutisch-Technische-
Assistentin
September 1996 – März 1997
Praktikum Kilian Apotheke, Erftstadt

Beruf als PTA ausgeübt: April 1997 – Mai 1998
Rathaus Apotheke, Kerpen
Juni 1998 – April 2002
Severin Apotheke, Brühl, Rheinland
Seit September 2002
Pfauen – Apotheke, Köln

Studium: WS 1998 – SS 2002
Pharmaziestudium Universität Bonn
WS 2002
Wechsel zur Universität Wien

Diplomarbeit: Praktischer Teil SS 2006